

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO BIOMARCADORES
PREDICTIVOS DE LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

LUIS SÁNCHEZ PÉREZ

DIRECTORES

ANA ISABEL SÁNCHEZ FRUCTUOSO

JOSÉ LUIS SANTIAGO ÁLVAREZ

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO
BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE LA EVOLUCIÓN
DEL TRASPLANTE RENAL**

LUIS SÁNCHEZ PÉREZ

DIRECTORES

ANA ISABEL SÁNCHEZ FRUCTUOSO

JOSÉ LUIS SANTIAGO ÁLVAREZ

Madrid 2021

Esta publicación ha sido financiada gracias al proyecto ASF.FERP.15 de la Fundación Eugenio Rodríguez Pascual.

*Crece la espiga arrogante enfrentándose al sol,
mas cuando su cuerpo grana y da frutos,
en gesto de humildad, se inclina hacia la tierra
para mostrar su respeto al sol.*

A mi marido, Eder. Por su apoyo incondicional y su paciencia en los momentos más duros. Sin él esta tesis no habría salido adelante, sin él mi vida estaría vacía. Tengo que agradecer a Dios, que al ponerle en mi vida me ha dado estabilidad y fuerza, haciendo que nuestros días en pareja tengan sentido. Juntos hemos luchado, juntos seguiremos luchando ante los inconvenientes del futuro y juntos somos uno. Gracias, Eder, por ser la ilusión y el complemento de mi vida.

A mi director, José Luis. Que con su tesón y su empeño ha conseguido sacar adelante este duro camino que ha sido dirigirme. No tengo palabras para agradecer que primeramente creyera en mí proponiéndome realizar este trabajo. Y después que me haya ayudado tanto a compaginar esta tesis con mi residencia en el hospital. Siempre le estaré agradecido.

Y a mí directora, Ana. Que con sus directrices ha perfilado esta tesis. También quiero agradecerle todo el esfuerzo de recogida de datos clínicos, así como la revisión de las biopsias y datos estadísticos que sin su ayuda esta tesis no hubiera sido posible. Al igual que quiero agradecer a todo su equipo de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos por el envío de muestras y la buena labor asistencial que realizan.

Quisiera agradecer también al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos por su meticulosa y excelente labor en el reconocimiento de la patología en las biopsias.

A mi familia, especialmente a mi madre. Gracias a ella soy quién soy. Y gracias a ella he podido llegar hasta aquí. Por su infinito amor y su esperanza, que nunca ha dejado de creer en mí. Incluso cuando uno mismo deja de creer.

A quien me ha ayudado en el camino. No puedo dejar de agradecer a Ángel, a Asier, a Aroa, a Elena, a Javi, y a cuantas personas han estado a mí alrededor. Pero especialmente a mi Natalia, que ha llevado conmigo la carga de esta Residencia en Inmunología, y literalmente, me ha aguantado.

El *valor* del científico no es descubrir lo que nadie ha descubierto, sino que el verdadero *valor* de un científico reside en decir lo que piensa sin miedo. Por eso, tengo que agradecer también a todas aquellas personas que no creyeron en mí, o se preocuparon en obstaculizar mi camino. Ya que, sin ellos, no habría encontrado el *valor* de seguir adelante y descubrir que puedo conseguir lo que me proponga. Como dijo Galileo "*Eppur si muove*". Y si bien es cierto: puede parecer que estamos quietos y, *sin embargo, nos movemos*.

Abreviaturas

- α -IL2R: Antagonistas de los receptores de la IL2
- ADCC: del inglés, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*
- APC: del inglés, *Antigen Presenting Cell*
- BCR: del inglés, *B cell Receptor*
- CCDC67: Del inglés, *Coiled-Coil Domain Containing 67*
- CCL8: del inglés, *Chemokine ligand 8*, o Interleucina 8
- CD: Célula dendrítica
- CMV: Citomegalovirus
- CPS1: Carbamil-fostato sintasa 1
- CsA: Ciclosporina A
- CTLA-4: del inglés, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
 - _fCTLA-4: forma de membrana de CTLA-4
 - _sCTLA-4 forma soluble de CTLA-4
- DEUP1: del inglés, *deuterosome assembly protein 1*
- DGF: del inglés, *Delayed Graft Function*
- DMC: Donantes Muertos por parada Cardio-circulatoria
- DME: donantes por Muerte Encefálica
- DNA: del inglés, *deoxyribonucleic acid*
- DPEP1: dipeptidasa 1
- DSA: del inglés, *Donor Specific Antibody*
- EDTA: Ác. EtilenDiaminoTetraAcético
- eGFR: del inglés, *estimated Glomerular Filtration Rate*
- FK: tacrolimus
- FOXP3: del inglés, *forkhead box P3*
- G-CSF: del inglés, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*
- GODT: del inglés, *Global Observatory on Donation and Transplantation*
- GWAS: del inglés, *Genome Wide Association Study*
- HLA: del inglés, *Human Leucocyte Antigen*
- IgG: inmunoglobulina G
- IgM: inmunoglobulina M
- IL-1: interleucina 1
- IL-2: interleucina 2
- IL-4: interleucina 4
- IL-5: interleucina 5
- IL-6: interleucina 6
- IL10: interleucina 10
- IL-12: interleucina 12
- IL-13: interleucina 13
- IL-17: interleucina 17
- IL-21: interleucina 21
- IL-23: interleucina 23
- IL-23R: receptor de Interleucina 23
- IFN γ : interferón gamma
- I κ B α : del inglés, *Inhibitor of NF κ B- α*
- IRF5: del inglés, *Interferon Regulatory Factor 5*
- IS: inmunosupresor
- _{im}TOR: inhibidor de *mammalian Target of Rapamycin*
- LRP2: receptor de LDL relacionado a la proteína 2

