



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma  
de Barcelona

TESIS DOCTORAL

**VESÍCULAS EXTRACELULARES EN ORINA COMO FUENTE NO  
INVASIVA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA LA  
MONITORIZACIÓN DE PACIENTES TRASPLANTADOS**

AUTOR/CANDIDATO A DOCTOR

**IOANA ELENA BANCU**

DIRECTORES

**Dr. Ricardo Lauzurica Valdemoros**

**Dr. Francesc E. Borràs Serres**

TUTOR

**Dr. Jordi Tor Aguilera**

Programa de Doctorado de Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

AÑO 2019



El Dr. Ricardo Lauzurica Valdemoros y el Dr. Francesc E. Borràs Serres, directores de la Tesis Doctoral presentada por Ioana Elena Bancu, certifican:

Que la tesis titulada “Vesículas extracelulares en orina como fuente no invasiva de material biológico para la monitorización de pacientes trasplantados” que presenta Ioana Elena Bancu para optar al grado de Doctor en Medicina ha estado realizada bajo nuestra dirección y consideramos adecuada su presentación como Tesis Doctoral en El Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dr. Ricardo Lauzurica Valdemoros

Dr. Francesc E. Borràs Serres

Badalona, 23 de abril 2019



*A April,*

Esta tesis ha sido financiada por el proyecto PI13/0050 del Instituto Carlo III, el programa de “Suport Grupos de Recerca” de la Secretaria d’Universitats i Recerca, Dpt. D’Empresa i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (2014SGR808, grupo REMAR), la Red de investigación Renal (REDinREN) (RD 16/009) del Instituto De Salud Carlos III y la Fundación Privada Cellex.

## Tabla de contenidos

AGRADECIMIENTOS .....	11
Listado de tablas .....	13
Listado de Figuras.....	14
SUMMARY .....	17
RESUMEN .....	19
ABREVIATURAS.....	21
INTRODUCCIÓN.....	25
1.1    La enfermedad renal crónica: un problema creciente .....	25
1.2    El trasplante renal como tratamiento de elección en la enfermedad renal crónica avanzada .....	26
1.3    Fracaso del injerto renal.....	27
1.3.1    Fracaso precoz del injerto renal .....	28
1.3.2    Fracaso tardío del injerto renal.....	28
1.4    Herramientas diagnósticas de fracaso del injerto renal.....	30
1.4.1    Marcadores séricos: creatinina sérica y filtrado glomerular .....	31
1.4.2    Marcadores urinarios: proteinuria.....	32
1.4.3    Pruebas de imagen: ecografía .....	32
1.4.4    Biopsia renal.....	33
1.5    Biomarcadores en trasplante renal.....	35
1.5.1    Clasificación de nuevos biomarcadores .....	36
1.5.2    microRNAs (miRNAs).....	37
1.5.2.1    miRNAs en el tejido renal trasplantado.....	37
1.5.2.2    miRNA séricos en el trasplante renal.....	39
1.5.2.3    miRNA urinarios en trasplante renal .....	39



1.5.3	Vesículas extracelulares en orina (oVE)	41
	HIPÓTESIS	47
	OBJETIVOS	51
3.1	Objetivo principal	51
3.2	Objetivos secundarios	51
	PACIENTES Y MÉTODOS	53
4.1	Población de estudio	55
4.2	Metodología para la obtención de las muestras de orina	55
4.3	Determinación de los parámetros bioquímicos	56
4.4	Estudio anatomopatológico de la biopsia renal	56
4.4.1	Procesamiento y examen de la biopsia renal	56
4.4.2	Microscopía óptica (MO)	57
4.4.3	Inmunofluorescencia directa (IF)	58
4.4.4	Microscopía electrónica (ME)	58
4.4.5	Interpretación de la biopsia renal	59
4.5	Aislamiento de las vesículas extracelulares	59
4.6	Selección de fracciones de SEC por tamaño mediante citometría de flujo basada en microesferas	59
4.7	Extracción de RNA	61
4.8	Secuenciación masiva: Next Generation Sequencing (NGS)	61
4.9	qPCR	61
4.10	Análisis estadístico	62
	RESULTADOS	65
5.1	Fase de Discovery	65
5.1.1	Pacientes con disfunción del injerto renal	65
5.1.1.1	Características clínicas de los pacientes	65

5.1.1.2	Características histológicas de la biopsia renal .....	69
5.1.2	Grupo control .....	72
5.1.3	Aislamiento de las vesículas extracelulares en orina .....	74
5.1.4.	Identificación de los miRNAs mediante secuenciación masiva (NGS) .	75
5.2	Fase de validación.....	80
5.2.1	Grupo de pacientes con disfunción del injerto renal.....	80
5.2.1.1	Características clínicas de los pacientes .....	80
5.2.1.2	Características histológicas de la biopsia renal .....	85
5.2.2	Grupo control .....	86
5.2.3	Validación de los miRNAs diferencialmente expresados mediante qRT-PCR	89
5.2.4	Comparación de los niveles de expresión de los miRNAs .....	89
5.2.4.1	Utilidad diagnóstica de los miRNAs en la disfunción renal de cualquier etiología	90
5.2.4.2	Poder diagnóstico de los miRNA en la disfunción renal de diferentes etiologías .....	92
	DISCUSIÓN .....	105
6.1	Fase de Discovery .....	106
6.2	Fase de validación.....	106
6.3	Ventajas y limitaciones de este estudio.....	114
	CONCLUSIONES .....	117
	LÍNEAS DE FUTURO .....	123
	BIBLIOGRAFÍA.....	127
	PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES .....	143



# AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda de compañeros, amigos y familia que me han motivado, corregido y apoyado, y a los cuales quiero dar las gracias.

En primer lugar, quiero agradecer a todos los pacientes que han participado en este proyecto; sin ellos la investigación no hubiera sido posible.

Gracias a mis directores, el Dr. Lauzurica y el Dr. Borràs, por apoyar la realización de esta tesis.

Muchas gracias a todo el servicio de Nefrología del Hospital Germans Trias i Pujol, por toda la formación que me han aportado en mi carrera profesional.

Gracias a Inés Lozano y a todo el equipo de IVECAT, por el soporte técnico en la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Bonal, por creer en mí, por no ponerme nunca obstáculos, por aceptarme.

A mi amiga y mejor compañera de trabajo que podía tener, a mi Fredzzia, por hacerlo parecer todo tan fácil siempre, por tener tanta paciencia conmigo, por enseñarme tanto a nivel profesional y personal.

A Ana, mi amiga, mi compañera, mi confidenta, mi Cervantes, mi mascota. Por escucharme siempre y no juzgarme nunca.

A Maru, por ser, casi siempre, mi amarilla.

Al que me acompañó hasta Mondulkiri cuando hizo falta, a Jordi.

A todos los residentes por todo lo que hemos compartido y aprendido juntos: a Marina por la jirafa, por las meriendas, a Inés por las recomendaciones de lectura, por el Demian, a Elena por el intento de bonding, lo conseguiremos.

Le multumesc parintilor si bunicilor mei pentru toata dragostea lor, pentru tot sprijinul, pentru ca au crezut mereu in mine.

Prietenilor mei dragi, Irina si Traian, mereu aproape, si de la 1000 de km.



# Listado de tablas

Tabla 1. Monitorización del paciente trasplantado renal. Guías KDIGO.....	30
Tabla 2. Definición y principales características de los biomarcadores.....	36
Tabla 3. Características clínicas de los pacientes (I).....	66
Tabla 4. Características clínicas de los pacientes (II).....	67
Tabla 5. Características clínicas de los pacientes (III).....	68
Tabla 6. Características histológicas de los pacientes diagnosticados de FIAT.....	69
Tabla 7. Características histológicas de los pacientes diagnosticados de RAC.....	70
Tabla 8. Características clínicas del grupo control (I).....	73
Tabla 9. Características clínicas del grupo control (II).....	73
Tabla 10. MicroRNAs diferencialmente expresados en los dos grupos de pacientes.....	78
Tabla 11. Análisis de componentes principales.....	80
Tabla 12. Características clínicas de los pacientes (I).....	81
Tabla 13. Características clínicas de los pacientes (II).....	82
Tabla 14. Características clínicas de los pacientes (III).....	83
Tabla 15. Características histológicas de los pacientes diagnosticados de FIAT.....	86
Tabla 16. Características clínicas del grupo control (I).....	87
Tabla 17. Características clínicas del grupo control (II).....	88
Tabla 18. Área bajo la curva (AUC) para los diferentes miRNAs ...	90
Tabla 19. Área bajo la curva (AUC) para combinaciones de 4 miRNAs.....	91

# Listado de Figuras

Figura 1. Esperanza de vida en función del tipo de tratamiento renal sustitutivo, trasplante renal vs diálisis.....	27
Figura 2. Sistemática de la valoración de la biopsia renal.....	57
Figura 3. Imagen de oVE de crio-microscopía electrónica.....	60
Figura 4. Biopsia renal, tinción Tricrómico de Masson: evidencia de fibrosis intersticial-atrofia tubular.....	70
Figura 5. Tinción hematoxilina-eosina: evidencia de rechazo agudo celular....	71
Figura 6. Tinción hematoxilina-eosina: evidencia de toxicidad crónica por anticalcineurínicos.....	72
Figura 7. Fracciones que muestran el valor de intensidad de fluorescencia más alto para cada marcador de CD.....	75
Figura 8. Electroferograma y gel de imagen asociada, obtenidos para la muestra de small RNA tras su migración en el Bioanalizador 2100.....	76
Figura 9. Diagrama de Venn del contenido de miRNA de los 3 grupos de patologías.....	77
Figura 10. Comparación de los miRNAs entre el grupo de pacientes con disfunción del injerto y grupo control (Mann-Whitney).....	89
Figura 11. Curvas ROC para hsa-miR-5 y hsa-miR-8.....	91
Figura 12. Áreas bajo la curva obtenidas tras la combinación de 4 y 5 miRNAs.....	92
Figura 13. Resultados de ensayos de validación mediante RT-q-PCR para hsa-miR-1.....	93
Figura 14. Área bajo la curva para el hsa-miR-1 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto.....	94

Figura 15. Resultados de ensayos de validación por RT-q-PCR para hsa-miR-5.....	95
Figura 16. 16. Área bajo la curva para hsa-miR-5 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto.....	95
Figura 17. Resultados de ensayos de validación mediante RT-q-PCR para hsa-miR-6.....	96
Figura 18. Área bajo la curva para hsa-miR-6 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto.....	97
Figura 19. Resultados de ensayos de validación mediante RT-q-PCR para hsa-miR-7.....	98
Figura 20. Área bajo la curva para hsa-miR-7 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto.....	99
Figura 21. Resultados de ensayos de validación mediante RT-q-PCR para hsa-miR-8.....	100
Figura 22. Área bajo la curva para hsa-miR-8 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto.....	101
Figura 23. Resultados de ensayos de validación por RT-q-PCR para hsa-miR-10.....	102





# SUMMARY

Kidney transplantation is the treatment of choice for patients with advanced chronic kidney disease. Although the renal graft survival at one year exceeds 90%, it has been estimated that at 5 years a quarter of the transplanted patients will not have a functioning renal graft. In routine clinical practice, laboratory parameters such as serum creatinine, glomerular filtration rate and proteinuria are being used to evaluate the renal graft. However, the alteration of these parameters is often late and they cannot distinguish between different pathologies. Renal biopsy is an invasive technique and its consequently associated with an increased risk of complications; in addition, it is a method of limited repeatability. Still, it remains the gold standard of diagnosis in the pathology of the transplanted kidney. Therefore, there is a need for developing alternative diagnostic methods.

The aim of this study was to evaluate the use of urine microvesicles as a non-invasive source of miRNAs that could allow an early diagnosis, as well as a frequent and accurate monitoring of the transplanted patients. The urine of the transplanted patients contains extracellular vesicles whose transcriptomic profile, in particular its miRNA content, reflects the physiopathological state of the kidney.

In the present work, we detected 12 miRNAs that were differentially expressed in the group of patients with graft dysfunction and the control group of transplanted patients with normal renal function. We observed that the combination of 5 of the miRNAs could represent a good diagnostic test to detect alterations of the renal function in the kidney transplanted patient.

Next, we explored the ability of each of the miRNAs to distinguish between three different histological diagnoses found in patients included in the study (acute rejection, interstitial fibrosis/ tubular atrophy and chronic anti-calcineurin toxicity). Two of the analysed miRNAs showed utility in discriminating between patients with acute cellular rejection and the control group, as well as between patients with acute cellular rejection and patients who presented another

pathology. Two of the analysed miRNAs discriminated patients with interstitial fibrosis / tubular atrophy.

The usefulness of our findings lies in the possibility of detecting alterations in the transplanted kidney by a completely non-invasive method. Our results, yet preliminary, should be validated in future studies.

# RESUMEN

El trasplante renal es el tratamiento de elección para los pacientes con enfermedad renal crónica avanzada. Aunque la tasa de supervivencia del injerto renal al año supera el 90%, se ha estimado que a los 5 años una cuarta parte de los pacientes trasplantados no tendrán un injerto renal funcionando. En la práctica clínica habitual, para valorar el injerto renal se están utilizando parámetros de laboratorio como la creatinina sérica, el filtrado glomerular y la proteinuria. Sin embargo, su alteración en muchas ocasiones es tardía y no permite discernir entre diferentes patologías. La biopsia renal sigue siendo el gold standard de diagnóstico en la patología del riñón trasplantado. No obstante, es una técnica invasiva, no exenta de complicaciones y con una repetibilidad limitada. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico alternativos.

El objetivo de este trabajo fue el de evaluar el uso de las vesículas extracelulares en orina como fuente no invasiva de miRNAs, que permita un diagnóstico precoz, así como una monitorización frecuente y precisa del paciente trasplantado. La orina de los pacientes trasplantados contiene vesículas extracelulares cuyo perfil transcriptómico, en particular su contenido de miRNAs, refleja el estado fisiopatológico del riñón.

En el trabajo actual, tras obtener el RNA de las vesículas extracelulares de orina, detectamos 12 miRNAs diferencialmente expresados en el grupo de pacientes con disfunción del injerto y el grupo control de pacientes trasplantados con función renal normal. Se objetivó que la combinación de 5 de los miRNAs estudiados podría representar un buen test diagnóstico para detectar una alteración de la función renal en el paciente trasplantado renal.

Exploramos la capacidad de cada uno de los miRNAs de discernir entre los distintos diagnósticos histológicos que presentaron los pacientes incluidos en el estudio (rechazo agudo celular, fibrosis intersticial/ atrofia tubular, toxicidad crónica por anticalcineurínicos). Dos de los miRNAs analizados mostraron utilidad en discriminar entre los pacientes con rechazo agudo celular y el grupo

control, así como entre los pacientes con rechazo agudo celular y los pacientes que presentaban las otras dos patologías analizadas. Otros dos miRNAs analizados permitieron discriminar pacientes con fibrosis intersticial/ atrofia tubular.

La utilidad de nuestros hallazgos reside en la posibilidad de detectar mediante un método completamente no invasivo la presencia de alteraciones en el riñón trasplantado. Nuestros resultados, aún preliminares, deberían ser validados en estudios futuros.

# ABREVIATURAS

AEBSF	4-hidrocloro de fluoruro (2-Aminoethyl) benzenosulfonil
ACP	Análisis de componentes principales
BCB	Del inglés, <i>beads coupling buffer</i>
CLCA1	Del inglés, <i>chloride channel accessory 1</i>
CKD-EPI	Del inglés, <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
DC	Donante cadáver
DCI	Disfunción crónica del injerto
DEFA5	Del inglés, <i>human alpha defensin 5</i>
DNA	Del inglés, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Ditiotreitol
DV	Donante vivo
ERC	Enfermedad renal crónica
ECV	Enfermedad cardiovascular
GO	Del inglés, <i>gene ontology</i>
FIAT	Fibrosis intersticial, atrofia tubular
FG	Filtrado glomerular
IR	Índice de resistencia
ISEV	Del inglés, <i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
KDIGO	Del inglés, <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
MFI	Del inglés, <i>median fluorescence intensity</i>
miRNA	Del inglés, <i>micro ribonucleic acid</i>
mRNA	Del inglés, <i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	Del inglés, <i>mammalian target of rapamycin</i>

NGAL	Del inglés, <i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
NGS	Del inglés, <i>next generation sequencing</i>
PAS	Del inglés, <i>periodic acid-Schiff</i>
NTA	Del inglés, <i>nanoparticle tracking analysis</i>
RAC	Rechazo agudo celular
RNA	Del inglés, <i>ribonucleic acid</i>
ROC	Del inglés, <i>receiver operating characteristic</i>
qPCR	Del inglés, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
SEC	Del inglés, <i>size-exclusion chromatography</i>
SV40	Virus del simio 40
TAC	Toxicidad por anticalcineurínicos
VE	Vesículas extracelulares
oVE	Vesículas extracelulares de orina





# INTRODUCCIÓN





# INTRODUCCIÓN

## 1.1 La enfermedad renal crónica: un problema creciente

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la pérdida progresiva, permanente e irreversible de la tasa de filtración glomerular a lo largo de un tiempo variable, expresada por una reducción del aclaramiento de creatinina estimado  $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  [1]. Representa un problema importante de salud pública, asociado a una gran morbilidad y mortalidad, así como a un elevado coste económico. Además, su prevalencia se ha incrementado en los últimos años[2]. Según datos del registro *United States Renal Data System* realizado entre el 2011 y 2014, se estima que la ERC tiene una prevalencia del 14,8% en la población estadounidense[3]. A nivel europeo, la prevalencia se sitúa entre el 3,3% y el 17,3%[4], aunque los registros son incompletos y presentan una gran variabilidad entre los diferentes países. En España, según datos del Registro de la Sociedad Española de Nefrología de 2017, la prevalencia de la ERC ha aumentado un 20% en los últimos diez años, pasando de 1.000 pacientes por millón de población (pmp) en 2006, a 1.211 en 2015. Actualmente, en Cataluña, se registran aproximadamente unos 630.000 pacientes con diagnóstico de ERC, de los cuales más de 9.600 requieren tratamiento renal sustitutivo.

Los pacientes con ERC presentan una alta prevalencia de enfermedad cardiovascular y una elevada mortalidad. La relación entre ERC y la enfermedad cardiovascular (ECV) es bidireccional. Por un lado, la presencia de ECV aumenta el riesgo de desarrollo y acelera la progresión de ERC[5]:[6]. A su vez, los pacientes con ERC presentan un alto riesgo de desarrollar ECV y una mortalidad de origen cardiovascular 30 veces más elevada que la población general[7]. Además, la presencia de deterioro de la función renal se asocia a un peor pronóstico y una mayor mortalidad en patologías como la insuficiencia cardíaca[8] y la cardiopatía isquémica[9]. De hecho, se ha comprobado que a partir de un filtrado glomerular (FG) estimado inferior a  $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ , existe una asociación inversa entre la disminución de la tasa

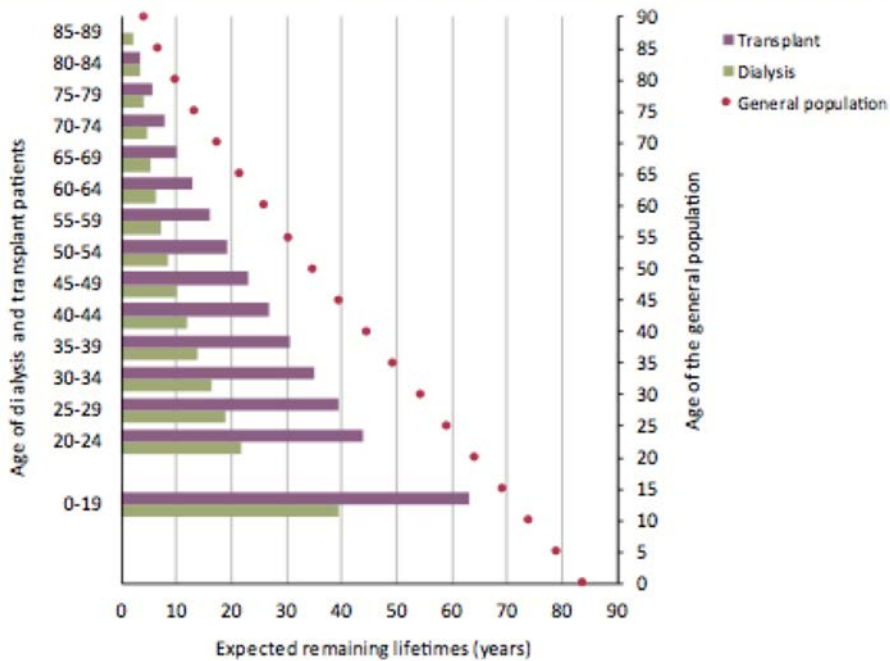
de filtración glomerular y el incremento en el riesgo de muerte, de eventos cardiovasculares y de hospitalización[10].

Por otro lado, la ERC es un predictor independiente del riesgo de mortalidad en la población general[11]. Según el estudio *Global Burden of Disease*, en el 2010 la ERC ocupaba el puesto 18 en la lista de causas de número total de muertes a nivel mundial[12].

Debido a su elevada prevalencia, a la gran morbilidad y mortalidad asociadas, y a su estrecha relación con otras enfermedades, la ERC tiene un alto impacto económico. En Estados Unidos, se estima que el coste global de la atención que reciben los pacientes con ERC supone casi un 6% del presupuesto sanitario[13].

## **1.2 El trasplante renal como tratamiento de elección en la enfermedad renal crónica avanzada**

La ERC puede progresar hacia una enfermedad renal crónica avanzada, que conlleva la necesidad de plantear un tratamiento renal sustitutivo (TRS). Entre los tratamientos disponibles se encuentran la diálisis y el trasplante renal. En la actualidad, se considera que el trasplante renal es el tratamiento de elección para los pacientes con enfermedad renal avanzada con necesidad de TRS. El trasplante renal ha demostrado mejorar la calidad de vida de los pacientes[14], aumentar la supervivencia a largo plazo en todos los grupos de edad[15][16][17][18] (Figura 1) y ser coste efectivo[14].



**Figura 1.** Esperanza de vida en función del tipo de tratamiento renal sustitutivo, trasplante renal vs diálisis, comparado con la población general, dividido por grupos de edad. (ERA-EDTA Registry Annual Report 2016).

Además, gracias a los avances en el campo de los tratamientos inmunosupresores y la intensificación del tratamiento protector cardíaco y renal en los últimos años, estamos asistiendo a un aumento de la supervivencia del injerto renal a corto plazo, lo que estimula aún más su realización. Los datos del registro americano informan que la probabilidad de fallo del injerto en el primer año ha disminuido. En este sentido, en el 2015 la supervivencia del injerto al año era de un 93% para riñones procedentes de donante cadáver y de un 98% para riñones procedentes de donante vivo[19].

### 1.3 Fracaso del injerto renal

En 1978, Rennie resumía: "Aunque ofrece una calidad de vida mucho mejor mientras funciona, un trasplante (de insuficiencia renal) en la mayoría de los

casos puede considerarse sólo como un alivio temporal de la forma básica de tratamiento, que es la diálisis"[20].

Cuarenta años más tarde, los avances científico-técnicos han permitido "alargar" considerablemente la fase de "alivio temporal". En efecto, aunque inequívocamente el trasplante renal es la alternativa de tratamiento con mejores índices de supervivencia y calidad de vida para los pacientes con ERC, la probabilidad de tener un injerto renal funcionando a los 5 años aún se sitúa alrededor del 73% en riñones procedentes de donante de cadáver, y en el 85% en riñones procedentes de donante vivo[21]. Esto significa que, a los 5 años, una cuarta parte de los pacientes trasplantados de donante cadáver no tendrán un injerto funcionando, siendo considerada la tasa de pérdida anual del injerto del 4 al 7%[22]. Las causas de pérdida del injerto se pueden clasificar - en función de su cronología- en precoces y tardías.

### **1.3.1 Fracaso precoz del injerto renal**

Las complicaciones precoces son aquellas que aparecen durante los primeros 6 meses post-trasplante. Durante este periodo, las complicaciones asociadas al riesgo de fracaso renal están principalmente relacionadas con la técnica quirúrgica y el rechazo agudo. Hoy en día, gracias a los avances en el campo del tratamiento inmunosupresor, el rechazo agudo se considera una causa menos frecuente de disfunción del injerto renal. Un estudio realizado con 1.317 pacientes, con un período de seguimiento de 10 años, reveló que el 18,8% de los pacientes presentaba fracaso del injerto debido a un rechazo agudo[23].

### **1.3.2 Fracaso tardío del injerto renal**

Se habla de fracaso tardío cuando el aumento del nivel de supervivencia del riñón trasplantado que se ha logrado a corto plazo no se ha visto acompañado de una mejoría similar a largo plazo, presentándose un deterioro lento y progresivo de la función renal a partir del sexto mes del trasplante.

Durante muchos años, la llamada "nefropatía crónica del trasplante" fue considerada la primera causa de fracaso del injerto renal a largo plazo[24]. Sin embargo, se trataba de un término poco claro, que nombraba una entidad que



incluía, en muchas ocasiones, lesiones poco específicas, englobando lesiones de causa inmunológica junto con otras de carácter no inmunológico.

Por esta razón, esta expresión ha caído en desuso. Hoy en día, se prefiere utilizar la locución “disfunción crónica del injerto” (DCI), definida como una entidad clínico-patológica compleja, con diferentes etiologías, con expresión clínica en forma de deterioro progresivo de la función renal, proteinuria e hipertensión. Esta nueva entidad, se presenta a nivel histológico con fibrosis intersticial y atrofia tubular (FIAT), cuya descripción debería incluir el grado de severidad[25].

La FIAT no es una entidad patológica *per se*, sino que es un término descriptivo e inespecífico empleado para caracterizar una lesión histológica que es común en prácticamente todos los procesos crónicos del injerto. De hecho, desde una perspectiva nefrológica, se cree evolutivamente que todos los injertos desarrollan FIAT[26].

Hay que remarcar que la DCI no sustituye al término "rechazo crónico". De hecho, el rechazo crónico es una forma de DCI que implica una patología de etiología claramente inmune. Según el último informe de la Reunión de Banff[27], el diagnóstico de rechazo crónico mediado por anticuerpos reúne tres criterios fundamentales: la evidencia histológica de lesión tisular crónica, la evidencia de interacción entre los anticuerpos y el endotelio vascular, y la evidencia serológica *de novo* de anticuerpos específicos de donante.

Otra entidad que merece una mención especial dentro de las causas de pérdida del injerto a largo plazo es la toxicidad por anticalcineurínicos (TAC),. Los anticalcineurínicos son fármacos inmunosupresores ampliamente utilizados, con potencial nefrotóxico, que pueden causar lesiones en el riñón trasplantado, tanto en la fase precoz post-trasplante como en la fase tardía. Las lesiones histológicas son similares para el tacrolimus y la ciclosporina, y pueden afectar a las arteriolas, a los túbulos y al intersticio. La toxicidad por anticalcineurínicos se describió inicialmente como la presencia conjunta de arteriopatía hialina y glomeruloesclerosis[28]. No obstante, estudios recientes indican que sólo un pequeño porcentaje de pérdidas de injertos se debe a la toxicidad por anticalcineurínicos. Hoy en día se considera que la toxicidad por

anticalcineurínicos (TCN) no va asociada a una lesión histológica específica y, por lo tanto, su diagnóstico se realiza por exclusión[29].

Todas las entidades anteriormente mencionadas comparten la misma forma de presentación clínica, generalmente asintomática para el paciente. El nefrólogo suele intuir la DCI a partir de la alteración de los parámetros de laboratorio, y se confirma y clasifica mediante el examen histopatológico de la biopsia renal.

#### 1.4 Herramientas diagnósticas de fracaso del injerto renal

La monitorización del injerto renal se realiza mediante la determinación de la concentración sérica de creatinina, el FG estimado y la proteinuria a diferentes intervalos de tiempo, en función del tiempo transcurrido desde el trasplante (Tabla 1). El aumento de la creatinina sérica, la disminución del filtrado glomerular y la aparición de proteinuria sugieren una disfunción del injerto renal.

Las guías Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) definen la disfunción crónica del injerto como una entidad clínico-patológica caracterizada por un filtrado glomerular estimado por debajo de 40 ml/min y una proteinuria superior a 500 mg/día a partir del primer año post-trasplante[30].

**Tabla 1.** Monitorización de la concentración sérica de creatinina y la proteinuria en el paciente trasplantado, según el tiempo transcurrido tras el trasplante renal. Guías KDIGO.

Monitorización del injerto según el tiempo transcurrido desde el trasplante renal						
Prueba	Semana 1	Mes 1	Mes 2-3	Mes 4-6	Mes 7-12	>12 meses
<b>Creatinina sérica</b>	Diario	2-3 veces/semana	Semanal	Cada 2 semanas	Mensual	Cada 2-3 meses
<b>Proteinuria</b>	Una determinación basal			Cada 3 meses		anual

### 1.4.1 Marcadores séricos: creatinina sérica y filtrado glomerular

La creatinina sérica es el marcador clínico más utilizado para la estimación del FG. La creatinina deriva del metabolismo de la creatina en el músculo esquelético y de la ingesta alimentaria. Se libera en la circulación de forma constante y se filtra de forma libre a través del glomérulo, sin que se reabsorba o metabolice a nivel renal.

Sus niveles dependen de la producción, de la dieta y de la masa muscular, de la hidratación y de la tasa de excreción. Es un parámetro que varía con la edad, el sexo, el peso y la masa muscular[31]. El inicio del aumento de la creatinina sérica se asocia en muchas ocasiones a una lesión histológica ya instaurada, irreversible, y sin posibilidad de intervención terapéutica [24][32].

En la actualidad, para la estimación de la función renal se recomienda el FG estimado, basado en la creatinina[33]. El FG estimado se calcula utilizando fórmulas como *Cockcroft-Gault*[34], *Modification of Diet in renal Disease Study (MDRD)*[33] o *Chronic Kidney Disease-Epiemiology Collaboration (CKD-EPI)*[35].

En el caso concreto del paciente trasplantado, para la estimación del FG se deben tener en cuenta los posibles factores que pueden interferir en su estimación:

- a) El tratamiento con corticoides, que provoca un efecto catabólico indiscriminado, disminuyendo la masa muscular y alterando el cociente masa muscular/peso total.
- b) La masa muscular, que se ve alterada por el efecto catabólico de ciertas condiciones clínicas como infecciones, rechazo y hemodiálisis prolongada previa.
- c) El uso frecuente de trimetoprim, antibiótico utilizado ampliamente en el post-trasplante como profilaxis; al bloquear la secreción de creatinina, infraestima el filtrado glomerular[36][37].



### **1.4.2 Marcadores urinarios: proteinuria**

En el seguimiento crónico del paciente trasplantado, la persistencia o la nueva aparición de proteinuria es un signo de daño del injerto[38] y es un factor predictor de pérdida del mismo[39].

La presencia de proteinuria post-trasplante ocurre más frecuentemente en pacientes cuya enfermedad de base es una glomerulonefritis, hipertensión o una enfermedad sistémica[40], y también en pacientes que presentan función retrasada del injerto tras el trasplante, o en pacientes cuyo índice de masa corporal supera los 25 kg/m<sup>2</sup> [41].

Mientras que la isquemia-reperfusión, el rechazo agudo y los fármacos nefrotóxicos (como la gentamicina o los antivirales) causan principalmente proteinuria de predominio tubular (proteinuria de 1-3 gramos en 24 h pero con una excreción de albúmina inferior a 500 mg en 2 h). Proteinurias más elevadas son generalmente atribuibles a glomerulonefritis recurrente o *de novo*, glomerulopatía del trasplante, o tratamiento con inhibidores de la vía mTOR[42].

La detección de proteinuria de nueva aparición, o un aumento de la proteinuria en el seguimiento crónico de un paciente trasplantado, una vez confirmada y tras haber descartado otros factores que pueden contribuir a la elevación de la misma (aumento de la ingesta de proteínas, esfuerzo físico aumentado, infecciones agudas), tiene que hacer sospechar de una patología relacionada con el injerto y es indicación de biopsia renal para realizar el diagnóstico.

### **1.4.3 Pruebas de imagen: ecografía**

La ecografía es una exploración complementaria no invasiva, empleada de rutina en el seguimiento del riñón trasplantado. Ha demostrado su utilidad en la detección y seguimiento de complicaciones urológicas y vasculares, siendo un buen método para detectar fístulas urinarias, urinomas, litiasis, obstrucción, hematomas, colecciones, etc.

Los hallazgos ultrasonográficos de una disfunción renal son inespecíficos y pueden incluir: aumento del tamaño renal, disminución del grosor cortical o

aumento de la ecogenicidad cortical y desaparición de la diferenciación corticomedular. Es una exploración complementaria subjetiva, con un valor predictivo negativo amplio[43].

El estudio Doppler aporta información complementaria sobre la perfusión renal y es útil en la detección de la oclusión arterial y la trombosis venosa. El índice de resistencia (IR) se utiliza de rutina en la monitorización del injerto y es de especial interés en el estudio ecográfico del riñón trasplantado. Aunque la elevación de los IRs puede hacer sospechar de una disfunción del injerto, es un parámetro inespecífico, con una utilidad limitada en la detección y seguimiento de la disfunción crónica del injerto[44].

#### **1.4.4 Biopsia renal**

La biopsia renal es la prueba *gold standard* en el diagnóstico de la patología del riñón trasplantado. En la actualidad, se considera esencial para establecer un diagnóstico correcto y adoptar una actitud terapéutica apropiada[45].

La biopsia renal es un **procedimiento invasivo**, por lo que no está exento de complicaciones[46]. Las principales complicaciones se relacionan con la edad, la función del riñón y el tamaño de la aguja, y pueden clasificarse principalmente en complicaciones mayores (que requieren una intervención, transfusiones, o procedimientos radiológicos invasivos), y complicaciones menores (que suelen resolverse de forma espontánea[47]). Las complicaciones mayores ocurren con una frecuencia entre el 0,4-2,9% y, aunque no son muy frecuentes, pueden llevar a la pérdida del injerto y poner en peligro la vida del paciente[48][49]. Las complicaciones menores, como la hematuria o el hematoma, presentan una incidencia en el riñón trasplantado más elevada, que varía entre el 9-10%.

Dado el riesgo de complicaciones, la biopsia tiene una **repetibilidad limitada**. Además, la evaluación de una misma biopsia renal por diferentes patólogos puede variar según la interpretación de los hallazgos patológicos[50], lo que implica una **reproducibilidad limitada**[51].

La biopsia renal suele estar indicada cuando se detecta una alteración de los parámetros analíticos previamente mencionados (creatinina sérica, FG y proteinuria), y hay sospecha de disfunción del injerto. La determinación de un único parámetro de laboratorio alterado no suele justificar por sí mismo la realización de una biopsia renal. No obstante, se ha sugerido que un incremento de más del 25% del valor basal de creatinina es suficiente para indicar la realización de una biopsia[52]. Sin embargo, es común que los pacientes trasplantados presenten alguna alteración en los parámetros analíticos durante los controles rutinarios, por lo que la realización de una biopsia renal no siempre garantizaría un diagnóstico certero, dada su limitada repetibilidad.

Para detectar de manera precoz la disfunción del injerto, y a pesar de la determinación analítica de una función renal estrictamente normal, se ha propuesto la realización de una biopsia renal de protocolo en el post-trasplante, a intervalos de tiempo determinados. En este sentido, un estudio que analizó más de 200 biopsias procedentes de más de 100 pacientes, concluyó que la realización de una biopsia de protocolo es capaz de detectar un rechazo silente en un 13% de los casos y un rechazo crónico en un 52%[53].

Para la evaluación de biopsias de injerto renal y la realización del diagnóstico de rechazo se utiliza la clasificación de Banff, considerada el primer sistema de clasificación de biopsias del injerto renal. Esta clasificación surgió a raíz de la primera reunión de patólogos y nefrólogos celebrada en Banff en 1991 y ha sido utilizada prácticamente en todo el mundo. Ésta permite la comparación de diferentes resultados obtenidos en biopsias renales realizadas en distintos centros, con distintos pacientes, o en momento evolutivos diferentes del post-trasplante de un mismo paciente. A lo largo de los años, dicha clasificación ha ido evolucionando, reflejando el aumento de conocimiento en el campo del trasplante renal. El último informe se publicó en 2018, tras la reunión realizada en Barcelona[27], alcanzando con ésta un total de 14 reuniones en las que se han ido añadiendo nuevos hallazgos.

La clasificación de Banff da una puntuación para cada biopsia de injerto renal, obtenida según la presencia de determinadas lesiones y según el grado de

cambios histopatológicos en los diferentes compartimentos. Sin embargo, se requieren parámetros adicionales (histopatológicos, moleculares, serológicos y/o clínicos) para determinar el diagnóstico.

En la versión de 2013 de la clasificación de Banff se incorporó por primera vez la evaluación molecular como parte del diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos, a raíz del trabajo publicado por Sis y colaboradores[54]. En este trabajo, los autores identificaron en la literatura un conjunto de genes asociados a la lesión de las células endoteliales y demostraron su sobreexpresión en biopsias con diagnóstico histológico de rechazo humoral.

En la reunión de Banff del 2015, la opinión de los expertos en relación al diagnóstico molecular del trasplante fue convergente, considerándolo una herramienta de diagnóstico de importante relevancia. Esta opinión ha sido respaldada en estudios posteriores[55]. Sin embargo, en la mayoría de casos, los datos moleculares disponibles han sido obtenidos de estudios de cohortes heterogéneas, por lo que son necesarios estudios de validación prospectivos y aleatorizados que permitan confirmar estos resultados.

## **1.5 Biomarcadores en trasplante renal**

La creatinina, el FG estimado y la proteinuria son parámetros útiles para valorar el estado del injerto renal en la práctica clínica habitual, ya que se alteran después de la instauración de la lesión renal. No obstante, no son capaces de discernir entre las diferentes patologías que pueden afectar al riñón trasplantado. Por esta razón, la biopsia renal, con sus limitaciones, sigue siendo imprescindible para el diagnóstico de la patología del riñón trasplantado.

Dado que para poder optimizar los resultados del trasplante renal es de vital importancia identificar de manera precoz las causas del fracaso del injerto, resulta necesario encontrar parámetros que puedan evaluarse de forma sencilla y no invasiva, y que a su vez permitan una monitorización más frecuente y precisa.

Recientemente se han desarrollado estudios experimentales que pretenden predecir la disfunción del trasplante renal mediante la definición de nuevos

biomarcadores. Un biomarcador se define como un parámetro objetivamente medible que permite evaluar un proceso biológico normal, un estado patológico o la respuesta a un tratamiento farmacológico[56]. Las fuentes más habituales de biomarcadores en medicina son los fluidos biológicos, dada su relativamente fácil accesibilidad. En el paciente trasplantado, las posibles fuentes de biomarcadores son la sangre periférica, la orina y el tejido renal. En estos tipos de muestras los biomarcadores más estudiados son los que buscan asociaciones con el rechazo agudo, el rechazo crónico y la disfunción crónica del injerto[57].

### 1.5.1 Clasificación de nuevos biomarcadores

En la actualidad se dispone de una gran variedad de tecnologías innovadoras como la genómica, la proteómica, la peptidómica, la microbiómica y la metabolómica, todas denominadas de forma genérica "ómicas"[58]. La aplicación de estas tecnologías en el campo de la investigación en biomarcadores ha dado lugar a importantes avances en la monitorización de pacientes con múltiples enfermedades. En la tabla 2 se presentan la definición y las principales características de estos nuevos biomarcadores[57].

**Tabla 2.** Definición y principales características de los biomarcadores basados en "ómicas"

<b>Biomarcadores</b>	<b>Definición y características</b>
<b>Genómicos</b>	Biomarcadores basados en el estudio de los genes y sus interrelaciones
<b>Transcriptómicos</b>	Biomarcadores basados en la expresión de ARN (transcriptoma completo o diferencias en la expresión de genes específicos seleccionados)
<b>Proteómicos</b>	Biomarcadores basados en el estudio del proteoma (estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función)
<b>Metabolómicos</b>	Biomarcadores basados en el estudio del metaboloma (estudio de todos los metabolitos de una muestra biológica específica)

### 1.5.2 microRNAs (miRNAs)

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de aproximadamente 20-30 nucleótidos, implicadas en la regulación postranscripcional de la expresión génica mediante el apareamiento de bases con su RNA mensajero. Los miRNAs regulan la expresión génica uniéndose a las regiones no traducidas de los mRNA e induciendo la degradación del mRNA o bien inhibiendo la traducción de proteínas, lo que a su vez reduce la expresión génica. Se identificaron por primera vez en 1993 en el microorganismo *Caenorhabditis elegans* como elementos reguladores de su desarrollo[59].

En la actualidad, se estima que el miRNoma humano está compuesto por más de 2.500 miRNAs[60] y se calcula que un 30% del total de los genes humanos se regulan por mecanismos dependientes de miRNA. Un solo miRNA puede regular alrededor de 200 transcritos diferentes, así como un mismo mRNA puede ser regulado por múltiples miRNAs[61]. Se cree que la mayoría de los genes reguladores de proteínas están bajo el control de los miRNAs, lo que significa que prácticamente todos los procesos biológicos están sujetos a la regulación dependiente de miRNA[62].

Fisiológicamente, los miRNAs están involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos como la proliferación[63], el desarrollo[64] y la apoptosis celular[65]. Concretamente, el papel de los miRNAs en la regulación del desarrollo, la fisiología y la patología renal se ha convertido en un área de investigación relevante[66]. Los miRNAs parecen jugar un papel fundamental en la fisiopatología de varias entidades patológicas con manifestación renal como la nefropatía diabética[67] o la nefroangioesclerosis[68]. Por esta razón, los miRNAs también se contemplan como potenciales biomarcadores en el trasplante renal.

#### 1.5.2.1 miRNAs en el tejido renal trasplantado

Los miRNAs, al estar involucrados en procesos biológicos complejos, tienen una gran influencia en la patología renal. Por lo tanto, su expresión en el tejido renal, en el suero o en la orina de los pacientes trasplantados puede proporcionar información sobre el estado del injerto.

Existen estudios en modelos animales que evidencian que el daño renal inducido por el fenómeno de isquemia-reperfusión va asociado a una expresión diferencial de 9 miRNAs a nivel de tejido renal[69]. En humanos, hay cada vez más evidencia sobre la participación de los miRNAs en la patología del riñón trasplantado. Sui y colaboradores[70], por ejemplo, han descrito un conjunto de 8 miRNAs sobreexpresados y 12 miRNAs infraexpresados en pacientes con rechazo agudo, con respecto al grupo control. Dos de los miRNAs, miRNA-320 y miRNA-324-3p, fueron confirmados mediante qRT-PCR. El grupo de Anglicheau examinó los miRNAs en tejido de biopsia renal de pacientes con rechazo agudo y detectó 17 miRNAs diferencialmente expresados. Además describió una fuerte correlación entre la expresión de un subconjunto de miRNAs (miR-142-5p y miR-155) y el rechazo agudo, sugiriendo que estos miRNAs pueden usarse como marcadores predictivos de rechazo agudo del injerto renal[71]. Ben-Dov y col.[72] caracterizaron los perfiles de expresión de miRNAs en biopsias renales con el diagnóstico histológico de FIAT, y posteriormente validaron sus resultados en una cohorte más amplia de 18 pacientes. El grupo de Wilflingseder[73] identificó un perfil de miRNAs en el tejido renal que permite discriminar los pacientes con rechazo agudo de los pacientes con función retrasada del injerto y del grupo control (en biopsias de protocolo).

Todos estos trabajos publicados hasta la fecha sobre la expresión de los miRNAs en el tejido renal de pacientes trasplantados, aunque son pocos y están realizados con un número limitado de pacientes, indican que los miRNAs son potenciales biomarcadores para identificar la patología renal y sugieren el papel de los miRNAs en la patogénesis de la lesión renal. Aunque la mayoría de estos estudios se centran en el rechazo agudo, cabe señalar que los miRNAs detectados como potenciales biomarcadores no coinciden entre los diferentes grupos de investigación.

### 1.5.2.2 *miRNA séricos en el trasplante renal*

Los miRNAs pueden ser detectados en fluidos corporales extracelulares como la sangre, siendo muy estables a la acción de las ribonucleasas presentes en suero o plasma. Por este motivo, los miRNAs detectados en suero han sido utilizados como biomarcadores diagnósticos de la patología del riñón trasplantado.

En 2014, Sui y col.[74] sugirieron que tres miRNAs (miRNA-181a, miR-483-5p y miR-557) detectados en suero de pacientes trasplantados podían utilizarse como biomarcadores predictivos de rechazo agudo.

En el mismo año, Betts y col.[75] encontraron dos miRNAs (miRNA-223 y miRNA-10a) en el suero de pacientes con rechazo agudo que disminuían su expresión después de un año del episodio de rechazo agudo, con respecto al momento del rechazo.

Los estudios presentados aquí apoyan la teoría de que los miRNAs circulantes representan un área interesante de investigación. No obstante, sería importante conocer si estos miRNAs reflejan cambios en las células de las que se predice que derivan o reflejan una patología más general. Por otra parte, mientras que los trabajos publicados han mostrado resultados interesantes y prometedores en cuanto al rechazo agudo, siguen faltando estudios que aborden el posible papel de los miRNAs como biomarcadores en el rechazo crónico del riñón trasplantado.

### 1.5.2.3 *miRNA urinarios en trasplante renal*

Contrariamente a lo que ocurre con el tejido renal, y en menor medida en sangre, la orina es un fluido biológico fácilmente accesible, que puede recogerse de forma no invasiva y repetida. Por lo tanto, es una fuente ideal para el estudio de posibles biomarcadores.

En la orina, así como en los demás fluidos biológicos, los miRNAs se pueden encontrar en forma libre o incluidos en vesículas extracelulares (VE). En este último caso, los miRNAs son altamente estables en comparación con las formas libres. Se ha demostrado que la concentración de miRNAs en las



vesículas extracelulares en orina (oVE) es más alta que en los *pellets* de orina[76]. Este hecho obedece a una alta presencia de actividad RNasa en los riñones, la vejiga y el tracto urinario para mantener la esterilidad y proteger el sistema excretor de las infecciones microbianas[77].

La mayoría de los estudios que investigan los niveles de miRNAs urinarios han utilizado *pellets* urinarios como fuente de miRNA. Sin embargo, el procedimiento de obtención de los *pellets* no es consistente entre estudios y raramente se describe en detalle[78]. Además, se ha podido observar que los *pellets* urinarios contienen una gran proporción de RNA degradado y de baja calidad[76], consistente con la actividad RNasa antes indicada. En cambio, la inclusión de miRNA en VE permite su encapsulación en membranas biológicas que impiden su degradación por enzimas presentes en la orina.

El origen de los miRNAs urinarios libres o incluidos en las VE sigue siendo controvertido. Parece lógico esperar que los miRNAs presentes en las VE se produzcan localmente en el tejido renal, dado que la mayoría de las VE no pueden atravesar la membrana glomerular. Sin embargo, en un estudio del año 2008 se detectaron 22 miRNAs, ninguno de ellos específico para el riñón, lo que puede sugerir que estos miRNAs estaban presentes en el plasma y se filtraron a través de la membrana glomerular[79]. A pesar de ello, e independientemente del origen, se ha demostrado que los niveles de miRNA en la orina están asociados a una serie de enfermedades que incluyen tumores genitourinarios[80] y enfermedades que afectan al riñón[81].

Debido a su estabilidad y accesibilidad, los miRNAs urinarios tienen un alto potencial como biomarcadores no invasivos de la lesión del injerto renal[82]. Sin embargo, hay pocos estudios sobre miRNAs en orina de pacientes trasplantados y, la mayoría de ellos, utiliza la orina total o los *pellets* de orina para la determinación de los miRNAs.

En el estudio de Lorenzen et al.[83] se comparó el perfil de los miRNAs urinarios de pacientes trasplantados renales considerados estables con pacientes trasplantados renales que presentaban rechazo agudo. Los miRNA-10a, miRNA-10b y miRNA-210 presentaron alteraciones en la orina de los pacientes con rechazo agudo, resultados confirmados posteriormente en una

cohorte de validación: miRNA-10b y miRNA-210 disminuyeron y miRNA-10a aumentó en pacientes con rechazo agudo, en comparación con los controles. Además, los bajos niveles de miRNA-210 se asociaron a una mayor disminución de la función renal un año después del trasplante.

El grupo de Scian [84] realizó la determinación de los miRNAs en tejido renal y orina de los pacientes con FIAT, identificando 5 miRNAs (miRNA-142-3p, miRNA-204, miRNA-107, miRNA-211, miRNA-32) diferencialmente expresados en el tejido renal de los pacientes con FIAT respecto al grupo control. En la fase de validación de los resultados, de forma coincidente, tanto en la biopsia renal como en la orina, los **miRNA-142-3p, miRNA-204 y miRNA-211**, tuvieron una expresión diferencial en los pacientes con FIAT respecto al grupo control.

En otro estudio[85], se analizó la orina de pacientes trasplantados con FIAT y se identificaron 22 miRNAs con una expresión diferente en comparación con la orina de pacientes con un trasplante normo-funcionante; 5 de ellos (miRNA-125b, miRNA-203, **miRNA-142-3p, miRNA-204, miRNA-211**), se validaron mediante PCR en una cohorte de 66 pacientes con FIAT. El mismo estudio evaluó además el contenido en miRNA de los oVE versus los *pellets*, mostrando resultados similares en cuanto al contenido de miRNA.

Recientemente, Zununi y col.[86] cuantificaron los niveles de expresión de los miRNAs en los *pellets* urinarios de los pacientes con FIAT, y detectaron que los miRNA-21 y miRNA-200b son capaces de diferenciar a los pacientes con FIAT de los controles sanos.

### **1.5.3 Vesículas extracelulares en orina (oVE)**

Las VE se describieron por primera vez en 1967 por Wolf[87] quien, mediante microscopía electrónica, observó que el plasma humano contenía pequeñas vesículas procedentes de plaquetas, con un diámetro entre 20 y 50 nm. A estas vesículas las denominó "polvo de plaquetas" y se consideraron que eran restos de membrana sin ningún significado biológico. Años más tarde, se describió que los linfocitos B secretaban vesículas con función presentadora de antígeno[88]. De esta forma, se abrió el camino que permitió el estudio de las

VE de casi todos los tipos de células de mamíferos, incluyendo las células madre, las células primarias del sistema inmune y nervioso, y numerosas líneas celulares neoplásicas.

El término VE se está utilizando para describir todas las formas de vesículas secretadas, incluidos exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, con algunas diferencias entre sí en cuanto a su tamaño y composición[89].

Hoy en día se conoce la importancia de las VE en la comunicación intercelular, a través de la transferencia de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos[90]. Así pues, las VE contienen distintos tipos de moléculas que reflejan el contenido proteico de las células de origen, así como el contenido lipídico y de ácidos nucleicos, principalmente mRNAs, miRNAs y rRNAs, aunque también DNA[91]. Su composición se modifica en función del metabolismo celular, y de ahí deriva el interés creciente por su posible potencial diagnóstico y terapéutico.

El estudio de las oVE tiene especial interés en nefrología, dado que se ha demostrado que contienen una gran variedad de proteínas y transportadores celulares específicos del riñón y del tracto urogenital[92]·[93]. De hecho, las oVE son una potencial fuente de nuevos miRNA como biomarcadores en el estudio de patología renal, y su relevancia está cada vez más reconocida[94]. Además, las oVE son muy estables y tienen la ventaja de mantener la integridad de los miRNA, protegiéndolos de la acción de las RNasas[95]·[96].

Hasta la fecha, varios estudios proteómicos sobre oVE han identificado proteínas que podrían estar asociadas con enfermedades renales, sobre todo en patologías como el fracaso renal agudo y la patología glomerular[97], así como en patologías del riñón trasplantado[98]·[99]·[100]. Sin embargo, probablemente, por el hecho de ser un campo de investigación en consolidación y expansión, aún existen dificultades metodológicas y de interpretación de los resultados, que en ocasiones resultan contradictorios. El grupo de Álvarez[98], por ejemplo, sugiere que niveles elevados de la proteína NGAL en los exosomas podrían relacionarse con una función retrasada del injerto, mientras que en otros estudios[101] se postula que dicha molécula no aporta información concluyente sobre el estado del injerto. No obstante, estudios realizados en pacientes con rechazo agudo han detectado un

aumento de las proteínas CLCA1 o DEFA5 en oVE[100], e incluso un aumento de VE positivas para CD3[102], probablemente relacionado con la infiltración linfocitaria del injerto renal.





# HIPÓTESIS







# HIPÓTESIS

El estudio histológico de la biopsia renal sigue siendo la prueba de referencia para el diagnóstico de certeza de la disfunción del injerto renal. Sin embargo, su principal limitación es la invasividad del procedimiento y su consecuente limitada repetitividad. Así pues, resulta necesario encontrar metodologías no invasivas que permitan seguimientos más frecuentes y precisos de la evolución del trasplante renal.

Diversos estudios han evidenciado la potencial aplicación del estudio transcriptómico en el diagnóstico de la disfunción del injerto. Concretamente, el perfil transcriptómico de las VE presentes en la orina de los pacientes trasplantados, en particular su contenido en miRNA, refleja el estado fisiopatológico del riñón. Por lo tanto, se podría hipotetizar que el estudio del perfil de miRNA de las oVE permitiría la identificación de patrones de expresión específicos de una determinada patología del riñón trasplantado.

De comprobarse esta hipótesis, podría plantearse el uso de las oVE para un diagnóstico precoz, una monitorización más frecuente y más precisa, y de nula invasividad para el paciente renal.





The image features a white background with a fine, vertical-lined texture. On the right side, there are several watercolor splatters and blotches in various colors: yellow, green, blue, and red. The splatters are of different sizes and some are clustered together, creating a dynamic and artistic composition. The word "OBJETIVOS" is printed in a bold, dark blue, sans-serif font at the bottom center of the page.

# OBJETIVOS





# OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo principal

Evaluar el uso de las oVE como fuente no invasiva de miRNAs que posibilite una monitorización más frecuente para el diagnóstico y seguimiento del paciente trasplantado, en sustitución de la biopsia renal.

## 3.2 Objetivos secundarios

- Agrupar a los pacientes según el diagnóstico histopatológico de la biopsia renal.
- Analizar el contenido de miRNA de las oVE de los pacientes incluidos en el estudio
- Identificar los miRNAs diferencialmente expresados en los pacientes trasplantados con disfunción del injerto y pacientes trasplantados con función renal normal.
- Definir patrones de expresión de miRNAs específicos de las distintas patologías del riñón trasplantado.







# PACIENTES Y MÉTODOS





# PACIENTES Y MÉTODOS

## 4.1 Población de estudio

Los criterios de inclusión para realizar la selección de la población de estudio fueron los siguientes: edad superior a 18 años y consentimiento informado firmado de cada paciente para participar en el estudio.

Se definieron dos grupos principales de pacientes:

- Pacientes trasplantados renales con disfunción del riñón trasplantado: pacientes trasplantados de donante vivo o de cadáver a los que se les practicó una biopsia renal por indicación clínica y que presentaban lesiones histológicas específicas en el examen anatómico-patológico.
- Pacientes trasplantados con función renal normal: pacientes trasplantados de donante vivo o de cadáver de más de 6 meses de evolución, con niveles de creatinina inferiores a 1,1 mg/dl, FG estimado superior a 80 ml/min/1,72m<sup>2</sup> y sin evidencia de proteinuria ni hematuria.

## 4.2 Metodología para la obtención de las muestras de orina

- Las muestras de orina de los pacientes sometidos a una biopsia renal se recogieron dentro de las 8 horas previas a la realización de la biopsia.
- En el caso de los pacientes trasplantados con función renal normal, las muestras de orina se recogieron en la visita rutinaria de la consulta externa de nefrología.
- El volumen de orina recogido fue de aproximadamente 150 ml en todos los pacientes.
- Las muestras se centrifugaron inmediatamente a 600xg durante 15 minutos y se congelaron a -80°C en presencia del inhibidor de proteasas AEBSF (0,138 mg/ml).



- Las muestras fueron codificadas e introducidas en una base de datos y remitidas al laboratorio para ser procesadas en un plazo máximo de 4 horas tras la recogida.

### **4.3 Determinación de los parámetros bioquímicos**

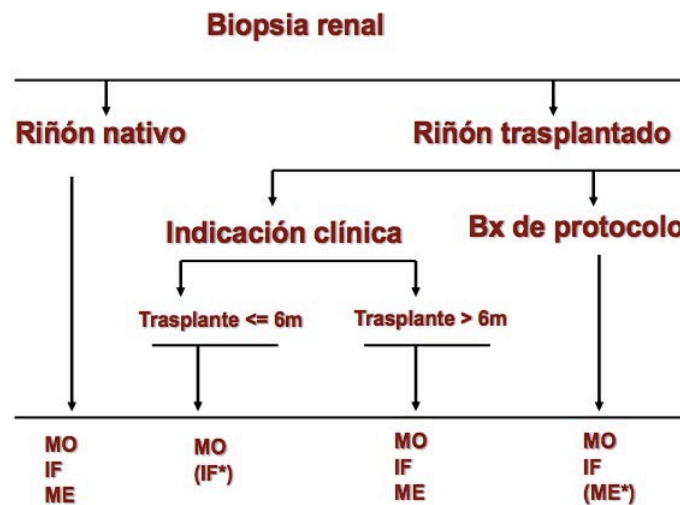
- La creatinina sérica fue determinada utilizando el analizador Cobas® 711 de Roche Diagnostics.
- El FG estimado en base a la ecuación CKD-EPI que incluye variables clínicas como la edad, el sexo y la raza.
- La presencia de proteínas en orina de 24h se determinó utilizando un método espectrofotométrico con rojo de pirogalol (pyrogallol red). Se definió como proteinuria la presencia de más de 300 mg de proteínas en orina de 24h.

### **4.4 Estudio anatomopatológico de la biopsia renal**

#### **4.4.1 Procesamiento y examen de la biopsia renal**

- La biopsia renal se acompañó de información clínica adecuada que permitiera la interpretación apropiada de los hallazgos morfológicos.
- Se utilizaron agujas de calibre 16 G para obtener dos cilindros, cada uno de ellos de al menos 1 cm de longitud.
- Una vez extraído el tejido renal, éste se mantuvo húmedo en una gasa empapada en suero fisiológico, evitando al máximo su manipulación.
- El transporte de la biopsia al laboratorio de patología se realizó de forma inmediata.
- Tras la identificación de glomérulos mediante el microscopio de disección o con una lupa, se dividió el tejido para ser analizado mediante distintas técnicas. Los métodos de análisis utilizados fueron la microscopía óptica, la inmunofluorescencia y, en algunos casos concretos, la microscopía

electrónica (Figura 2). La división de la muestra se realizó dependiendo del problema clínico. En general, la mayor parte de la muestra (aproximadamente el 70% del total de la biopsia) se procesó para el estudio de microscopía óptica, el 20% para inmunofluorescencia y el 10% restante para microscopía electrónica.



**Figura 2.** Sistemática de la valoración de la biopsia renal. Bx: biopsia renal; MO: microscopía óptica; IF: inmunofluorescencia; ME: microscopía electrónica; \*: técnicas que se utilizaron en casos concretos.

#### 4.4.2 Microscopía óptica (MO)

- El tejido se fijó en formaldehído al 10% y, posteriormente, se incluyó en bloques de parafina de los que se obtuvieron múltiples cortes (de 8 a 16) de 2 a 3 micras de grosor.
- Las tinciones estándar utilizadas en todas las biopsias renales fueron hematoxilina-eosina, PAS, tricrómico de Masson y plata-metenamina. En algún caso se utilizaron otras tinciones como rojo Congo para amiloide o Von Gieson para fibras elásticas.

- El tejido en parafina se utilizó también para el estudio inmunohistoquímico de C4d, SV40, IgG4, inmunofenotipo de los linfocitos y tipificación de amiloide, entre otros.

#### **4.4.3 Inmunofluorescencia directa (IF)**

- El tejido en fresco se congeló de forma rápida en nitrógeno líquido o en el criostato. Se realizaron cortes de congelación de 3 a 4 micras y se utilizaron anticuerpos marcados con fluoresceína.
- Los antígenos investigados de forma habitual fueron inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), componentes del complemento (C3, C1q y C4), fibrinógeno y cadenas ligeras kappa y lambda.
- En algún caso se utilizaron anticuerpos adicionales, como los dirigidos contra la cadena  $\alpha$  del colágeno tipo IV o los dirigidos contra las subclases de IgG.
- Se realizaron fotografías y se archivaron todos los casos positivos.

#### **4.4.4 Microscopia electrónica (ME)**

- El tejido para el estudio de microscopia electrónica se fijó en solución de Karnovsky y se incluyó en epoxi (resina). A continuación, se realizaron cortes semifinos de 1 micra de grosor, se tiñeron con azul de toluidina y se utilizaron para identificar una zona con al menos uno o dos glomérulos.
- En base a la información obtenida en los semifinos, se piramidó el bloque (tejido envuelto en resina) y se obtuvieron los cortes “ultrafinos”. Estos últimos se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en el microscopio electrónico.
- Posteriormente, se realizaron fotografías y se generó un archivo fotográfico de los hallazgos diagnósticos.

#### **4.4.5 Interpretación de la biopsia renal**

La evaluación de la biopsia renal incluyó el estudio de múltiples cortes seriados en ciertos casos, que fueron teñidos con una variedad de tinciones histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia, así como mediante microscopía electrónica. La microscopía electrónica es una técnica diagnóstica imprescindible en enfermedades como el síndrome de Alport, la enfermedad de membrana basal fina y la glomerulopatía fibrilar/ inmunotactoide, entre otras. Por otra parte, es una técnica complementaria y confirmatoria en el conjunto de las glomerulonefritis y en las lesiones crónicas del trasplante (glomerulopatía y capilaropatía del trasplante).

#### **4.5 Aislamiento de las vesículas extracelulares**

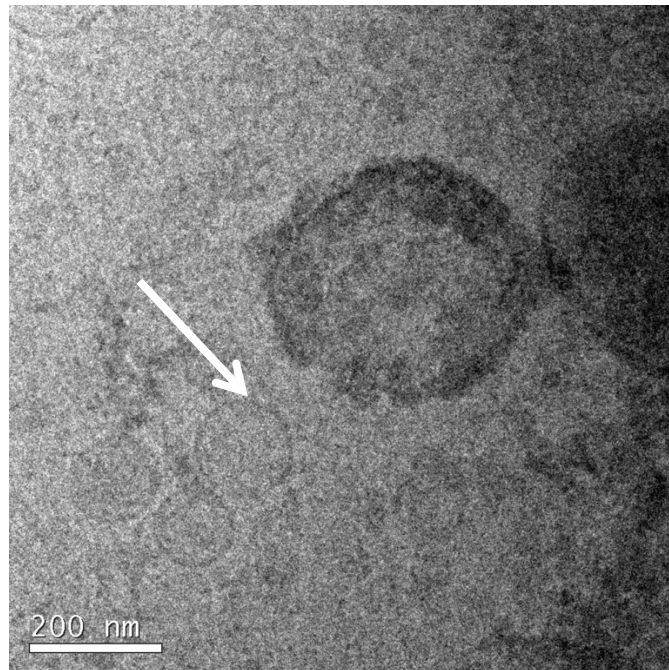
Las oVE se obtuvieron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) después de la concentración de la orina, tal y como ha sido descrito previamente por nuestro grupo de trabajo[103]. Resumidamente, las muestras de orina se descongelaron durante la noche a 4°C y se centrifugaron a 17.000xg durante 10 min. El sobrenadante se mantuvo a 4°C y el sedimento se trató con DTT (200 mg/ml, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a 37°C, para eliminar los polímeros de proteína Tamm-Horsfall[104]. El sedimento tratado con DTT y el sobrenadante se mezclaron y centrifugaron nuevamente a 17.000xg durante 10 min. El sobrenadante se concentró por ultrafiltración, usando el filtro Centricon® Plus 70 con un punto de corte de 100 kDa (Millipore, Bedford, MA). Posteriormente, se cargó 1 ml del volumen de orina concentrada en una columna de SEC de sefarosa CL-2B (Sigma) de 10 ml para aislar los oEV. Para cada muestra, se recogieron 20 fracciones de 0,5 ml.

#### **4.6 Selección de fracciones de SEC por tamaño mediante citometría de flujo basada en microesferas**

Para determinar las fracciones que contenían oVE de las columnas de SEC, se determinó la presencia de marcadores VE como las tetraspaninas CD63 y CD9 mediante citometría de flujo basada en microesferas, tal y como se ha descrito previamente en la literatura[105][103]. Se incubaron 50 µL de las fracciones de

SEC con microesferas de aldehído / sulfato-látex de 4  $\mu\text{m}$  (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con tampón BCB (PBS, BSA al 0,1% y 0,01%  $\text{NaN}_3$ ) (Sigma Aldrich) durante la noche a temperatura ambiente en rotación. Las microesferas recubiertas con oVE se lavaron con tampón BCB y se marcaron con anti-CD9 (Clon VJ1 / 20), anti-CD63 (Clon TEA 3/18) o isotipo de IgG de ratón policlonal (Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 30 min a 4°C. Después de lavar con tampón BCB, las perlas recubiertas con oVE se incubaron con el anticuerpo IgG anti-ratón de cabra secundario conjugado con FITC (Bionova, NS, Canadá) y se analizaron mediante citometría de flujo (FacsVerse, BD Biosciences San Jose, CA). En la Figura 3 se puede observar una imagen de crio-microscopía electrónica de las oVE obtenidas por este método.

Se calculó la intensidad de fluorescencia mediana FITC (MFI) de las perlas recubiertas con oVE para cada fracción usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).



**Figura 3.** Imagen de oVE de crio-microscopía electrónica, detalle a gran aumento (escala 200 nm). La flecha blanca indica una vesícula extracelular.

#### **4.7 Extracción de RNA**

El RNA total se extrajo de las oVE usando el kit mirCURY (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante con las modificaciones publicadas anteriormente[106]. Posteriormente, el RNA se precipitó usando glucógeno (20 mg/ml, Roche), 10% de una solución 3 M de acetato de sodio (Sigma-Aldrich), a pH 5.2 y 2.5 veces (v/v) de etanol absoluto. El perfil de RNA se determinó usando un kit de alta resolución (kit de RNA pequeño) en un sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

#### **4.8 Secuenciación masiva: *Next Generation Sequencing* (NGS)**

La secuenciación masiva se realizó utilizando TruSeq small RNA (Illumina, San Diego, CA). Para cada biblioteca, el RNA se ligó a adaptadores que contenían un índice único. Las muestras de RNA se retro-transcribieron a DNAC usando cebadores específicos para los adaptadores. Utilizando Pippin Prep (Sage Science, Beverly, MA), las muestras de DNAC se seleccionaron por tamaño, primero de 115 a 165 pb, y luego de 165 a 250 pb. Se utilizó el ensayo Agilent D1000 para evaluar el tamaño y la calidad del DNA y cuantificar la biblioteca DNAC generada. Se analizó un conjunto equimolar de todas las muestras en HiSeq2500 (Illumina), utilizando la generación de clúster de extremo emparejado TruSeq (v3 para cBOT). El paquete DESeq se usó para normalizar y analizar la expresión diferencial entre los miRNA encontrados[107]. Se utilizó el método Benjamini-Hochberg, que es una herramienta estadística útil para evitar errores estadísticos de tipo I (falsos positivos)[108].

#### **4.9 qPCR**

Los miRNAs relevantes seleccionados inicialmente en una primera cohorte (formada por un grupo de pacientes con disfunción del injerto y un grupo control) fueron probados en una nueva cohorte de pacientes y en un nuevo grupo control. El grupo control y los pacientes se seleccionaron siguiendo los criterios indicados para la primera cohorte. Se aislaron las oVE y se extrajo el RNA total, tal y como se ha descrito anteriormente.

La transcripción inversa de los miRNA se realizó utilizando el kit de síntesis de cDNA de miRNA TaqMan Advanced (ThermoFisher Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para el análisis de expresión de miRNAs mediante qPCR se utilizaron los Taqman Advance Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA), para 10 tipos de miRNA codificados: hsa-miR-1, hsa-miR-2, hsa-miR-3, hsa-miR-4, hsa-miR-5, hsa-miR-6, hsa-miR-7, hsa-miR-8, hsa-miR-9, hsa-miR-10.

Esta denominación de los miRNAs fue designada por el equipo investigador de forma arbitraria, con la intención de mantener la confidencialidad hasta el momento de la obtención de una posible patente.

Los cDNA no diluidos se usaron en proporciones apropiadas usando Taqman Fast Advanced Master Mix (Thermofisher Scientific). Se usó hsa-miR-10a-5p como control interno y se utilizó RNA total de riñón (Thermofisher) como control positivo. Los valores de Ct de los triplicados se promediaron y se usaron para los cálculos de  $\Delta Ct$ .

#### **4.10 Análisis estadístico**

El análisis de componentes principales (ACP), el análisis de la característica operativa del receptor (ROC) y la prueba de Mann-Whitney se realizaron con GraphPrims v5 y SPSS v15. El nivel de significación estadística fue  $p < 0.05$ .





# RESULTADOS





# RESULTADOS

El abordaje experimental se planteó en dos fases distintas: una primera fase de definición de marcadores o fase de Discovery, y una segunda fase de validación de los resultados experimentales previos.

En la fase inicial se seleccionaron un total de 14 pacientes trasplantados a los que se les realizó una biopsia renal por indicación clínica, y que fueron diagnosticados de FIAT (n=3), RAC (n=5) y TAC (n=6). Además, se seleccionó un grupo control que incluía 8 muestras de pacientes trasplantados con función renal normal a los que no se les realizó biopsia. Se recogió la orina de todos los pacientes, tal y como se ha detallado con anterioridad en el apartado 4.2. Los miRNAs vesiculares de orina de estos pacientes se analizaron mediante secuenciación. Tras la normalización de los resultados se seleccionaron un total de 12 miRNAs diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes con patología del riñón trasplantado y el grupo control, para su posterior validación en una nueva cohorte.

En la segunda fase de validación se seleccionaron un nuevo grupo de 22 muestras de pacientes (7 FIAT, 9 RAC, 6 TAC) y 8 muestras control (8 pacientes trasplantados con función renal normal); se aislaron las oVE y se analizaron los miRNA mediante RT- qPCR.

## 5.1 Fase de Discovery

### 5.1.1 Pacientes con disfunción del injerto renal

#### 5.1.1.1 *Características clínicas de los pacientes*

Se analizó la orina de un total de 14 pacientes trasplantados renales que presentaban disfunción del injerto renal. El grupo estudiado incluía 5 mujeres y 9 hombres, con una media de edad de 53 años (rango de edad entre 33 y 68 años). Del total de pacientes, 4 habían sido trasplantados en la fase prediálisis y los 10 restantes llevaban en diálisis entre 4 y 48 meses. Seis de los pacientes habían recibido un trasplante de vivo, mientras que en 8 casos el riñón era

procedente de un donante cadáver. A pesar de que dos de los pacientes habían recibido un trasplante previo, ninguno de los 14 pacientes tenía anticuerpos anti-HLA preformados. En el momento de la toma de muestra, los 14 pacientes recibían tratamiento inmunosupresor estándar con prednisona, micofenolato de mofetilo y anticalcineurínicos (la mayoría tacrolimus, excepto un paciente que estaba bajo tratamiento con ciclosporina).

Las características clínicas de los pacientes en el momento de la biopsia renal se indican en las tablas 3, 4 y 5.

**Tabla 3.** Características clínicas de los pacientes (I)

<b>Nº paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>Tipo de TRS</b>	<b>Tiempo en diálisis</b>	<b>1r TR</b>	<b>Donante DV/DC</b>	<b>BR</b>
1	M	60	preHD		si	DV	FIAT
2	V	68	preHD		si	DC	FIAT
3	M	49	HD	36	si	DC	FIAT
4	V	53	preHD		si	DV	RAC
5	V	63	HD	36	si	DC	RAC
6	V	25	preHD		si	DV	RAC
7	V	43	HD	48	no	DC	RAC
8	V	65	HD	36	si	DC	RAC
9	V	33	HD	12	si	DV	TCN
10	M	50	HD	48	si	DC	TCN
11	M	41	HD	>120	no	DC	TCN
12	V	54	HD	4	si	DV	TCN
13	V	33	HD	12	si	DV	TCN
14	M	48	DP	12	si	DC	TCN

V: varón; M: mujer; HD: hemodiálisis; DV: donante vivo; DC: donante cadáver; BR: biopsia renal; FIAT: fibrosis intersticial/ atrofia tubular; RAC: rechazo agudo celular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; TRS: tratamiento renal sustitutivo.

**Tabla 4.** Características clínicas de los pacientes (II)

Nº paciente	HLA	Mismatch	Ac HLA preTR	Tratamiento inicial	ERC de base	Tiempo desde TR (meses)	FRI
1	A11, A31, B27, B40, DR01, DR11	2A, 2B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	GN IgA	12	No
2	A2, A3, B15, B18, DR3, DR16	1A, 2B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	ND	14	no
3	A1, A2, B44, B56, DR3, DR6	2A, 2B, 1DR	no	prednisona, CsA	RVU	36	no
4	A3, A32, B7, B38, DR1, DR11	2A, 1B, 2DR	no	prednisona, FK, MMF	GNPM	12	no
5	A02, A24, B14, B44, DR01, DR04	2A, 0B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	NAE	36	no
6	A02, A03, B51, B52, DR07, DR15	1A, 1B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	24	no
7	A02, A32, B15, B45, DR03, DR13	1A, 2B, 0DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	48	no
8	A02, A68, B14, B27, DR11	2A, 2B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	HSIF	36	no
9	A01, A30, B40, B73, DR04, DR11	1A, 1 B, 0DR	no	prednisona, FK, MMF	LES	12	no
10	A26, A-, B14, B5, DR7, DR13	1A, 2B, 0DR	no	prednisona, FK, MMF	LES	48	no
11	A01, A32, B35, B51, DR04, DR03	2A,0B,0DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	>120	no
12	A2, A31, B40, B51, DR04, DR13	1A, 2B, 2DR	no	prednisona, FK, MMF	PQR	4	no
13	A01, A30, B40, B73, DR04, DR11	1A, 1B, 0DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	12	no
14	A11, A68, B35, B51, DR01, DR12	2A, 1B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	12	no

FK: tacrolimus; CsA: ciclosporina; MMF: micofenolato de mofetilo; GN IgA: glomerulonefritis IgA; ND: nefropatía diabética; GNMP: glomerulonefritis membrano-proliferativa; RVU: reflujo vesico uretral; NAE: nefroangioesclerosis; NF: no filiada; HSIF: hialinosis segmentaria y focal; LES: lupus eritematoso sistémico; PQR: poliquistosis renal; FIAT: fibrosis intersticial/ atrofia tubular; RAC: rechazo agudo celular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; TR: trasplante renal.

**Tabla 5.** Características clínicas de los pacientes (III)

Nº paciente	HTA	DM2	Creat (mg/dl)	Prot/creat (mg/gr)
1	si	si	2,96	292
2	si	no	2,30	44
3	no	no	2	20
4	si	no	2,11	447
5	no	no	6,11	113
6	si	si	3,70	128
7	si	no	4,03	286
8	si	no	1,5	61
9	no	no	1,91	30,5
10	no	no	2,49	403
11	si	no	1,8	43
12	si	si	2,29	130
13	no	no	1,93	35
14	si	no	3,08	280

HTA: hipertensión arterial; DM2: diabetes mellitus 2; creat: creatinina plasmática; prot/creat: cociente proteínas/creatinina en orina.

A todos los pacientes se les practicó una biopsia renal por indicación clínica. En todos los casos analizados el motivo fue una alteración de la creatinina, con una media de creatinina en el momento de la biopsia de 2,72 mg/dl (rango entre 1,5 mg/dl y 6,1 mg/dl). Además, todos los pacientes presentaron proteinurias inferiores a 500 mg/gr.

La biopsia renal se practicó tras unos 30 meses de media después del trasplante renal (rango entre 4 y 120 meses).

### 5.1.1.2 Características histológicas de la biopsia renal

Los 14 pacientes se clasificaron en 3 grupos, en función del diagnóstico anatomopatológico:

- 1) Pacientes diagnosticados de FIAT
- 2) Pacientes diagnosticados de RAC
- 3) Pacientes diagnosticados de TCN

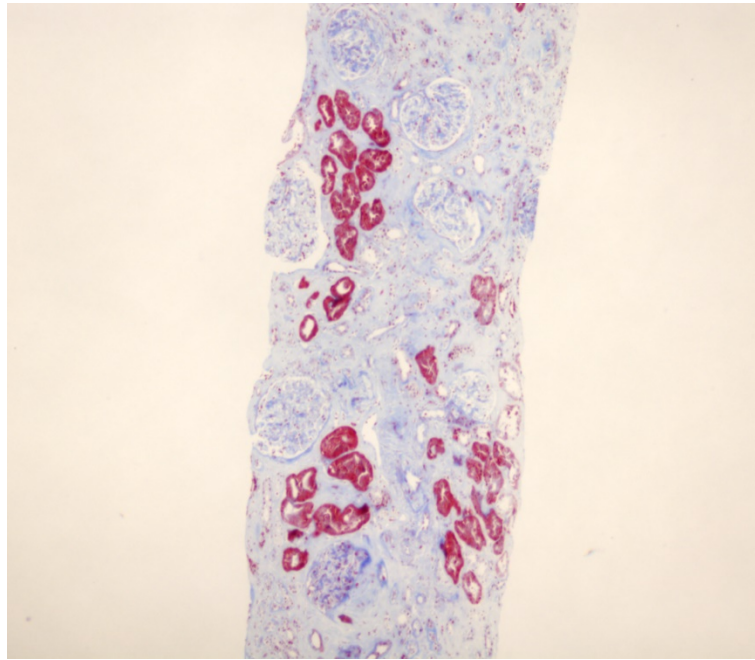
Los pacientes etiquetados de FIAT presentaban diferentes grados de fibrosis intersticial/ atrofia tubular, con escasa o nula inflamación local asociada. Las características histológicas de los pacientes diagnosticados de FIAT se presentan en la tabla 6.