- MAMBA: manosidasa β
- Mb: membrana
- MHC: del inglés, *Major Histocompatibility Complex*
- MMF: micofenolato de Mofetilo
- NFATC1: factor nuclear de activación de células T 1
- NF κ B: del inglés, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- NK: del inglés, *Natural Killer cell*
- ONT: Organización Nacional del Trasplante
- OR: *odds Ratio*
- PCR: del inglés, *Polymerase Chain Reaction*
- Pmp: por millón de población
- PRA: del inglés, *Panel Reactive Antibody*
- PTPRO: del inglés, *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type O*
 - PTPRO_f: forma completa de PTPRO
 - PTPRO_t: forma truncada de PTPRO
- RA: rechazo Agudo
- RAC: rechazo Agudo Celular
- RMA: rechazo mediado por anticuerpos
- RT-PCR: del inglés, *Real Time PCR*
- SDS: Dodecil Sulfato de Sodio, detergente
- SHROOM3: del inglés, *Shroom family member 3*
- SLC6A13: del inglés, *solute carrier family 6 member 3*
- SNP: del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*
- SYPL2: del inglés, *Synaptophysin like 2*
- Tc: células T citotóxicas
- TCR: del inglés, *T cell Receptor*
- TE: Tris-EDTA, tampón
- Tfh: células T foliculares
- TGF- β : del inglés, *Transforming Growth Factor beta*
- Th: del inglés, *T helper cell*
- TNF- α : del inglés, *Tumoral Necrosis Factor alfa*
- TP53INP2: del inglés, *Tumor protein p53 inducible nuclear protein 2*
- Treg: células T reguladoras
 - μ Treg: Treg tímicas
 - γ Treg: Treg: inducidas en periferia
- UBE2Q2: del inglés, *Ubiquitin conjugating enzyme E2Q2*
- UMOD: uromodulina.
- UTR: del inglés, *untranslated region*
- WHO: del inglés, *World Health Organization*

Índice

Resumen.....	13
<i>Summary</i>	18
Introducción	23
1. Trasplante renal: Situación actual	24
2. Factores moleculares en el trasplante.....	25
2.1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad en el trasplante.....	25
2.2. Anticuerpos preformados en el receptor	28
3. Células en el trasplante.....	30
3.1. Células presentadoras de antígeno	30
3.2. Células efectoras	32
4. Rechazo Inmunológico del Injerto	38
4.1. Rechazo hiperagudo	38
4.2. Rechazo agudo	38
4.3. Rechazo crónico	40
5. Factores de riesgo implicados en el fallo del injerto	40
5.1. Factores no inmunológicos.....	40
5.2. Factores inmunológicos.....	43
6. Polimorfismos asociados al trasplante renal	46
6.1. SNPs relacionados con respuesta aloimmune	47
6.2. SNPs asociados a función renal en pacientes con enfermedad renal crónica en no trasplantados.....	56
Hipótesis y objetivos	57
1. Hipótesis.....	58
2. Objetivos	58
Material y métodos	59
1. Diseño del estudio	60
2. Variables	62
3. Genotipado de SNPs	64
3.1. Aislamiento y cuantificación de DNA	64
3.2. Tipaje de SNPs.....	67
3.3. Estudio de anticuerpos anti-HLA	73
4. Análisis estadístico.....	74
4.1. Análisis de asociación de un polimorfismo con la enfermedad	74
5. Inferencia de haplotipos	77
6. Limitaciones del estudio.....	78

Resultados	79
1. Análisis de polimorfismos localizados en factores de transcripción implicados en la primera señal de activación de linfocitos	80
2. Análisis de polimorfismos localizados en genes de moléculas que participan en la segunda señal de activación de linfocitos	85
3. Análisis de polimorfismos localizados en citocinas y receptores que participan en la tercera señal de activación de linfocitos.....	92
4. Análisis de replicación de SNPs asociados con rechazo en trasplante renal.....	103
5. Análisis de polimorfismos asociados a función renal en enfermedad renal crónica realizado en pacientes con trasplante renal	108
Discusión	110
1. Influencia de polimorfismos localizados en factores de transcripción implicados en la primera señal de activación de linfocitos	111
1.1. NFKBIA	111
1.2. FOXP3.....	113
2. Implicación de polimorfismos localizados en genes de moléculas que participan en la segunda señal de activación de linfocitos	116
2.1. CD28 y CD86.....	116
2.2. CTLA-4	118
3. Papel de polimorfismos localizados en citocinas y receptores que participan en la tercera señal de activación de linfocitos.....	124
3.1. IL-6.....	125
3.2. IL-21	125
3.3. IL-17A	129
3.4. IL-12B	130
3.5. IL-23R	131
3.6. Análisis multivariable de los SNPs	134
4. Efecto de SNPs previamente asociados con rechazo en trasplante renal	136
4.1. PTPRO	136
4.2. DEUP1	138
4.3. Análisis multivariable de los SNPs	139
5. Efecto de polimorfismos asociados a función renal en enfermedad renal crónica realizado en pacientes con trasplante renal	140
5.1. UBE2Q2.....	140
5.2. UMOD.....	141
6. Figuras resumen de la implicación de los polimorfismos analizados	143
Conclusiones	144
Referencias.....	146
Anexo	168

Resumen

El trasplante renal sigue siendo a día de hoy el tratamiento de elección para la insuficiencia renal crónica terminal. Se ha demostrado que es mejor terapia sustitutiva que la diálisis y se relaciona de forma directa con el aumento la supervivencia en estos pacientes. Sin embargo, el trasplante del órgano induce en el receptor una reacción inmunológica llamada rechazo que deteriora el injerto y condiciona la calidad de vida del paciente. Para evitarlo es necesario administrar fármacos inmunosupresores que modulen la respuesta inmunológica preservando el órgano. Es indudable que durante las últimas décadas se han producido grandes avances tanto en el conocimiento del sistema inmunitario como en los tratamientos inmunosupresores que han conducido a una reducción de la incidencia de rechazo. Sin embargo, todos estos avances no han tenido el impacto esperado en la supervivencia del injerto a largo plazo.

Esta situación nos empujó a investigar sobre aquellos parámetros que nos permitiesen predecir con suficiente antelación los episodios de rechazo y así poder establecer un correcto balance entre las terapias de inmunosupresión y una respuesta inmune contra el injerto. El objetivo principal es conocer los polimorfismos genéticos asociados con el rechazo y con una peor función renal en los pacientes con trasplante renal. Además, pretendemos determinar qué polimorfismos genéticos son capaces de predecir la respuesta al tratamiento de inducción y correlacionar los polimorfismos genéticos estudiados asociados a riesgo de sufrir rechazo del trasplante renal con los hallazgos histopatológicos en las biopsias.