**Tabla 6.** Características histológicas de los pacientes diagnosticados de FIAT

Nº paciente	Esclerosis glomerular	Arterioesclerosis	C4D
1	5/9	moderada	-
2	2/10	no	-
3	5/24	moderada	-

La Figura 4 muestra una biopsia renal con el diagnóstico histológico de fibrosis intersticial-atrofia tubular.





**Figura 4.** Biopsia renal, tinción Tricrómico de Masson: evidencia de fibrosis intersticial-atrofia tubular.

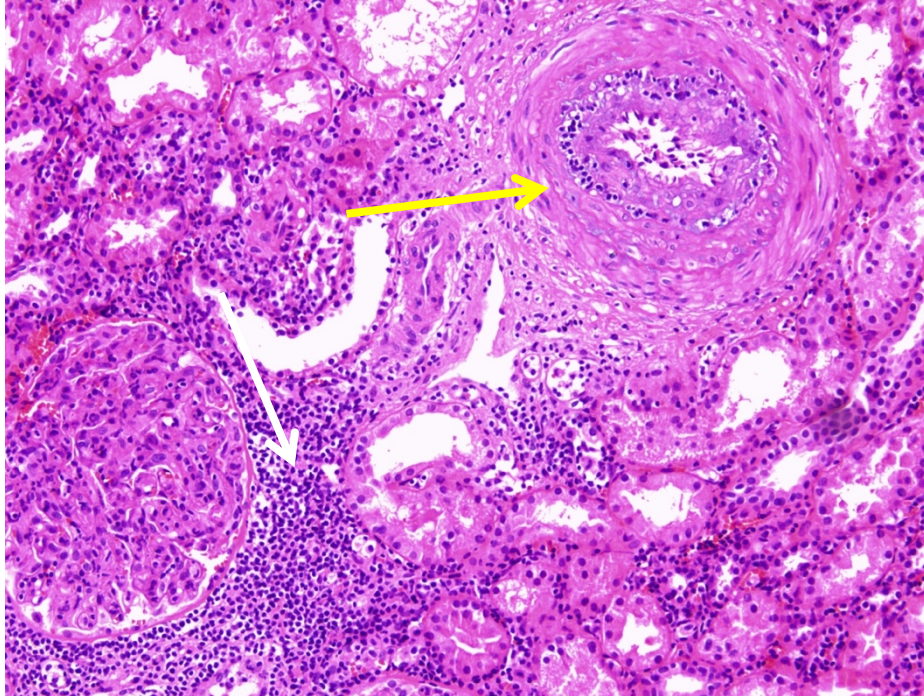
En cuanto a los pacientes con diagnóstico de RAC, según la clasificación de Banff, dos de ellos presentaban un rechazo tipo IA y los otros 3 presentaban un rechazo tipo IIA. La tabla 7 muestra las características histológicas de los pacientes diagnosticados de RAC.

**Tabla 7.** Características histológicas de los pacientes diagnosticados de RAC

Nº paciente	Tipo RAC	Glomérulos esclerosados	Arteritis intimal	FIAT	Hialinosis	C4D	SV40
4	IIA	2/11	leve-moderada	-	-	-	-
5	IIA	0/16	leve-moderada	-	-	-	-
6	IIA	4/37	leve-moderada	-	moderada	-	-
7	IA	0/5	-	-	-	-	-
8	IA	1/36	-	-	leve	-	-

RAC: rechazo agudo celular; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular

La Figura 5 muestra una biopsia renal con el diagnóstico histológico RAC tipo IIA.

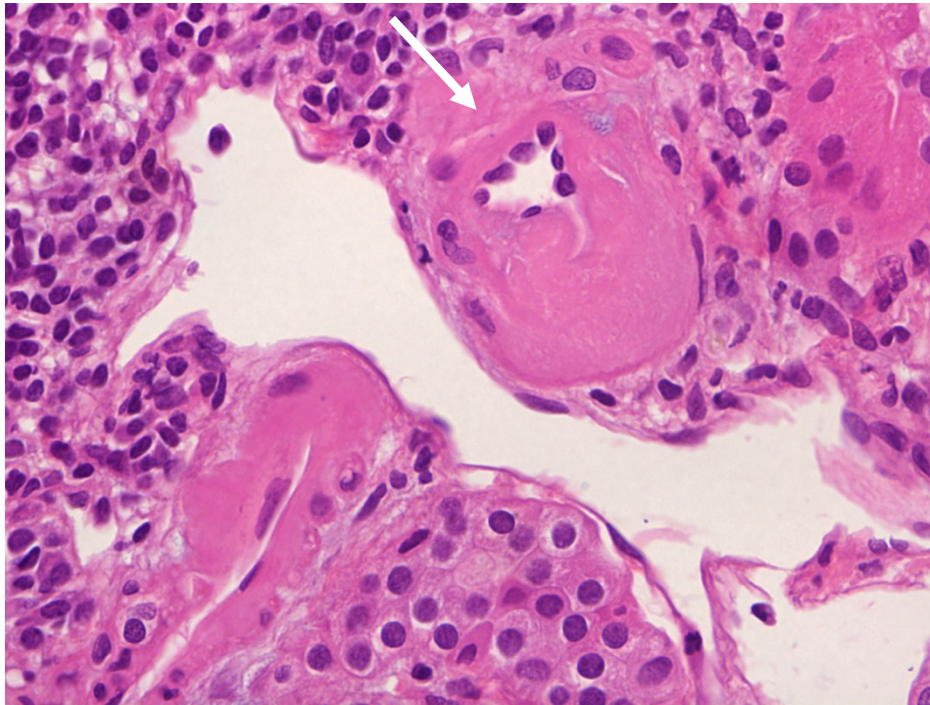


**Figura 5.** Tinción hematoxilina-eosina: presencia de infiltrado inflamatorio intersticial (flecha blanca), presencia de arteritis intimal (flecha amarilla).

Los pacientes incluidos en el grupo de TCN presentaban como hallazgos principales una arteriopatía nodular severa, y/o vacuolización isométrica tubular, con muy escasa o nula inflamación en zonas sanas y de FIAT, y con inmunofluorescencia negativa. Todos los pacientes tenían una inmunotinción negativa para C4d.

La Figura 6 muestra una biopsia renal con el diagnóstico histológico de toxicidad por anticalcineurínicos.





**Figura 6.** Tinción hematoxilina-eosina: hialinosis arteriolar circunferencial (indicada por la flecha blanca); formación de nódulos en perfíricos, sugestivo de toxicidad crónica por anticalcineurínicos.

### 5.1.2 Grupo control

El grupo control estuvo constituido por 8 pacientes trasplantados renales con función renal normal. En las tablas 8 y 9 se presentan las características clínicas de estos pacientes.

El grupo estudiado incluía 4 mujeres y 4 hombres, con una media de edad de 57 años (rango de edad entre 42 y 69 años). Dos de ellos se habían trasplantado en la fase prediálisis y 6 de ellos llevaban un tiempo entre 2 y 5 años en diálisis. Dos de los pacientes habían recibido un trasplante de donante vivo, mientras que en 6 casos el riñón era procedente de un donante cadáver. Ningún paciente tenía anticuerpos anti-HLA preformados previo al trasplante. Cuatro de los pacientes incluidos recibían tratamiento inmunosupresor con prednisona, tacrolimus, micofenolato, mientras los otros 4 recibían sólo prednisona y tacrolimus en el momento de la biopsia.

Ninguno de los pacientes incluidos era diabético y 6 de ellos eran hipertensos controlados con medicación antihipertensiva. Todos tenían función renal normal

con creatinina dentro del rango de la normalidad y filtrado glomerular superior a 80 ml/min/1,72m<sup>2</sup>.

**Tabla 8.** Características clínicas del grupo control (I)

Nº paciente	Sexo	Edad	Tipo de TRS	Tiempo en diálisis (meses)	1r TR	Donante DV/DC
1	V	57	HD	18	si	DC
2	M	64	HD	60	si	DC
3	V	63	HD	48	no	DC
4	M	45	HD	24	si	DC
5	v	42	HD	18	si	DC
6	V	57	HD	12	no	DC
7	M	65	preHD	0	si	DV
8	M	69	preHD	0	si	DV

V: varón; M: mujer; HD: hemodiálisis; DV: donante vivo; DC: donante cadáver; TRS: tratamiento renal sustitutivo.

**Tabla 9.** Características clínicas del grupo control (II)

Nº paciente	HLA	Mismatch	Ac HLA preTR	Tratamiento inicial	ERC de base	tiempo desde TR (meses)	FRI
1	A2, A30, B7, B50, DR1, DR15	2A, 1B, 0DR	no	Prednisona, FK, MMF	HSIF	25	no
2	A2, A3, B7, B8, DR03, DR13	0A, 1B, 0DR	no	Prednisona, FK, MMF	GN IgA	>120	no
3	A3, A24, B38, B-	1A, 1B,	no	Prednisona,	NF	>120	no

	DR13, DR -	1DR		FK, MMF				
4	A01, A02, B27, B50, DR 11, DR 13	1A, 2B, 0DR	no	Prednisona, FK	NF	>118	no	
5	A2, A-, B51, B-, DR 04, DR 08	0A, 1B, 2DR	no	Prednisona, FK	GN IgA	>120	no	
6	A01, A03, B07 ,B44, DRB101, DRB104	1A, 1B, 1DR	no	Prednisona, FK	PQR	>120	no	
7	A02, B41, B4, DR07, DR13	0A, 1B, 0Dr	no	Prednisona, FK, MMF	NF	60	no	
8	A02, A03, B18, B07, DR03, DR15	1A, 0B, 0Dr	no	Prednisona, FK, MMF	NF	48	no	

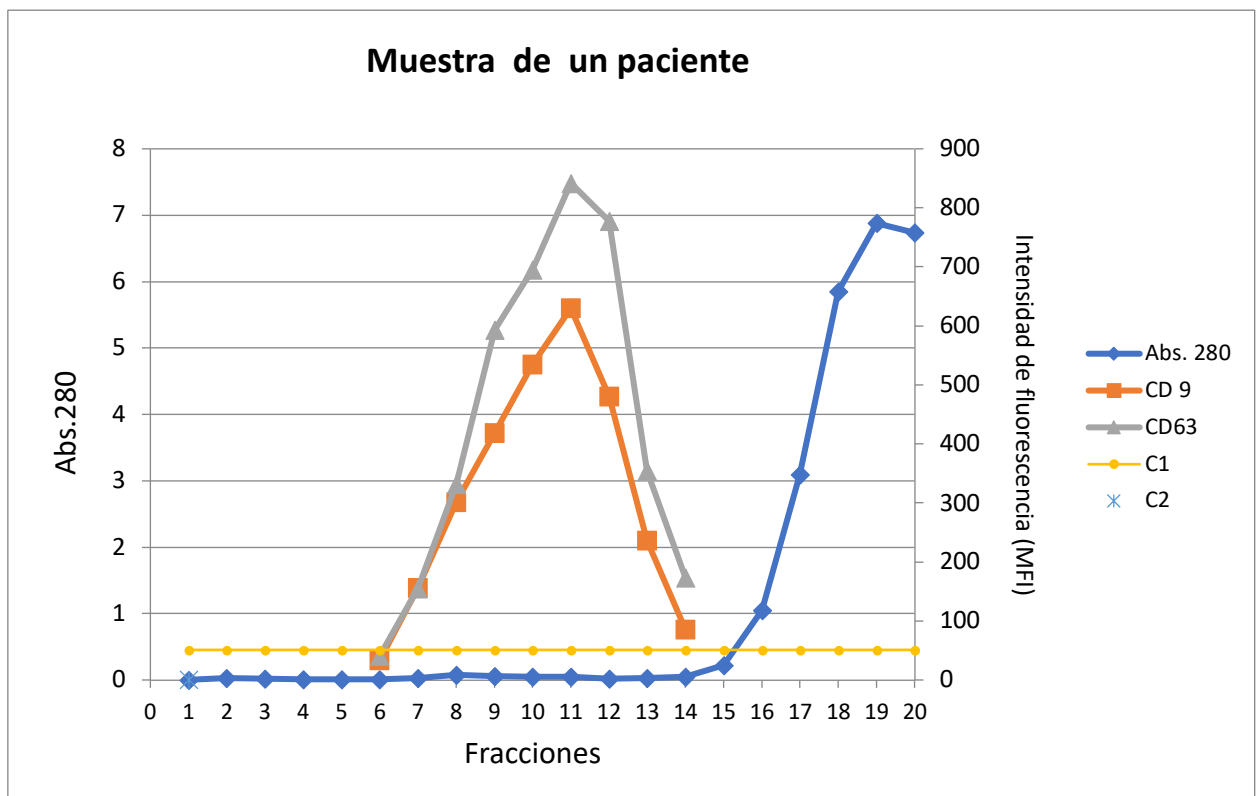
HLA: del inglés, human leukocyte antigens; ERC: enfermedad renal crónica; FK: tacrolimus; MMF: micofenolato de mofetilo; HSIF: hialinosis segmentaria y focal; NF: no filiada; GN IgA: glomerulonefritis IgA; HSIF: hialinosis segmentaria y focal; PQR: poliquistosis renal; FRI: función retrasada del injerto; TR: trasplante renal.

Al no haber ningún parámetro clínico alterado, no se dispone de biopsia renal de ninguno de los pacientes del grupo control.

### 5.1.3 Aislamiento de las vesículas extracelulares en orina

Las oVE se obtuvieron según la metodología descrita previamente. Para determinar en qué fracciones se encontraban las oVE, se analizó la presencia de tetraspaninas CD9 y CD63 mediante citometría de flujo. Se observó que la medida más alta de intensidad fluorescencia (MFI) para CD9 y CD63 se encontró en las fracciones 9-13 de cromatografía (Figura 7). Estas fracciones se utilizaron posteriormente para la extracción del miRNA vesicular.

Es importante remarcar que, en todos los experimentos realizados, las fracciones pico de tetraspanina se detectaron antes de la elución de la proteína.



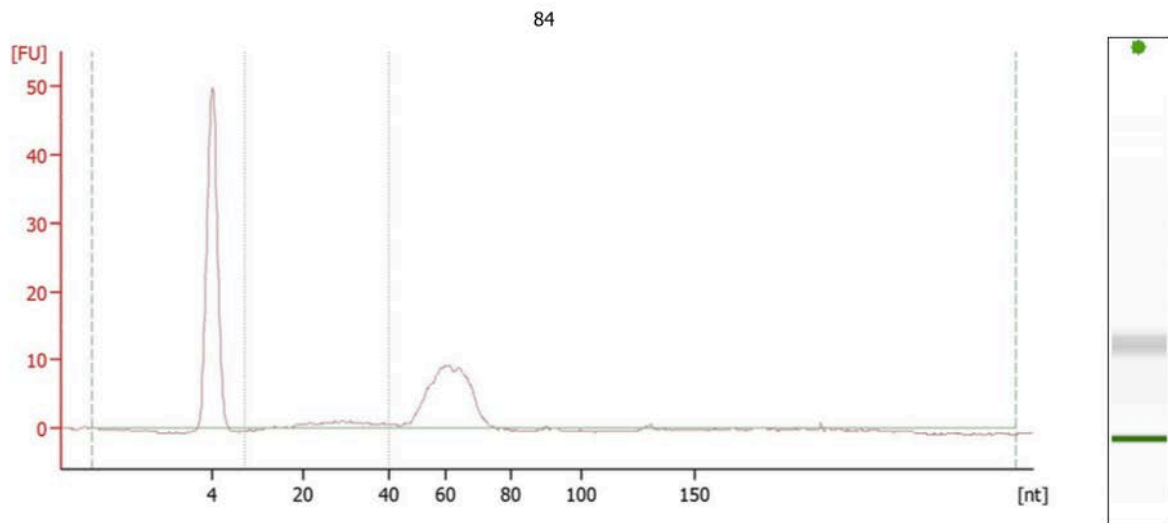
**Figura 7.** Fracciones que muestran el valor de intensidad de fluorescencia (MFI) más alto para cada marcador de CD (símbolos cuadrados de CD9 y símbolos triángulos de CD63). También se muestran las fracciones en las que se detectó el contenido de proteínas por primera vez y que siempre fue posterior a la obtención de VE (línea y símbolos azules).

#### 5.1.4 Identificación de los miRNAs mediante secuenciación masiva (NGS)

Para identificar los miRNAs expresados en las oVE se llevaron a cabo experimentos de secuenciación masiva del contenido de RNA vesicular de los pacientes con disfunción del injerto (n=14) y del grupo control (n=8).

La extracción de RNA se realizó con el kit miRCURY y se concentró mediante precipitación con glucógeno. Posteriormente, se realizó una electroforesis (Bioanalyzer 2100) que detectó la presencia de *small* RNAs (RNAs de 50 a 250 nucleótidos de longitud) en todas las muestras. Se identificaron dos tamaños de RNA: uno correspondiente a unos 20 nucleótidos (nts), que coincidió con el

tamaño esperado para los miRNA, y una segunda banda de RNA de entre 40 y 70 nts, correspondiente a moléculas de RNA de pequeño tamaño o “small RNAs”. En la Figura 8 se presenta el contenido de RNA de una de las muestras analizadas (muestra 1 FIAT).

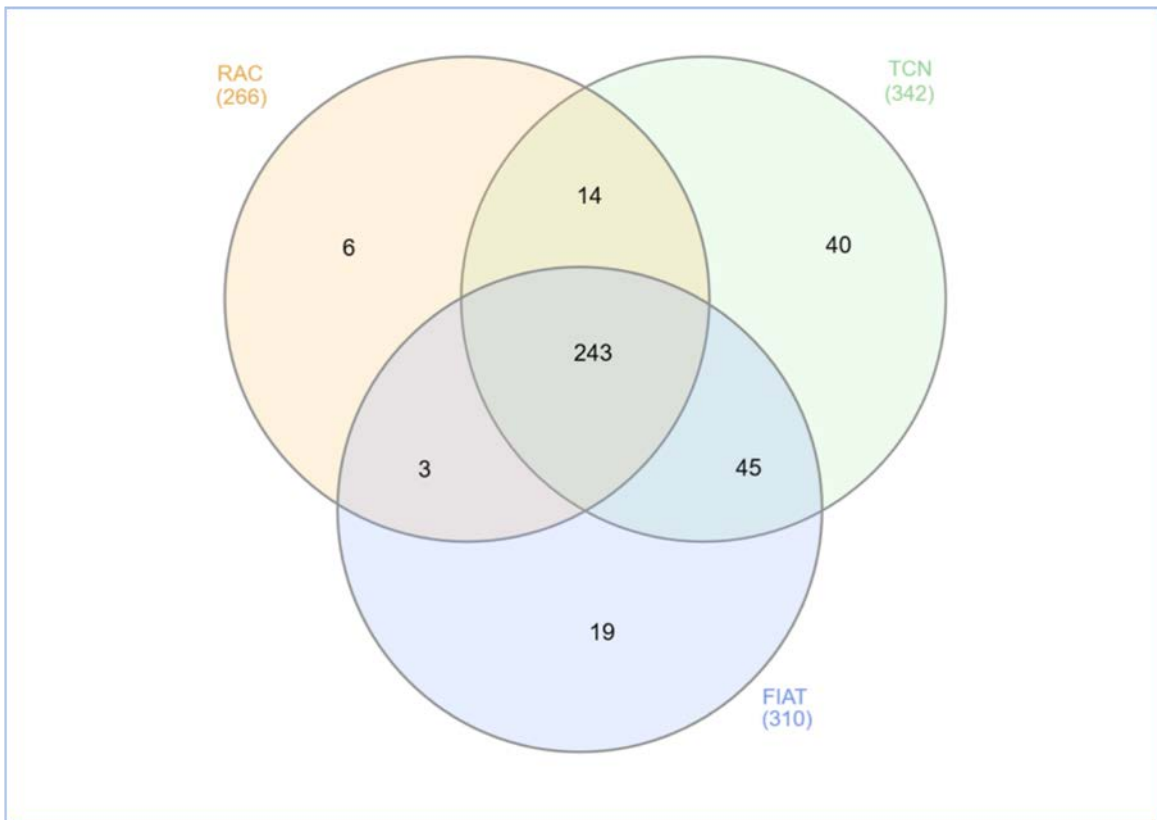


**Figura 8.** Electroferograma y gel de imagen asociada, obtenidos para la muestra de *small* RNA tras su migración en el Bioanizador 2100. El eje vertical muestra las unidades de fluorescencia (indicativo de abundancia relativa) y el eje horizontal muestra la longitud en nucleótidos del RNA.

Una vez confirmada la presencia de *small* RNAs y, en concreto, de miRNAs, se realizaron las librerías de secuenciación. Los análisis de dichos resultados se centraron específicamente en las secuencias de miRNAs y *small* RNA.

Se identificaron un total de 1.500 miRNAs. En primer lugar, se aplicó un control cualitativo que consistió en validar la presencia de un miRNA si éste se detectaba al menos 5 veces. Bajo este criterio, el número de miRNAs analizado fue de 553.

En segundo lugar, se detectaron los miRNAs exclusivos de cada grupo, se seleccionaron los miRNAs presentes en todas las muestras del mismo grupo y se contrastaron con los de los demás grupos. En la Figura 9 se muestra el diagrama de Venn resultante.



**Figura 9.** Diagrama de Venn del contenido de miRNA de los 3 grupos de patologías.

Se analizaron 310 secuencias de los pacientes diagnosticados con FIAT, 266 secuencias de los pacientes diagnosticados con RAC y 342 de los pacientes diagnosticados con TCN. Se identificaron 243 secuencias presentes en todas las muestras (punto de intersección), 19 secuencias presentes exclusivamente en pacientes con FIAT, 6 secuencias presentes exclusivamente en pacientes con RAC y 40 secuencias exclusivas de los pacientes con FIAT.

Tras aplicar el procedimiento de normalización con el paquete DESeq2 y el test estadístico de Benjamini-Hochberg, se identificaron 26 miRNAs con mayor probabilidad de estar diferencialmente expresados entre los dos grupos (grupo de pacientes trasplantados renales que presentaban disfunción del injerto renal y grupo control de pacientes trasplantados con función renal normal). Los niveles de expresión de los 26 miRNAs identificados (con un valor de  $p < 0,05$ ) se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** MicroRNAs diferencialmente expresados en los dos grupos de pacientes

<b>miRNA</b>	<b>log2(Fold Change)</b>	<b>p-valor ajust</b>
hsa-miR-1	1,7667	0,0193
hsa-miR-2	-1,0302	0,0243
hsa-miR-3	-1,2036	0,0296
hsa-miR-4	2,0664	0,0008
hsa-miR-5	0,5262	0,0271
hsa-miR-6	-1,1106	0,0048
hsa-miR-7	-1,5534	0,6301
hsa-miR-8	-0,9261	0,0166
hsa-miR-9	0,5479	0,0271
hsa-miR-10	-2,5689	0,3440
hsa-miR-11	-2,1508	0,0051
hsa-miR-12	-2,0465	0,0077
hsa-miR-13	-1,6162	0,0271
hsa-miR-14	-1,6149	0,0361
hsa-miR-15	-1,5464	0,0271
hsa-miR-16	1,1536	0,0374
hsa-miR-17	1,3554	0,0463

hsa-miR-18	1,4450	0,0463
hsa-miR-19	2,0529	0,0305
hsa-miR-20	2,2491	0,0051
hsa-miR-21	-1,1491	0,0263
hsa-miR-22	-0,7530	0,0134
hsa-miR-23	-1,6009	0,0580
hsa-miR-24	-0,6687	0,0490
hsa-miR-25	1,4140	0,0989
hsa-miR-26	1,8668	0,0314

A partir de la identificación de estos 26 miRNAs, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de seleccionar cuáles de ellos discriminaban mejor entre los pacientes trasplantados con función renal normal y los pacientes con disfunción del injerto.

El análisis de ACP identificó 5 miRNAs que eran capaces de clasificar correctamente un 92,9% de pacientes con función renal normal. Sólo un paciente con disfunción del injerto se catalogó como paciente con función renal normal (Tabla 11).

Adicionalmente, se seleccionaron 7 miRNAs que por sus características (número de lecturas, p-valor y log2) podrían ser relevantes a pesar de no haber sido seleccionados por el análisis estadístico.



**Tabla 11.** Análisis de componentes principales

Grupo	Grupo de pertenencia			Total	
	pronosticado				
	1	2			
Original	Recuento	1	8	0	8
		2	0	14	14
	%	1	100,0	0,0	100,0
		2	0,0	100,0	100,0
Validación cruzada	Recuento	1	8	0	8
		2	1	13	14
	%	1	100,0	0,0	100,0
		2	7,1	92,9	100,0

Grupo 1: grupo control; Grupo 2: grupo con disfunción del injerto.

Con el fin de evaluar los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva, los 12 miRNAs seleccionados se validaron por RT-qPCR en una nueva cohorte de pacientes y controles.

## 5.2 Fase de validación

### 5.2.1 Grupo de pacientes con disfunción del injerto renal

#### 5.2.1.1 Características clínicas de los pacientes

Se estudió la orina de un total de 22 pacientes trasplantados renales que presentaban disfunción del injerto renal.

El grupo estudiado incluía 9 mujeres y 13 hombres, con una media de edad de 44 años (rango de edad entre 33 y 68 años). A todos los pacientes se les había practicado una biopsia renal por indicación clínica, alteración de la creatinina sérica o aumento de proteinuria. Cinco de ellos se habían trasplantado en la fase prediálisis y los 17 restantes llevaban un tiempo entre 4 y 120 meses en diálisis. Cuatro de los pacientes habían recibido un trasplante de vivo, mientras

que en 18 casos el riñón era procedente de un donante cadáver. Ningún paciente tenía anticuerpos antiHLA preformados previos al trasplante. Los 22 pacientes recibían tratamiento inmunosupresor estándar con prednisona, micofenolato de mofetilo y anticalcineurínicos.

Las características clínicas de los pacientes en el momento de la biopsia renal se muestran en las Tablas 12, 13 y 14.

**Tabla 12.** Características clínicas de los pacientes (I)

<b>Nº paciente</b>	<b>HTA</b>	<b>DM2</b>	<b>Creat (mg/dl)</b>	<b>Prot/creat (mg/gr)</b>
1 (FIAT)	si	no	2,49	51
2 (FIAT)	no	si	2,8	2000
3 (FIAT)	si	si	2,6	296
4 (FIAT)	si	no	3,11	1000
5 (FIAT)	si	no	1,6	1680
6 (FIAT)	si	si	2,16	210
7 (FIAT)	si	no	2,3	44
8 (RAC)	si	no	2,5	1900
9 (RAC)	si	no	1,28	321
10 (RAC)	no	no	2,49	403
11 (RAC)	si	no	1,8	43
12 (RAC)	si	si	2,29	130
13 (RAC)	no	no	0,77	457
14 (RAC)	no	no	4	10
15 (RAC)	si	no	2,11	477
16 (RAC)	no	no	2,2	463
17 (TCN)	si	no	1,58	303
18 (TCN)	no	no	6,11	113
19 (TCN)	no	si	3,17	548

20 (TCN)	si	no	2,1	58
21 (TCN)	si	si	3,7	128
22 (TCN)	si	no	4,03	286

HTA: hipertensión arterial; DM2: diabetes mellitus 2; creat: creatinina plasmática; prot/creat: proteínas/creatinina en orina.

**Tabla 13.** Características clínicas de los pacientes (II)

Nº paciente	Sexo	Edad	Tipo de TRS	Tiempo en diálisis (meses)	1r TR	Donante DV/DC
1 (FIAT)	V	57	HD	48	si	DC
2 (FIAT)	M	61	HD	98	no	DC
3 (FIAT)	V	66	preHD		si	DC
4 (FIAT)	V	67	preHD		si	DC
5 (FIAT)	V	62	HD	36	si	DC
6 (FIAT)	M	49	HD	36	si	DC
7 (FIAT)	M	57	HD	72	si	DC
8 (RAC)	V	53	preHD		si	DV
9 (RAC)	V	64	HD	24	si	DC
10 (RAC)	M	53	HD	19	si	DC
11 (RAC)	V	25	preHD		si	DV
12 (RAC)	V	29	HD	32	si	DC
13 (RAC)	V	43	HD	48	no	DC
14 (RAC)	V	65	HD	36	si	DC
15 (RAC)	V	23	preHD		si	DV

<b>16 (RAC)</b>	V	43	HD	11	si	DC
<b>17 (TCN)</b>	M	50	HD	48	si	DC
<b>18 (TCN)</b>	M	41	HD	>120	no	DC
<b>19 (TCN)</b>	V	54	HD	4	si	DV
<b>20 (TCN)</b>	M	57	HD	10	si	DC
<b>21 (TCN)</b>	M	36	HD	42	si	DC
<b>22 (TCN)</b>	M	56	HD	20	si	DC

V: varón; M: mujer; HD: hemodiálisis; DV: donante vivo; DC: donante cadáver; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; RAC: rechazo agudo celular; TRS: tratamiento renal sustitutivo.

**Tabla 14.** Características clínicas de los pacientes (III)

<b>Nº paciente</b>	<b>HLA</b>	<b>Mismatch</b>	<b>Ac HLA preTR</b>	<b>Tratamiento inicial</b>	<b>ERC de base</b>	<b>tiempo desde TR (meses)</b>	<b>FRI</b>
<b>1 (FIAT)</b>	A33, A68, B40, B44, DR01, DR04	2A, 2B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	48	no
<b>2 (FIAT)</b>	A2, A-, B60, B-, DR11, DR13	0A, 2B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	PQR	98	no
<b>3 (FIAT)</b>	A24, A29, B15, B44, DR07, DR13	1A, 2B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	GN mesangial	17	no
<b>4 (FIAT)</b>	A02, A03, B15, B18, DR03, DR16	2A, 2B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	ND	9	no
<b>5 (FIAT)</b>	A02, A32, B07, B 49, DR01, DR11	2A,0B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	36	si
<b>6 (FIAT)</b>	A1, A2, B44,	2A, 2B, 1DR	no	prednisona,	RVU	36	no

	B56, DR3, DR6				FK, MMF			
<b>7 (FIAT)</b>	A02, A03, B27, B35, DR11, DR13	1A, 2B, 0DR	no		prednisona, FK, MMF	IgA	72	no
<b>8 (RAC)</b>	A3, A32, B7, B38, DR1, DR11	2A, 1B, 2DR	no		prednisona, FK, MMF	GN mesangi al	<1	no
<b>9 (RAC)</b>	A1, A6, B27, B57, DR7, DR14	2A,2B,1 DR	no		prednisona, FK, MMF	escleros is tuberos a	24	si
<b>10 (RAC)</b>	A01, A24, B35, B39, DR14, DR16	2A, 1B, 2DR	no		prednisona, FK, MMF	NF	19	
<b>11 (RAC)</b>	A02, A03, B51, B52, DR 7, DR 15	1A, 1B, 1DR	no		prednisona, FK, MMF	NF	<1	no
<b>12 (RAC)</b>	A01, A02, B08, B44, DR 03, DR 04	1A,1B, 1DR	no		prednisona, FK, MMF	NF	32	no
<b>13 (RAC)</b>	A02, A32, B15, B45, DR 03, DR 13	1A, 2B, 0DR	no		prednisona, FK, MMF	NF	48	no
<b>14 (RAC)</b>	A02, A68 , B14, B27, DR 11, DR-	2A, 2B, 1DR	no		prednisona, FK, MMF	HSIF	36	no
<b>15 (RAC)</b>	A24, A30, B14, B18, DR15, DR 04	1A, 1B, 1DR	no		prednisona, FK, MMF	NF	>120	no
<b>16 (RAC)</b>	A02, A33, B35, B44, DR 01, DR 11	1A,1B, 1DR	no		prednisona, FK, MMF	NF	11	no
<b>17 (TCN)</b>	A26, A-, B14, B5, DR 7, DR13	1A, 2B, 0DR	no		prednisona, FK, MMF	PQR	48	no

<b>18 (TCN)</b>	A01,A32, B35, B51, DR 04, DR03	2A,0B,0DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	>120	si
<b>19 (TCN)</b>	A2, A31, B40, B51, DR 4, DR13	1A,2B,2DR	no	prednisona, FK, MMF	NF	4	no
<b>20 (TCN)</b>	A25, A29, B18, B44, DR07, DR15	1A,2B,2DR	no	prednisona, FK, MMF	PQR	10	no
<b>21 (TCN)</b>	A68,A29, B51,B 44, DR13, DR 07	2A,1B,1 DR	no	prednisona, FK, MMF	nefrocal cinosis	42	no
<b>22 (TCN)</b>	A01, A02, B15, B57, DR 04, DR15	1A,1B,1DR	no	prednisona, FK,MMF	HSiF	20	si

HLA: human leukocyte antigens; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; RAC: rechazo agudo celular; ERC: enfermedad renal crónica; FK: tacrolimus; MMF: micofenolato de mofetilo; HSIF: hialinosis segmentaria y focal; NF: no filiada; GN IgA: glomerulonefritis IgA; PQR: poliquistosis renal; FRI: función retrasada del injerto.

### 5.2.1.2 Características histológicas de la biopsia renal

Los 22 pacientes trasplantados renales se clasificaron en función del diagnóstico anatomopatológico en tres grupos: pacientes diagnosticados de FIAT, pacientes diagnosticados de RAC y pacientes diagnosticados de TCN.

El grupo de pacientes etiquetados como FIAT presentaron diferentes grados de fibrosis, afectación glomerular y vascular (ver Tabla 15).

**Tabla 15.** Características histológicas de los pacientes diagnosticados de FIAT

Nº paciente	Grado de fibrosis	Glomérulos esclerosados	Hialinosis	C4d
1	I	1/7	leve	-
2	II	-	severa	-
3	II	5/9	moderada	-
4	II	3/11	severa	-
5	I	2/12	leve	-
6	I	7/14	severa	-
7	II	5/24	leve	-

El grupo de pacientes diagnosticados de rechazo agudo celular se clasificaron en función del tipo de rechazo en: tipo IA (3), IIA (4), IB (1), IIB (1).

En todos los casos, la afectación por FIAT fue inferior al 10% y el grado de esclerosis glomerular inferior al 10%, sin presentar fibrosis intersticial/atrofia vascular y con inmunotinción para C4d y SV40 negativas.

El grupo de pacientes con TCN presentó como hallazgo anatomopatológico principal, arteriopatía hialina severa y/o vacuolización isométrica del epitelio tubular.

### 5.2.2 Grupo control

Los sujetos incluidos en el grupo control fueron 8 pacientes trasplantados renales con función renal normal. En las Tablas 16 y 17 se presentan las características clínicas de este grupo.

El grupo estudiado incluyó 7 varones y 1 mujer, con una media de edad de 54 años (rango de edad entre 45 y 67 años). Uno de ellos se había trasplantado en la fase prediálisis y los 7 pacientes restantes llevaban en diálisis entre 7 y 60 meses. Tres de los pacientes habían recibido un trasplante de vivo, mientras

que en los otros cinco casos el riñón era procedente de un donante cadáver. Ningún paciente tenía anticuerpos antiHLA preformados previos al trasplante. Todos los pacientes incluidos recibían tratamiento inmunosupresor estándar con prednisona, tacrolimus y micofenolato de mofetilo en el momento de la biopsia.

Uno de los pacientes incluidos era diabético y cinco de ellos eran hipertensos controlados con medicación antihipertensiva. Todos tenían función renal normal con creatinina dentro del rango de la normalidad y un FG superior a 80 ml/min/1,72m<sup>2</sup>.

**Tabla 16.** Características clínicas del grupo control (I)

Nº paciente	Sexo	Edad	Tipo de TRS	Tiempo en diálisis (meses)	1r TR	Donante DV/DC
1	V	57	HD	18	si	DC
2	M	64	HD	60	si	DC
3	V	57	HD	12	no	DC
4	V	53	HD	48	si	DV
5	V	56	HD	24	si	DV
6	V	45	preHD	-	si	DV
7	V	46	HD	12	si	DC
8	V	61	HD	7	si	DC

V: varón; M: mujer; HD: hemodiálisis; TR: trasplante renal; TRS: tratamiento renal sustitutivo; DV: donante vivo; DC: donante cadáver.



**Tabla 17.** Características clínicas del grupo control (II)

<b>N<sup>a</sup> paciente</b>	<b>HLA</b>	<b>Mismatch</b>	<b>Ac HLA preTR</b>	<b>Tratamiento inicial</b>	<b>ERC de base</b>	<b>tiempo desde TR (meses)</b>	<b>FRI</b>
<b>1</b>	A3, A30, B7, B50, DR1, DR15	2A, 1B, 0DR	no	prednisona, FK, MMF	HSIF	25	No
<b>2</b>	A2, 3, B7, B8, DR03, DR13	0A, 1B, 0DR	no	prednisona, FK, MMF	GN IgA	>120	no
<b>3</b>	A01, A03, B07, B44, DR01, DR04	1A, 1B, 1DR	no	prednisona, FK	PQR	>120	no
<b>4</b>	A02, A26, B15, B41, DR07, DR-	0A, 1B, 0DR	no	prednisona, CsA, MMF	GN IgA	118	no
<b>5</b>	A01, A-, B08, B15, DR03, DR13	2A, 2B, 1Dr	no	prednisona, FK, MMF	GN MB	>120	no
<b>6</b>	A02, A24, B18, B35, DR03, DR14	0A, 1B, 0DR	no	prednisona, FK, MMF	GN IgA	60	no
<b>7</b>	A24, A32, B38, B49, DR01, DR03	1A, 1B, 1DR	no	prednisona, FK, MMF	RVU	>120	no
<b>8</b>	A24, A25, B18, B51, DR7, DR15	1A, 1B 1DR	no	prednisona, FK, MMF	NTIC	118	no

HLA: human leukocyte antigens; TR: trasplante renal; HSIF: hialinosis segmentaria y focal; GN IgA: glomerulonefritis IgA; GN MB: glomerulonefritis membranosa; RVU: reflujo besico uretral; NTIC: nefritis túbulo intersticial crónica.

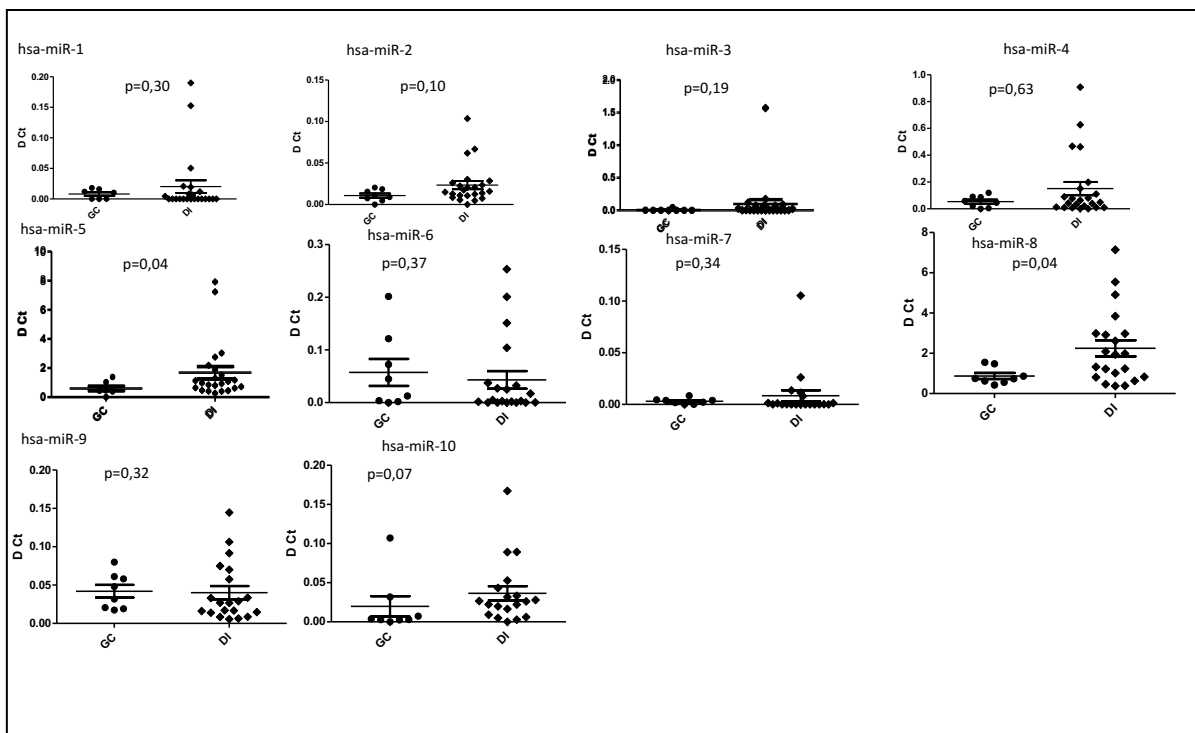
### 5.2.3 Validación de los miRNAs diferencialmente expresados mediante qRT-PCR

Se realizó mediante qRT-PCR la validación de los 12 miRNAs seleccionados que mostraron diferencias de expresión entre pacientes trasplantados con función renal normal y pacientes con disfunción del injerto.

Dos de los miRNAs no pudieron evaluarse debido a que no se produjo amplificación, probablemente por un mal funcionamiento de la sonda Taqman, ya que tampoco se observó amplificación en el control positivo correspondiente.

### 5.2.4 Comparación de los niveles de expresión de los miRNAs

De los 10 miRNAs estudiados, las diferencias en las expresiones de hsa-miR-5 y hsa-miR-8 entre los dos grupos de pacientes llegaron a alcanzar niveles estadísticamente significativos (Figura 10).



**Figura 10.** Comparación de los miRNAs entre el grupo de pacientes con disfunción del injerto (DI) y grupo control (GC) (Mann-Whitney).

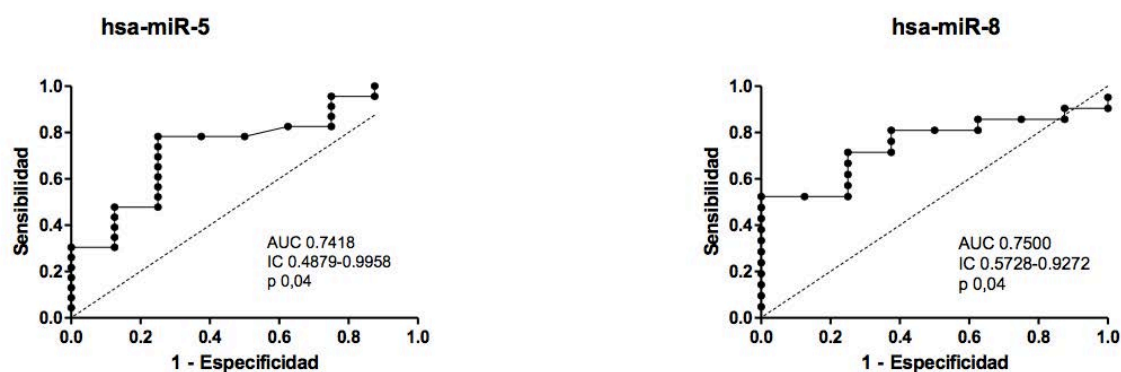
#### 5.2.4.1 Utilidad diagnóstica de los miRNAs en la disfunción renal de cualquier etiología

Para discriminar los pacientes con disfunción del injerto renal de los pacientes del grupo control con función renal normal, se realizaron curvas ROC para cada uno de los miRNAs, considerando que la capacidad discriminativa mejora a medida que el área bajo la curva (AUC) se acerca al valor de 1.

Las AUCs variaron entre 0,55 y 0,74 (Tabla 18), siendo este valor superior a 0,7 para hsa-miR-5 y hsa-miR-8 (Figura 11), con una  $p < 0,05$ , lo que sugiere que ambos miRNAs podrían ser útiles en el diagnóstico de los pacientes con disfunción del injerto.

**Tabla 18.** Área bajo la curva (AUC) para los diferentes miRNAs

miRNA	AUC	IC 95%	p-valor
hsa-miR-1	0,6335	0,4308-0,8363	0,2918
hsa-miR-2	0,6957	0,4999-0,8914	0,1042
hsa-miR-3	0,6576	0,4606-0,8547	0,1905
hsa-miR-4	0,5598	0,3366-0,7830	0,6195
hsa-miR-5	0,7418	0,4879-0,9958	0,0446
hsa-miR-6	0,6125	0,3771-0,8479	0,3600
hsa-miR-7	0,6188	0,3829-0,8546	0,3340
hsa-miR-8	0,7500	0,5728-0,9272	0,0404
hsa-miR-9	0,6250	0,4216-0,8284	0,3092
hsa-miR-10	0,7237	0,4782-0,9692	0,0710



**Figura 11.** Curvas ROC para hsa-miR-5 y hsa-miR-8.

Con la finalidad de aumentar el AUC, para obtener una mejor sensibilidad y especificidad, se estudió la posibilidad de realizar combinaciones de los miRNAs, utilizando aquellos con mejor potencial diagnóstico.

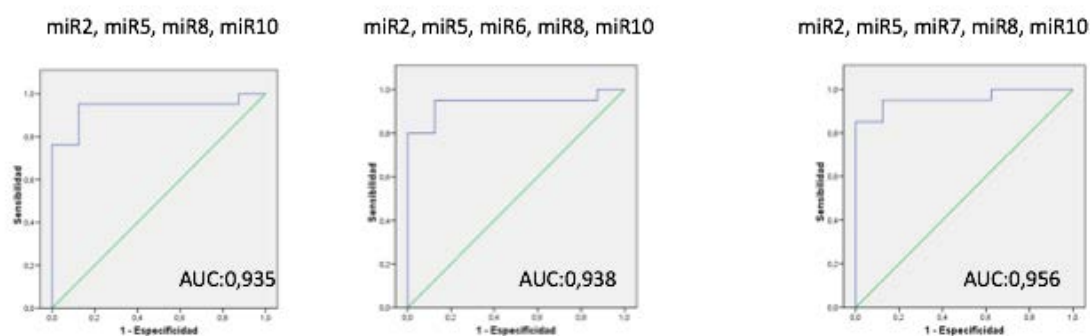
La combinación de dos de los miRNAs estudiados generó valores de AUC entre 0,43 y 0,89. Al añadir un tercer miRNA a la combinación de dos de los miRNA con mejor poder diagnóstico, el AUC aumentó hasta 0,923. Finalmente, la combinación de cuatro de los 10 miRNAs estudiados aumentó el valor del AUC, situándolo entre 0,88 y 0,93 (Tabla 19).

**Tabla 19.** Área bajo la curva (AUC) para combinaciones de 4 miRNAs

miRNAs	AUC	p-valor	IC 95
2, 5, 8, 10	0,935	<0,001	0,839-1,031
2, 5, 6, 8	0,888	0,002	0,730- 1,042
2, 5, 7, 8	0,906	0,001	0,782-1,036
1, 2, 5, 8	0,911	0,001	0,785-1,307

AUC: área bajo curva; IC: intervalo de confianza.

Añadiendo un quinto miRNA a la combinación de 4 miRNAs con mejor poder diagnóstico, obtuvimos un AUC entre 0,938-0,956, sugiriendo que la combinación de 5 miRNAs es útil para diferenciar los pacientes con disfunción del injerto de los pacientes control (Figura 12).



**Figura 12.** Áreas bajo la curva (AUC) obtenidas tras la combinación de 4 y 5 miRNAs.

#### 5.2.4.2 Poder diagnóstico de los miRNA en la disfunción renal de diferentes etiologías

Para evaluar el papel de los miRNAs en el diagnóstico de las diferentes causas de disfunción del injerto analizamos el poder diagnóstico de cada uno de ellos.

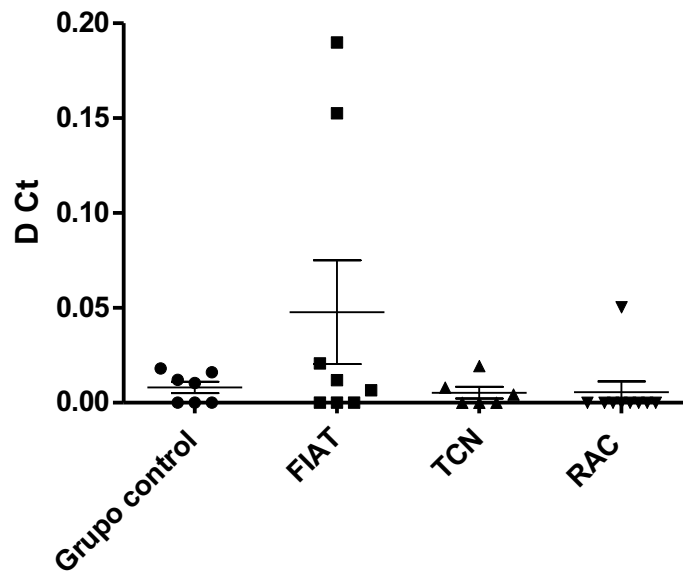
##### A. hsa-miR-1 en el diagnóstico de disfunción renal

En la Figura 13 se puede observar la distribución de hsa-miR-1 en cada grupo del estudio. La expresión de hsa-miR-1 fue homogénea para todos los pacientes con RAC, a excepción de uno que mostró una expresión diferente.

Analizando las características de los pacientes diagnosticados con RAC mediante biopsia renal, la mayoría de ellos presentaron rechazo en el primer año post-trasplante, exceptuando dos de los pacientes, que fueron diagnosticados a los 3 y a los 15 años tras el trasplante renal.

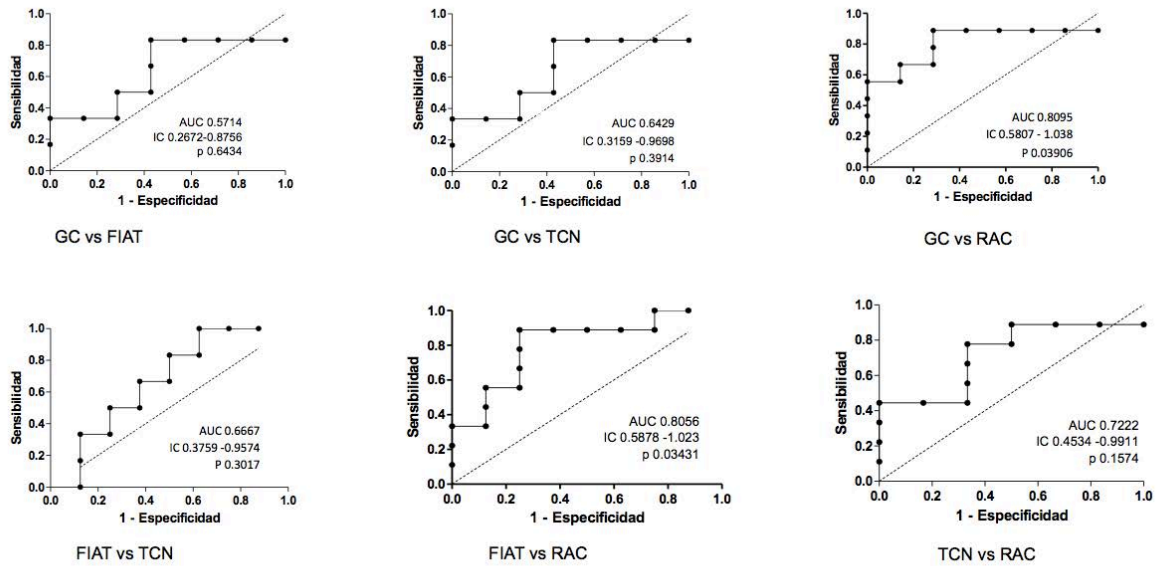
Según la clasificación de Banff, los pacientes presentaban grados diferentes de rechazo agudo celular (3 IA, 4 IIA, 1 IB, 1 II B), pero no había variabilidad en cuanto al grado de fibrosis ni al de esclerosis glomerular dentro del grupo,

exceptuando el paciente biopsiado 15 años tras el trasplante, que presentaba un grado marcado de fibrosis intersticial, atrofia tubular y afectación vascular en forma de hialinosis. Este paciente presenta una expresión de hsa-miR-1 distinta al resto de los pacientes diagnosticados de RAC.



**Figura 13.** Resultados de ensayos de validación mediante RT-q-PCR para hsa-miR-1. FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

En la figura 14 se presentan las AUC para el hsa-miR-1 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto.

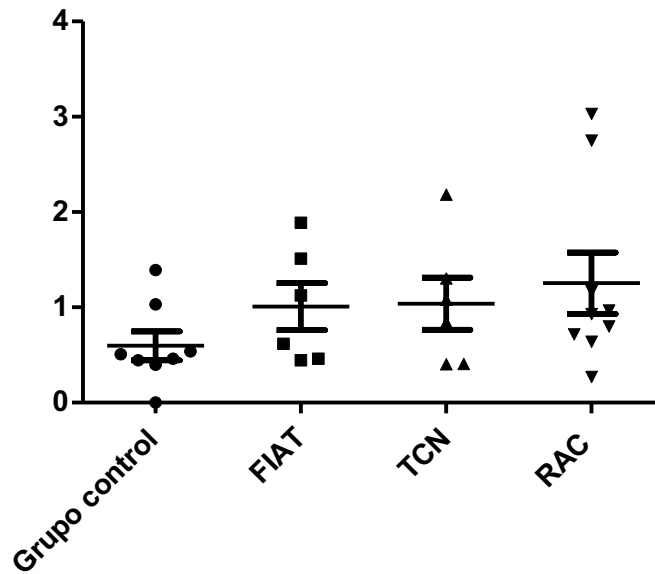


**Figura 14.** Área bajo la curva (AUC) para el hsa-miR-1 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto. GC: grupo control; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

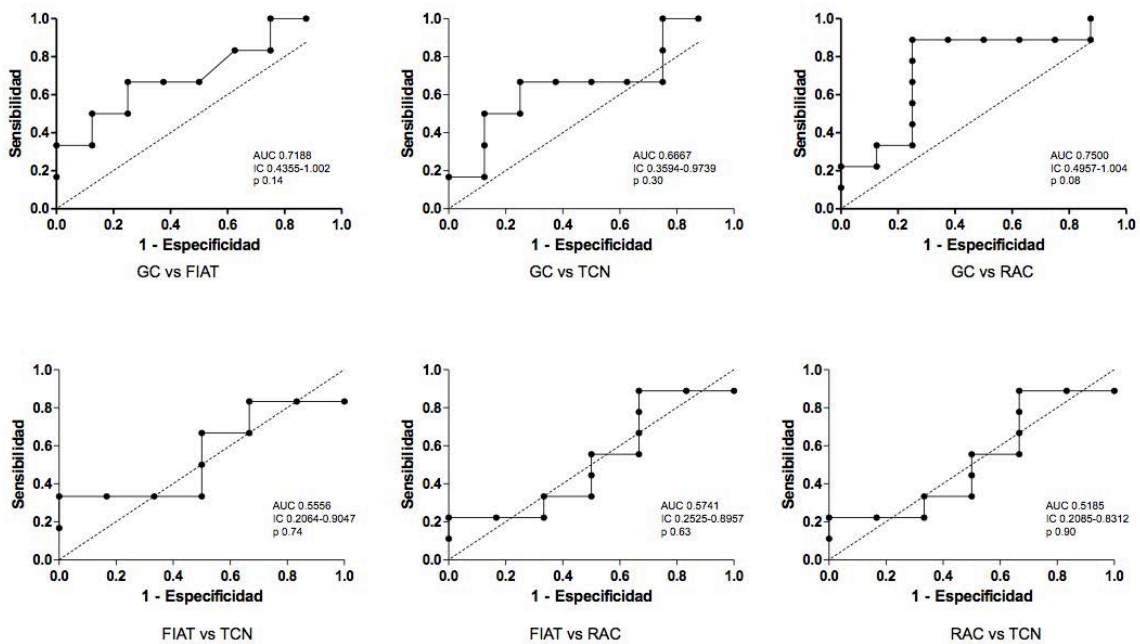
Por lo tanto, el hsa-miR-1 muestra potencial diagnóstico y podría ser útil para detectar pacientes con RAC, diferenciándolos de aquellos que presentan FIAT, TCN o pacientes con función renal normal (del grupo control).

#### B. hsa-miR-5 en el diagnóstico de disfunción renal

Los niveles de expresión de hsa-miR-5 fueron ligeramente superiores en todos los grupos con respecto al grupo control y, especialmente, en el grupo de pacientes diagnosticados de RAC (ver Figura 15). Por lo tanto, hsa-miR-5 se podría considerar como un marcador útil para discriminar pacientes con RAC de pacientes del grupo control (AUC=0,75; Figura 16). Sin embargo, los valores de AUC de la curva ROC no alcanzaron significación estadística, debido probablemente al pequeño tamaño de la muestra.



**Figura 15.** Resultados de ensayos de validación por RT-q-PCR para hsa-miR-5. FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.



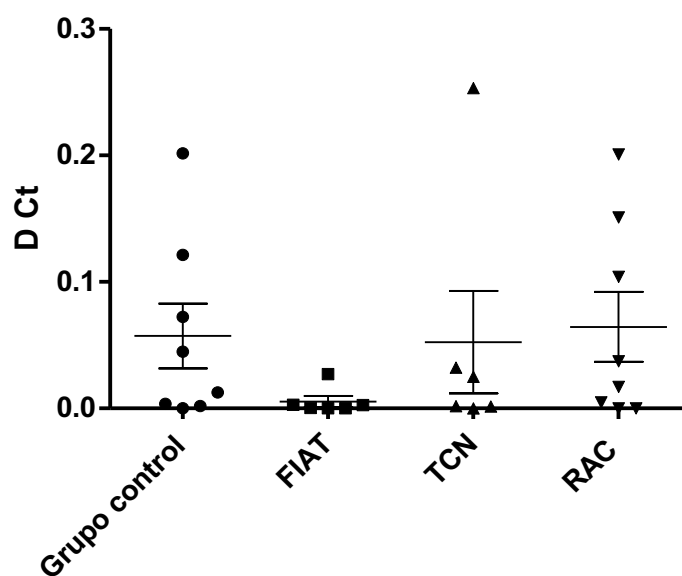
**Figura 16.** Área bajo la curva (AUC) para hsa-miR-5 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto. GC: grupo control; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.



### C. Papel del hsa-miR-6 en el diagnóstico de disfunción renal

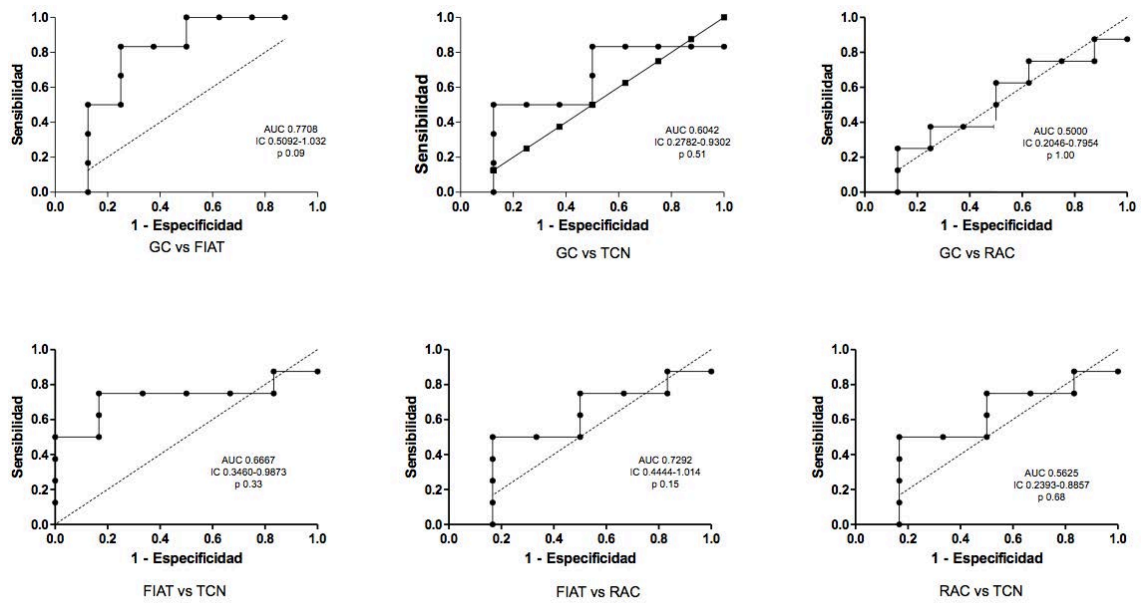
Los niveles de expresión de hsa-miR-6 se mostraron muy homogéneos dentro del grupo de los pacientes con FIAT y con más variaciones en el grupo control y las otras patologías (Figura 17).

Todos los pacientes del grupo FIAT tenían una alteración de la función renal con aumento de la creatinina en el momento de la biopsia. Todas las biopsias del grupo FIAT presentaban como hallazgo principal diferentes grados de fibrosis intersticial/atrofia, con o sin inflamación en las áreas de fibrosis.



**Figura 17.** Resultados de ensayos de validación mediante RT-q-PCR para hsa-miR-6. FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

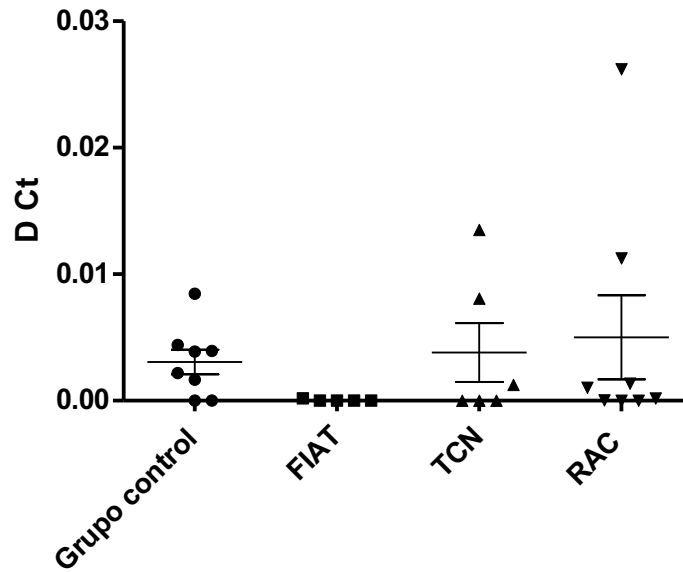
Dada la particular distribución observada, hsa-miR-6 podría considerarse un marcador útil para discriminar los pacientes con FIAT del grupo control (AUC=0,77; Figura 18) y de los pacientes con RAC (AUC=0,72; Figura 18). Como en el caso anterior, el escaso número de pacientes analizados no permite alcanzar diferencias significativas.



**Figura 18.** Área bajo la curva (AUC) para hsa-miR-6 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto. GC: grupo control; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

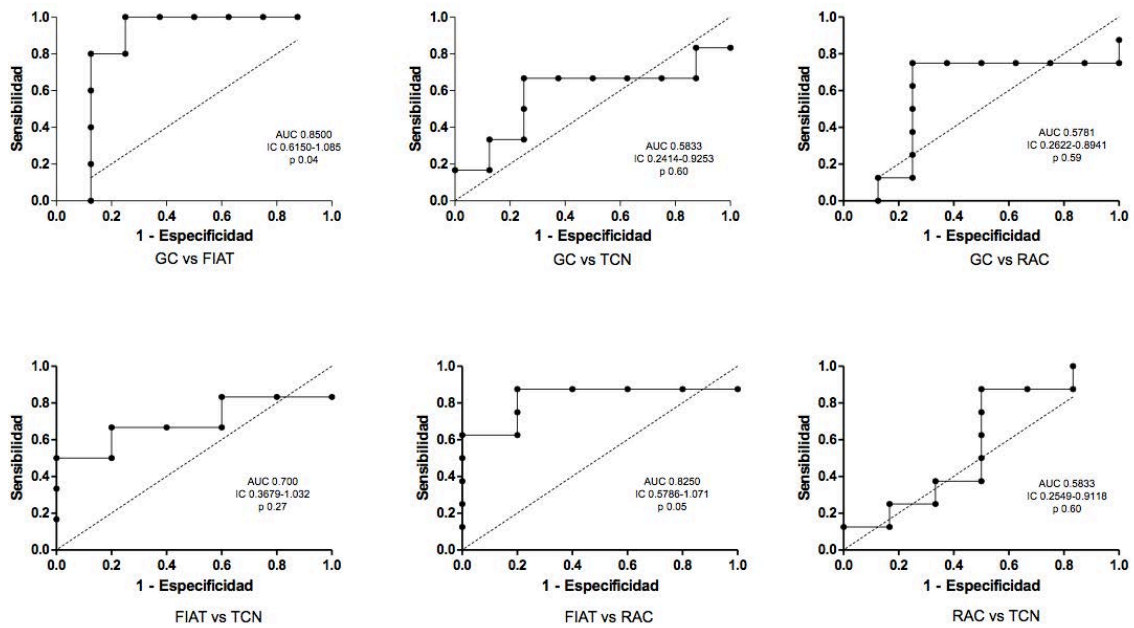
#### D. hsa-miR-7 en el diagnóstico de disfunción renal

De forma similar a lo observado en el caso anterior, hsa-miR-7 presentó niveles de expresión parecidos para los pacientes que pertenecían al grupo FIAT, mientras que los niveles de expresión fueron más variables en los pacientes del grupo control y los que presentaban un RAC o una TCN.



**Figura 19.** Resultados de ensayos de validación mediante RT-q-PCR para hsa-miR-7. FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

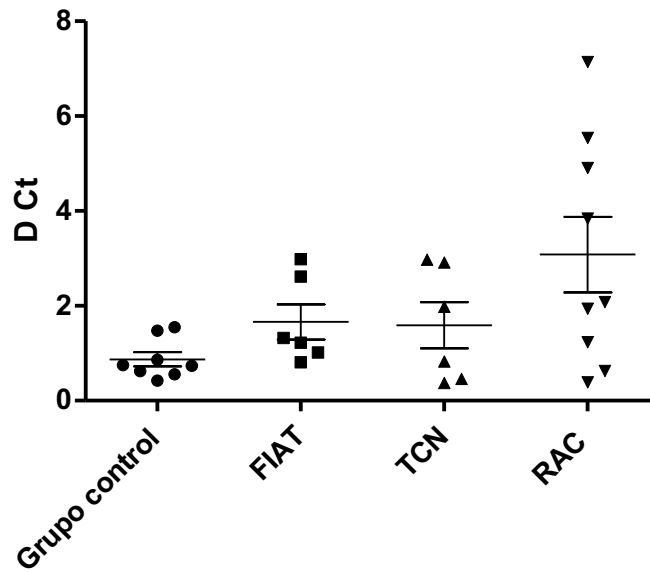
Los resultados obtenidos sugieren la utilidad de hsa-miR-7 como biomarcador capaz de discriminar pacientes con FIAT del grupo control, así como de aquellos que presentan un RAC o una TCN. En este caso, y a pesar del reducido número de pacientes, cabe señalar que sí se obtuvieron índices de significación en las curvas ROC que relacionan FIAT con Control ( $p=0,04$ ) y FIAT con RAC ( $p=0,05$ ), lo que refuerza la descripción del marcador (Figura 20).



**Figura 20.** Área bajo la curva (AUC) para hsa-miR-7 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto. GC: grupo control; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

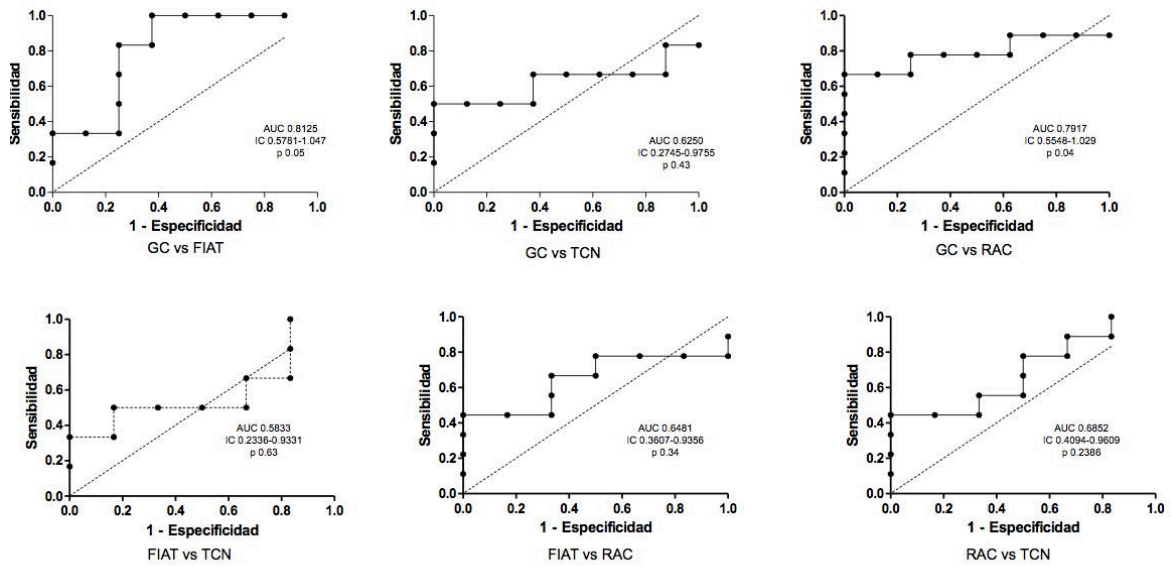
### E. hsa-miR-8 en el diagnóstico de disfunción renal

El miRNA hsa-miR-8 presentó niveles de expresión diferentes para el grupo control en comparación con los pacientes que presentaron FIAT, RAC o TCN en la biopsia renal (ver Figura 21). Este miRNA es uno de los más expresados en los procesos patológicos estudiados.



**Figura 21.** Resultados de ensayos de validación mediante RT-q-PCR para hsa-miR-8. FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

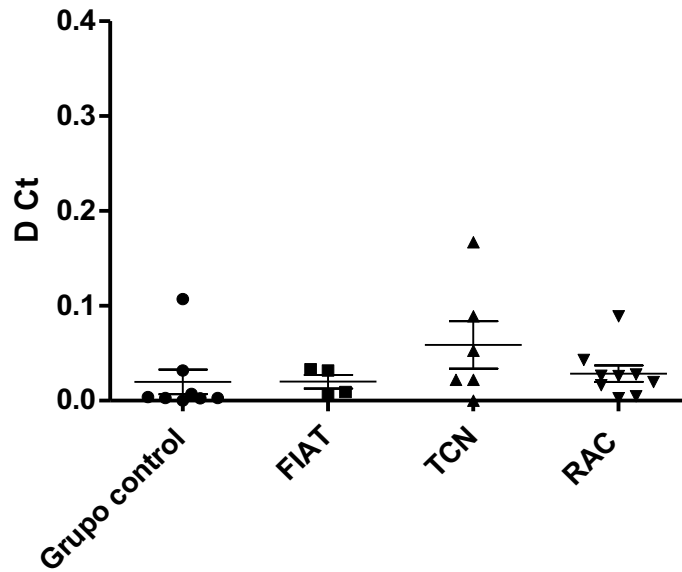
Por lo tanto, hsa-miR-8 podría ser un marcador útil para discriminar entre el grupo control y los que presentan FIAT, RAC o TCN. Nuevamente, los índices de significación alcanzados en la comparativa entre el grupo control y FIAT, así como el grupos control y RAC, son indicativos de la posible utilidad de este miRNA para discernir entre procesos patológicos y una situación estable (Figura 22).



**Figura 22.** Área bajo la curva (AUC) para hsa-miR-8 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto. GC: grupo control; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

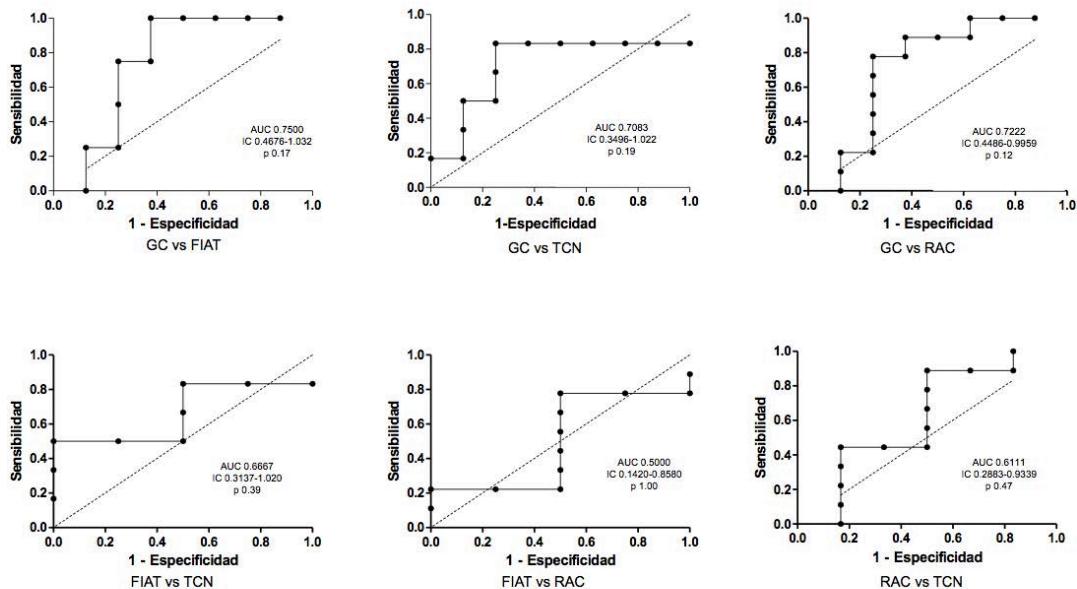
#### F. hsa-miR-10 en el diagnóstico de disfunción renal

Por último, hsa-miR-10 presentó niveles de expresión diferentes para el grupo control en comparación con los pacientes que presentaban FIAT o TCN en la biopsia renal (Figura 23). En este caso, destaca la homogeneidad de la expresión del marcador en todos los grupos, excepto en el caso de los TCN.



**Figura 23.** Resultados de ensayos de validación por RT-q-PCR para hsa-miR-10. FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.

El miRNA hsa-miR-10 es un marcador que podría discriminar entre el grupo control y los pacientes con FIAT o con TCN (Figura 24).



**Figura 24.** Área bajo la curva (AUC) para hsa-miR-8 en las diferentes etiologías de la disfunción del injerto. GC: grupo control; FIAT: fibrosis intersticial atrofia tubular; TCN: toxicidad por anticalcineurínicos; RAC: rechazo agudo celular.



The image features a white background with a fine, vertical-lined texture. On the right side, there is an abstract watercolor-style artwork. It consists of various colored splatters and dots in shades of yellow, blue, green, and red. A prominent yellow shape, resembling a leaf or a splash, is located in the middle-right area. Below it, there are several blue and green dots of varying sizes. A small red dot is visible at the bottom right corner. The overall composition is minimalist and artistic.

# DISCUSIÓN





# DISCUSIÓN

El trasplante renal sigue siendo la mejor opción de tratamiento renal sustitutivo para los pacientes con enfermedad renal crónica avanzada. Sin embargo, a pesar de los avances médicos de los últimos años, un número destacado de pacientes trasplantados desarrollan disfunción del injerto y con necesidad posterior de reiniciar diálisis[22]. Por consiguiente, es necesaria una monitorización intensiva de estos pacientes que permita obtener un diagnóstico precoz de la disfunción del injerto.

La biopsia renal es la herramienta actual más precisa para el diagnóstico de la patología del riñón trasplantado. No obstante, la biopsia no se puede realizar de forma repetida ni puede formar parte del seguimiento rutinario del paciente trasplantado, por lo que resulta esencial encontrar biomarcadores fiables y no invasivos que permitan una detección precoz de la disfunción del injerto renal.

En nuestro caso, escogimos la orina (y no sangre/suero/plasma o tejido) como muestra biológica para identificar potenciales biomarcadores. Las ventajas que presenta la orina frente a otras muestras es su elevada disponibilidad, así como la ausencia de riesgos y molestias para el paciente durante la recogida.

La identificación de miRNA en las oVE genera amplias posibilidades de investigación y respalda la hipótesis de que las VE pueden representar un vehículo a través del cual una célula se comunica con otra.

En este trabajo decidimos utilizar las oVE por distintas razones. En primer lugar, el contenido de las oVE refleja el estado del riñón y de la vía urinaria y ha demostrado ser una fuente importante de biomarcadores en el campo de la nefrología[109]. En efecto, se ha descrito que las VE poseen un alto contenido en miRNAs, que parecen estar específicamente empaquetados y exclusivamente expresados[110]. Además, el estudio de los miRNAs en las oVE ha ido adquiriendo una importancia creciente en el ámbito de la fisiopatología renal[111]. Su principal ventaja respecto a otros biomarcadores está relacionada con su estabilidad. A diferencia del estudio de orina completa o de los *pellets* de orina, el contenido de las oVE está protegido por una capa

bilipídica que impide su degradación[112]. En consecuencia, su contenido se considera más puro y más específico de lo que ocurre en el riñón.

Aunque se requieren cohortes grandes para confirmar su utilidad, los miRNAs pueden cumplir con los criterios de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad requeridos en un biomarcador ideal y no invasivo[113].

Esta tesis doctoral se desarrolló en dos fases, que en realidad fueron dos estudios complementarios: una fase inicial de *Discovery* y una segunda fase de validación de los resultados obtenidos en la fase inicial.

## **6.1 Fase de *Discovery***

La parte de *Discovery* del estudio se realizó con dos cohortes: pacientes trasplantados con disfunción del injerto –a los que se les había realizado una biopsia renal por indicación clínica– y pacientes trasplantados con función renal estrictamente normal. En ambas cohortes se analizó el contenido en miRNAs de las oVE y se identificaron más de 1.500 miRNAs. Mediante distintos procesos (control cualitativo, proceso de normalización y análisis de componentes principales), se llegaron a seleccionar 5 miRNAs capaces de detectar correctamente casi un 93% de los pacientes con función renal normal. A estos 5 miRNAs se les añadieron 7 más que podían ser relevantes por sus características en cuanto número de lecturas, p y log 2. Así pues, en esta fase inicial se seleccionaron 12 miRNAs como potenciales biomarcadores (alguno de ellos descritos previamente en la patología del riñón trasplantado) en la diferenciación de pacientes trasplantados con disfunción del injerto de pacientes trasplantados con función renal normal.