Entre los biomarcadores que vamos a estudiar en el trasplante se encuentran los polimorfismos de genes implicados en las cascadas de activación del sistema inmunitario, tanto en la primera (polimorfismos de los genes *NFKBIA* y *FOXP3*), como en la segunda (polimorfismos de los genes *CD28*, *CD86* y *CTLA4*) como en la tercera señal (polimorfismos de los genes *IL6*, *IL21*, *IL17A*, *IL12B* y *IL23R*). Todos estos genes

modulan la respuesta del sistema inmunitario pudiendo explicar así la heterogeneidad en la evolución de los injertos. También, nos propusimos analizar una serie de polimorfismos descritos en la bibliografía que están asociados con el rechazo renal (polimorfismos de los genes *PTPRO* y *DEU1*) y con la función renal en pacientes con enfermedad renal crónica (polimorfismos de los genes *UBE2Q2* y *UMOD*).

Se trata de un estudio de cohortes retrospectivo, a partir de una base de datos prospectiva de los pacientes trasplantados en el Servicio de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos. Así, se incluyeron 869 pacientes consecutivos que recibieron un trasplante renal en nuestro centro entre el 1 de enero de 2005 y el 31 de diciembre de 2016. Todos los rechazos han sido confirmados histopatológicamente y categorizados siguiendo los criterios de la clasificación de Banff por parte del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos.

Estudiamos el DNA aislado de muestras de sangre anticoagulada de estos pacientes trasplantados entre 2005 y 2016 para estudiar los episodios de rechazo durante el primer año. El estudio genético se realizó mediante análisis de SNPs mediante ensayos con sondas *TaqMan*[®] en un sistema de RT-PCR 7900HT (*Applied Biosystems*) y mediante *iPLEX Gold Assay* (*Sequenom, inc.*).

Los resultados encontrados en la primera señal de activación inmunitaria mostraron una asociación protectora del SNP rs696 del gen *NFKBIA* para el rechazo agudo celular (RAC), sobre todo en los pacientes sin tratamiento de inducción con Timoglobulina. En los SNPs relacionados con la segunda señal de activación leucocitaria observamos como el rs3087243 de *CTLA4* confería protección frente al RAC y al RAC de Grado ≥ 2 de la clasificación de Banff, sobre todo en pacientes que no habían recibido tratamiento de inducción. También realizamos el análisis de algunos polimorfismos pertenecientes a la tercera señal de activación, y encontramos que el rs4833837 de *IL21* presentaba

protección para el RAC <2 de la clasificación de Banff en pacientes que habían recibido tratamiento de inducción, sin embargo, era de un factor de riesgo para el rechazo mediado por anticuerpos (RMA) en pacientes que no habían recibido tratamiento de inducción. El rs3212227 del gen *IL12B* se asociaba con un mayor riesgo de padecer RAC y RAC de Grado ≥ 2 de la clasificación de Banff. Y por último en esta tercera señal, encontramos varias asociaciones de los polimorfismos de *IL23R*: el rs18089677 se asoció con un mayor riesgo de RAC y RAC de Grado ≥ 2 de la clasificación de Banff. Sin embargo, el rs12070470 y el rs7528924 conferían protección frente al RAC y al RAC de Grado ≥ 2 de la clasificación de Banff, además, este último, también otorgaba protección frente al RMA.

Al estudiar los SNPs que habían sido descritos, previamente en la bibliografía, como factores de riesgo en el trasplante renal, encontramos que tanto el rs7976329 de *PTPRO* y el rs10765602 de *DEUPL1* conferían riesgo de RAC y al RAC de Grado <2 de la clasificación de Banff, especialmente en los pacientes que no habían recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina.

Cuando valoramos los SNPs que habían sido descritos como factores de riesgo para la función renal en pacientes con enfermedad renal crónica en no trasplantados sólo observamos asociaciones con dos SNPs. El rs1394125 de *UBE2Q2* era un factor de riesgo en los pacientes trasplantados al asociarse con una tasa de filtración más baja y una proteinuria mayor. Sin embargo, el rs12917707 de *UMOD* se asociaba a una mayor tasa de filtración y una menor proteinuria en los pacientes estudiados.

Al realizar los estudios de análisis multivariable pudimos comprobar que seguían siendo factores de asociación independientes para RAC: rs696 (*NFKBIA*), rs3087243 (*CTLA4*), rs3212227 (*IL12*), rs10889677 (*IL23R*), rs12070470 (*IL23R*) y rs7976329 (*PTPRO*). Y para el RAC de Grado ≥ 2 de la clasificación de Banff: rs696 (*NFKBIA*), rs3087243

(*CTLA4*), rs7976329 (*PTPRO*). Y también para el RAC de Grado <2 de la clasificación de Banff: rs7976329 (*PTPRO*) y rs10765602 (*DEUPI*).

Así, podemos concluir que los polimorfismos rs696 del gen *NFKBIA*, rs231775 de *CTLA4*, rs4833837 de *IL21*, rs3212227 de *IL12B* y rs10889677 de *IL23R* implicados en la activación de los linfocitos T, están asociados con distintos grados de rechazo inmunológico según la clasificación de Banff en función de que los pacientes hayan recibido o no tratamiento de inducción con Timoglobulina. También se confirma que los SNPs, rs7976329 de *PTPRO* y rs10765602 de *DEUPI* están asociados con el rechazo inmunológico en concreto en aquellos pacientes que presentan RAC de Grado <2 de la clasificación de Banff siendo la asociación del rs7976329 de *PTPRO* independiente del tratamiento de inducción con Timoglobulina. Por último, podemos afirmar que de los *loci* examinados por estar implicados en la función renal en pacientes con enfermedad renal crónica, sólo los polimorfismos rs1394125 de *UBE2Q2* y rs12917707 de *UMOD* están asociados con la función renal en nuestra cohorte de pacientes con trasplante renal.

Summary

Nowadays, kidney transplantation is still the treatment of choice for end-stage chronic kidney disease. It has proven to be the best replacement therapy for dialysis and it is directly related to increased survival rates in these patients. However, the transplantation of the organ causes in the receiver an immune reaction called “rejection” that deteriorates the graft and it conditions the patient's life quality. To avoid this, it is necessary to use immunosuppressive drugs that modulate the immune response while preserving the organ. There no doubt there has been a major progress both in the knowledge of the immune system and in immunosuppressive treatments during the last decade, which led to a lower rate of rejection's incident. Nevertheless, not all these progresses have had the expected impact on long-term allograft survival.

This scenario led us to research those parameters that would allow us to predict in good time the rejection episodes to point out the right balance between immunosuppression therapies and an immune response against the graft. The main objective is to know the genetic polymorphisms associated with rejection and a worse renal function in kidney transplant patients. Moreover, we want to determine which genetic polymorphisms may predict the response to induction therapy and we want to correlate the genetic polymorphisms associated with the risk of suffering kidney transplant rejection with the histopathological findings in the biopsies.

Among the biomarkers that we are about to study in the transplant there are polymorphisms of genes involved in the activation of the immune system both in the first (polymorphisms of the *NFKBIA* and *FOXP3* genes), the second (polymorphisms of the *CD28*, *CD86* and *CTLA4* genes) and the third signal (polymorphisms of the *IL6*, *IL21*, *IL17A*, *IL12B* and *IL23R* genes). All these genes modulate the immune system response, which may explain the heterogeneity in the evolution of the grafts. In addition, we set out to analyze a series of polymorphisms described in the bibliography

that are associated with kidney rejection (polymorphisms of the *PTPRO* and *DEU1* genes) and with kidney function in patients with chronic kidney disease (polymorphisms of the genes *UBE2Q2* and *UMOD*).

This is a retrospective cohort study, based on a prospective database of transplant patients at the Nephrology Department of the Clínico San Carlos Hospital. In this way, a total of 869 consecutive patients who received a kidney transplant at our Hospital between January 1, 2005 and December 31, 2016 were included. All the rejections were confirmed histopathologically and categorized according to the criteria of the Banff classification by the Pathology Department of Clínico San Carlos Hospital.

We have studied DNA isolated from anticoagulated blood samples from transplanted patients between 2005 and 2016 to study the rejection episodes during the first year. The genetic study was performed by analyzing SNPs using TaqMan® probes tests in a 7900HT RT-PCR system (*Applied Biosystems*) and using iPLEX Gold Assay (*Sequenom, Inc.*).

The results found at the first signal of immune activation showed a protective association of the SNP rs696 of the *NFKBIA* gene for T-cell mediated acute rejection (TCMR), especially in patients without thymoglobulin induction treatment. In the SNPs related to the second leukocyte activation signal we observed how *CTLA4* rs3087243 conferred protection against TCMR and TCMR Grade ≥ 2 of the Banff's classification, especially in patients who had not received induction treatment. We also performed some polymorphisms analysis that belonged to the third activation signal, and we found that rs4833837 of *IL21* showed a protection for TCMR Grade < 2 of the Banff's classification in patients who had received induction therapy, nonetheless it was a risk factor for antibody-mediated acute rejection (AMR) in patients who had not received induction therapy. The rs3212227 of the *IL12B* gene was associated with an increased

risk of TCMR and TCMR Grade ≥ 2 of the Banff's classification. Finally, in this third signal, we found several associations of *IL23R* polymorphisms: rs18089677 was associated with an increased risk of TCMR and TCMR Grade ≥ 2 of the Banff's classification. However, rs12070470 and rs7528924 conferred protection against TCMR and TCMR Grade ≥ 2 of the Banff's classification, and this last one also conferred protection against AMR.

When it comes to study the SNPs previously described in the bibliography as risk factors in kidney transplantation, we found that both *PTPRO* rs7976329 and *DEUP1* rs10765602 conferred risk of TCMR and TCMR Grade < 2 of the Banff's classification, especially in patients who had not received induction therapy with Thymoglobulin.

When we assessed the SNPs that had been described as risk factors for kidney function in no transplanted patients with chronic kidney disease we only observed associations with two SNPs. The rs1394125 of *UBE2Q2* was a risk factor in transplant patients as it was associated with lower filtration rate and higher proteinuria. Nonetheless, the rs12917707 of *UMOD* was associated with a higher filtration rate and lower proteinuria in the patients we studied.

When we performed the multivariate analysis studies, we could verify that the following were still independent association factors for TCMR: rs696 (*NFKBIA*), rs3087243 (*CTLA4*), rs3212227 (*IL12*), rs10889677 (*IL23R*), rs12070470 (*IL23R*) and rs7976329 (*PTPRO*). Moreover, for the TCMR Grade ≥ 2 of the Banff's classification: rs696 (*NFKBIA*), rs3087243 (*CTLA4*), rs7976329 (*PTPRO*). Finally, for the TCMR Grade < 2 of the Banff's classification: rs7976329 (*PTPRO*) and rs10765602 (*DEUP1*).

Thus, we can conclude that the polymorphisms rs696 of the *NFKBIA* gene, rs231775 of *CTLA4*, rs4833837 of *IL21*, rs3212227 of *IL12B* and rs10889677 of *IL23R* involved in

the activation of T lymphocytes, all of them are associated with different degrees of immune rejection according to Banff's classification, depending on whether or not patients received induction therapy with Thymoglobulin. It is also confirmed that SNPs, rs7976329 of *PTPRO* and rs10765602 of *DEU1* are associated with immune rejection in those patients who present TCMR Grade <2 of the Banff's classification, being the association of rs7976329 of *PTPRO* independent of thymoglobulin induction treatment. Finally, after analyzing the loci involved in renal function with chronic renal disease we could confirm that only the polymorphisms rs1394125 of *UBE2Q2* and rs12917707 of *UMOD* are associated with renal function in our cohort of patients with renal transplantation.

Introducción

1. Trasplante renal: situación actual

En la actualidad, la mejor opción terapéutica que existe para tratar la insuficiencia renal terminal sigue siendo el trasplante. El éxito del mismo radica en que mejora la calidad de vida del paciente, además de reducir las complicaciones y la mortalidad en comparación con el tiempo en diálisis¹⁻³. Por este motivo, se realizan un número significativo de trasplantes renales en todo el mundo, a fecha de 31 de diciembre de 2019, se produjeron a nivel global 95.536 (19,38 pmp) (*Figura 1*). En Europa se llevaron a cabo 28.306 (35,69 pmp) de los cuales 3.423 (73,77 pmp) fueron practicados en España⁴. Nuestro país tiene una amplia experiencia en la realización de trasplantes renales y en la donación de órganos, de los 3.423 riñones trasplantados, 3.088 (66,55 pmp) se realizaron de donantes cadáveres y 335 (7,22 pmp) de donantes vivos. De los trasplantes realizados a pacientes procedentes de donantes cadáveres, 2.074 (44,70 pmp) fueron a causa de una muerte cerebral, mientras que en 1.014 (21,85 pmp) de los casos se debió a donaciones después de una muerte a causa de un evento cardiocirculatorio⁵.