## **6.2 Fase de validación**

### Comparación de los niveles de expresión de los miRNAs

Para validar nuestros resultados, en la segunda fase o fase de validación, 10 de los 12 miRNAs seleccionados –dos de los miRNAs no pudieron evaluarse debido a un error técnico– se detectaron mediante qPCR en dos nuevas cohortes: pacientes con disfunción del injerto y pacientes control trasplantados

con función renal estrictamente normal. Según los resultados obtenidos, únicamente 2 de los 10 miRNAs detectados en la fase de *Discovery* llegaron a presentar diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión entre el grupo de pacientes con disfunción del injerto y pacientes trasplantados con función renal normal.

Esta aparente discordancia entre los resultados de las dos fases pudo ser debida a las diferencias entre las plataformas utilizadas: NGS en la fase de *Discovery* y qPCR en la fase de validación. Mientras que NGS permite detectar cualquier miRNA presente en niveles suficientemente elevados, la técnica de qPCR posibilita un análisis más sensible y preciso utilizando un conjunto preseleccionado de miRNAs.

No obstante, el enfoque de utilizar una herramienta relativamente nueva como la NGS en la fase de *Discovery* y una herramienta más consolidada como la qPCR para la posterior validación, ha demostrado ser altamente rentable en estudios previos, ya que permite incluir muchas más muestras en una primera fase y aumentar la confianza estadística de los resultados posteriores[114]. La experiencia de nuestro grupo en estudios previos realizados con NGS para detectar el contenido miRNA vesicular de donante vivos y de cadáver[115] también refleja las ventajas de esta tecnología.

Así pues, la selección inicial de miRNAs llevada a cabo en la fase inicial del estudio mediante NGS permitió ampliar las posibilidades de detección de miRNAs como potenciales biomarcadores de la disfunción del injerto renal, que posteriormente se analizaron en la fase de validación.

Tras evaluar mediante qPCR los 10 miRNAs en la nueva cohorte de pacientes trasplantados con función renal normal, se estudió, por una parte, la capacidad de cada uno de los 10 miRNAs para discriminar los pacientes con disfunción del injerto renal de los pacientes trasplantados con función renal normal y, por otro lado, la utilidad de cada uno de los miRNAs para detectar una patología concreta del riñón trasplantado.

### miRNAs como marcadores del daño del injerto renal

Para discriminar los pacientes con disfunción del injerto renal de los pacientes del grupo control con función renal normal, se realizaron curvas ROC para cada uno de los miRNAs.

De los resultados obtenidos pudimos concluir que dos de los miRNAs estudiados presentaban una sensibilidad y una especificidad significativas para el diagnóstico de pacientes con disfunción del injerto. Además, se observó que la evaluación conjunta de varios miRNAs (entre 3 y 5 miRNAs) podía representar un buen test diagnóstico para detectar una alteración de la función renal en el paciente trasplantado, ya que aumentaba considerablemente el grado de significación.

Los miRNAs han sido evaluados por otros grupos de investigación como potenciales biomarcadores en el trasplante de órganos sólidos[116]:[117]. En el campo del trasplante renal, los miRNAs han surgido como potenciales protagonistas para el futuro de la investigación, aunque, hasta la fecha, el número de publicaciones sobre este tema es limitado. En la literatura actual, existen además pocos estudios que presenten resultados sobre los miRNAs en orina de pacientes trasplantados, y la mayoría de ellos se centran en patologías concretas, como el rechazo agudo[83]:[118] y la fibrosis intersticial/atrofia tubular[85]:[86].

Un estudio de muy reciente publicación investiga sobre el papel predictivo de los miRNAs en pacientes con función retrasada del injerto[119]. Utilizando la orina recogida en las primeras horas post-trasplante, los autores identifican los miRNAs en los *pellets* y posteriormente dividen los pacientes en función de si presentan o no función retrasada del injerto, seleccionando aquellos miRNAs diferencialmente expresados entre los dos grupos. A continuación, en una nueva cohorte de pacientes validan sus resultados mediante qPCR y, utilizando las curvas ROC, identifican un conjunto de 6 miRNAs capaces de identificar aquellos pacientes que van a presentar función retrasada del injerto y confirman sus hallazgos en un nuevo grupo de pacientes de un centro distinto.

Según nuestro conocimiento, hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio que investigue miRNAs en oVE en pacientes con disfunción del injerto de cualquier etiología. Tener un marcador urinario de disfunción de injerto podría ser útil si su detección pudiera predecir la alteración de los parámetros utilizados actualmente en el seguimiento rutinario del paciente trasplantado, como la creatinina y el FG, para así poder identificar aquellos pacientes con disfunción del injerto antes de que ésta fuera clínicamente evidente.

En nuestro estudio, todos los pacientes con disfunción del injerto fueron seleccionados por presentar una alteración de la función renal, con elevación de la creatinina y disminución del FG. Quedaría por demostrar el papel predictivo de los miRNAs determinados en nuestra investigación.

Una cuestión que se podría plantear sería la posible relación entre la detección de los miRNAs urinarios y la presencia de insuficiencia renal. Sin embargo, se ha demostrado que los niveles urinarios de miRNAs totales no se alteran en presencia de insuficiencia renal, aunque sí se ha descrito que induce una disminución de los miRNAs en suero[120], probablemente debido a la acumulación de RNAsas[121].

En los diferentes grupos de pacientes con disfunción del injerto de nuestro estudio, el grado de insuficiencia renal fue similar, por lo que podemos afirmar que la expresión diferencial observada de los miRNAs no es atribuible al grado de insuficiencia renal.

#### La utilidad de los miRNAs para identificar diferentes tipos de lesión renal

A continuación, evaluamos la utilidad que podrían tener cada uno de los 10 miRNAs seleccionados para discernir entre las diferentes etiologías de disfunción del injerto.

Según los hallazgos de la biopsia renal, los pacientes con disfunción del injerto se clasificaron en 3 grupos de patologías: RAC, FIAT y TCN.

Siguiendo nuestra hipótesis, exploramos la capacidad de cada uno de los miRNAs para diferenciar entre los distintos diagnósticos histológicos que presentaron los pacientes incluidos en la investigación.



### La utilidad de los miRNAs para identificar el rechazo agudo celular

Se detectaron 2 miRNAs que demostraron ser útiles en la discriminación de pacientes con RAC: hsa-miR-1, que permitió diferenciar entre los pacientes con RAC y el grupo control, así como entre los pacientes con RAC y los pacientes que presentaron las otras dos patologías analizadas; y hsa-miR-5, que presentó capacidad de discriminar pacientes con RAC de pacientes del grupo control.

El rechazo agudo celular se suele diagnosticar en las primeras semanas del trasplante renal, aunque puede aparecer meses o años después del mismo[122], sobre todo en relación a una falta de adherencia al tratamiento. Es por ello que un diagnóstico precoz resulta de gran utilidad para un abordaje terapéutico focalizado en la mejora del pronóstico.

En los últimos años, en el mundo del trasplante de órganos se han realizado grandes esfuerzos dirigidos a la posible identificación de marcadores no invasivos de rechazo agudo[123]. Aunque parece ser que la interacción entre los mRNA y los miRNAs es crucial, siguen sin conocerse los mecanismos moleculares específicos del rechazo agudo. Así que, hasta la fecha, ninguno de los marcadores estudiados se ha introducido en la aplicación clínica de rutina.

En muy pocos estudios se ha abordado la asociación entre miRNAs urinarios y el rechazo mediado por células T. En el estudio del grupo de Lorenzen y col.[83], se examinó el perfil de los miRNAs urinarios en muestras de orina de cinco pacientes con rechazo agudo y cinco pacientes con función del injerto estable. Se detectó que los miRNA-10a, miRNA-10b y miRNA-210 se expresaban de manera diferencial en los pacientes que presentaban rechazo en comparación con los controles. Los resultados fueron validados posteriormente en una nueva cohorte de 62 pacientes con rechazo agudo, 19 pacientes con función renal estable y 13 pacientes con función renal estable e infección del tracto urinario, confirmando que los niveles de miR-210 disminuían sólo en pacientes con rechazo agudo. Otro estudio reciente multicéntrico, prospectivo analiza el papel predictivo de rechazo agudo de ciertos miRNAs previamente seleccionados[124]. En dicho trabajo, detectaron

una expresión diferencial de los miRNA-142-3p, miRNA-155-5p y miRNA-210-3p en los *pellets* de orina de los pacientes, antes y durante el episodio del rechazo, con una capacidad excelente –según las curvas ROC– del mi-RNA-155-5p de diferenciar los pacientes que van a presentar un rechazo . Sin embargo, no realizaron la validación posterior en una nueva cohorte.

Hasta la fecha, ninguno de los estudios publicados investiga el papel de los miRNA en oVE en el RAC. En nuestro estudio, identificamos 2 miRNAs en oVE, que podrían ser útiles para detectar los pacientes que presentan RAC. Cabe destacar que uno de los pacientes que fueron diagnosticados de RAC presentó una expresión distinta de hsa-miR-1. Dicho paciente desarrolló rechazo agudo a los 15 años tras el trasplante renal y, a nivel histológico presentaba, además, un marcado grado de fibrosis intersticial y hialinosis a nivel vascular. Podemos por lo tanto intuir que, en este caso, la utilidad de hsa-miR-1 para detectar RAC disminuyó dado que el paciente asociaba a nivel histológico otras lesiones. Probablemente, los miRNAs detectados en nuestro estudio como marcadores de RAC sean más útiles en aquellos pacientes que desarrollan un rechazo precoz, antes de que el injerto llegue a presentar elementos de cronicidad como la FIAT o la afectación vascular. La interpretación de dichos marcadores se debería hacer, por supuesto, siempre en el contexto clínico de cada paciente, junto con los parámetros de laboratorio utilizados en la práctica habitual y, cuando se disponga de ella, con los datos histológicos de la biopsia del donante.

Es posible que la utilidad de los miRNAs detectados en nuestro estudio sea mayor en aquellos pacientes que presentan una elevación de la creatinina sin una causa clara en los primeros meses post-trasplante, más que en aquellos que presentan una función retrasada del injerto (en este caso suele haber un componente de necrosis tubular asociada) y en pacientes con una biopsia del donante sin o con poca afectación a nivel intersticial, tubular y vascular previa a la implantación. De confirmarse su utilidad para detectar RAC en estudios prospectivos con tamaño de muestra superiores, los miRNAs detectados en el trabajo actual podrían ser de gran aplicación clínica en la detección precoz del

rechazo y, en consecuencia, se podría instaurar un tratamiento inmediato para evitar un mayor deterioro o pérdida del injerto renal.

Un aspecto a remarcar es el distinto grado de rechazo –según la clasificación de Banff (IA, IIA) –, con o sin afectación vascular, de los trasplantados incluidos en el grupo de pacientes con RAC. Por lo tanto, los marcadores detectados no podrían discernir las formas de rechazo con afectación vascular, consideradas más graves y que habitualmente requieren un tratamiento más agresivo. Aun así, nuestros hallazgos no carecen de importancia, ya que en la actualidad el tratamiento inicial del rechazo agudo, independientemente del grado de rechazo, se basa en dosis elevadas de corticoides[125].

#### La utilidad de los miRNAs para identificar fibrosis intersticial/atrofia tubular

Dos de los miRNAs analizados fueron útiles para discriminar pacientes con FIAT (hsa-miR-6 y el hsa-miR-7) del resto de pacientes (pacientes del grupo control y pacientes con las otras patologías analizadas).

La FIAT representa un término descriptivo e inespecífico. Todas las patologías que afectan al riñón trasplantado acaban generando fibrosis intersticial y atrofia tubular. Aunque es una lesión evidenciada sobre todo en patología crónica, se ha descrito que este proceso se inicia precozmente tras el trasplante y se puede objetivar en pacientes con una buena función del injerto[126] con una incidencia de hasta un 50% en el primer año, un 70% en el segundo año y hasta un 100% a los 10 años del trasplante[127]:[26].

Claramente, la progresión de la fibrosis se asocia a un deterioro funcional y a un peor pronóstico del injerto renal[128]:[129]. Por esta razón, resulta primordial encontrar un biomarcador no invasivo de monitorización que detecte la lesión histológica antes de que ésta sea clínicamente evidente.

Las publicaciones sobre los miRNAs urinarios en la FIAT son escasas. De ellas, cabe destacar las publicaciones del grupo de Scian. En uno de los estudios[84], identifican 3 miRNAs (miRNA-142-3p, miRNA-211, miRNA-204) diferencialmente expresados en los *pellets* de orina de 7 pacientes con FIAT versus 7 pacientes con función renal normal, que posteriormente validan en una cohorte de 36 pacientes. El mismo grupo[85] publicó después un trabajo

sobre el valor predictivo de los miRNAs en la FIAT. Identificaron 4 miRNAs (miRNA-99a, miRNA-140-3p, miRNA-200b y miRNA-200) diferencialmente expresados a los 3 y 20 meses en los *pellets* de orina de pacientes que a lo largo de 2 años desarrollan FIAT, en comparación con aquellos trasplantados que mantienen una función renal estable. En conjunto, los dos estudios demuestran que, probablemente, para la monitorización del injerto sería más útil el análisis de un conjunto de miRNAs que un solo miRNA.

En ocasiones, los resultados publicados son contradictorios. En un estudio reciente[86], relativamente pequeño, se muestra la capacidad de mi-RNA21 y mi-RNA 200b en orina para discriminar los trasplantados con FIAT de los que presentan función renal normal. En este último estudio, FIAT se asoció a niveles altos de mi-RNA-200b, mientras que en el estudio de Maluf y col.[85] se encontraron niveles bajos del mismo mi-RNA-200b en los pacientes con FIAT.

En el presente trabajo detectamos dos miRNAs que podrían ser útiles para discernir FIAT (hsa-miR-6 y hsa-miR-7). Los pacientes incluidos en el grupo FIAT presentaron biopsias renales con FIAT como principal lesión histológica, sin otras lesiones asociadas. En la práctica habitual, pocas veces las biopsias presentan lesiones histológicas “exclusivas” de un solo compartimento. Las biopsias que llegan a ser diagnósticas de un fenotipo concreto no superan el 30% y, aún en estas situaciones, suelen haber cambios histológicos asociados[23]. En muchas ocasiones, el patólogo se limita a describir la situación de cada elemento del riñón. Un biomarcador que pueda marcar estos hallazgos añadidos (grado de fibrosis, esclerosis glomerular o vascular) sería también de gran importancia, en especial en relación al pronóstico del injerto.

#### La utilidad de los miRNAs para identificar toxicidad por anticalcineurínicos

Ninguno de los miRNAs analizados demostró tener una expresión diferencial en el grupo de pacientes etiquetados como TAC.

Durante las últimas décadas se ha postulado que el uso crónico de los inhibidores de calcineurina contribuyen a la pérdida tardía del trasplante y pueden ser la causa principal de daño crónico del injerto renal[130].

Las lesiones histológicas comúnmente atribuidas a la "nefrotoxicidad de CsA" crónica no fueron lo suficientemente específicas en estudios posteriores para diagnosticar definitivamente la TAC. Shanoudj y col.[131] encontraron hialinosis arteriolar, considerada como la lesión patológica más específica de la TAC, presente en el 65% de los pacientes que nunca tuvieron ninguna exposición a los anticalcineurínicos, hechos reafirmados en la revisión de Mengel y col.[132], que concluyeron que no existe un diagnóstico histológico específico de TAC.

En el presente trabajo, clasificamos en el grupo TAC aquellos pacientes que presentaban lesiones histológicas clásicamente descritas como TAC, principalmente arteriopatía hialina nodular. Intentamos que los grupos fueran homogéneos en cuanto el grado de fibrosis y de afectación vascular. Sin embargo, la arteriopatía hialina, al ser un hallazgo histológico probablemente no propio de la TAC, abría la posibilidad de que no todos nuestros pacientes presentasen arteriopatía hialina secundaria a la toxicidad por anticalcineúricos. Este hecho, además de contar con un número limitado de pacientes, podría explicar la falta de encontrar un miRNA capaz de discriminar los pacientes con TAC.

En la literatura actual encontramos tan solo un estudio[133] sobre el poder diagnóstico de los miRNAs en la TAC. Se trata de un estudio en animales con toxicidad inducida por ciclosporina, que detecta 76 miRNAs expresados de manera diferencial en el tejido renal de los animales con TAC frente a los controles.

### **6.3 Ventajas y limitaciones de este estudio**

La utilidad de nuestros hallazgos reside en la posibilidad de detectar por un método completamente no invasivo la presencia de alteraciones en el riñón trasplantado.

Una limitación de nuestro estudio es el limitado tamaño muestral del ensayo de validación, por lo que nuestros resultados deben considerarse como preliminares. Sería necesario realizar una validación posterior en una cohorte ampliada para poder establecer adecuadamente su valor diagnóstico.

Otra limitación que se podría plantear es el elevado coste económico y de tiempo invertido en el aislamiento y la cuantificación de los miRNAs, así como en la obtención de los resultados. Por lo tanto, se requeriría una mayor optimización de estos procedimientos antes de su aplicación en la práctica clínica habitual[134]. Aun así, si tenemos en cuenta que se puede establecer un diagnóstico precoz con un biomarcador fiable y así instaurar de manera inmediata el tratamiento adecuado, se podría evitar la pérdida del injerto renal, con sus inherentes consecuencias a nivel de supervivencia y calidad de vida del paciente trasplantado. En consecuencia, la determinación de miRNAs en orina se podría considerar un procedimiento coste-efectivo, aunque serían necesarios estudios de coste-efectividad para poder realizar una correcta valoración. En este sentido, cabe destacar que hoy en día la qPCR es una herramienta de diagnóstico ampliamente utilizada en medicina para la detección de virus, bacterias y hongos patogénicos. Esta prueba ofrece gran sensibilidad y especificidad en un tiempo corto y con un coste menor[135], de modo que, una vez establecidos los miRNAs en oVE específicos para un diagnóstico concreto, se podría utilizar la qPCR sobre estos miRNAs e identificar aquellos miRNAs “patológicos”.







# CONCLUSIONES





# CONCLUSIONES

- 1) En una fase inicial de *Discovery*, mediante técnicas de NGS, se identificaron un total de 26 miRNA diferencialmente expresados entre el grupo de pacientes trasplantados renales con disfunción del injerto de cualquier etiología y el grupo control de pacientes trasplantados con función renal normal.
- 2) Doce de estos 26 miRNAs permitieron discriminar entre los pacientes trasplantados con función renal normal y los pacientes con disfunción del injerto.
- 3) En la fase de validación, sólo dos de los 12 miRNAs identificados, concretamente hsa-miR-5 y hsa-miR-8, presentaron diferentes niveles de expresión estadísticamente significativos entre el grupo de pacientes con disfunción del injerto y el grupo control.
- 4) La combinación de 3 o más de estos miRNAs (incluyendo los miRNA 5 y 8) fue útil para diferenciar con mayor grado de significación los pacientes con disfunción del injerto de los pacientes del grupo control.
- 5) El hsa-miR-1 y el hsa-miR-5 se expresaron de manera diferencial en el grupo de los pacientes con RAC respecto a los pacientes del grupo control y a los pacientes con otras patologías (FIAT y TCN).
- 6) El hsa-miR-6 y el hsa-miR-7 se expresaron de manera diferencial en el grupo de los pacientes con FIAT respecto al resto de los pacientes (pacientes del grupo control y pacientes con otra de las patologías analizadas).







# LÍNEAS DE FUTURO





# LÍNEAS DE FUTURO

En el desarrollo del proyecto actual han surgido ideas que podrían convertirse en líneas de investigación futuras para mejorar y ampliar el conocimiento actual sobre el tema. A continuación se enumeran algunas de ellas:

- La primera línea de continuación de este trabajo de investigación sería validar nuestros resultados, aún preliminares, en un mayor número de pacientes.
- Un aspecto a tener en cuenta del presente trabajo es que los miRNAs identificados detectan el daño renal ya instaurado. En un futuro, para confirmar la capacidad de estos miRNAs de detectar de forma precoz la patología del injerto antes de que ésta se presente clínicamente de forma evidente, se podría plantear la posibilidad de monitorizar al paciente trasplantado de forma rutinaria mediante la detección de los miRNAs y realizar una biopsia renal si se hallaran alteraciones en los miRNAs descritos como “patológicos”.
- Otra posible línea de trabajo podría consistir en estudiar el comportamiento de los miRNAs tras la instauración del tratamiento, y así confirmar si pueden ser utilizados también para comprobar la respuesta terapéutica.
- Por otro lado, se podría plantear la utilidad de los miRNAs como diana terapéutica, con dos posibles enfoques: inhibición de los miRNAs para reducir su sobreexpresión y reemplazo de miRNA para restaurar su expresión.







# BIBLIOGRAFÍA





# BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. S. Cabrera, “Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica . Prevalencia . de riesgo de enfermedad renal crónica,” *Nefrología*, 2004.
- [2] J. Coresh *et al.*, “Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States,” *JAMA*, vol. 298, no. 17, p. 2038, 2007.
- [3] R. Saran *et al.*, “US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States,” *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 69, no. 3, pp. A7–A8, 2017.
- [4] K. Brück *et al.*, “CKD Prevalence Varies across the European General Population.,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016.
- [5] W. M. McClellan, R. D. Langston, and R. Presley, “Medicare patients with cardiovascular disease have a high prevalence of chronic kidney disease and a high rate of progression to end-stage renal disease.,” *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, 2004.
- [6] E. F. Elsayed *et al.*, “Cardiovascular disease and subsequent kidney disease,” *Arch. Intern. Med.*, 2007.
- [7] V. Jha *et al.*, “Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives,” *Lancet*, 2013.
- [8] H. L. Hillege *et al.*, “Renal function as a predictor of outcome in a broad spectrum of patients with heart failure,” *Circulation*, 2006.
- [9] N. S. Anavekar *et al.*, “Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction.,” *N. Engl. J. Med.*, 2004.
- [10] A. S. Go, G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch, and C. Hsu, “Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 13, pp. 1296–305, 2004.
- [11] K. Matsushita *et al.*, “Association of estimated glomerular filtration rate

and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis," *Lancet*, vol. 375, no. 9731, pp. 2073–2081, 2010.

- [12] R. Lozano *et al.*, "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010," *Lancet*, 2012.
- [13] U. S. R. D. S. U. 2011 A. D. R. A. of C. K. D. and E.-S. R. D. in the United, "USRDS 2011 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States," *Bethesda, MD Natl. Institutes Heal. Natl. Inst. Diabetes Dig. Kidney Dis. Bethesda, MD*, 2011.
- [14] D. E. Hricik *et al.*, "Life satisfaction in renal transplant recipients: preliminary results from the transplant learning center.," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 38, no. 3, pp. 580–587, 2001.
- [15] C. G. Rabbat, K. E. Thorpe, J. D. Russell, and D. N. Churchill, "Comparison of mortality risk for dialysis patients and cadaveric first renal transplant recipients in Ontario, Canada.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 11, no. 5, pp. 917–22, 2000.
- [16] R. A. Wolfe *et al.*, "Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant," *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, no. 23, pp. 1725–1730, 1999.
- [17] M. J. Pérez-Sáez, E. Arcos, J. Comas, M. Crespo, J. Lloveras, and J. Pascual, "Survival Benefit From Kidney Transplantation Using Kidneys From Deceased Donors Aged  $\geq 75$  Years: A Time-Dependent Analysis," *Am. J. Transplant.*, vol. 16, no. 9, pp. 2724–2733, 2016.
- [18] J. Lloveras, E. Arcos, J. Comas, M. Crespo, and J. Pascual, "A Paired Survival Analysis Comparing Hemodialysis and Kidney Transplantation From Deceased Elderly Donors Older Than 65 Years," *Transplantation*, vol. 99, no. 5, pp. 991–996, 2015.

- [19] R. Saran *et al.*, “US Renal Data System 2017 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States,” *American Journal of Kidney Diseases*, 2018.
- [20] D. Rennie, “Home dialysis and the costs of uremia,” *N. Engl. J. Med.*, 1978.
- [21] USRDS, “2015 USRDS Annual Data Report Volume 1: CKD in the United States,” *United States Ren. Data Syst.*, vol. 1, pp. 1–120, 2016.
- [22] K. E. Lamb, S. Lodhi, and H.-U. Meier-Kriesche, “Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal,” *Am. J. Transplant.*, vol. 11, no. 3, pp. 450–62, 2011.
- [23] Z. M. El-Zoghby *et al.*, “Identifying specific causes of kidney allograft loss,” *Am. J. Transplant.*, vol. 9, no. 3, pp. 527–535, 2009.
- [24] J. R. Chapman, P. J. O’Connell, and B. J. Nankivell, “Chronic renal allograft dysfunction,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 10, pp. 3015–26, 2005.
- [25] K. Solez *et al.*, “Banff ’05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (‘CAN’),” in *American Journal of Transplantation*, 2007, vol. 7, no. 3, pp. 518–526.
- [26] B. J. Nankivell, R. J. Borrows, C. L.-S. Fung, P. J. O’Connell, R. D. M. Allen, and J. R. Chapman, “The natural history of chronic allograft nephropathy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 24, pp. 2326–33, 2003.
- [27] M. Haas *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,” in *American Journal of Transplantation*, 2018.
- [28] B. D. Myers, J. Ross, L. Newton, J. Luetscher, and M. Perlroth, “Cyclosporine-Associated Chronic Nephropathy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 311, no. 11, pp. 699–705, 1984.
- [29] A. J. Matas, “Chronic progressive calcineurin nephrotoxicity: An overstated concept,” *American Journal of Transplantation*, vol. 11, no. 4.

pp. 687–692, 2011.

- [30] K. W. Group, “KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients.,” *Am. J. Transplant*, vol. 9 Suppl 3, pp. S1-155, 2009.
- [31] M. Mayersohn, K. Conrad, and R. Achari, “The influence of a cooked meat meal on creatinine plasma concentration and creatinine clearance.,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1983.
- [32] K. Solez, F. Vincenti, and R. S. Filo, “Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tarolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group,” *Transplantation*, vol. 66, no. 12, pp. 1736–1740, 1998.
- [33] A. S. Levey *et al.*, “Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO),” *Kidney Int.*, vol. 67, no. 6, pp. 2089–2100, 2005.
- [34] D. W. Cockcroft and H. Gault, “Prediction of Creatinine Clearance from Serum Creatinine,” *Nephron*, vol. 16, no. 1, pp. 31–41, 1976.
- [35] A. Earley, D. Miskulin, E. J. Lamb, A. S. Levey, and K. Uhlig, “Estimating equations for glomerular filtration rate in the era of creatinine standardization: A systematic review,” *Annals of Internal Medicine*. 2012.
- [36] F. F. Horber, J. Scheidegger, and F. J. Frey, “Overestimation of renal function in glucocorticosteroid treated patients,” *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 28, no. 5, pp. 537–541, 1985.
- [37] W. El Haggan *et al.*, “The Evolution of Weight and Body Composition in Renal Transplant Recipients: Two-Year Longitudinal Study,” *Transplant. Proc.*, vol. 38, no. 10, pp. 3517–3519, 2006.
- [38] M. K. Shamseddin and G. A. Knoll, “Posttransplantation proteinuria: An approach to diagnosis and management,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 6, no. 7, pp. 1786–1793, 2011.
- [39] H. Reichel, M. Zeier, and E. Ritz, “Proteinuria after renal transplantation: Pathogenesis and management,” *Nephrology Dialysis Transplantation*,

- vol. 19, no. 2, pp. 301–305, 2004.
- [40] J. I. Roodnat *et al.*, “Proteinuria after renal transplantation affects not only graft survival but also patient survival.,” *Transplantation*, vol. 72, no. 3, pp. 438–44, 2001.
- [41] a Sancho *et al.*, “Risk factors and prognosis for proteinuria in renal transplant recipients.,” *Transplant. Proc.*, vol. 39, no. 7, pp. 2145–7, 2007.
- [42] C. Ponticelli and G. Graziani, “Proteinuria after kidney transplantation,” *Transplant International*, vol. 25, no. 9. pp. 909–917, 2012.
- [43] S. K. Rodgers, C. P. Sereni, and M. M. Horrow, “Ultrasonographic evaluation of the renal transplant,” *Radiologic Clinics of North America*, vol. 52, no. 6. pp. 1307–1324, 2014.
- [44] C. Jimenez, M. O. Lopez, E. Gonzalez, and R. Selgas, “Ultrasonography in kidney transplantation: values and new developments,” *Transplant. Rev.*, 2009.
- [45] I. A. Al-Awwa, S. Hariharan, and M. R. First, “Importance of allograft biopsy in renal transplant recipients: correlation between clinical and histological diagnosis.,” *Am. J. kidney Dis.*, vol. 31, no. 6 Suppl 1, pp. S15-8, 1998.
- [46] R. R. Redfield *et al.*, “Nature, timing, and severity of complications from ultrasound-guided percutaneous renal transplant biopsy,” *Transpl. Int.*, vol. 29, no. 2, pp. 167–172, 2016.
- [47] B. Peters *et al.*, “A study of clinical complications and risk factors in 1001 native and transplant kidney biopsies in Sweden,” *Acta radiol.*, vol. 55, no. 7, pp. 890–896, 2013.
- [48] W. L. Whittier, “Complications of the Percutaneous Kidney Biopsy,” *Advances in Chronic Kidney Disease*, vol. 19, no. 3. pp. 179–187, 2012.
- [49] A. Preda, L. C. Van Dijk, J. A. Van Oostaijen, and P. M. T. Pattynama, “Complication rate and diagnostic yield of 515 consecutive ultrasound-guided biopsies of renal allografts and native kidneys using a 14-gauge Biopty gun,” *Eur.Radiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 527–530, 2003.



- [50] M. Antonieta Azancot *et al.*, “The reproducibility and predictive value on outcome of renal biopsies from expanded criteria donors,” *Kidney Int.*, vol. 85, no. 5, pp. 1161–1168, 2014.
- [51] P. N. Furness *et al.*, “International variation in histologic grading is large, and persistent feedback does not improve reproducibility.,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 27, no. 6, pp. 805–810, 2003.
- [52] M. M. and R.-A. M.A., “Percutaneous renal graft biopsy: a clinical, laboratory and pathological analysis,” *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 1999.
- [53] A. Schwarz *et al.*, “Protocol biopsy program after renal transplantation: Structure and first results,” *Transplant. Proc.*, 2002.
- [54] B. Sis, G. S. Jhangri, S. Bunnag, K. Allanach, B. Kaplan, and P. F. Halloran, “Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates Antibody-mediated damage despite lack of C4d staining,” *Am. J. Transplant.*, 2009.
- [55] P. F. Halloran, K. S. Famulski, and J. Reeve, “Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples,” *Nature Reviews Nephrology*. 2016.
- [56] A. J. Atkinson *et al.*, “Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework,” *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 69, no. 3. pp. 89–95, 2001.
- [57] M. Salvadori and A. Tsalouchos, “Biomarkers in renal transplantation: An updated review,” *World J. Transplant.*, vol. 7, no. 3, p. 161, 2017.
- [58] S. V. Bontha, D. G. Maluf, T. F. Mueller, and V. R. Mas, “Systems Biology in Kidney Transplantation: The Application of Multi-Omics to a Complex Model,” *American Journal of Transplantation*. 2017.
- [59] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*,” *Cell*, 1993.
- [60] A. Kozomara and S. Griffiths-Jones, “MiRBase: Annotating high

- confidence microRNAs using deep sequencing data," *Nucleic Acids Res.*, 2014.
- [61] Y. V. Pabón-Martínez, "MicroARNs: una visión molecular TT - MicroRNA (miRNA): A molecular view," *Rev. la Univ. Ind. Santander. Salud*, 2011.
- [62] J. A. Vidigal and A. Ventura, "The biological functions of miRNAs: Lessons from in vivo studies," *Trends in Cell Biology*. 2015.
- [63] A. A. Dar, S. Majid, D. De Semir, M. Nosrati, V. Bezrookove, and M. Kashani-Sabet, "miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein," *J. Biol. Chem.*, 2011.
- [64] A. E. Kulozik, "Stay Tuned: miRNA Expression and Nonsense-Mediated Decay in Brain Development," *Molecular Cell*. 2011.
- [65] J. F. He, Y. M. Luo, X. H. Wan, and D. Jiang, "Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis," *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2011.
- [66] K. Bhatt, Q.-S. Mi, and Z. Dong, "microRNAs in kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles," *AJP Ren. Physiol.*, vol. 300, no. 3, pp. F602–F610, 2011.
- [67] A. Krupa, R. Jenkins, D. D. Luo, A. Lewis, A. Phillips, and D. Fraser, "Loss of MicroRNA-192 Promotes Fibrogenesis in Diabetic Nephropathy," *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2010.
- [68] G. Wang *et al.*, "Intrarenal expression of miRNAs in patients with hypertensive nephrosclerosis," *Am. J. Hypertens.*, 2010.
- [69] J. G. Godwin, X. Ge, K. Stephan, A. Jurisch, S. G. Tullius, and J. Iacomini, "Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010.
- [70] W. Sui, Y. Dai, Y. Huang, H. Lan, Q. Yan, and H. Huang, "Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation," *Transpl. Immunol.*, vol. 19, no. 1, pp. 81–85, 2008.
- [71] D. Anglicheau *et al.*, "MicroRNA expression profiles predictive of human

- renal allograft status," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 13, pp. 5330–5335, 2009.
- [72] I. Z. Ben-Dov, T. Muthukumar, P. Morozov, F. B. Mueller, T. Tuschl, and M. Suthanthiran, "MicroRNA Sequence Profiles of Human Kidney Allografts With or Without Tubulointerstitial Fibrosis," *Transplant. J.*, vol. 94, no. 11, pp. 1086–1094, 2012.
- [73] J. Wilflingseder *et al.*, "Molecular pathogenesis of post-transplant acute kidney injury: Assessment of whole-genome mRNA and miRNA profiles," *PLoS One*, 2014.
- [74] W. Sui *et al.*, "Serum MicroRNAs as New Diagnostic Biomarkers for Pre- and Post-Kidney Transplantation," *Transplant. Proc.*, vol. 46, no. 10, pp. 3358–3362, 2014.
- [75] G. Betts, S. Shankar, S. Sherston, P. Friend, and K. J. Wood, "Examination of serum miRNA levels in kidney transplant recipients with acute rejection," *Transplantation*. 2014.
- [76] L. Cheng, X. Sun, B. J. Scicluna, B. M. Coleman, and A. F. Hill, "Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine," *Kidney Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 433–444, Mar. 2018.
- [77] K. Mizuta, S. Awazu, T. Yasuda, and K. Kishi, "Purification and characterization of three ribonucleases from human kidney: Comparison with urine ribonucleases," *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990.
- [78] C. Mall, D. M. Rocke, B. Durbin-Johnson, and R. H. Weiss, "Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential," *Biomark. Med.*, vol. 7, no. 4, pp. 623–631, 2013.
- [79] H. S. Melkonyan *et al.*, "Transrenal nucleic acids: From proof of principle to clinical tests - Problems and solutions," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008.
- [80] M. Hanke *et al.*, "A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder

- cancer,” *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, 2010.
- [81] G. Wang *et al.*, “Serum and urinary free microRNA level in patients with systemic lupus erythematosus,” *Lupus*, 2011.
- [82] M. van de Vrie, J. K. Deegens, M. Eikmans, J. van der Vlag, and L. B. Hilbrands, “Urinary MicroRNA as Biomarker in Renal Transplantation,” *American Journal of Transplantation*, vol. 17, no. 5. pp. 1160–1166, 2017.
- [83] J. M. Lorenzen *et al.*, “Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients,” *Am. J. Transplant.*, vol. 11, no. 10, pp. 2221–2227, 2011.
- [84] M. J. Scian *et al.*, “MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA,” *Am. J. Transplant.*, vol. 11, no. 10, pp. 2110–2122, 2011.
- [85] D. G. Maluf *et al.*, “The urine microRNA profile may help monitor post-transplant renal graft function.,” *Kidney Int.*, vol. 85, no. 2, pp. 439–49, 2014.
- [86] S. Zununi Vahed, Y. Omid, M. Ardalan, and N. Samadi, “Dysregulation of urinary miR-21 and miR-200b associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) in renal transplant recipients,” *Clin. Biochem.*, vol. 50, no. 1–2, pp. 32–39, 2017.
- [87] P. Wolf, “The nature and significance of platelet products in human plasma,” *Br. J. Haematol.*, vol. 13, no. 3, pp. 269–288, 1967.
- [88] G. Raposo, “B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles,” *J. Exp. Med.*, 1996.
- [89] E. Cocucci, G. Racchetti, and J. Meldolesi, “Shedding microvesicles: artefacts no more,” *Trends in Cell Biology*. 2009.
- [90] G. De Palma, F. Sallustio, and F. P. Schena, “Clinical application of human urinary extracellular vesicles in kidney and urologic diseases,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 7. 2016.
- [91] E. R. Abels and X. O. Breakefield, “Introduction to Extracellular Vesicles:

- Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake,” *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 36, no. 3, pp. 301–312, 2016.
- [92] T. Pisitkun, R.-F. Shen, and M. A. Knepper, “Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, no. 36, pp. 13368–13373, 2004.
- [93] P. A. Gonzales *et al.*, “Large-Scale Proteomics and Phosphoproteomics of Urinary Exosomes,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 2, pp. 363–379, 2009.
- [94] H. Zhou *et al.*, “Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery,” *Kidney Int.*, vol. 69, no. 8, pp. 1471–1476, 2006.
- [95] K. C. Miranda *et al.*, “Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease,” *Kidney Int.*, vol. 78, no. 2, pp. 191–199, 2010.
- [96] L. Cheng, X. Sun, B. J. Scicluna, B. M. Coleman, and A. F. Hill, “Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine,” *Kidney Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 433–444, 2014.
- [97] A. Gámez-Valero, S. I. Lozano-Ramos, I. Bancu, R. Lauzurica-Valdemoros, and F. E. Borràs, “Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases,” *Frontiers in Immunology*, vol. 6, no. JAN. 2015.
- [98] S. Alvarez *et al.*, “Urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation,” *Transplant. Proc.*, vol. 45, no. 10, pp. 3719–3723, 2013.
- [99] V. Dimuccio *et al.*, “Urinary CD133+ extracellular vesicles are decreased in kidney transplanted patients with slow graft function and vascular damage,” *PLoS One*, vol. 9, no. 8, 2014.
- [100] T. K. Sigdel *et al.*, “Perturbations in the Urinary Exosome in Transplant Rejection,” *Front. Med.*, vol. 1, no. January, pp. 1–10, 2015.