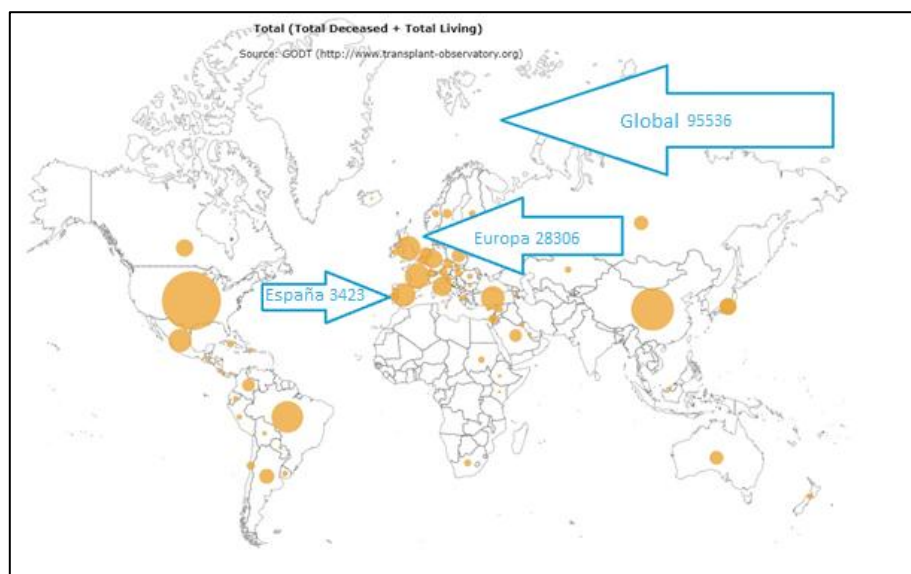


Figura 1: datos de Trasplante en 2019 según “Those 2019 data are based on the Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT) data, produced by the WHO-ONT collaboration”⁴.

2. Factores moleculares en el trasplante

A pesar de todos los avances en el proceso de trasplante tanto en el conocimiento del sistema inmunitario como en el tratamiento inmunosupresor, la pérdida del injerto sigue siendo un problema importante y el rechazo tiene un papel crítico en el deterioro del órgano trasplantado. Como todos sabemos, el sistema inmunitario es un conjunto de células y factores proteicos diseñados para enfrentarse a aquello que de algún modo no conoce, o es ajeno a él. Entendiendo el concepto de “extraño” como aquellas moléculas, o antígenos, que no son del propio organismo y por consiguiente no han sido previamente presentadas a este sistema de protección cuando se está generando^{6, 7}. Este complejo conjunto de factores que conforma el sistema inmunitario humano debe detectar, identificar y eliminar todo aquello que haya sido incorporado al organismo. En el trasplante de órgano sólido el sistema entra en alerta y se ve obligado a rechazar aquello que no es propio⁸. Los elementos que participan en este proceso se enumeran a continuación.

2.1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad en el trasplante

El organismo posee un sistema de identificación genética que lo hace único y diferente al resto de organismos de la misma especie y de otras especies. Este sistema se llama complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), no sólo participa en la identificación genética, sino que también es la forma por la cual se presenta todo aquello que es ajeno al propio organismo^{9, 10}. En humanos, al MHC se le denomina HLA del inglés *Human Leukocyte Antigen*, se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 formando un grupo de genes que están asociados entre sí mediante una función y expresión características^{9, 10}. Estos loci del HLA pertenecen a dos tipos de genes muy polimórficos que se clasifican como clase I y

clase II. Estas clases del HLA expresan proteínas que tienen función homóloga presentando antígenos; sin embargo, las estructuras proteicas derivadas de la expresión de estos genes son diferentes, al igual que es diferente su localización en las células del organismo⁹.

La clase I comprende aquellos genes que determinan la expresión de una proteína que va a contener el péptido de presentación de todo aquello ajeno al organismo que haya sido procesado por las células^{9, 11}. Clásicamente se describieron por métodos serológicos dos moléculas asociadas a la presentación antigénica en el trasplante: HLA-A y HLA-B¹². El HLA de clase I se expresa de forma constitutiva en todas las células somáticas nucleadas y su expresión puede ser diferencial dependiendo del tejido y su estado¹³. Su vía de presentación antigénica es endógena, es decir, cada célula procesa péptidos y los incorpora a la molécula de HLA de la clase I para posteriormente exponerlos en la superficie celular, y así, ser reconocidos por las células del sistema inmunitario, concretamente linfocitos T CD8⁺ citotóxicos⁹.

La clase II comprende aquellos genes que forman las dos cadenas que van a presentar los péptidos no propios que hayan sido capturados por unas células específicas del sistema inmunitario. El HLA de clase II está formada por dos cadenas polipeptídicas α y β cada una codificada en un gen distinto. Clásicamente, de todos estos genes los que se describieron mediante métodos serológicos han sido los genes de HLA-DR y HLA-DQ^{14, 15}. Las moléculas de clase II, al contrario que la clase I, no se encuentran en toda la célula del organismo, sino que solo están presentes de forma constitutiva en un grupo de células del sistema inmunitario: los linfocitos B, los macrófagos y células dendríticas, éstas son conocidas como las células presentadoras de antígeno, APC del inglés *Antigen Presenting Cell*^{8, 14}. También, se encuentran en ciertos endotelios vasculares y células epiteliales de algunos órganos como en el renal, además se potencia

su expresión en micro-ambientes proinflamatorios como es el trasplante¹⁶. Estas APC tienen la capacidad de endocitar y procesar los antígenos exógenos que encuentren ajenos al organismo y expresarlos con alta eficiencia en la superficie celular. De esta forma, serán reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4⁺ para iniciar la respuesta inmune¹⁷.

La expresión del HLA en las superficies celulares es de 100.000 – 300.000 moléculas⁹ y está influenciada por factores externos como la inflamación o la infección que genera una respuesta de citocinas que aumentan la transcripción de genes tanto de la clase I como de la clase II incrementando su expresión en la superficie^{6, 9} y con ello aumentando su eficiencia inmunológica frente al aloinjerto¹⁸.

En el trasplante, los antígenos del aloinjerto se pueden presentar de varias formas al sistema inmunitario del receptor. Dependiendo como sean estas presentaciones se desencadenan diferentes respuestas en el organismo que conducen, si no se remedia, al rechazo del órgano trasplantado^{19, 20}. La importancia de este paso radica en el reconocimiento del aloantígeno por el linfocito T mediante el sistema de reconocimiento del linfocito T o TCR, del inglés *T-Cell Receptor*. Este es el primer paso de la respuesta adaptativa frente al injerto, que va a transmitir la primera señal de activación al linfocito T estimulando la maquinaria genética que da lugar a la expansión clonal a expensas de las otras señales de coestimulación necesarias^{19, 20}.

En condiciones fisiológicas los linfocitos T reconocen el antígeno presentado por las moléculas de HLA propias. Sin embargo, la respuesta desencadenada en el trasplante por los linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ del receptor van a reconocer de forma directa los grupos HLA alogénicos intactos de las células del injerto del donante. Es la vía de reconocimiento directo^{19, 20}. Las células que presenten la clase I en su superficie restringirán a los linfocitos T CD8⁺ desencadenando una respuesta citotóxica; sin

embargo, la clase II restringirá a los linfocitos T cooperadores $CD4^+$ generando una respuesta mediada por citocinas^{17, 21}. Este mecanismo implica que la expansión de linfocitos T alogénicos sea de 100 a 1000 veces mayor que aquellos que no reconocen péptidos alogénicos ya que tienen la capacidad de reconocer las estructuras del HLA no propias y a su vez los péptidos alogénicos presentados en las moléculas de HLA del injerto²². El reconocimiento directo es una de las causas por las que los aloinjertos pueden desencadenar reacciones de rechazo tempranas y muy intensas¹⁷.

La vía más habitual de presentar antígenos es la vía indirecta; en el trasplante también es usada en la respuesta adaptativa frente al injerto. Las células APC del receptor van a fagocitar células o restos celulares del donante procesando los péptidos polimórficos del HLA y otros péptidos derivados de moléculas cuasi-polimórficas^{17, 21}. Como resultado, presentan con moléculas de HLA de la clase II propias los péptidos alogénicos del donante desencadenando una respuesta mediada por linfocitos T cooperadores $CD4^+$ ²¹.

2.2. Anticuerpos preformados en el receptor

La compatibilidad entre donante y receptor en el trasplante es esencial para un mejor pronóstico de la supervivencia del injerto^{12, 14, 15, 23, 24}. Se entiende como compatibilidad donante-receptor a la concordancia que existe entre los alelos HLA presentes en el injerto y los del receptor. Clásicamente se han estudiado en el trasplante de órgano sólido los alelos de *HLA-DR*, *HLA-B* y *HLA-A*¹². Se sabe que las incompatibilidades entre los alelos HLA aumentan el riesgo de sufrir rechazo, y que este es directamente proporcional a la cantidad de incompatibilidades que haya entre donante-receptor^{15, 25}. Además, la supervivencia del injerto va disminuyendo según aumentan las incompatibilidades²⁶⁻²⁸.

La inmunosupresión ha mejorado el pronóstico de los injertos en los receptores elevando la tasa a un 90% de supervivencia con donantes cadáveres y 95% de supervivencia del injerto con donantes *de vivo* en el primer año post-trasplante^{17, 21}, a pesar de ello el rechazo del injerto sigue siendo una causa importante de pérdida del órgano debido principalmente a la formación de anticuerpos anti-HLA, que se generan *de novo* en el paciente^{24, 29}. Esta producción frente a moléculas HLA requiere de un estímulo antigénico previo que se produce cuando el receptor entra en contacto con células procedentes de otro individuo cuyas moléculas HLA son diferentes²¹. Estos anticuerpos circulantes son específicos del donante y se generan debido a las incompatibilidades que existen entre los alelos del HLA del injerto y del receptor. Son los anticuerpos donante-específicos, o DSA del inglés *Donor Specific Antibody*, y son causa de rechazo mediado por anticuerpos²⁴. Es de sobra conocido que el riesgo de rechazo entre los receptores que no tienen DSA es mucho menor que aquellos que tienen DSA preformados de trasplantes anteriores, al igual, que el riesgo es muy elevado en aquellos pacientes que generan DSA *de novo*, frente al injerto^{23, 24}.

3. Células en el trasplante

El daño tisular que se produce en el trasplante de órgano sólido es inevitable debido a diversos factores, entre ellos los tiempos de espera que provocan una isquemia prolongada en el órgano y el proceso mismo de manipulación quirúrgica³⁰. Estos factores producen una estimulación de la respuesta inmunitaria, lo que va a generar una alta demanda celular en el lugar del daño^{30, 31}. En el transcurso de esta respuesta, las células van a necesitar una serie de factores solubles (citocinas y quimiocinas) propios de la respuesta inflamatoria³² que estimulan y ayudan a la proliferación celular. Las células implicadas en este proceso se describen a continuación.

3.1. Células presentadoras de antígeno

Como ya comentamos, las APCs tienen la labor de capturar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos T mediante la restricción de las moléculas HLA, generando señales que estimulan su proliferación y diferenciación¹⁴. Una vez entran en contacto las células y el antígeno, estas moléculas migran por la membrana plasmática mediante el citoesqueleto^{33, 34} hasta conformar un complejo entramado de interacciones moleculares donde el eje central es la presentación TCR-antígeno-HLA I/II y sus moléculas accesorias (correceptores CD4/CD8 y moléculas de adhesión). Este contacto celular es la sinapsis inmunológica³⁵. Para que la presentación del antígeno sea efectiva y se produzca la activación del linfocito T, deben entrar en contacto durante la sinapsis, otras moléculas adicionales que se van a encargar de la segunda señal de activación. De este modo los linfocitos T podrán diferenciarse a células efectoras CD4⁺ o T colaboradores, y/o CD8⁺ o T citotóxicos³⁶. Estas moléculas que participan en la segunda señal han sido descritas en la literatura debido a su importancia tanto activadora como supresora celular: CD28, CTLA-4 (del inglés *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) y CD86³⁷⁻⁴⁰.