- [101] P. W. Peake *et al.*, “A comparison of the ability of levels of urinary biomarker proteins and exosomal mRNA to predict outcomes after renal transplantation,” *PLoS One*, 2014.
- [102] J. Park *et al.*, “Integrated Kidney Exosome Analysis for the Detection of Kidney Transplant Rejection,” *ACS Nano*, 2017.
- [103] I. Lozano-Ramos *et al.*, “Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 4, no. 2015, 2015.
- [104] P. Fernández-Llama, S. Khositseth, P. A. Gonzales, R. A. Star, T. Pisitkun, and M. A. Knepper, “Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation,” *Kidney Int.*, 2010.
- [105] C. Thery, S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton, “Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids <http://users.ugent.be/~kraemdon/Exosomes-microvesicles/Thery%20et%20al.,%20Exosome%20Protocols.pdf>,” *Curr. Protoc. cell Biol. / Editor. board, Juan S.Bonifacino ...[et al.]*, 2006.
- [106] S. K. Channavajjalaa *et al.*, “Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2014.
- [107] M. I. Love, W. Huber, and S. Anders, “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2,” *Genome Biol.*, 2014.
- [108] Y. Benjamini and Y. Hochberg, “Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing,” *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 2018.
- [109] A. Gámez-Valero, S. I. Lozano-Ramos, I. Bancu, R. Lauzurica-Valdemoros, and F. E. Borràs, “Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases,” *Front. Immunol.*, vol. 6, no. JAN, 2015.
- [110] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall, “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells,” *Nat. Cell Biol.*, 2007.



- [111] J. M. Lorenzen, H. Haller, and T. Thum, "MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease," *Nature Reviews Nephrology*. 2011.
- [112] T. Pisitkun, R. Johnstone, and M. A. Knepper, "Discovery of Urinary Biomarkers," *Mol. Cell. Proteomics*, 2006.
- [113] V. Metzinger-Le Meuth, O. Fourdinier, N. Charnaux, Z. A. Massy, and L. Metzinger, "The expanding roles of microRNAs in kidney pathophysiology," *Nephrol. Dial. Transplant*, 2019.
- [114] T. Blondal *et al.*, "Genome-wide comparison of next-generation sequencing and qPCR platforms for microRNA profiling in serum," in *Methods in Molecular Biology*, 2017.
- [115] L.-R. S.I. *et al.*, "Molecular profile of urine extracellular vesicles from normo-functional kidneys reveal minimal differences between living and deceased donors," *BMC Nephrol.*, 2018.
- [116] J. Hu *et al.*, "Plasma microRNA, a potential biomarker for acute rejection after liver transplantation.," *Transplantation*, 2013.
- [117] J.-P. Duong Van Huyen *et al.*, "MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection.," *Eur. Heart J.*, 2014.
- [118] T. D. Domenico, G. Joelsons, R. M. Montenegro, and R. C. Manfro, "Upregulation of microRNA 142-3p in the peripheral blood and urinary cells of kidney transplant recipients with post-transplant graft dysfunction," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 2017.
- [119] U. Khalid *et al.*, "A urinary microRNA panel that is an early predictive biomarker of delayed graft function following kidney transplantation," *Sci. Rep.*, 2019.
- [120] C. S. Neal, M. Z. Michael, L. K. Pimlott, T. Y. Yong, J. Y. Z. Li, and J. M. Gleadle, "Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease.," *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 26, no. 11, pp. 3794–802, 2011.
- [121] P. S. Mitchell *et al.*, "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 30, pp.

10513–10518, 2008.

- [122] H. U. Meier-Kriesche *et al.*, “Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era,” *Transplantation*, 2000.
- [123] W. Gwinner, “Renal transplant rejection markers,” *World Journal of Urology*. 2007.
- [124] O. Millán *et al.*, “Urinary miR-155-5p and CXCL10 as prognostic and predictive biomarkers of rejection, graft outcome and treatment response in kidney transplantation,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2017.
- [125] C. Lamarche, J.-M. Côté, L. Sénécal, and H. Cardinal, “Efficacy of Acute Cellular Rejection Treatment According to Banff Score in Kidney Transplant Recipients,” *Transplant. Direct*, 2016.
- [126] Y. T. Ting, P. T. Coates, R. J. Walker, and A. D. McLellan, “Urinary tubular biomarkers as potential early predictors of renal allograft rejection,” *Nephrology*. 2012.
- [127] F. G. Cosio *et al.*, “Kidney allograft fibrosis and atrophy early after living donor transplantation,” *Am. J. Transplant.*, 2005.
- [128] M. Mengel, “Deconstructing interstitial fibrosis and tubular atrophy: a step toward precision medicine in renal transplantation,” *Kidney International*. 2017.
- [129] M. Haas, “Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy: What is in a name?,” *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2014.
- [130] N. Issa, A. Kukla, and H. N. Ibrahim, “Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: A review and perspective of the evidence,” *American Journal of Nephrology*. 2013.
- [131] R. Snanoudj *et al.*, “Specificity of histological markers of long-term CNI nephrotoxicity in kidney-transplant recipients under low-dose cyclosporine therapy,” *Am. J. Transplant.*, 2011.
- [132] M. Mengel, M. Mihatsch, and P. F. Halloran, “Histological Characteristics

- of Calcineurin Inhibitor Toxicity-There Is No Such Thing as Specificity!," *Am. J. Transplant.*, 2011.
- [133] J. L. Gooch, C. King, C. E. Francis, P. S. Garcia, and Y. Bai, "Cyclosporine A alters expression of renal microRNAs: New insights into calcineurin inhibitor nephrotoxicity," *PLoS One*, 2017.
- [134] P. Trionfini, A. Benigni, and G. Remuzzi, "MicroRNAs in kidney physiology and disease," *Nature Reviews Nephrology*. 2015.
- [135] S. A. Bustin and R. Mueller, "Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis," *Clin. Sci.*, 2005.



# PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES





# PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

1. Gámez Valero A, Lozano Ramos I, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE; “Urinary extracellular vesicles as biomarkers in kidney disease” *Frontiers in immunology* 2015 Jan 30;6:6.
2. S. Inés Lozano-Ramos, Ioana Bancu, Laura Carreras-Planella, Marta Monguió-Tortajada, Laura Cañas, Javier Juega, Josep Bonet, M. Pilar Armengol, Ricardo Lauzurica, Francesc E. Borràs. Molecular profile of urine extracellular vesicles from normo-functional kidneys reveal minimal differences between living and deceased donors. *BMC Nephrology* (2018) 19:189.
3. I. Bancu, I. Lozano, L. Cañas, J. Juega, M. Pérez R. Lauzurica, F. Borràs. Urinary miRNA as a potential biomarker in kidney transplantation ERA-EDTA Congress, May 24-27 2018, Copenhagen, Denmark. Awarded for outstanding scientific presentation. *Transplantation*: July 2018 - Volume 102 - Issue - p S59







# Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases

Ana Gámez-Valero<sup>1†</sup>, Sara Inés Lozano-Ramos<sup>1†</sup>, Ioana Bancu<sup>2</sup>, Ricardo Lauzurica-Valdemoros<sup>2</sup> and Francesc E. Borràs<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> IVECAT-Group, Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain

<sup>2</sup> Nephrology Service, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain

## Edited by:

Matias Sáenz-Cuesta, Biodonostia Health Research Institute, Spain

## Reviewed by:

Felix Royo, CIC bioGUNE, Spain  
Wei Sun, Peking Union Medical College, China

## \*Correspondence:

Francesc E. Borràs, Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Ctra. de Canyet s/n, Edifici "Escoles," Badalona 08916, Spain  
e-mail: feborras@igtp.cat

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work (Dual first authorship).

Most cells physiologically release vesicles as way of intercellular communication. The so-called Extracellular Vesicles (EVs) include exosomes, ectosomes, and apoptotic bodies, which basically differ in their composition and subcellular origin. Specifically, EVs found in urine reflect the state of the urinary system, from podocytes to renal-tubular cells, thus making them an excellent source of samples for the study of kidney physiology and pathology. Several groups have focused on defining biomarkers of kidney-related disorders, from graft rejection to metabolic syndromes. So far, the lack of a standard protocol for EVs isolation precludes the possibility of a proper comparison among the different biomarkers proposed in the literature, stressing the need for validation of these biomarkers not only in larger cohorts of patients but also considering the different methods for EVs isolation. In this review, we aim to gather the current knowledge about EVs-related biomarkers in kidney diseases, with a special emphasis in the methods used to date for EVs enrichment, and discussing the need for more specific protocols of EV isolation in clinical practice.

**Keywords: urinary extracellular vesicles, kidney disease, biomarker, therapy, isolation**

## INTRODUCTION

Extracellular Vesicles (EVs) have awakened the interest of the scientific community due to their different roles in intercellular communication, pathogenesis, drug, and gene vector delivery, and as possible reservoirs of biomarkers (1–3). These vesicles can be released from different kind of cells, from platelets to cells of the immune system and neurons, among others (4), and can be found in several body fluids, including plasma, urine, and saliva (5, 6).

The term EVs includes different types of vesicles, mainly exosomes (EXs), ectosomes, and apoptotic bodies. These distinct types of vesicles differ in several aspects (7, 8). EXs are 30–150 nm diameter vesicles derived from the inward budding of endosomal membranes, resulting in the progressive accumulation of intraluminal vesicles (known as EXs) within large multivesicular bodies (MVBs). These EXs are released to the milieu by fusion with the plasma membrane (8, 9). Ectosomes, also referred as Microvesicles (MVs) are bigger than EXs (100–1000 nm) and they are produced by the direct budding of the plasma membrane (10). Finally, dying cells also shed membranous vesicles, called apoptotic blebs, with heterogeneous shape and size (8). Hence, the different subcellular origin of EVs accounts for their specific composition and function. In this sense, EVs contain a specific subset of common proteins related to biogenesis and trafficking and also a specific signature from their cell or tissue of origin (8, 11), including protein and nucleic acids (4, 12, 13). Therefore, the study of the proteome and the nucleic acid content of EVs may provide information about the cell or tissue of origin and, importantly, their physiological state. Three public online databases including all gathered information about EV content are available: EVpedia, ExoCarta, and Vesiclepedia (2, 14–16).

Urine is a body waste fluid, which can be easily obtained, being therefore an ideal fluid for biomarker determination and analysis. But urine is a complex mixture of filtered and secreted proteins, salts, urea, and metabolites that may vary, not only in physiological situations but specially in diseases associated with renal involvement (17, 18). In addition, the protein composition of the urine is highly dependent on the glomerular filtration rate (GFR), tubular metabolism, tubular reabsorption, diet, and hydration status of the patient among others. The variation in the concentration of a certain protein could be the result of any tissue disorder or pathophysiological alteration. It is estimated that only around 3% of urine proteins are contained in urinary EVs. Therefore, potential interesting biomarkers contained in EVs may be just undetected due to their dilution in whole urine. Thus, the determination of biomarkers specifically related to urinary EVs may be of interest to uncover alterations on the renal system (18).

## ISOLATION TECHNIQUES AND METHODS TO OBTAIN URINARY EXTRACELLULAR VESICLES

The complexity of body fluids, and in this case urine, hampers the study of the specific molecular content of EVs.

A previous step to EVs isolation is the management of the sample. Based on the studies of Zhou et al. (19), which focused in the protein content of EVs, it is recommended the use of protease inhibitors in the collection containers to preserve the sample. In addition, an extensive vortex is required to recover the highest amount vesicles, as EVs could remain attached to the plastic. Samples can be either processed immediately or storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Due to the lack of consensus in the published data, the international society of EVs has recently published a position paper, in which

they recommend further studies on this issue (6). In addition, as a normal procedure in urine samples, bacterial contamination of the physiologic micro-environment should be avoided (6, 20).

Many studies conducted to date have enriched urinary EVs using methods that do not exclude the presence of non-EV contaminants. However, a gold-standard technique for isolating EVs in the clinical practice is still missing. In this section, we summarize and discuss the different methods used to isolate urinary EVs.

When initiating the isolation of urinary EVs, a first consideration has to be paid to the presence of the Tamm–Horsfall protein (THP)-also known as uromodulin-, a common component of urine samples in both physiological and pathological conditions. THP, among others proteins (such as albumin) that are increased in urine under several kidney pathologies, do interfere with urinary EVs-related biomarkers research and discovery. Therefore, pre-isolation techniques to reduce or eliminate their presence before any EVs isolation/determination are recommended (6, 21). DTT-treatment has been the most widely solution to avoid EV-entrapment by THP (22). An alternative to DTT is the use of 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic (CHAPS), a mild detergent also proposed to solubilize THP. The main advantage of CHAPS is the preservation of the protein conformation and the enzymatic activity (23). This may be important in experimental designs involving functional activities of urinary EVs. However, it has been also mentioned that CHAPS treatment is more time consuming than DTT-treatment (24). Thus, the use of each method would be directed by the final use of the sample.

Once these major contaminants are reduced, the sample is prepared for enrichment and isolation of EVs. This could be achieved following different methods.

### ULTRACENTRIFUGATION

Ultracentrifugation was first used to isolate EVs by Jonhstone and Stahl (25, 26), and since then it has been widely used for EVs isolation regardless the origin of the sample. Thus far, most studies found in the literature carry out a two-step differential ultracentrifugation (UC) to isolate EVs: a first low-speed centrifugation at  $10,000\text{--}17,000 \times g$  to eliminate cellular debris, apoptotic bodies, and larger EVs, and a second step at higher speed – ranging  $100,000\text{--}200,000 \times g$  depending on the study-, to pellet smaller EVs. In some cases, this centrifugation method could be complemented or replaced with a size filtration step to remove protein aggregates and cell debris. However, some authors consider that filtration step may fracture larger EVs in smaller ones (6).

Under pathological conditions, when glomeruli filtration is compromised, there is a massive loss of protein in urine. These proteins, together with THP and their aggregates could be co-isolated with urinary EVs. To obtain a more purified sample, the pelleted EVs by the differential UC can be processed and resolved by sucrose density gradients to remove contaminants (27). Other density gradients such as potassium bromide or iodixanol (Optiprep™) have been recently proposed to isolate EVs reducing protein contaminations in plasma (28, 29).

Although UC is the technique of reference for basic research in EVs, major drawbacks undermine their applicability in the clinical setting, including the high operator-dependent variability, the lack

of a universal protocol, the expensive equipment required, and the low throughput (30).

### FILTRATION

Filtration is based on passing the sample through a nanomembrane (in general polyethersulfone or PVDF membranes) in a short low-speed centrifugation. This method avoids UC, and can be used with low-volume samples. Cheruvanky et al. analyzed this method as a new option for isolating urinary EVs. They detected that some proteins classically related to EVs were retained by the nanomembrane, thus making necessary an extra-washing step to recover the total amount of EVs (31). In addition, Rood et al. found a low recovery of EVs markers together with co-isolation of proteins i.e., albumin within the urinary EVs pellet (21). Thus far, the protein adherence to the nanomembrane and the high protein retention are important disadvantages for isolating urinary EVs from proteinuric patients using this method. Other options, such as filtration applying vacuum or ultrafiltration, which use a low protein binding membrane, can be used to purify urinary EVs from low-volume samples (32).

### IMMUNO-AFFINITY AND PEPTIDE-BASED ISOLATION

Extracellular vesicles are characterized by the presence of several surface proteins, such as the tetraspanin family. Taking advantage of this proteins expression, several affinity-based methods have been developed to isolate EVs. These methods use antibodies (attached to magnetic beads or other supports) to specific EV proteins (4, 33). Immuno-isolation of EVs still requires a low-speed centrifugation step or magnetic techniques to concentrate vesicles (6, 24).

Ghosh et al. proposed a method for isolating EVs using a synthetic peptide with specific affinity for heat shock proteins, which are described as EVs markers (16). Similar to antibodies, this technique takes advantage of the membrane proteins present on the surface of EVs. The so-called Vn-96 peptide seems to be able to capture EVs from plasma, urine, and cell culture supernatant (34).

Nevertheless, due the lack of unequivocally specific EVs pan-markers, EVs obtained by these methods would render biased samples depending on the antibody or peptide used (9).

### AGGREGATING AGENTS

Several commercial precipitation reagents have been introduced in the last few years. These reagents such as ExoQuick-TC™, Total EX isolation reagent from Invitrogen™, Exospin™, and miRCURY™ EX isolation kit from cells, urine and CSF, among others, are based on aggregating agents followed by a low-speed centrifugation. The advantage of these methods is their easy application and faster performance, with a huge applicability in diagnostic laboratories and low operator variability (35, 36). On the other hand, their main drawback is the co-isolation of a complex mixture of EVs together with protein aggregates (37) that may interfere with further EV-related marker determination and analyses. Thus, these methods still require of specific pre-treatments to eliminate larger EVs and aggregates (4, 6, 24, 29).

### SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY

In the last years, size-exclusion chromatography (SEC) has been applied to fractionate complex biologic samples, such as urine and

plasma, and isolate EVs excluding the main contaminants, such as protein aggregates or lipoproteins usually co-isolated by UC. Rood et al. used UC followed SEC to optimize the purity of the urinary EVs. Importantly, this group demonstrated that non-EV-related contaminants could mask the presence of relevant EV markers (21), thus emphasizing the importance of eliminating as much contaminants as possible.

More recently, Muller et al. used this technique for isolating morphologically intact EXs without protein contamination from human plasma samples (38, 39). In our laboratory, we have obtained similar results using urine samples. Thus, SEC can be applied to highly enrich EVs in an efficient manner. In addition, SEC is a medium throughput technique susceptible to be implemented in the clinical setting.

### MICROFLUIDIC-BASED METHODS

Microfluidic-based methods have been recently developed to isolate EVs. Exochip™ is a microfluidic-based platform based on a polydimethylsiloxane matrix covered with Abs against CD63 (classical exosomal marker) developed for the immuno-affinity isolation of circulating EVs. This method does not require a separation step for quantification of EVs, as the vesicles are labeled with a fluorescent dye allowing their quantification using a plate reader. In addition, RNA extraction or proteomic studies can be carried out as well (40).

Recently, Santana et al. have developed a microfluidic platform to isolate EVs based on their diameter and the deterministic lateral displacement. First assays carried out have shown an efficient separation among EVs subpopulations without altering their biology and morphology. However, the ability to separate EVs aggregates should be deeply analyzed in further experiments. In addition, this technology should also be tested on complex biological samples in which the density of the sample is highly variable (41).

### HYDROSTATIC DIALYSIS

Musante et al. have recently presented hydrostatic dialysis to isolate urinary EVs without need of UC and as a possible solution to highly diluted samples. This method is based in a dialysis membrane with molecular weight cut-off of 1000 kDa, removing all possible contaminants from EVs samples (36).

In summary, although different isolation methods for EVs have been developed, a standard consensus – with special relevance in the clinical settings – is still missing. This is of special importance due to the variable results obtained when comparing different techniques (37) or even when using different RNA extraction methods, in which the presence of high amounts of RNA could be indicative of non-EV contaminating RNAs (42).

## URINARY EVs AS A SOURCE OF BIOMARKERS FOR KIDNEY-RELATED DISEASES

Chronic kidney diseases are a public health issue as they cause important morbidity and mortality and impose high economic burden. Several studies suggested that the chronic kidney diseases (CKD) are an independent predictor of mortality risk in the general population (43). In addition, associations between reduced GFR and the risk of death, cardiovascular events, and hospitalization were observed (44).

The replacement therapy for patients with irreversible chronic kidney failure includes hemodialysis or peritoneal dialysis, being the renal transplantation (RTx) by far the modality of choice for those patients (45). Many factors can affect long time graft survival, and despite remarkable progress has been made in the last years, immunologic rejection and adverse effects of immunosuppressive agents still have significant negative long-term consequences.

Currently, kidney function is indirectly monitored by measuring the GFR, creatinine clearance, serum creatinine, and proteinuria. However, these markers are usually a late sign of kidney damage that indicates – rather than predicts – renal dysfunction. Moreover, the unique gold-standard technique to diagnose kidney diseases is renal biopsy. Needless to say that needle biopsies are an invasive non-reproducible technique, and may be associated with patient morbidity. Thus, there is an additional need to find non-invasive alternatives to kidney biopsies.

In the case of kidney failure and/or renal diseases, urine is the perfect source of biomarkers for developing new diagnostic tools to identify and stratify patients. Different research programs have been conducted to biomarkers discovery. Initially, efforts were focused to the analyses of total urine, while lately, the study of urine derived EVs have gained interest. Particularly, urinary EVs are secreted from all cell types that face the urinary space (glomerular structures, renal tubule cells, and the cells lining the urinary tract) as represented in **Figure 1**. It is thus considered that urinary EVs may be a non-invasive image of the physiological state of the renal-tubular system (18, 46). Therefore, an increasing amount of research groups have focused their interest in the study of urinary EVs in kidney diseases. To date, several proteomic studies on EVs have identified proteins that could be associated to kidney diseases (47, 48). **Table 1** shows a summary of the current state of biomarkers discovery related to kidney disorders, which are also detailed below.

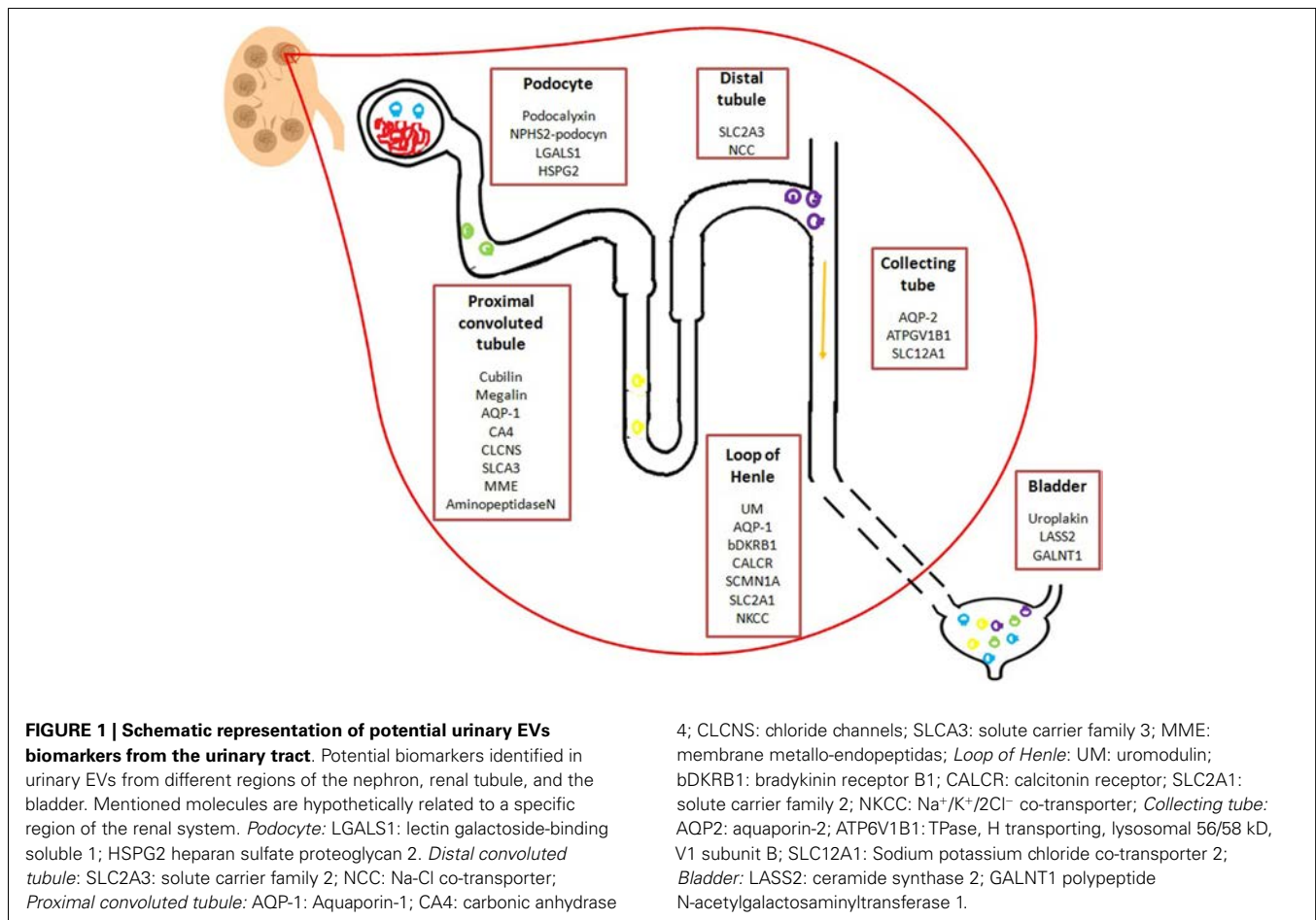
### ACUTE KIDNEY INJURY

Acute kidney injury is a disorder characterized by a rapid decline in the GFR and retention of nitrogenous waste products (71).

Acute kidney injury can be divided in: pre-renal, intrinsic, and post-renal. Pre-renal acute kidney injury (AKI) is the most common cause of AKI and is an appropriate physiologic response to renal hypo-perfusion. The causes of intrinsic acute renal failure (ARF) can be categorized into the following: diseases involving large vessels, diseases of renal microvasculature and glomeruli, ischemic, and nephrotoxic acute tubular necrosis, all processes involving tubulointerstitium. Post-renal AKI is due to urinary tract obstruction and accounts for <5% of cases of AKI (72).

Acute kidney injury may be one of the best examples in which serum creatinine concentration (Scr) is used as biomarker of kidney failure. Nonetheless, its concentrations vary widely, and it is not informative in asymptomatic stages and cannot predict the outcome of the disease. It is known that substantial loss of GFR may not manifest with elevations in Scr for several days, and creatinine based estimated GFR is not accurate.

Serum creatinine concentration increases when renal filtration is decreased at least 30%. Moreover, it has been shown that high levels of Scr may not be associated to renal-tubular



injury or kidney injury (73). These reasons clearly reflect the need for new more sensitive biomarkers.

Kidney injury molecule-1, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), or interleukin-18 have been proposed as potential biomarkers for the early diagnosis of AKI in total urine (4, 74). Besides, other groups have recently reported Heat Shock Protein 72 (Hsp72) as putative biomarker, demonstrating an increase in mRNA levels after ischemia and kidney injury (73, 75). Despite these new approaches in biomarkers research, the “classical” parameters already mentioned continue to be used.

As mentioned before, one of the possible causes of acute renal damage is *renal ischemia-reperfusion*. During the ischemia, the absence of nutrients and oxygen creates a hypoxic condition, which promotes the reactive oxidative species formation and inflammatory response once the blood flux is restored. Related to EVs, Zhou et al. identified EVs containing Fenituin-A as potential biomarker after renal injury using an AKI rat model. These EVs were detected not only before any increase in Scr levels but also before any structural change could be detected by kidney biopsy. In addition, this marker was in the same way detected in total urine (76). A few years later, the same group identified transcription factor 3 (ATF3) as an additional EVs biomarker for AKI. Importantly, these biomarkers were only detected on EVs coming from patients and were not present in healthy volunteers (49).

Also, in a rat model for ischemia-reperfusion, Sonoda et al. reported the decrease of exosomal aquaporin-1. Similar results were confirmed in a transplant group of patients (50). The most interesting feature of this biomarker is that they could not find this decrease in EVs in a rat model of nephrotic syndrome, suggesting that this marker could be specific for this pathological state.

#### GLOMERULAR DISEASES

Podocytes are specialized epithelial cells forming the glomerular filtration barrier together with the glomerular basement membrane and endothelial cells. The damage of this structure leads to a loss of proteins and blood cells (77). In glomerular diseases, podocytes are the main cells affected being therefore considered, which podocyte-derived EVs may be a promising source of biomarkers.

#### Diabetic nephropathy

One of the main causes of glomerular disorders is diabetic nephropathy. Related to it, Barutta et al. described a differential expression of 22 exosomal miRNAs between normo and micro-albuminuric patients. Interestingly, the levels of miR-145 and miR-130a in urinary EVs were increased in diabetic and micro-albuminuric patients compared to normo-albuminuric controls. In contrast, miR-155 and miR-424 levels were lower

**Table 1 | Summary of EVs biomarkers related to kidney disease.**

Pathology	Sample	Isolation method	Biomarker	Reference	Model
<b>ACUTE INJURE</b>					
AKI	Spot	DC/200000g	Fetuin A	(76)	Rat and human
	10–16 ml	DC/200000g	ATF3	(49)	Rat and human
I/R	5–8 ml	DC/200000g	Aquaporin-1	(50)	Rat and human
	10–16 ml	DC/200000g	Transcription factor 3	(49)	Rat and human
<b>GLOMERULAR INJURY</b>					
FSGS	10–16 ml	DC/200000g	Wilm's tumor 1	(49, 51)	Rat and human
	45 ml	DC/200000g + SEC	PODXL	(21)	Human
GKD	15 ml	DC	ADAM10	(52)	Cell line and human
DN	450 ml	DC/200000g	miR-130, miR-145, miR-155, and miR-424	(53)	Mice, cell line, and human
	–	Filtra-centrifugation	DPP IV	(54)	Human
	100 ml	DC/175000g	AMBP, MLL3, and VDAC1	(55)	Human
LN	–	DC/200000g	miR-26a, ADAM10	(56)	Mice and human
IgAN	30 ml	SGC	Ceruloplasmin and miR-26a	(57)	Human
TBN	30 ml	SGC	Aminopeptidase A and vasorin		
<b>FIBROSIS</b>					
RF	–	DC/200000g	miR-29c and miR-200	(58)	Human
GF	–	DC/200000g	CD2AP, synaptodin mRNA	(59)	Human
<b>OTHER RENAL DISORDERS</b>					
CKD	25 ml	Ultrafiltration	mRNA IL-18, NGAL	(60)	Human
Tx	10 ml	DC/200000g	NGAL	(61)	Human
	200 ml	DC/100000g	CD133	(62)	Human
PKD	–	DC/150000g	PKD1, PKD2, PKHD1	(63)	Human
<b>CANCER</b>					
MPC	5 ml	DC/100000g	ATGB1	(64)	Cell line and human
	–	DC/110000g	ITGA3		Cell line and human
	200 ml	DC/100000g	miR-34a	(65)	Cell line and human
BC	–	SGC	PSA, PSMA	(66)	Cell line and human
	–	SGC	EDIL-3	(67)	Cell line and human
	–	DC/100000g	LASS2, GALNT1	(68)	Human
	50 ml	DC/100000g	TACSTD2	(69)	Human
RCC	50 ml	DC/200000g	MMP-9, DKP4, EMMPRIN, PODXL	(70)	Human

Methods: DC, differential centrifugation; SGC, sucrose gradient centrifugation.

Disease: AKI, acute kidney injury; I/R, ischemia reperfusion injury; FSGS, focal segmentary glomerulosclerosis; GKD, glomerular kidney disease; DN, diabetic nephropathy; LN, lupus nephritis; IgAN, IgA nephropathy; TBN, thin basement nephropathy; RF, renal fibrosis; GF, glomerulofibrosis; CKD, chronic kidney disease; RTx, renal transplantation; PKD, polycystic kidney disease; MPC, metastatic prostate cancer; BC, bladder cancer; RCC, renal cell cancer.

Biomarkers: PODXL, podocalyxin-like; AMBP,  $\alpha$ -microglobulin/bikunin precursor; MLL3, histone-lysine N-methyltransferase; VDAC1, voltage-dependent anion-selective channel protein 1; CD2AP, CD2-associated protein; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; ATGB1, GTP-binding protein 1; ITGA3, integrin, alpha 3; PSA, prostate specific antigen; PSMA, prostate specific membrane antigen; EDIL-3, EGF-like repeats and discoidin I-like domain; LASS2, ceramide synthase 2; GALNT1 polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; DKP4, Dickkopf related protein 4; EMMPRIN, extracellular matrix metalloproteinase inducer; PKD1, polycystin-1; PKD2, polycystin-2; and PKHD, 1 polyductin.

in micro-albuminuric patients whilst normo-albuminuric and healthy controls showed similar levels (53). Then, in mesangial cells cultures, they demonstrated that hyperglycemic conditions induce miR-145 expression. Thus, this miRNA profile represents a novel approach in the search of EVs biomarkers, although further studies with larger cohort of patients are required.

Another interesting putative biomarker for diabetic nephropathy is dipeptidyl-peptidase. This enzyme, which plays a role in T-cell activation, is known to be over-expressed in the plasma of diabetic patients. Its high expression in the kidney took Sun

et al. to analyze the vesicular content in a subset of patients and found over-expression of this protein in urinary EVs compared to controls (54).

The quantitative analysis of urinary EVs proteome from diabetic patients carried out by Zubiri et al. showed interesting differences compared to controls. Interestingly, 65% of the proteins detected were identified only in one of the experimental groups. Among those,  $\alpha$ -microglobulin/bikunin precursor (AMBP), histone-lysine N-methyltransferase (MLL3) were increased in patients, whilst voltage-dependent anion-selective

channel protein 1 (VDAC1) were decreased (55). Hence, these proteins are suggested as promising biomarkers, although more studies are needed for verification.

### **Glomerulonephritis**

IgA nephropathy is the most common glomerular lesion of glomerulonephritis whose clinical presentation may vary from hematuria to rapidly progressive glomerulonephritis. Specifically, IgA nephropathy (IgAN) is induced by: aberrant glycosylation of IgA1, synthesis of antibodies directed against galactose-deficient IgA1, binding of the galactose-deficient IgA1 by the anti-glycan/glycopeptide antibodies to form immune complexes and accumulation of these complexes in the glomerular mesangium. Moreover, each step of this pathological process has susceptibility loci proposed by genome-wide association studies but DNA-based tests have not been developed (78).

Purification of urinary EVs from IgA nephropathy patients was carried out by Moon et al. (57). These authors identified ceruloplasmin (CP) as biomarker in this disease. In this way, CP concentration appeared higher in IgA patients than in controls; though deeper studies must be performed to confirm these results.

Another important glomerulopathy characterized by podocyte injury is the focal segmental glomerulosclerosis. This pathology could be autoimmune or secondary to obesity and drugs among others. Initial studies by Zhou et al. (49) demonstrated the over-expression of the Wilm's Tumor 1 protein, a transcription factor required for normal kidney development, in urinary EVs from a mice model with podocyte injury and in humans with focal segmental glomerulosclerosis (49). Some years later, the results were re-evaluated and confirmed by the same group in a larger cohort of patients (51).

Lupus nephritis is a frequent and potentially serious complication among patients with systemic lupus erythematosus whose clinical manifestations are varied being the most common manifestations proteinuria (commonly leading to nephrotic syndrome), microscopic hematuria, and reduced GFR. The histopathology of lupus nephritis (LN) is pleomorphic; based on light microscopic (LM), immunofluorescence (IF), and electron microscopic (EM) findings it can be classified into six classes (79).

Some differences in the levels of several miRNAs have been reported between controls and LN and IgAN patients. Among those, miR-26a is normally found in the glomeruli of control samples, but their levels are decreased in glomeruli from patients. Interestingly, Ichii et al. (56) have reported a higher level of miR-26a in EVs from patients compared to controls, thus suggesting a mechanism for the reduced levels found in patient's glomeruli. The authors suggested this microRNA could be considered a direct and predictive biomarker of podocyte and glomerular injury.

Similarly, Gutwein et al. studied ADAM10 and its substrate L1, are expressed in differentiated podocytes. Moreover, ADAM10 could be found in urinary EVs and in total urine of LN and IgAN patients but it is absent on healthy donor urine or EVs (52). Although it is not clear the role of this molecule in the kidney or in the EVs, their differential expression suggests they could be considered as possible biomarkers of glomerular damage.

### **Thin basement membrane nephropathy**

Thin basement membrane nephropathy is characterized by non-progressive hematuria, minimal proteinuria, and normal renal function due to a thinned glomerular basement membrane. This pathology is thought to be caused by mutation in collagen genes such as COL4 and COL5 (80).

Renal biopsy is the only technique to diagnose between IgAN and thin basement membrane nephropathy (TBMN). In urinary EVs from TBMN patients, aminopeptidase N, and vasorine precursors were increased compared with IgAN patients. Thus, these precursors could be used as biomarkers in hematuric patients to differentiate between TBMN and early IgAN (57).

### **KIDNEY FIBROSIS**

As mentioned before, CKD is a major death cause worldwide, associated with fibrosis leading to organ failure in the final stages, independently of the primary cause. Lv et al. (58) found a reduced level of urinary EVs miR-29 and miR-200 in a selected group of CKD patients compared to controls. Furthermore, they found that miR-9a and miR-29c could discriminate between mild and moderate-severe fibrosis. Similarly, the same group evaluated other molecules such as CD2AP, NPHS2, and synaptodin mRNA in urinary EVs. They reported an increase of synaptodin and a decrease in CD2AP mRNA levels in patients. As before, their results suggested that CD2AP mRNA levels could reflect tubule-interstitial fibrosis and the glomerulosclerosis degree (59). These results clearly support the idea of using RNA content from urinary EVs as non-invasive tools in the study of renal function and diseases progression.

### **POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE**

Polycystic kidney disease (PKD) is a genetic disorder characterized by kidney cystic dilatations that may course with multiple organ involvement. This disease is caused by a dysregulation of PKD1, PKD2, or PKHD1 genes (81, 82). Proteomic studies in urinary EVs by several groups revealed that polycystin-1, polycystin-2, and polyductin (products of the mentioned genes) are easily detectable in patients' samples, and therefore could be considered for the analysis of the disease (18, 63).

### **RENAL TRANSPLANTATION**

Renal transplantation is the best option for end stage renal disease patients.

The use of urinary EVs as a source of biomarkers for kidney injury after RTx was probed by Alvarez et al. (61). In this study, the authors demonstrated the presence of NGAL in cellular fraction and in urinary EVs from patients. Urinary EVs NGAL detection differed between patients and controls. Interestingly, different quantities of NGAL were detected between deceased and living donors. Thus, suggesting that NGAL could be a biomarker of damage and delayed graft function (61).

Likewise, it has been recently published that other proteins classically associated to kidney injury in total urine could not be considered as EV biomarkers such as kidney injury molecule-1 (KIM-1) and cystatin. These molecules did not show significant changes in urinary EVs while NGAL mRNA was decreased after transplantation but arose to normal levels in a few days (60); in



addition, EV NGAL did not correlate with creatinine reduction. Moreover, in this case, urinary levels of IL-18 and NGAL correlate better with creatinine reduction than EVs markers (60). NGAL, KIM-1, and IL-18 have been proposed as AKI biomarkers as well, but it seems that in the case of RTx, these EVs markers do not correlate with outcome or creatinine level. Thus, the patients' selection, the degree of the disease and the biomarkers approach play a critical role in the wide of results found between studies. One of the main goals in the search of urinary EVs biomarkers is the reproducibility of the results between different methods and different sample volumes, among others.

The presence of urinary EVs expressing the progenitor marker CD133 has been lately reported by Dimuccio et al. (62). In healthy donors, they could identify two EVs subpopulations based on CD133 expression with a different profile for classical and urinary specific markers. These CD133<sup>+</sup> EVs were detectable at high levels in urine from healthy donors but not in patients with end stage renal disease. In the case of transplanted patients, CD133<sup>+</sup> EVs levels were lower than in healthy donors but higher than in chronic patients. The authors considered CD133<sup>+</sup> EVs as possible biomarkers for tubular function and renal tissue regeneration after transplantation in order to detect possible graft rejection, kidney damage, or incomplete tissue regeneration.