Además, existe una tercera señal mediada por citocinas que es indispensable para la proliferación y diferenciación hacia células efectoras. También son parte necesaria las quimiocinas, que guían la migración de las APCs hacia los lugares donde se ha producido un daño tisular o hacia los sitios de presentación antigénica, como son los ganglios linfáticos⁴¹⁻⁴³. Dentro de las APCs destacamos las siguientes.

3.1.1. Células dendríticas

Las células dendríticas (CDs) son APCs de origen hematopoyético que se encuentran residentes en los tejidos y los órganos, las cuales tienen la capacidad de presentar antígenos de manera efectiva a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺⁴⁴. Estas células tienen una alta concentración de moléculas HLA en su superficie que pueden presentar alo péptidos que conduzcan a un rechazo⁴⁵. Esto es debido a la estimulación producida por ciertas citocinas pro-inflamatorias como IL-12 que activan a la célula y la inducen a migrar a los órganos linfoides secundarios donde se encuentran con los linfocitos que desencadenan el rechazo⁴⁶.

3.1.2. Células fagocíticas mononucleares

Los monocitos son células de origen hematopoyético circulantes en sangre periférica, que una vez que se establecen en un tejido tienen mayor capacidad de fagocitar, denominándose macrófagos. Estos macrófagos son APCs que tienen la habilidad de regular la respuesta pro-inflamatoria o anti-inflamatoria⁴⁷. Estas células tienen la capacidad de eliminar las células dañadas por la cirugía del trasplante. Esto hace que sean capaces de procesar los aloantígenos procedentes del donante y los presenten a través de moléculas de HLA; una vez se han activado los macrófagos tienen mayor capacidad de expresar moléculas de HLA de la clase II. Además, los macrófagos activos secretan citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, CCL8, TNF- α , IL-12 e INFs que

reclutan y activan al componente celular en el injerto dirigiendo las primeras etapas del rechazo inmunitario^{6, 47}. Se ha visto que la mejora en la supervivencia del trasplante se asocia a la reducción de la infiltración de estas células en el injerto⁴⁸.

3.2. Células efectoras

El siguiente grupo de células que participan en la respuesta son las efectoras. Estas células van a intervenir de manera activa en el balance de la tolerancia-rechazo del trasplante, de forma que son capaces de modular la respuesta o destruir aquellos componentes que no son del propio organismo. Se caracterizan por pertenecer a la respuesta inmunitaria adaptativa, son los linfocitos B y los linfocitos T.

3.2.1. Linfocitos B

Los linfocitos B son células que se originan y maduran en la médula ósea. Estas células son las precursoras de las células plasmáticas, que son las productoras de anticuerpos⁴⁹. Los linfocitos B necesitan varias señales de activación; la primera, es el contacto del antígeno con el receptor de reconocimiento antigénico o BCR (del inglés, *B Cell Receptor*). Los antígenos pueden ser reconocidos en su forma soluble o mediante el contacto en la superficie de una APC^{50, 51}. Una vez se transmite la primera señal, las células B necesitan una segunda señal de activación que es proporcionada por los linfocitos T CD4⁺ foliculares (Tfh) en la zona T/B de los folículos germinales de los órganos linfoides secundarios. Al activarse completamente el linfocito B sufre una transformación hacia célula plasmática, productora activa de anticuerpos específicos frente al aloantígeno (de alta afinidad), que migra para enquistarse en la médula ósea⁴⁹⁻⁵¹. Desde la médula ósea producirán DSAs, que se han visto asociados con rechazo humoral mediado por anticuerpos, que repercuten de manera severa en la supervivencia

del injerto⁵⁰. De hecho, los métodos terapéuticos actuales no alcanzan a prevenir el 10% de los DSAs que se generan *de novo* en el trasplante durante el primer año y que son gravemente lesivos para el injerto⁵¹. Además, se ha relacionado de forma directa a los DSA con el rechazo mediado por células T⁵². Todo esto indica que los linfocitos B tienen un papel decisivo en el trasplante⁵³.

3.2.2. Linfocitos T

Los Linfocitos T se caracterizan por tener un TCR capaz de reconocer los antígenos presentados en el contexto del HLA. Este receptor les clasifica en dos subpoblaciones en base a la composición de sus cadenas polipeptídicas: los TCR $\alpha\beta$, que son el 95% del total, y los TCR $\gamma\delta$ que comprenden el 5% restante⁵⁴. Como anteriormente se comentó, este receptor es el encargado de la transmisión de la primera señal de activación en los linfocitos T, pero necesita la ayuda unas moléculas colindantes que les permitan reconocer con exactitud las partículas del complejo HLA sin error. Estos co-receptores son los CD8 y CD4, los cuales van a reconocer las moléculas de HLA de clase I y clase II, respectivamente. Estos marcadores de superficie nos van a volver a clasificar de forma exclusiva y dicotómica las células T en dos grupos, las derivadas de CD8⁺ o citotóxicas (Tc) con funciones líticas sobre las células del injerto y las CD4⁺ o colaboradoras (Th, del inglés *T helper*) con funciones de coordinación de la respuesta inmunitaria dirigida por citocinas que dañan el injerto por inducción de la inflamación^{36, 55, 56}.

3.2.2.1. Linfocitos CD8⁺ o citotóxicos

Los linfocitos CD8⁺ están restringidos por el HLA de clase I⁵⁷. Son indispensables para el mantenimiento de la inmunidad frente a patógenos invasores y frente a tumores⁵⁸. Estas células proliferan y se diferencian a Tc, cuya actividad citolítica va decayendo con

el tiempo y también se genera un tipo celular $CD8^+$ de memoria capaz de reaccionar nuevamente al daño de forma más rápida y agresiva⁶. En el trasplante, los linfocitos $CD8^+$ son capaces de llegar mediante diferentes estímulos citocínicos y quimioquímicos al lugar donde está el injerto, una vez allí reconocen los HLA de clase I e inducen la proliferación de Tc. Esto conlleva a la destrucción del injerto mediante la inducción de apoptosis celulares¹⁴. Este mecanismo de apoptosis celular es bien conocido en estas células, bien sea por su receptor estimulador de la apoptosis Fas-ligando, bien sea por la secreción de factores solubles (granzimas y perforinas) capaces de inducir la muerte de las células del injerto^{14, 59}. Todos estos mecanismos causan disminución de la supervivencia del injerto y retraso en la función del injerto debido a la destrucción celular intra-injerto⁶⁰. Cabe destacar, que los linfocitos T $CD8^+$ son los primeros causantes del rechazo en etapas tempranas, pero que la principal causa de rechazo está ligada a la inflamación inducida por citocinas procedentes de los linfocitos $CD4^+$ ^{6, 61}.