#### RENAL CELL CARCINOMA

Recently, the comparison of the protein profile of urinary EVs derived from renal cell carcinoma (RCC) patients with control subjects was carried out by Raimondo et al. (70). This study has shown a different protein profile between them. Specifically, in the case of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), Dickkopf related protein 4 and Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN), all of them involved in matrix remodeling, and found over-expressed in RCC patients. Moreover, these proteins correlated with the disease progression and the metastatic potential (70).

#### PROSTATE CANCER

Benign prostate hyperplasia is one of the most common diseases in men, and only a low proportion of prostate hyperplasias progress to an aggressive disease. The current diagnostic protocol of this tumor includes the serum determination of the prostate specific antigen (PSA), digital rectal examination, and biopsy. This combination could fail identifying properly between aggressive or non-aggressive cancer, leading to an over-treatment of patients (83). Despite urine would be apparently the best biological fluid to find new biomarkers in this pathology, a major effort has been focused in plasma samples (84). Regarding to urine studies, Mitchell et al. found the presence of prostate markers PSA and PSMA in EVs from patients' samples compared to EVs from healthy controls (66). Recently, ITGA3 and ITGB1 proteins have been identified significantly more abundant in urinary EVs from metastatic prostate cancer patients compared to benign prostate hyperplasia patients and patients without metastasis (64).

Corcoran et al. (65) described a panel of miRNAs that could be used as biomarker for metastatic prostatic cancer. This panel was set up from studies performed in cell lines in previous publications, and analyzed in human urine samples. The decreased

expression of miR-34a is suggested to be a useful tool to discriminate between prostate cancer and benign hyperplasia. In addition, BCL-2, a well-known pro-apoptotic gene, is described as the target of this miRNA (65).

#### BLADDER CANCER

Together with prostate and RCC, bladder cancer is another important disorder of the urinary tract. Recently, it was described that urinary EVs from bladder cancer patients promote tube formation on endothelial cell lines and cell migration; once again EVs are shown to be a vehicle to promote cancer progression. Chen et al. reported the diagnostic potential of the cancer-related protein TACSTD2 in a short cohort of bladder cancer patients (69). Moreover, EGF-like repeats and discoidin I-like domain-3 (EDIL-3) was found to be over-expressed on bladder cancer cell lines (67). Later, the presence of this protein was confirmed in patients' EVs (67).

Recently, Perez et al. described a different expression profile for four different EV mRNA encoding for LASS2, GALNT1 ARHGEF39, and FOXO3 (68). Briefly, ARHGE39 and FOXO3 were detected only in controls whilst GALNT1 and LASS2 were detected only in urinary EVs from patients. Further studies are required to assess these proteins as bladder cancer biomarkers.

#### EVs AS A THERAPEUTIC APPROACH IN KIDNEY DISEASES

Research on EVs is not only focused on their potential role as source of biomarkers but also as new therapeutic tools. Taking into account the properties and functions of EVs, different clinical studies have been developed with the aim to use them in therapy (85).

In the context of AKI, only a few studies have tested different sources of EVs for their therapeutic potential. Cantaluppi et al. tested the effect of EVs from endothelial progenitor cells in a rat model for ischemia and reperfusion injury. The miRNA content of these vesicles seems to have a positive effect in tubular cells, reducing apoptosis and promoting cell proliferation (86, 87). Ischemia-reperfusion is characterized by the over-expression of the adhesion molecule MCP-1. During this process, transcriptional repressor activating transcription factor 3 (ATF3), which has an anti-apoptotic effect and inhibit inflammatory state, is induced. Chen and colleagues probed that injection of exosomal ATF3 into model mice, reduces I/R kidney injury (88). Similarly, the effect of liver stem cells EVs in the regeneration of renal tubule injury has been demonstrated in the last months. Sánchez et al. suggest the role of these vesicles in a paracrine mechanism, inhibiting apoptosis of renal-tubular cells in an AKI murine model (89).

#### CONCLUSION

Kidney-related diseases, among others, might clearly benefit of research focused on urinary EVs. These vesicles may concentrate potential biomarkers – otherwise unnoticed by dilution in whole urine – that may reflect the physiological state of the renal system, and which may be relevant in several pathologies affecting the urinary tract, from the kidney to the bladder. However, some issues need to be solved before urinary EVs could be established as a source of biomarkers in the clinical setting. First, it is important to define whether these potential biomarkers should be determined

in whole urine or specifically associated to urinary EVs, as this could be related to each pathologic condition. It is considered that RNA and proteins are better preserved in EVs than in urine, being protected from the milieu. Indeed, EVs have the advantage of being directly derived from cells of the renal system, but the disadvantage of needing additional steps. Moreover, due to the different EV isolation procedures used – perhaps biasing the results – it is not clear whether some of the biomarkers identified so far are actually EV-related. Thus, a standard consensus on this subject would be desirable before blind studies on larger cohort of patients are performed to unequivocally identify urinary EV-related biomarkers for kidney diseases. Although most of the results so far are still preliminary, several of the proposed biomarkers have enlighten the way to a better understanding and diagnose of kidney diseases. Besides, as EVs can target and modify the behavior of specific cells, their potential use in therapeutic protocols will merit future research in kidney-related diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Spanish “Ministerio de Ciencia e Innovación” through grant PI13/00050 from the “Fondo de Investigación Sanitaria” (FIS-ISCIII), also from Secretaria d’Universitats i Recerca del Departament d’Economia i Coneixement de la “Generalitat de Catalunya” (2014SGR804) and from REDinREN 2.0 (RD12/0021/0027). Francesc E. Borràs is sponsored by the “Researchers Stabilization Program” from the Spanish “Sistema Nacional de Salud” (SNS-ISCIII) and “Direcció d’Estratègia i Coordinació,” Catalan Health Dept. (CES07/015).

## REFERENCES

- Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MA, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* (2011) 2:282. doi:10.1038/ncomms1285
- Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* (2012) 10(12):e1001450. doi:10.1371/journal.pbio.1001450
- Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res* (2013) 46(10):824–30. doi:10.1590/1414-431X20132964
- Wang D, Sun W. Urinary extracellular microvesicles: isolation methods and prospects for urinary proteome. *Proteomics* (2014) 14(16):1922–32. doi:10.1002/pmic.201300371
- Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* (2011) 9:9. doi:10.1186/1479-5876-9-9
- Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* (2013) 2:1–25. doi:10.3402/jev.v2i0.20360
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* (2009) 19(2):43–51. doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003
- Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics* (2010) 9(2):197–208. doi:10.1074/mcp.M900152-MCP200
- Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* (2014) 29:116–25. doi:10.1016/j.ccb.2014.05.004
- Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* (2013) 65(3):398–401. doi:10.1016/j.addr.2012.07.019
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* (2013) 200(4):373–83. doi:10.1083/jcb.201211138
- Wang Z, Hill S, Luther JM, Hachey DL, Schey KL. Proteomic analysis of urine exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *Proteomics* (2012) 12(2):329–38. doi:10.1002/pmic.201100477
- Lázaro-Ibáñez E, Sanz-García A, Visakorpi T, Escobedo-Lucea C, Siljander P, Ayuso-Sacido A, et al. Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *Prostate* (2014) 74(14):1379–90. doi:10.1002/pros.22853
- Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* (2012) 1. doi:10.3402/jev.v1i0.18374
- Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res* (2012) 40(D1):D1241–4. doi:10.1093/nar/gkr828
- Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* (2014). doi:10.1093/bioinformatics/btu741
- Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* (2006) 7(9):R80. doi:10.1186/gb-2006-7-9-R80
- Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics* (2006) 5(10):1760–71. doi:10.1074/mcp.R600004-MCP200
- Zhou H, Yuen PST, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int* (2006) 69(8):1471–6. doi:10.1038/sj.ki.5000273
- Jacquillet G, Hoorn EJ, Vilasi A, Unwin RJ. Urinary vesicles: in splendid isolation. *Nephrol Dial Transplant* (2013) 28(6):1332–5. doi:10.1093/ndt/gfs599
- Rood IM, Deegens JK, Merchant ML, Tamboer WP, Wilkey DW, Wetzels JF, et al. Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int* (2010) 78(8):810–6. doi:10.1038/ki.2010.262
- Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA, et al. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int* (2010) 77(8):736–42. doi:10.1038/ki.2009.550
- Musante L, Saraswat M, Duriez E, Byrne B, Ravidà A, Domon B, et al. Biochemical and physical characterisation of urinary nanovesicles following CHAPS treatment. *PLoS One* (2012) 7(7):e37279. doi:10.1371/journal.pone.0037279
- Salih M, Zietse R, Hoorn EJ. Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol* (2014) 306(11):F1251–9. doi:10.1152/ajprenal.00128.2014
- Harding C, Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem Biophys Res Commun* (1983) 113(2):650–8. doi:10.1016/0006-291X(83)91776-X
- Johnstone RM, Adam M, Pan BT. The fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro. *Biochem Cell Biol* (1984) 62(11):1246–54. doi:10.1139/o84-159
- Raj DA, Fiume I, Capasso G, Pocsfalvi G. A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney Int* (2012) 81(12):1263–72. doi:10.1038/ki.2012.25
- Yuana Y, Levels J, Grootemaat A, Sturk A, Nieuwland R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* (2014) 3:1–5. doi:10.3402/jev.v3.23262
- Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandesompele J, et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles* (2014) 3:24858. doi:10.3402/jev.v3.24858
- Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* (2014) 3. doi:10.3402/jev.v3.23111
- Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol* (2007) 292(5):F1657–61. doi:10.1152/ajprenal.00434.2006
- Merchant ML, Powell DW, Wilkey DW, Cummins TD, Deegens JK, Rood IM, et al. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS. *Proteomics Clin Appl* (2010) 4(1):84–96. doi:10.1002/prca.200800093
- Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang CS, Mechler A, Simpson RJ, et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics* (2013) 13(22):3354–64. doi:10.1002/pmic.201300282

34. Ghosh A, Davey M, Chute IC, Griffiths SG, Lewis S, Chacko S, et al. Rapid isolation of extracellular vesicles from cell culture and biological fluids using a synthetic peptide with specific affinity for heat shock proteins. *PLoS One* (2014) **9**(10):e110443. doi:10.1371/journal.pone.0110443
35. Schageman J, Zeringer E, Li M, Barta T, Lea K, Gu J, et al. The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA cargo. *Biomed Res Int* (2013) **2013**:253957. doi:10.1155/2013/253957
36. Musante L, Tataruch DE, Holthofer H. Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy. *Front Endocrinol* (2014) **5**:149. doi:10.3389/fendo.2014.00149
37. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* (2012) **82**(9):1024–32. doi:10.1038/ki.2012.256
38. Muller L, Hong CS, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods* (2014) **411**:55–65. doi:10.1016/j.jim.2014.06.007
39. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FA, Sturk A, Nieuwland R, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles* (2014) **3**:23430. doi:10.3402/jev.v3.23430
40. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, Nagrath S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip* (2014) **14**(11):1891–900. doi:10.1039/c4lc00136b
41. Santana SM, Antonyak MA, Cerione RA, Kirby BJ. Microfluidic isolation of cancer-cell-derived microvesicles from heterogeneous extracellular shed vesicle populations. *Biomed Microdevices* (2014) **16**(6):869–77. doi:10.1007/s10544-014-9891-z
42. Channavajjhala SK, Rossato M, Morandini F, Castagna A, Pizzolo F, Bazzoni F, et al. Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes. *Clin Chem Lab Med* (2014) **52**(3):345–54. doi:10.1515/cclm-2013-0562
43. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* (2010) **375**(9731):2073–81. doi:10.1016/S0140-6736(10)60674-5
44. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* (2004) **351**(13):1296–305. doi:10.1056/NEJMoa041031
45. 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. *N Engl J Med* (1999) **341**(23):1725–30. doi:10.1056/NEJM199912023412303
46. Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Păunescu TG, Da Silva N, et al. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int* (2010) **78**(2):191–9. doi:10.1038/ki.2010.106
47. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS, et al. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)* (2005) **10**(3):283–90. doi:10.1111/j.1440-1797.2005.00387.x
48. Dear JW, Street JM, Bailey MA. Urinary exosomes: a reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *Proteomics* (2013) **13**(10–11):1572–80. doi:10.1002/pmic.201200285
49. Zhou H, Cheruvanku A, Hu X, Matsumoto T, Hiramatsu N, Cho ME, et al. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney Int* (2008) **74**(5):613–21. doi:10.1038/ki.2008.206
50. Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, Kanno Y, Yoshinaga K, Uchida K, et al. Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* (2009) **297**(4):F1006–16. doi:10.1152/ajprenal.00200.2009
51. Zhou H, Kajiyama H, Tsuji T, Hu X, Leelahavanichkul A, Vento S, et al. Urinary exosomal Wilms' tumor-1 as a potential biomarker for podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol* (2013) **305**(4):F553–9. doi:10.1152/ajprenal.00056.2013
52. Gutwein P, Schramme A, Abdel-Bakky MS, Doberstein K, Hauser IA, Ludwig A, et al. ADAM10 is expressed in human podocytes and found in urinary vesicles of patients with glomerular kidney diseases. *J Biomed Sci* (2010) **17**:3. doi:10.1186/1423-0127-17-3
53. Barutta F, Tricarico M, Corbelli A, Annaratone L, Pinach S, Grimaldi S, et al. Urinary exosomal microRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PLoS One* (2013) **8**(11):e73798. doi:10.1371/journal.pone.0073798
54. Sun AL, Deng JT, Guan GJ, Chen SH, Liu YT, Cheng J, et al. Dipeptidyl peptidase-IV is a potential molecular biomarker in diabetic kidney disease. *Diab Vasc Dis Res* (2012) **9**(4):301–8. doi:10.1177/1479164111434318
55. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, Calvo E, Martin-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *J Proteomics* (2014) **96**:92–102. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.037
56. Ichii O, Otsuka-Kanazawa S, Horino T, Kimura J, Nakamura T, Matsumoto M, et al. Decreased miR-26a expression correlates with the progression of podocyte injury in autoimmune glomerulonephritis. *PLoS One* (2014) **9**(10):e110383. doi:10.1371/journal.pone.0110383
57. Moon PG, Lee JE, You S, Kim TK, Cho JH, Kim IS, et al. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. *Proteomics* (2011) **11**(12):2459–75. doi:10.1002/pmic.201000443
58. Lv LL, Cao YH, Ni HF, Xu M, Liu D, Liu H, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* (2013) **305**(8):F1220–7. doi:10.1152/ajprenal.00148.2013
59. Lv LL, Cao YH, Pan MM, Liu H, Tang RN, Ma KL, et al. CD2AP mRNA in urinary exosome as biomarker of kidney disease. *Clin Chim Acta* (2014) **428**:26–31. doi:10.1016/j.cca.2013.10.003
60. Peake PW, Pianta TJ, Succar L, Fernando M, Pugh DJ, McNamara K, et al. A comparison of the ability of levels of urinary biomarker proteins and exosomal mRNA to predict outcomes after renal transplantation. *PLoS One* (2014) **9**(2):e86844. doi:10.1371/journal.pone.0098644
61. Alvarez S, Suazo C, Boltansky A, Ursu M, Carvajal D, Innocenti G, et al. Urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. *Transplant Proc* (2013) **45**(10):3719–23. doi:10.1016/j.transproceed.2013.08.079
62. Dimuccio V, Ranghino A, Praticò Barbato L, Fop E, Biancone L, Camussi G, et al. Urinary CD133+ extracellular vesicles are decreased in kidney transplanted patients with slow graft function and vascular damage. *PLoS One* (2014) **9**(8):e104490. doi:10.1371/journal.pone.0104490
63. Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, et al. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol* (2009) **20**(2):278–88. doi:10.1681/ASN.2008060564
64. Bijnsdorp IV, Geldof AA, Lavaei M, Piersma SR, van Moorselaar RJ, Jimenez CR, et al. Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes of metastatic prostate cancer patients. *J Extracell Vesicles* (2013) **2**:22097. doi:10.3402/jev.v2i0.22097
65. Corcoran C, Rani S, O'Driscoll L. miR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression: extracellular miRNAs as biomarkers for CRPC. *Prostate* (2014) **74**(13):1320–34. doi:10.1002/pros.22848
66. Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J, Court J, Mason MD, Tabi Z, et al. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med* (2009) **7**(1):4. doi:10.1186/1479-5876-7-4
67. Beckham CJ, Olsen J, Yin PN, Wu CH, Ting HJ, Hagen FK, et al. Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Del1 and facilitate cancer progression. *J Urol* (2014) **192**(2):583–92. doi:10.1016/j.juro.2014.02.035
68. Perez A, Loizaga A, Arceo R, Lacasa I, Rabade A, Zorroza K, et al. A pilot study on the potential of RNA-associated to urinary vesicles as a suitable non-invasive source for diagnostic purposes in bladder cancer. *Cancers* (2014) **6**(1):179–92. doi:10.3390/cancers6010179
69. Chen CL, Lai YF, Tang P, Chien KY, Yu JS, Tsai CH, et al. Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients. *J Proteome Res* (2012) **11**(12):5611–29. doi:10.1021/pr3008732
70. Raimondo F, Morosi L, Corbetta S, Chinello C, Brambilla P, Della Mina P, et al. Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes. *Mol Biosyst* (2013) **9**(6):1220. doi:10.1039/c3mb25582d
71. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* (2005) **365**(9457):417–30. doi:10.1016/S0140-6736(05)17831-3
72. Liaño F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid acute renal failure study group. *Kidney Int* (1996) **50**(3):811–8. doi:10.1038/ki.1996.380
73. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Cortés-González C, Ojeda-Cervantes M, Gamba G, Morales-Buenrostro LE, et al. Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury: Hsp72 as a novel biomarker to detect AKI. *EMBO Mol Med* (2011) **3**(1):5–20. doi:10.1002/emmm.201000105

74. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* (2005) **365**(9466):1231–8. doi:10.1016/S0140-6736(05)74811-X
75. Morales-Buenrostro LE, Salas-Nolasco OI, Barrera-Chimal J, Casas-Aparicio G, Irizar-Santana S, Pérez-Villalva R, et al. Hsp72 is a novel biomarker to predict acute kidney injury in critically ill patients. *PLoS ONE* (2014) **9**(10):e109407. doi:10.1371/journal.pone.0109407
76. Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, Yuen PST, Hoffert JD, Yasuda H, et al. Exosomal fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* (2006) **70**(10):1847–57. doi:10.1038/sj.ki.5001874
77. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol* (2014) **5**:160. doi:10.3389/fendo.2014.00160
78. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, et al. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* (2011) **22**(10):1795–803. doi:10.1681/ASN.2011050464
79. Churg J, Berstein J, Glassock RJ. *Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease*. New York, NY: Igaku-Shoin (1995).
80. Tryggvason K. Thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* (2006) **17**(3):813–22. doi:10.1681/ASN.2005070737
81. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol* (2009) **20**(2):363–79. doi:10.1681/ASN.2008040406
82. Hartung EA, Guay-Woodford LM. Autosomal recessive polycystic kidney disease: a hepatorenal fibrocystic disorder with pleiotropic effects. *Pediatrics* (2014) **134**(3):e833–45. doi:10.1542/peds.2013-3646
83. Nogueira L, Corradi R, Eastham JA. Other biomarkers for detecting prostate cancer. *BJU Int* (2010) **105**(2):166–9. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.09088.x
84. Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal miRNAs as biomarkers for prostate cancer. *Front Genet* (2013) **4**:36. doi:10.3389/fgene.2013.00036
85. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* (2009) **9**(8):581–93. doi:10.1038/nri2567
86. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregius MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int* (2012) **82**(4):412–27. doi:10.1038/ki.2012.105
87. Bitzer M, Ben-Dov IZ, Thum T. Microparticles and microRNAs of endothelial progenitor cells ameliorate acute kidney injury. *Kidney Int* (2012) **82**(4):375–7. doi:10.1038/ki.2012.152
88. Chen HH, Lai PF, Lan YF, Cheng CF, Zhong WB, Lin YF, et al. Exosomal ATF3 RNA attenuates pro-inflammatory gene MCP-1 transcription in renal ischemia-reperfusion. *J Cell Physiol* (2014) **229**(9):1202–11. doi:10.1002/jcp.24554
89. Sanchez MB, Bruno S, Grange C, Tapparo M, Cantaluppi V, Tetta C, et al. Human liver stem cells and derived extracellular vesicles improve recovery in a murine model of acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther* (2014) **5**(6):124. doi:10.1186/scrt514

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 04 December 2014; paper pending published: 12 December 2014; accepted: 07 January 2015; published online: 30 January 2015.

Citation: Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R and Borràs FE (2015) Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Front. Immunol.* **6**:6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00006

This article was submitted to *Inflammation*, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2015 Gámez-Valero, Lozano-Ramos, Bancu, Lauzurica-Valdemoros and Borràs. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Molecular profile of urine extracellular vesicles from normo-functional kidneys reveal minimal differences between living and deceased donors

S. Inés Lozano-Ramos<sup>1,2</sup>, Ioana Bancu<sup>3,4</sup>, Laura Carreras-Planella<sup>1,2</sup>, Marta Monguió-Tortajada<sup>1,2</sup>, Laura Cañas<sup>3,4</sup>, Javier Juega<sup>3,4</sup>, Josep Bonet<sup>3,4</sup>, M. Pilar Armengol<sup>5</sup>, Ricardo Lauzurica<sup>4†</sup> and Francesc E. Borràs<sup>1,2,4\*†</sup>

## Abstract

**Background:** Kidney transplantation (KTx) is the best therapeutic approach for chronic kidney diseases leading to irreversible kidney failure. Considering the origin of the graft, several studies have reported differences between living (LD) and deceased donors (DD) in graft and patient survival. These differences seem to be related to multiple factors including, donor age and time of cold ischemia among others. Many of transplanted organs come from old-aged DDs, in which pre-transplant biopsy is recommended. However, kidney biopsy has several limitations, and there is a need to develop alternatives to assess the status of a kidney before transplantation. As the analysis of urinary extracellular vesicles (uEVs) rendered promising results as non-invasive biomarkers of kidney-related pathologies, this pilot study aimed to investigate whether profiling uEVs of LDs and DDs may be of help to assess the quality of the kidney before nephrectomy.

**Methods:** uEVs from 5 living donors and 7 deceased donors were isolated by size-exclusion chromatography, and their protein and miRNA content were analysed by liquid chromatography followed by mass spectrometry and next generation sequencing, respectively. Then, hierarchical clustering and venn diagrams were done with Perseus software and InteractiVenn tool. Specific EVs data bases were also used for Gene Ontology analysis.

**Results:** Next generation sequencing revealed that uEVs from DDs contained less miRNAs than LDs, but most of the DD-expressed miRNAs were shared with LDs (96%). Only miR-326 (targeting the apoptotic-related Bcl2) was found significantly over-represented in LD. Focusing on the protein content, we detected a low intra-group correlation in both types of donors. Despite these differences, hierarchical clustering of either miRNA or protein data could not identify a differential profile between LDs and DDs. Of note, 90% of transplanted patients had a functional graft after a year from KTx.

**Conclusions:** In this pilot study we found that, in normo-functional grafts, minor differences in uEVs profile could not discriminate between LDs and DDs.

**Keywords:** Extracellular vesicles, Exosomes, Kidney transplantation, Kidney donor, Size-exclusion chromatography

\* Correspondence: feborras@igtp.cat

†Ricardo Lauzurica and Francesc E. Borràs contributed equally to this work.

<sup>1</sup>REMAR-IVECAT Group, Health Science Research Institute Germans Trias i Pujol, Can Ruti Campus, Ctra. de Canyet s/n, Edifici "Escoles", 08916 Badalona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain

Full list of author information is available at the end of the article





## Background

Chronic kidney disease is a public health issue, causing an important mortality rate and high economic impact [1]. Currently, different replacement therapies for end-stage renal disease include haemodialysis, peritoneal dialysis and kidney transplantation (KTx). Of these, only KTx improves the quality of life of the patients, and is clearly better compared to dialysis regarding patient survival [2–4].

KTx may be performed using organs from living (LD) or deceased donors (DD). Although the number of LDs has increased in the late years [5], the majority of transplanted organs come from aged DDs in a state of neurological death. Some of the most important parameters affecting patient's survival after transplantation are related to age (of both donor and recipient), previous pathology of the recipient and the extent of the ischemia-reperfusion injury [4, 6–8]. It is widely accepted, and strongly supported, that transplantation from LDs offers better long-term outcomes than deceased organ transplants [9–11]; because of DDs are usually older, have more comorbidities and longer cold ischemia time than LD [10–12]. Moreover, in order to maintain the organs in optimal conditions, hemodynamic stability, adequate oxygenation, the correction of hypothermia, diabetes insipidus and electrolyte disturbances should be corrected by drug administration [13]. For these purposes, DDs might receive dopamine, noradrenalin and vasopressin among other drugs. In addition, specific antibiotic treatment might be administered if infection is suspected [14]. All these maintaining interventions may modify the quality of the organ.

To date, the quality of the organ before nephrectomy has only been estimated by sonographic images and kidney biopsy. In fact, kidney biopsy is recommended in expanded criteria donors, including those aged over 60 years, or showing hypertension, diabetes and in non-beating heart donors [15]. Nevertheless, kidney biopsy requires the invasive sampling of the organ and thus might affect also its quality. Therefore, alternative non-invasive techniques are needed to determine the organ status and predict the KTx outcome.

In this context, Extracellular Vesicles (EVs) have emerged as a source of non-invasive biomarkers for several diseases [16, 17]. In particular, urine EVs (uEVs) are viewed as a subcellular image of the glomerular and tubular systems, and changes in their composition may reflect ongoing events occurring in the renal system [18–20]. In this sense, a growing number of studies have proposed several EV-related biomarkers for kidney dysfunction, graft rejection [18, 21–23], or chronic kidney disease [21, 24, 25]. Also, a recently published study analysed EVs from graft-preservation fluid to predict delayed graft function [26]. However, no reports to date have investigated the uEVs profiles from LD and DD organs to distinguish their quality status prior to transplantation.

We aim to profile uEV from living and deceased donors to define their RNA and protein content before KTx.

In this pilot study, we explored the miRNA and protein content of uEVs from LD and DD kidney donors. Using size-exclusion chromatography (SEC) as a minimally altering isolation technique to obtain uEVs [27], we report the great similarity in the molecular profile of uEVs from LDs and DDs. Importantly, this correlated with the kidney function of the transplanted patients, which showed normal renal function 1 year after transplantation. In addition, we have identified several previously non-described uEVs miRNAs.

## Methods

The study protocols were approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Germans Trias i Pujol University Hospital and conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. No statistical power calculation was conducted prior to the study, size sample was estimated based on previous publications [28–30].

### Urine collection

First morning void urine was collected from living kidney donors ( $n = 5$ ) before undergoing nephrectomy. Urine samples from deceased kidney donors ( $n = 7$ ) were collected directly from the catheter 6 h before surgery was performed. Immediately after collection, urine (70–100 mL) was centrifuged at 600 g for 15 min to eliminate cell and debris and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  in the presence of the protease inhibitor AEBSF (0.138 mg/mL; Roche, Basel, Switzerland).

### Urine EV isolation by SEC

Cell-free urine samples were unfrozen overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  and centrifuged at 17,000 g for 10 min. The supernatant was kept and the 17,000 g pellet was treated with DTT (200 mg/mL, Sigma-Aldrich) for 10 min at  $37^{\circ}\text{C}$  to release Tamm-Horsfall protein polymers, as previously described [31]. The DTT-treated pellet and the 17,000 g supernatant were mixed and centrifuged again at 17,000 g for 10 min. Then, supernatant was concentrated by ultrafiltration, using a 100 kDa cut-off Centricon filter unit (Millipore, Bedford, MA). One mL of the retained volume of concentrated urine was then loaded into a 10-mL sepharose CL-2B (Sigma) SEC column to isolate uEVs. For each sample, 20 fractions of 0.5 ml were collected [32].

### Nanoparticle tracking analysis

Concentration and size distribution of uEVs were determined by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) in a Nanosight LM10–12 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) equipped with a 638 nm laser and CCD camera (model F-033). Briefly, samples were diluted 50 to 100 times in PBS to reach optimal concentration for



instrument linearity. Three videos of 60s time were recorded for each sample at 24 °C, at a camera level of 16, the camera shutter at 30.02 ms and the camera gain set at 650, as recommended by the manufacturer. Analysis was performed using the NTA software version 3.0.

#### Flow cytometry

SEC fractions were incubated with aldehyde/sulfate-latex beads of 4 μm (Invitrogen, Carlsbad, CA). Then, EV-coated beads were labelled with anti-CD9 (Clone VJ1/20), anti-CD63 (Clone TEA 3/18) or polyclonal mouse IgG isotype (Abcam, Cambridge, UK) and as secondary antibody FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Bionova, NS, Canada) was used. Then samples were analysed by flow cytometry (FacsVerse, BD Biosciences San Jose, CA). Singlet beads were gated, and the FITC median fluorescence intensity (MFI) of the EVs-coated beads was calculated for each fraction using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR) [32, 33].

#### RNA analysis

RNA analyses were performed in samples from 5 LDs and 5 DDs. Total RNA was extracted from uEVs using mirCURY kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark) following manufacturer's instructions with the previous published modifications [34]. Then, RNA was precipitated using glycogen (20 mg/mL; Roche); 10% AcNa 3 M, pH 5.2 (Sigma-Aldrich) and 2.5 times (v/v) of absolute ethanol. RNA profiling was determined using a high resolution kit (Small RNA kit) in a Bioanalyser 2100 System (Agilent technologies, Santa Clara, CA).

Deep sequencing was performed using TruSeq small RNA, (Illumina, San Diego, CA). An equimolar pool of all samples were run on HiSeq2500 (Illumina) using TruSeq paired end cluster generation (v3 for cBOT).

The DESeq package was used to normalize and analyse differential expression between the miRNAs found [35]. Qualitative analysis was done based on raw counts and a given miRNA was accepted as present when the raw count was of at least 5 copies.

#### Proteomic analysis

The uEVs-protein content was analysed in DD ( $n = 5$ ) and LD ( $n = 5$ ) by liquid chromatography following mass spectrometry (LC-MS/MS). Briefly, uEVs proteins were digested (LysC and trypsin) and injected in an Orbitrap XL with a 120 min gradient CID method using a 12 cm column. BSA controls were included both in the digestion and LC-MS/MS analysis for quality control.

The data has been analysed using Proteome Discoverer (v2.0) an internal version of the search algorithm Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) against human database (SwissProt Apr 2015 and UniProt Apr 2015). Peptides have been filtered based on a 5% False Discovery Rate.

#### Analysis

Venn diagrams and hierarchical clustering was performed using the InteractiVenn tool ([www.interactivenn.net](http://www.interactivenn.net)) [36] and Perseus software (1.6.0.2) [37, 38]. Further analyses related to biological function and location were based on specific databases, for EVs: EVpedia [39, 40], Exocarta [41, 42] and Vesiclepedia [43]; for miRNAs: mirbase [44]; and for target prediction: miRDB ([mirdb.org/miRDB/](http://mirdb.org/miRDB/)) [45].

## Results

### Clinical and epidemiological characteristics of donors

A total of 5 LD and 7 DD were included in this pilot study. The LD group included 2 males and 3 females, with a mean age of 57 years old (ranging from 45 to 69). One of the LDs was receiving treatment for hypothyroidism (Levothyroxine) and dyslipemia (statins). Kidney parameters in LDs revealed normal function and no other pathologies were detected. Urine samples were collected from the first morning urine before kidney extraction. After surgery these donors were further monitored in our hospital for 12 to 26 months, and all of them showed normal kidney function. Mean time of cold ischemia in the LD group was of 2.4 h (ranging from 2 to 4 h).

The DD group included 3 males and 4 females, with a mean age of 67 years old (ranging from 49 to 84). Causes of death were cerebrovascular accident, trauma, pulmonary thromboembolism and cardiac event. Most of DDs received standardized pharmacological treatment to maintain blood pressure and preserve organ function (detailed in Table 1). Four of the DDs showed dyslipemia, while serum creatinine levels of the donors were all between 0.8–3.41 mg/dL (Normal range 0.7–1.3 mg/dL). Urine samples from DDs were obtained 6 hours before the surgery. Kidney biopsy was performed in all of the donors using the Remuzzi scoring system to assess the histopathology [46]. Grafts showed a score between 2 and 5, and all were accepted for transplantation. Mean time of cold ischemia in the DD group was 18.5 h (range 13–22 h).

### Transplantation details and graft outcome after transplantation

The study is based on a cohort of 12 donors (5 LD and 7 DD). Two organs from DD were not transplanted due to thromboembolism (1 organ) and intra-operative decision of the surgeon (1 organ), thus a total of 17 kidney transplants (5LD + 12DD) were performed (summarized in Table 2). Stable kidney function in LD was established at median of 5.5 days (range 5–8 days) while it was achieved at median of 17.5 days (range 6–30 days) in DD recipients. Among all transplanted organs, one patient (graft from DD7) presented delayed graft function and another (graft from LD4) never attained a functional graft due to acute cellular rejection. Also, a patient (graft from DD6) developed acute cellular rejection but attributable to lack of adherence to the

**Table 1** Clinical and Epidemiological characteristics of living and deceased donors

uEV Analysis	Age	Gender	HTA	DM2	DLP	Others	SrCr (mg/dL)	Remuzzi Score		Cause of death	Drugs	ICU Drugs
								RK	LK			
LD1 P,T	40–45	F	–	–	–	–	0.7	–	–	–	–	–
LD2 P,T	55–60	F	–	–	–	–	0.98	–	–	–	–	–
LD3 P,T	65–70	M	–	–	–	–	0.63	–	–	–	–	–
LD4 P,T	50–55	M	–	–	Yes	Hipotiroidism	0.93	–	–	–	simvastatin, Levotiroxine	–
LD5 P,T	55–60	F	–	–	–	–	1.02	–	–	–	–	–
DD1 P, T	65–70	F	Yes	–	Yes	–	0.8	3	3	CVA	Olmesartan, Lormetazepam	noradrenaline, furosemide
DD2 P, T	65–70	F	–	Yes	–	obesity	0.8	5	5	Ictus	metformine, insuline	clopidogrelt, amoxiciline-clavulanic
DD3 P,T	80–85	F	Yes	–	Yes	–	1.5	4	5	CVA	bisoprolol,torasemide, lorazepam, sertralín, simvastatin	–
DD4 T	75–80	M	Yes	Yes	Yes	–	1.8	4	4	Trauma	Triflusal;enalapril; Metformin; Gliclazide; Ezetimibe; Allopurinol; Glucosamine; Tenoxicam; Omeprazole	manitol, actocortine, noradrenaline,
DD5 T	55–60	M	Yes	–	–	–	1.56	2	–	Cardiac event	Losartan, Atorvastatin, fenofibrate	propofol, atropine, midazolam, noradrenaline
DD6 P	45–50	M	–	–	–	Bone cyst	3.41	2	2	PTE	oxcarbazepine, diazepam, Celecoxib.	adrenaline
DD7 P	70–75	F	–	–	Yes	osteoporosis	0.73	3	2	Ictus	Calcium	noradrenaline

A summary of the age, gender, diseases, cause of death and medication of all the patients is included in this Table. P: sample used for proteomic assays. T: sample used for NGS assays

F female, M male; HTA Hypertension, DM2 Diabetes Mellitus type 2, DLP Dyslipemia, CVA cerebrovascular accident, PTE Pulmonary thrombo-embolism, SrCr Serum Creatinine, RK right kidney, LK left kidney

immunosuppressive treatment. Additionally, two patients needed graft biopsies which revealed respectively anti-calcineurinic toxicity and interstitial fibrosis and tubular atrophy. Chronic humoral rejection was absent in all patients. All the relevant information of the graft outcome is detailed in Table 3.

One year after transplantation, 4 of 5 grafts from LD and 11 of 12 grafts from DD were functional. One year after KTx, serum creatinine levels were between 1.1–1.2 mg/dL in the recipients of LD kidneys and 1.01–2.6 mg/dL in the recipients of DD kidneys (normal range 0.7–1.3 mg/dL).

**Table 2** Sample characterization

	Living donor	Deceased Donor
Urine samples	n = 5	n = 7
Kidneys available for KTx	n = 5	n = 14
Kidneys transplanted	n = 5	n = 12
Functional organs (1 year after KTx)	n = 4	n = 11

Sample size details from urine sample collection to recipients outcome

**Isolation of uEVs from LDs and DDs**

SEC-fractions were collected and analysed for tetraspanin markers as a direct evidence of uEV presence. Figure 1 shows the typical SEC elution profile obtained, in which uEVs eluted in fractions 7 to 9 according to the highest fluorescence intensity for CD9 and CD63. uEV samples from both LDs and DDs had the same distribution and no changes were detected either for CD9 or CD63 MFI levels (data not shown). From each sample, three chromatographic fractions containing uEVs (those showing the highest level of CD9 and CD63) were pooled in a final volume of 1.5 mL, and all the subsequent experiments were performed using these pooled fractions.

Regardless of the type of donor, NTA analyses revealed that uEVs had a size distribution modal range from 124 to 250 nm with a mean of 223 ± 30 nm. Particle concentration was well above 10<sup>10</sup> particles/mL in all samples, showing no differences between both groups. All together these data indicated that uEVs from LDs and DDs did not differ in terms of concentration, size distribution or presence of well-defined EV markers (data not shown).

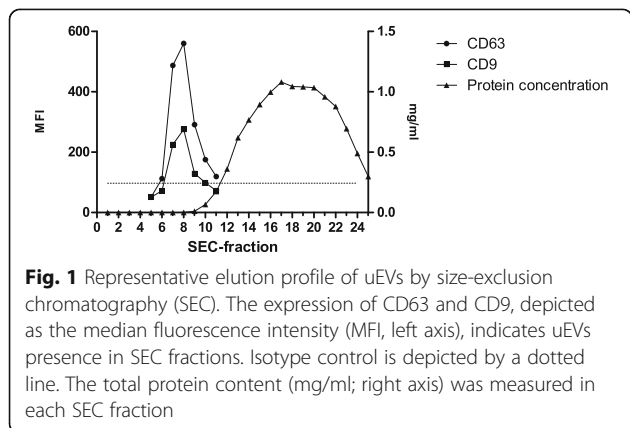
**Table 3** Clinical characteristics of kidney receptors

Donor	uEV Analysis	Cold ischemia (hours)	Mismatch			Recipient's previous KTx	DSA	IS	Delay Graft function	ACR	CHR	KB	Days until stable Renal function	SrCr (mg/dL) 1 year After KTx
			A	B	DR									
LD1	P, T	2	0	0	0	1	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	-	5	1
LD2	P, T	2	1	1	1	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	-	6	1.2
LD3	P, T	2	1	1	2	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	-	8	1.14
LD4	P, T	2	1	1	1	-	-	P, B, FK, MMf	Yes	Yes	-	ACR	-	-
LD5	P, T	4	1	2	1	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	-	-	-
DD1	P, T	20	2	2	1	-	-	P, FK, MMf	-	-	-	-	14	1,82
Not transplanted														
DD2	P, T	18	2	2	1	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	-	20	1.77
		22	0	0	1	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	-	15	1.23
DD3	P, T	18	1	1	1	-	-	P, FK, Th, Everolimus	-	-	-	-	7	1.45
Not transplanted														
DD4	T	20	1	1	1	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	CNTI	15	1.67
		15	1	2	1	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	ATN, TAIF	6	2.6
DD5	T	20	1	2	2	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	-	9	1.64
		17	1	1	1	-	-	Ecuzumab, P, FK, MMf, Th	-	-	-	-	24	1.39
DD6	P	13	2	2	1	-	-	P, B, FK, MMf	-	Yes	-	ACR	24	1.03
		22	1	1	1	-	Yes	P, FK; MMf, Th	-	-	-	-	25	1.16
DD7	P	17	2	2	1	-	-	P, B, FK, MMf	Yes	-	-	-	30	1.01
		20	1	1	1	-	-	P, B, FK, MMf	-	-	-	-	30	1.01

A summary of the HLA-mismatch, donor specific antibodies (DSA), cold ischemia time, previous transplants, immunosuppression treatment, delay graft function and renal biopsy are provided. P: sample used for proteomic assays. T: sample used for transcriptomic NGS assays  
 KTx Kidney transplantation, DSA donor specific antibodies, IS immunosuppression treatment, ACR acute cellular rejection, CHR chronic humoral rejection, KB kidney biopsy, P Prednisone, FK Tacrolimus, MMf mycophenolate mofetil, B Basiliximab, Th Thymoglobulin, ATN Acute tubular necrosis, CNTI calcineurin inhibitor toxicity, TAIF tubular atrophy and interstitial fibrosis, AS arteriosclerosis

**RNA content of uEVs**

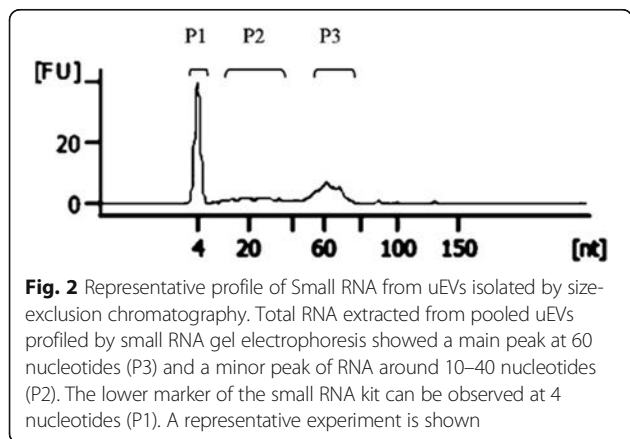
The RNA content of uEVs was analysed in 5 LDs and 5 DDs. RNA species of < 200 nucleotides (nts) were detected in all samples of both groups (Fig. 2). Of note, the RNA profile analysis showed a high variability in the



amount of RNAs found in the different samples, independently from the type of donors.

NGS results showed that miRNAs comprised around the 30% of the total RNA content of uEVs, while the remaining 70% was distributed among different RNA species, including tRNA (20%), unmapped RNAs (15%), and non-sense RNA (10%). Also, rRNAs and a minor proportion of protein coding RNAs (< 10%) were found. Given their relevance in cell regulation, miRNAs were further analysed [47, 48].

A deeper analysis of miRNA content showed a high correlation between samples regardless of the group (R of Pearson 0.96 ± 0.02). The shared and unique miRNAs found in LD and DD groups can be seen in the Venn Diagram shown in Fig. 3a. Up to 205 miRNA sequences were found to be present in all samples, from which a 5.4% (n = 10) have not been previously identified in EVs according to specific databases [39, 42, 43] (Table 4). These miRNAs were analysed with a target prediction tool (mirdb.org/miRDB/) [45] and most of them are



predicted to target genes related with the urinary tract such as ion channels (SLCs) and aquaporins (AQ), among others.

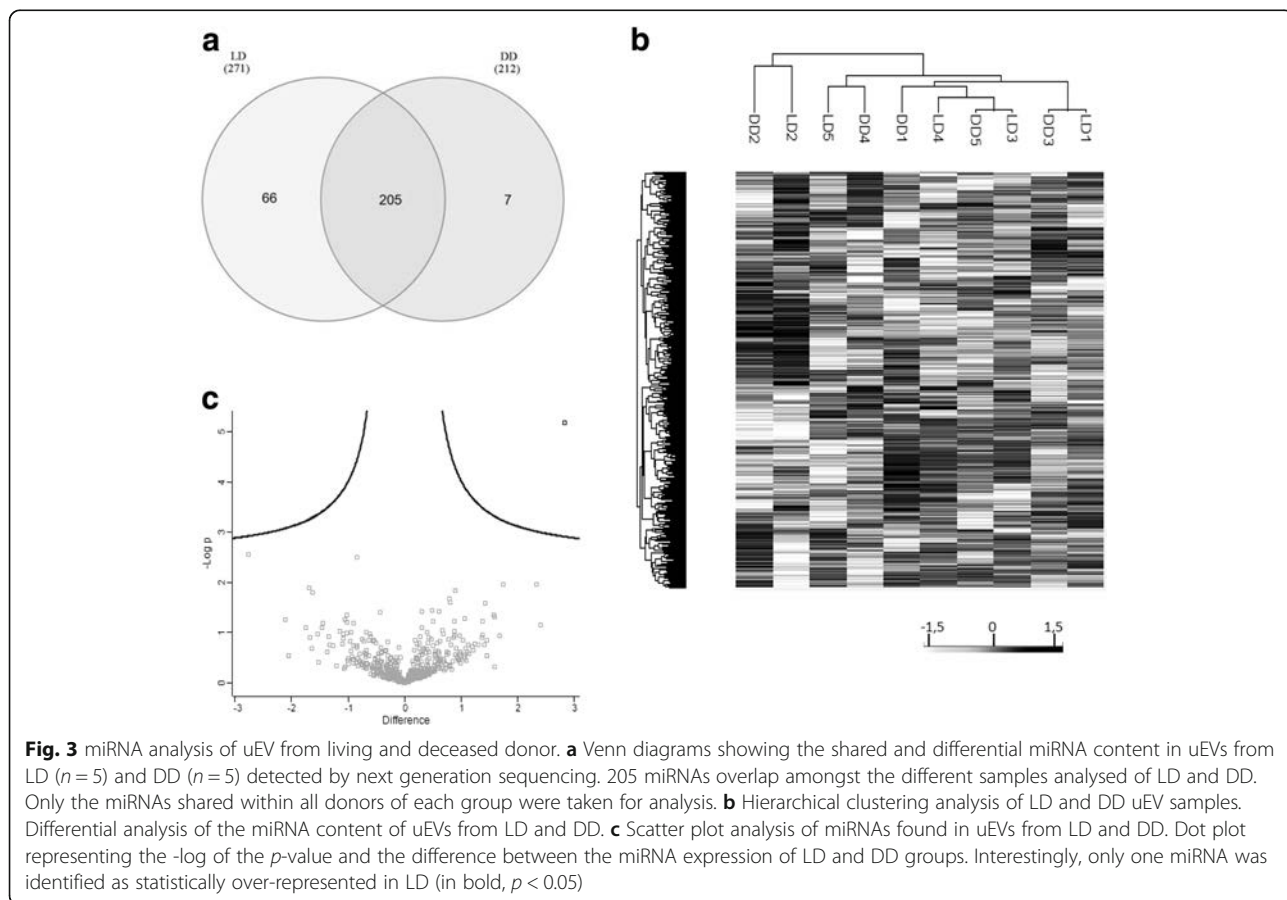
On the other hand, despite the good correlation found, a higher number of miRNAs was found in LDs compared to DDs (a total of 66 sequences, 24% of miRNAs found in LDs). To further investigate the potential role of the miRNAs exclusively detected in LDs ( $n = 66$ ) and DDs ( $n = 7$ ), these miRNAs were analysed by target

prediction analysis. A total of 4225 potentially targeted genes were identified for LD miRNAs (target score over 90%), while 367 potentially targeted genes were identified for DD miRNAs. GO analyses of these potential targets revealed that, in comparison to the DD group, the LD group showed an overrepresentation of genes involved in cell adhesion, vesicle mediated transport and cytoskeleton organization, while genes related with regulation of the metabolism were underrepresented.

To investigate whether these differences could segregate different patterns of expression specifically related to the type of donor (which could be of relevance for the graft outcome), hierarchical clustering of miRNAs found was performed (Fig. 3b). Interestingly, no aggregation was detected, meaning that both types of samples showed a similar profile. Moreover, volcano plot revealed only one miRNA differentially overexpressed in LD (miR-326;  $p < 0.05$ ) (Fig. 3c). Despite the differences found in the content of miRNAs, the analyses revealed similar profiles between uEVs from LD and DD.

**Proteomic content of uEVs**

Analogously to RNA studies, the proteomic profile was determined on uEVs from LDs and DDs ( $n = 5$  each).



**Table 4** miRNAs found by size-exclusion chromatography not described in vesicle-specific databases

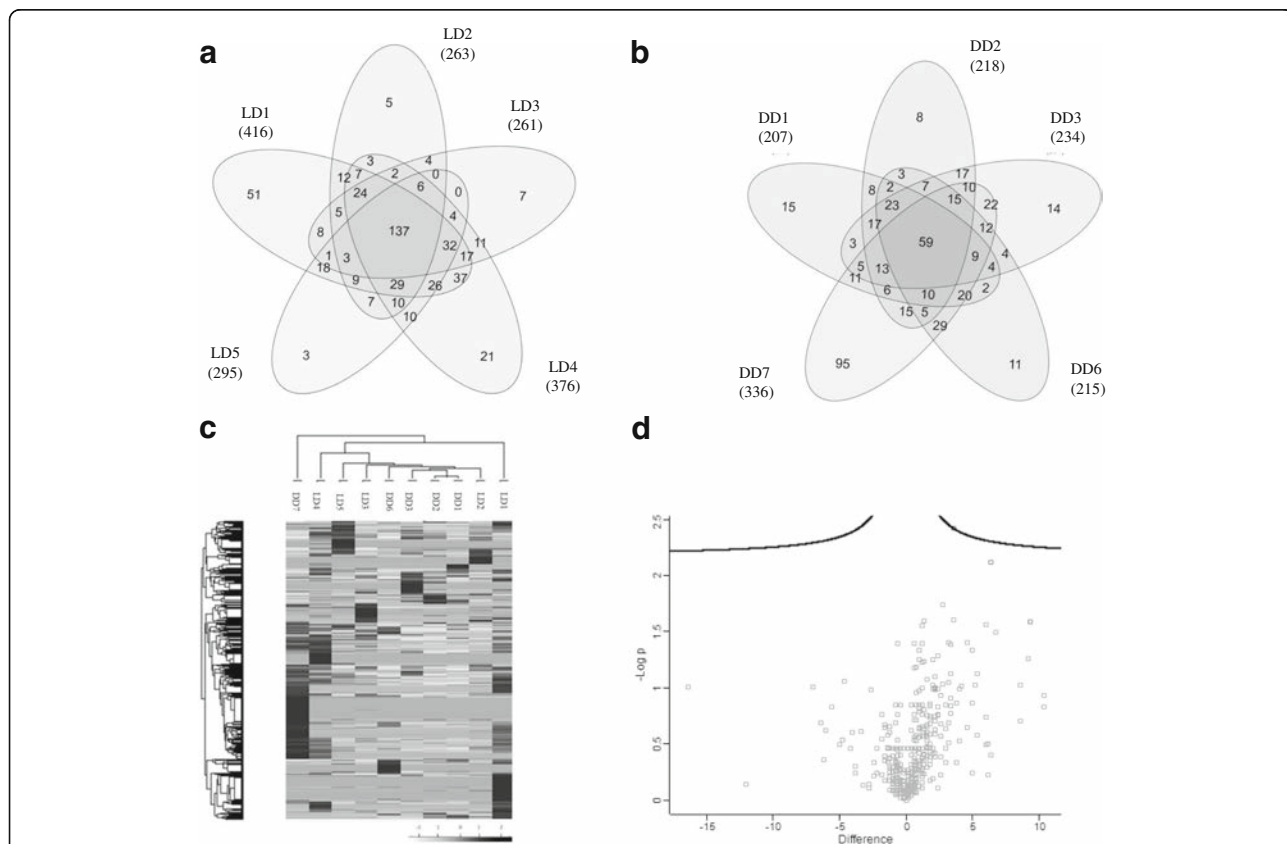
miRNA ID
hsa-miR-7977
hsa-miR-1260a
hsa-miR-210-5p
hsa-miR-653-5p
hsa-miR-3605-3p
hsa-miR-203a-3p
hsa-miR-888-5p
hsa-miR-152-3p
hsa-miR-874-3p
hsa-miR-598-3p

miRNAs found by size-exclusion chromatography and shared between LDs and DDs ( $n = 205$ ) were compared with those reported in specific databases (EVpedia, Exocarta and Vesiclepedia). Those miRNAs not previously reported in EVs databases are listed

Unfortunately, two of the samples of the DD could not be used for proteomic analysis due to rather low protein content, and were replaced by two different samples (not previously analysed for miRNA).

Only proteins identified by at least two unique peptides were considered in the analysis and raw data was cleaned up from known contaminants such as keratins and Tamm-Horsfall protein. Under these conditions, more than 500 proteins were identified in both groups.

Of note, intra-group Pearson correlation values were lower in the DD group ( $R$  values  $0.53 \pm 0.22$ ) compared with the LD group ( $0.61 \pm 0.12$ ), indicating a higher heterogeneity amongst the DD samples. This was also depicted by Venn diagrams showing up to 137 proteins shared by all LDs (Fig. 4a) while only 59 proteins were shared by all DDs (Fig. 4b). Most of the proteins shared by all DDs (83%, 49 proteins) were also found in all LDs. The majority of these coincident proteins have been previously described as related to EVs, including Ezrin (EZR), Galectin-3-binding protein (LGALS3BP) and Annexins (ANXA). In addition, proteins related to the urinary system such as Nephrylin (NEP),



**Fig. 4** Protein analysis uEV from living and deceased donor by LC/MS-MS. Venn diagrams showing the overlap of proteins detected in uEVs from LD (a) and DD (b). c Hierarchical clustering analysis according to the protein content of uEVs from LD and DD. The analysis did not segregate samples in their corresponding group. d Scatter dot plot analysis of the protein content of uEVs from LD and DD. Scatter plot representing the -log of the  $p$ -value and the differences between LD and DD group



Aminopeptidase N (ANPEP), Aquaporin-1 (AQP1) and several ion transporters are also be found in both groups.

When these results were further compared to investigate whether a different uEVS proteomic profile could not be detected between LD and DD, neither hierarchical clustering nor differential expression analyses revealed a pattern or proteins differentially expressed by LDs and DDs (Fig. 4c and d, respectively). This lack of clear segregation among samples indicates a similar uEVs profile regardless the donor's origin.

## Discussion

In this pilot study, we aimed to characterise the miRNA and protein profiles of SEC-isolated uEVs from living and deceased kidney donors to profile the organ status before Kidney transplantation (KTx). Several factors account for the outcome of KTx, including those related to the characteristics of the donor [2–4, 11]. Although one of the most important factors directly affecting KTx outcome is the time of cold ischemia, which is usually longer in DD organs, an additional factor to be considered is the status of the organ before the extraction. This could be affected by several factors such as age, donor general condition, or cause of death in DDs. In these aspects, the cohort of patients included in this pilot study shared the same characteristics of larger reported cohorts in terms of mean age and cold ischemia time in DD.

Acceptance of a given organ for transplantation is currently based on clinical and histopathological parameters. The latter are based on a kidney biopsy prior to transplantation, performed only under some circumstances -such as donors aged > 60 years old, or suffering from cardiovascular disorders-, with the aim to verify the quality of the kidney. Yet, as biopsy sampling variability and differences in criteria of analysis may lead to different assessment of the quality of the organ [49, 50], gathering additional information (such that found in uEVs) may be of help defining clearer criteria for organ acceptance.

Given that organ transplant donor characteristics are evolving to older donors (most of them with chronic pathologies) pre-transplant biopsy in these expanded criteria donors is highly recommended to evaluate the state of the organ. As kidney biopsies have limitations, there is a need to improve the analysis of the kidney status prior to transplantation. In this context, the content of uEVs that come from the excretory system may be of interest. Several studies have already shown that urinary EVs may contain specific signatures which may potentially serve as biomarkers of disease [20]. Similarly, normal kidneys also produce EVs, and their specific profile may be indicative of the physiological status of each particular organ. Profiling some specific markers found in urinary EVs may be of clear interest in this particular scenario as a source of non-invasive diagnostic and

prognostic biomarkers on the kidney status before nephrectomy.

Most of uEV-related parameters, such as size, concentration and the presence of classical EV markers -including tetraspanins CD63 and CD9- were equally detected in LD and DD samples. Moreover we did not detect in our DD-uEVs preparations any contamination of apoptotic bodies-such as the presence of histones-, which could be expected after the inflammatory state produce by brain death [13, 51]. In this sense, the absence of plasma EVs markers (such as CD5L or moesin), supports that urinary derived EVs are mainly analysed.

Focusing on the study of the RNA content of SEC-isolated uEVs, and in line with previous studies based on ultracentrifuged samples [52], miRNAs and, to a lesser extent, tRNA and rRNA, were among the most abundant RNA species in uEVs. Given the prominent role of miRNAs in cell communication and regulation, we focused on their profile in LD and DD. Although most miRNAs found in DDs were also present in LDs, up to 24% of miRNAs (mainly related to cell communication and signal transduction) were detected only in LDs. The miRNA target prediction showed that those genes related with cell adhesion, vesicle mediated transport and cytoskeleton organization were overrepresented in LD compared to DD, while genes related to regulation of metabolism were underrepresented. These data may be suggestive of an alteration in intracellular trafficking and metabolism in DD. Yet, due to the complexity of miRNA regulation processes and the multiples targets described for a given specific miRNA, further studies are needed to reveal the functional implication of each of them in the specific nephrologic context.

In fact, only one miRNA (miR-326) was found to be over-represented in LD group. miR-326 was described previously in EVs derived from cancer cell lines [53], plasma [54] and endothelial cells [55], and it has been described to target *bcl-xL*, a member of the *bcl-2* family, inducing apoptosis in human platelets [56]. It has also been reported that down-regulation of miR-326 may be involved in chemoresistance in lung cancer [57], poor prognosis and metastatic gastric cancer [58, 59] and osteosarcoma [60]. But the presence of this miRNA was not found before in uEVs and its role in the urinary track remains unknown.

Additionally, we further detected eleven miRNAs not described previously in EVs databases which are predicted to target genes related with the urinary tract. Once again, SEC is confirmed as confident method for isolating uEVs isolated and can be used for EV-related RNA studies and points out to their relevance in normal kidney function.

Focusing on the proteomic studies, and as seen in the miRNA data, a first observation was the identification of



higher number of proteins in LDs compared to DDs. In addition, intra-group analyses demonstrated a higher level of variability of protein expression among DDs, which could be related to intrinsic or extrinsic factors such as the donor-conditioning regime. Despite the minimal differences detected between LD and DD in the proteomic and miRNA analysis, in this study all transplanted organs were functional 1 year after KTx, indicating that these minimal changes seem not to be of major relevance for organ function.

Currently, the majority of transplanted kidneys are obtained from aged DDs in a state of neurological death. The use of drugs and medical intervention to maintain these donors in optimal conditions may alter the organ, as suggested by Nemati et al. [61]. Our results show that, before nephrectomy, uEVs derived from DDs showing a 1 year follow-up normal functioning kidneys, contained minimal alterations in their miRNA composition compared to uEVs from LDs. On the other hand, although the DD protein content was highly heterogeneous; such differences did not correlate with the short-term (1 year) graft survival. Additional studies, in a larger cohort of donors and recipients, are needed to investigate whether the information contained in uEVs from subclinical altered kidneys could anticipate any detrimental effect on the graft after transplantation, as recently suggested using preservation fluids [26]. Despite there are some limitations in our pilot study, such as a reduced number of samples and a high variability found among donors, we have successfully profiled uEVs from kidney donors. These results although preliminary, open the possibility to analyse donor uEVs in search of potential biomarkers of kidney quality before nephrectomy.

## Conclusions

Based on uEVs miRNA and proteomic data, no major differences could be detected between LDs and DDs, suggesting that the physiological status of the well-functioning organs before nephrectomy was similar in both groups.

## Abbreviations

BSA: Bovine serum albumin; DD: Deceased donor; EVs: Extracellular vesicles; KTx: Kidney transplantation; LD: Living donor; miRNA: Micro ribonucleid acid; NGS: Next generation sequencing; NTA: Nanoparticle tracking analysis; SEC: Size exclusion chromatography; uEVs: Urine extracellular vesicles

## Acknowledgements

Thanks to Marco A. Fernández (Flow Cytometry Unit, IGTP) and the PMPPC Genomics Unit for helpful advices. Also to Dr. Hernando A. del Portillo (ICREA Research Professor at ISGLOBAL-IGTP) for access to NTA instrument. Antibodies anti-CD9 and anti-CD63 were a gift from Dr. María Yañez-Mó (Unidad de Investigación, Hospital Sta. Cristina, IIS-IP; Departamento Biología Molecular/CBM-SO, UAM) and Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de la Princesa, IIS-IP, UAM; Cell-cell Communication Laboratory, CNIC).

## Funding

This work was supported by the PI13/00050 project, integrated in the National R + D + I and funded by the ISCIII and the European Regional Development Fund (<http://www.isciii.es>). Also by the "Suport Grups de Recerca" programme

of Secretaria d'Universitats i Recerca, Dept. Empresa i Coneixement, Generalitat de Catalunya (2014SGR804, Group REMAR, <http://agaur.gencat.cat>), the Instituto de Salud Carlos III-Red de Investigación Renal (REDinREN) (RD16/0009 Feder Funds, <http://www.isciii.es>, <http://redinren.org>), and Fundació Cellex. FEB is sponsored by the "Researchers Stabilization Program" from the Spanish "Sistema Nacional de Salud" (SNS- ISCIII, <http://www.isciii.es>) and "Direcció d'Estratègia i Coordinació" Catalan Health Department (CES07/015). Funders play no role in design, sample collection or data analysis.

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author.

## Authors' contributions

SILR: Sample processing, performed most of the experiments, data analyses. Drafted and approved the manuscript; IB: Clinical data, patients care, final approval; LCP: Data analysis, intellectual content, final approval; MMT: Provided intellectual content of critical importance, final approval; LC: Provided intellectual content of critical importance, final approval; JJ: Provided intellectual content of critical importance, final approval; JB: Provided intellectual content of critical importance, final approval; MPA: Provided intellectual content of critical importance, final approval; RL: Conception, design, interpretation of data. Writing and final approval of the manuscript and FEB: Conception, design, interpretation of data. Writing and final approval of the manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

The study protocols were approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Germans Trias i Pujol University Hospital and conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from the living donor and from the next of kin for deceased donor.

## Consent for publication

Not applicable

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>REMAR-IVECAT Group, Health Science Research Institute Germans Trias i Pujol, Can Ruti Campus, Ctra. de Canyet s/n, Edifici "Escoles", 08916 Badalona, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain. <sup>3</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Spain. <sup>4</sup>Nephrology Service, Germans Trias i Pujol University Hospital, Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain. <sup>5</sup>Genomic Platform, Health Science Research Institute Germans Trias i Pujol, Can Ruti Campus, Badalona, Ctra. de Canyet s/n, Edifici "Escoles", 08916 Badalona, Barcelona, Spain.

Received: 11 October 2017 Accepted: 19 July 2018

Published online: 31 July 2018

## References

- Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet Elsevier Ltd.* 2010;375:2073–81.
- Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:2135–41.
- Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang K. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. *JAMA.* 1993;270:1339–43.

4. Ojo AO, Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Williams L, Berling DP. Comparative mortality risks of chronic dialysis and cadaveric transplantation in black end-stage renal disease patients. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 1994;24:59–64.
5. SRTR – Scientific Registry of Transplant Recipients. Available from: <http://www.srtr.org/>
6. Nogueira JM, Haririan A, Jacobs SC, Cooper M, Weir MR. Cigarette smoking, kidney function, and mortality after live donor kidney transplant. *Am J Kidney Dis*. 2010;55:907–15.
7. Gjertson DW, Cecka JM. Living unrelated donor kidney transplantation. *Kidney Int*. 2000;58:491–9.
8. Sapir-Pichhadze R, Young A, Joseph KS. Living donor age and kidney transplant outcomes: an assessment of risk across the age continuum. *Transpl Int*. 2013;26:493–501.
9. Chkhotua AB, Klein T, Shabtai E, Yussim A, Bar-Nathan N, Shaharabani E, et al. Kidney transplantation from living-unrelated donors: comparison of outcome with living-related and cadaveric transplants under current immunosuppressive protocols. *Urology*. 2003;62:1002–6.
10. Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. *Kidney Int*. 2002;62:311–8.
11. Guimaraes J, Araújo AMM, Santos F, Nunes CSS, Casal M. Living-donor and Deceased-donor Renal Transplantation: Differences in Early Outcome—A Single-center Experience. *Transpl Proc Elsevier Inc*. 2015;47:958–62.
12. Cecka JM. The UNOS renal transplant registry. *Clin Transpl*. 2001;1–18.
13. Van Der Hoeven JABB, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersema J, Van Schilfgaarde R, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int*. 2003;64:1874–82.
14. Darby JM, Stein K, Grenvik A, Stuart SA. Approach to management of the heartbeating “brain dead” organ donor. *JAMA*. 1989;261:2222–8.
15. Randhawa P. Role of donor kidney biopsies in renal transplantation. *Transplantation*. 2001;71:1361–5.
16. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32:623–42.
17. Salih M, Zietse R, Hoorn EJ. Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306:F1251–9.
18. Peake PW, Pianta TJ, Succar L, Fernando M, Pugh DJ, McNamara K, et al. A comparison of the ability of levels of urinary biomarker proteins and exosomal mRNA to predict outcomes after renal transplantation. Ashton N, editor. *PLoS One*. 2014;9:e98644.
19. Zhang W, Zhou X, Zhang H, Yao Q, Liu Y, Dong Z. Extracellular Vesicles in Diagnosis and Therapy of Kidney Diseases. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2016; 311(5):F844–51. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00429>.
20. Gamez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE. Urinary Extracellular Vesicles as Source of Biomarkers in Kidney Diseases. *Front Immunol* 2015;6:6.
21. Zhang X, Nagaraja HN, Nadasdy T, Song H, McKinley A, Prosek J, et al. A composite urine biomarker reflects interstitial inflammation in lupus nephritis kidney biopsies. *Kidney Int*. 2012;81:401–6.
22. Alvarez S, Suazo C, Boltansky A, Ursu M, Carvajal D, Innocenti G, et al. Urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2013;45:3719–23.
23. Dimuccio V, Ranghino A, Praticò Barbato L, Fop F, Biancone L, Camussi G, et al. Urinary CD133+ extracellular vesicles are decreased in kidney transplanted patients with slow graft function and vascular damage. *PLoS One*. 2014;9:e104490.
24. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, Calvo E, Martín-Lorenzo M, Gonzalez-Calero L, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *J Proteomics*. 2014;96:92–102.
25. Barutta F, Tricarico M, Corbelli A, Annaratone L, Pinach S, Grimaldi S, et al. Urinary Exosomal MicroRNAs in Incipient Diabetic Nephropathy. *PLoS One*. 2013;8:e73798.
26. van Balkom BWM, Gremmels H, Ooms LSS, Toorop RJ, Dor FJMF, de Jong OG, et al. Proteins in preservation fluid as predictors of delayed graft function in kidneys from donors after circulatory death. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12:817–24.
27. Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L, Franquesa M, Beyer K, Borrás FE. Size-exclusion chromatography-based isolation minimally alters extracellular vesicles’ characteristics compared to precipitating agents. *Sci Rep*. 2016;6:33641.
28. de Menezes-Neto A, Sáez MJF, Lozano-Ramos I, Seguí-Barber J, Martín-Jaular L, Ullate JME, et al. Size-exclusion chromatography as a stand-alone methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-derived vesicles from healthy individuals. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27378.
29. Carreras-Planella L, Soler-Majoral J, Rubio-Esteve C, Lozano-Ramos SI, Franquesa M, Bonet J, et al. Characterization and proteomic profile of extracellular vesicles from peritoneal dialysis efflux. *PLoS One*. 2017;12:1–20.
30. Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, Adiconis X, Sivachenko A, Russ C, et al. Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. *PLoS One*. 2014;9:1–9.
31. Fernandez-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA, et al. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int*. 2010;28:e164.
32. Lozano-Ramos I, Bancu I, Oliveira-Tercero A, Pilar Armengol M, Menezes-Neto A, Del Portillo HA, et al. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:1–11.
33. Théry C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;3:22.1–3.22.29.
34. Channavajhala SK, Rossato M, Morandini F, Castagna A, Pizzolo F, Bazzoni F, et al. Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52:345–54.
35. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol BioMed Central*. 2014;15:550.
36. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:169.
37. Cox J, Mann M. 1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:S12.
38. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016;13:731–40.
39. Kim D-K, Kang B, Kim OY, Choi D, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013;2 <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20384>.
40. Kim D-K, Lee J, Kim SR, Choi D-S, Yoon YJ, Kim JH, et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 2015;31:933–9.
41. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*. 2009;9:4997–5000.
42. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol*. 2015; 428:688–92.
43. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10:e1001450.
44. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42: D68–73.
45. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D146–52.
46. Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G, et al. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med*. 2006;354:343–52.
47. Trionfani P, Benigni A. MicroRNAs as master regulators of glomerular function in health and disease. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:1686–96.
48. Forero A, So L, Savan R. Re-evaluating strategies to define the Immunoregulatory roles of miRNAs. *Trends Immunol*. 2017;38:558–66.
49. Antonietti Azancot M, Moreso F, Salcedo M, Cantarelli C, Perello M, Torres IB, et al. The reproducibility and predictive value on outcome of renal biopsies from expanded criteria donors. *Kidney Int*. 2014;85:1161–8.
50. Piovesan AC, Lucon AM, David DSR, Nahas WC, Antonopoulos IM, Srougi M. Multifocal Renal Allograft Biopsy: Impact on Therapeutic Decisions. *Transplant Proc*. 2008;40:3397–400.
51. Bouma HR, Ploeg RJ, Schuuris TA. Signal transduction pathways involved in brain death-induced renal injury. *Am J Transplant*. 2009;9:989–97.
52. Cheng L, Sun X, Scicluna BJ, Coleman BM, Hill AF. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int*. 2014;86:433–44.

53. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, et al. Let-7 MicroRNA Family Is Selectively Secreted into the Extracellular Environment via Exosomes in a Metastatic Gastric Cancer Cell Line. *PLoS One*. 2010;5:e13247.
54. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. 2013;14:319.
55. van Balkom B, Eisele AS, Pegtel DM, Bervoets S, Verhaar MC. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:26760.
56. Yu S, Huang H, Deng G, Xie Z, Ye Y, Guo R, et al. miR-326 targets antiapoptotic Bcl-xL and mediates apoptosis in human platelets. *PLoS One*. 2015;10:e0122784.
57. Li J, Li S, Chen Z, Wang J, Chen Y, Xu Z, et al. miR-326 reverses chemoresistance in human lung adenocarcinoma cells by targeting specificity protein 1. *Tumour Biol. Tumor Biol*. 2016;37:13287–94.
58. Li Y, Gao Y, Xu Y, Ma H, Yang M. Down-regulation of miR-326 is associated with poor prognosis and promotes growth and metastasis by targeting FSCN1 in gastric cancer. *Growth Factors*. 2015;33:267–74.
59. Ji S, Zhang B, Kong Y, Ma F, Hua Y. MiR-326 inhibits gastric cancer cell growth through down regulating NOB1. *Oncol Res*. 2016;25:853–61.
60. Cao L, Wang J, Wang PQ. MiR-326 is a diagnostic biomarker and regulates cell survival and apoptosis by targeting Bcl-2 in osteosarcoma. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:828–35.
61. Nemati E, Einollahi B, Lesan Pezeshki M, Porfarziani V, Reza Fattahi M, Pezeshki ML, et al. Does kidney transplantation with deceased or living donor affect graft survival? *Nephrourol Mon*. 2014;6:e12182.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)





## 322.4

**Urinary miRNA as a Potential Biomarker in Kidney Transplantation**

Ioana Bancu<sup>1</sup>, Inés Lozano-Ramos<sup>2</sup>, Laura Cañas<sup>1</sup>, Javier Juega<sup>1</sup>, Mónica Pérez-Mir<sup>1</sup>, Ricardo Lauzurica<sup>1</sup>, Francesc Borràs-Serres<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Nephrology Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>2</sup>REMAR-IVECAT Group, Health Science Research Institute Germans Trias i Pujol, Can Ruti Campus, Badalona, Spain.

**Introduction and Aims:** Kidney transplantation is the best available treatment for patients with end stage chronic kidney disease. The diagnosis of the pathology of the kidney graft relies on the determination of the creatinine, estimated glomerular filtration rate and proteinuria. These parameters are altered after the onset of renal injury and they are not able to discern between various pathologies. The kidney biopsy, an invasive and not extent of complications procedure, remains essential for the diagnosis of the renal pathology. Hence the importance of finding parameters that allow an early diagnosis of the pathology involved in graft dysfunction. Urine is ideal for the study of possible biomarkers, its collection is easy, non-invasive and repeatable. Our aim was to analyse the miRNA content of urinary extracellular vesicles of the transplanted patients and define differential patterns of expression of miRNA specific to the different pathologies of the transplanted kidney.

**Methods:** Kidney transplanted patients with a kidney biopsy performed for clinical indication were selected. The biopsies were assessed according to Banff classification. From all biopsies those exhibiting acute cellular rejection (ACR), interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) and calcineurin inhibitors toxicity (CIT) were selected. Kidney transplanted patients with normal function (defined as eGFR CKD-EPI >90ml/min/1,72m<sup>2</sup>) and without proteinuria were defined as control group. First morning void urine was collected from patients. After low speed centrifugation to eliminate cell debris, Urine EVs were obtained by Size exclusion chromatography after urine concentration. EV-contained fractions selected as CD63 and CD9 positive fractions were pooled. Then, total RNA was extracted using mirCURY kit and high-throughput sequencing was done. Taqman qPCR were performed using the Taqman Advance miRNA assays for the following miRNAs (hsa-miR-1; has-miR-2, hsa-miR-3; hsa-miR-4, hsa-miR-5, hsa-miR-6; hsa-miR-7; hsa-miR-8; hsa-miR-9, has-miR-10). hsa-miR-10a-5p was used as internal control and Total RNA kidney (Thermofisher) was used as positive control. Ct values of triplicates were averaged and used for  $\Delta$ Ct calculations. Principal component analysis (PCA), Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis and Mann-Whitney test were done using GraphPrims v5 and SPSS v15. P<0.05 were set as significant.

**Results:** A total of 8 control samples and 14 pathological samples (3 IFTA, 6 ACR and 5 CIT) were processed by next generation sequencing. A total of 1500 miRNAs were identified, then after normalization and principal component analysis 12 miRNAs were selected to be tested in a new cohort. A new control group(N=8) and patients (IFTA: n=9; ACR: n=9; CIT: n=6) were selected as mentioned before. Then, uEVs and total RNA were isolated as described above. We found that eight miRNAs had different expression patterns in the urine of patients with any kind of graft pathology compared to controls.

**Conclusion:** miRNA profiling in urine has potential as a novel method for detecting pathology in kidney transplant.

## 322.6

**MicroRNAs in Kidney Hypothermic Machine Perfusion Fluid as Novel Biomarkers for Graft Function. Have Changes in Normalization Guidelines Support Previous Results?**

Victoria Gómez Dos Santos<sup>1</sup>, María Laura García Bermejo<sup>2</sup>, Mercedes Ruiz Hernández<sup>1</sup>, Eduarne Ramos Muñoz<sup>2</sup>, Víctor Díez Nicolás<sup>1</sup>, Ana Fernández Rodríguez<sup>3</sup>, Sandra Elías Triviño<sup>3</sup>, Adolfo Martínez Pérez<sup>4</sup>, Sara Álvarez Rodríguez<sup>1</sup>, Vital Hevia Palacios<sup>1</sup>, Francisco Javier Burgos Revilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Urology Department. Hospital Ramón y Cajal, Urology Surgery and Transplantation Group. IRYCIS. Alcalá University, Madrid, Spain;

<sup>2</sup>Biomarkers and Therapeutic Targets Group, IRYCIS, Madrid, Spain;

<sup>3</sup>Nephrology Department, Hospital Ramón y Cajal. Alcalá University, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Transplantation Coordination, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

*Urology Surgery and Transplantation Group. IRYCIS. Madrid. Spain. Biomarkers and Therapeutic Targets Group. IRYCIS. Madrid. Spain.*

**Background:** Delayed graft function (DGF) is a common complication after deceased donor kidney transplantation (KT) which affects short and long-term outcome. Currently available biomarkers in perfusate lack sensitivity in predicting graft outcome.

Our group has already set up a protocol to determine miRNAs in preservation solution during graft perfusion and a panel was selected. The purpose of normalization is to remove technical variation in data which is not related to the biological changes under investigation. Proper normalization is critical for the correct analysis and interpretation of results. New normalization guidelines in miRNAs analysis have been recently established.

The aim of the study was to validate the selected miRNAs panel according to those renewed normalization guidelines as a way of results support.

**Material and Methods:** A prospective cohort study was conducted on graft dysfunction in KT from ECD. Ethical approval was obtained from Ethics Review Board. As a discovery cohort, a total of 8 samples selected according to immediate and graft function at 1 year were analyzed. miRNAs were previously detected by Real-Time PCR performed using SYBR Green and specific LNA probes for each miRNA of interest (Exiqon) as well as exogenous Spike-in as technical control. Renewed normalization guidelines involved the use of the average of all miRNAs expression. The statistical significant differences were observed by means of GenEX v6 Enterprise software from Exiqon.

**Results:** Initial normalization was performed using Spike-in (UniSP2) levels. Data analysis by SPSS indicate that miR-486, miR-18a, miR20a, miR363-3p, miR144-3p, miR454-3p, mir223 3p, miR142-5p, miR502-3p, miR144-3p and miR144-5p discriminate between the DGF appearance after transplantation. Moreover, miR130a-3p, miR-30e-5p, miR-324-3p were associated to the diminished renal function after one year (GRF < 30).

A second normalization analysis using GenEX v6 Enterprise software from Exiqon, using the average of all miRNAs expression (Mean Expression Value) as normalization parameter was performed.

This second analysis confirm that 486-5p, 144-3p, 142-5p, 144-5p, are again associated to DGF appearance. Regarding diminished renal function after a year any miRNAs were confirmed by Mean Expression Value.

**Conclusions:** We have identified some miRNAs in preservation solution that can be associated to DGF after transplantation. Analysis compliance with new normalization international guidelines confirms the significance of a subset of miRNAs previously associated to DGF post-KT.

miRNAs Screening Assay, DGF in immediate post-KT Normalization Guidelines Comparison	
Normalization by Spike-In	Normalization by Mean Expression Value
miR-486-5p	miR-486-5p
miR-18a	
miR-20a	
miR-363-3p	
mi-144-3p	miR-144-3p
miR-454-3p	
miR-223-3p	
miR-142-5p	miR-142-5p
miR-502-3p	
miR-144-5p	miR-144-5p

FIGURE 1.