3.2.2.2. Linfocitos $CD4^+$ o colaboradores

Los linfocitos Th reconocen péptidos alogénicos en el contexto de la clase II del HLA⁵⁷. Como ya se ha comentado, la principal función efectora de estas células es la coordinación de la respuesta inmunitaria mediante la secreción de citocinas. Las citocinas actúan de diferentes formas en las células diana; produciendo activación y generación de anticuerpos en los linfocitos B^{41, 62, 63}; activación del endotelio vascular para el transvase de células inmunitarias^{41, 42}; mantenimiento de la inmunidad innata y la inflamación^{6, 41}; y, especialmente promoviendo y regulando la respuesta celular mediada por células T. Esto conduce a la diferenciación de las distintas subpoblaciones de linfocitos Th0 en Th1, Th2, Th17, Tfh y los linfocitos T reguladores (Treg) todas ellas implicadas en procesos de rechazo del injerto⁶⁴⁻⁶⁷.

3.2.2.2.1. Linfocitos Th1 y Th2

Clásicamente se ha separado los linfocitos CD4⁺ en dos grupos, Th1 y Th2, en función de la citocinas que secretaban⁶⁸. Los Th1, principalmente, se caracterizan por la secreción de INF- γ , IL-2 y TNF- α , mientras que las células Th2 secretan una amplia gama de citocinas, tales como IL-4, IL-5 e IL-13⁶⁶ (*Figura 2*). Ambas vías se han considerado mutuamente excluyentes, ya que las citocinas que producen unos inhiben a las de la otra clase celular⁶; esto indica que sus funciones serán diferentes y sus vías de expansión clonal determinarán unas consecuencias distintas en el trasplante. La Th1, tienen la capacidad de activar frente al injerto a los linfocitos Tc y a los macrófagos induciendo la respuesta celular típicamente relacionada con el rechazo agudo⁶⁶. En las biopsias de pacientes con rechazo agudo en trasplantes de riñón se encontró principalmente INF- γ , característico de las Th1⁶⁹. Mientras que las Th2, son células que estimulan las vías independientes de fagocitos: se caracterizan por potenciar la producción de anticuerpos T-dependientes (aquellos que han sido previamente reconocidos por linfocitos T aloreactivos) y estimular la inflamación⁷⁰. Se ha sugerido que los rechazos crónicos están asociados a las células Th2, ya que se han visto en biopsias realizadas en estos rechazos^{71, 72}. Además, como hemos comentado están detrás de los rechazos mediados por anticuerpo por su capacidad de estimular las células B^{29, 70}. Clásicamente se creía que el balance entre Th1 y Th2 determinaba el equilibrio entre el rechazo y la tolerancia⁷³, actualmente se conocen más líneas celulares que intervienen de forma compleja en el trasplante alterando el clásico paradigma^{19, 68, 74}.

3.2.2.2.2. Linfocitos Th17

Las citocinas como el factor de crecimiento transformante β (TFG- β , del inglés *Transforming Growth Factor β*), IL-6, IL-1, IL-21 y IL-23 son capaces de diferenciar

los Th0 hacia los linfocitos Th17^{19, 75}. Su principal función es generar un nexo entre la inmunidad adaptativa y la innata, mediante la secreción de IL-17^{74, 76} (*Figura 2*); esta citocina es capaz de estimular a los neutrófilos y reclutarlos al lugar del aloinjerto donde se producen lesiones por su actividad⁷⁶. Estas células, también, tienen la capacidad intrínseca de producir IL-21 que juega un papel indispensable en la activación autocrina de los Th17⁷⁷, en la generación de linfocitos foliculares y en el desarrollo de anticuerpos mediante la estimulación de los linfocitos B en los centros germinales^{74, 78, 79}. Diversos estudios han demostrado que estas células están claramente implicadas en el rechazo de órganos^{74, 80, 81}.

3.2.2.2.3. Linfocitos T foliculares

En los ganglios linfáticos se encuentran los linfocitos Tfh, estos son necesarios para la maduración de los linfocitos B, y decisivos para la producción de inmunoglobulinas en los rechazos mediados por anticuerpos. Estas células están reguladas bajo la citocina IL-21 necesaria para su diferenciación¹⁹ (*Figura 2*).

3.2.2.2.4. Linfocitos T reguladores

Los linfocitos Treg son las células de la inmunidad adaptativa capaces de suprimir la respuesta inmunitaria y mantener la tolerancia frente a lo propio. Su capacidad es adquirida sobre todo en el timo, donde reconocen péptidos del organismo generando respuestas de tolerancia que derivan en células tímicas (tTreg) o naturales; por otro lado, pueden desarrollarse a partir de CD4⁺ vírgenes en la periferia cuando son expuestas a un antígeno propio o ajeno, por lo que estas células serán inducidas (iTreg)^{82, 83}. Los Treg son identificados por ser CD4⁺, FoxP3⁺, CTLA-4^{alto} y CD25^{alto}^{84, 85}, de estos marcadores el más interesante de la línea celular es el FoxP3^{82, 86}. Este factor de transcripción es el controlador maestro que permite que se desarrollen y diferencien los

Th0 cuando son expuestas a un gradiente de $\text{TGF-}\beta$ ⁸⁶. Estas células van a ejercer su principal actividad mediante dos vías: por la capacidad supresora de las citocinas secretadas IL-10 y $\text{TGF-}\beta$ (Figura 2); y, por la supresión por contacto molecular con B7 de las APCs mediante la unión a CTLA-4^{84, 87}. En el trasplante se ha visto que su efecto es beneficioso para la supervivencia del injerto⁸⁸⁻⁹¹.

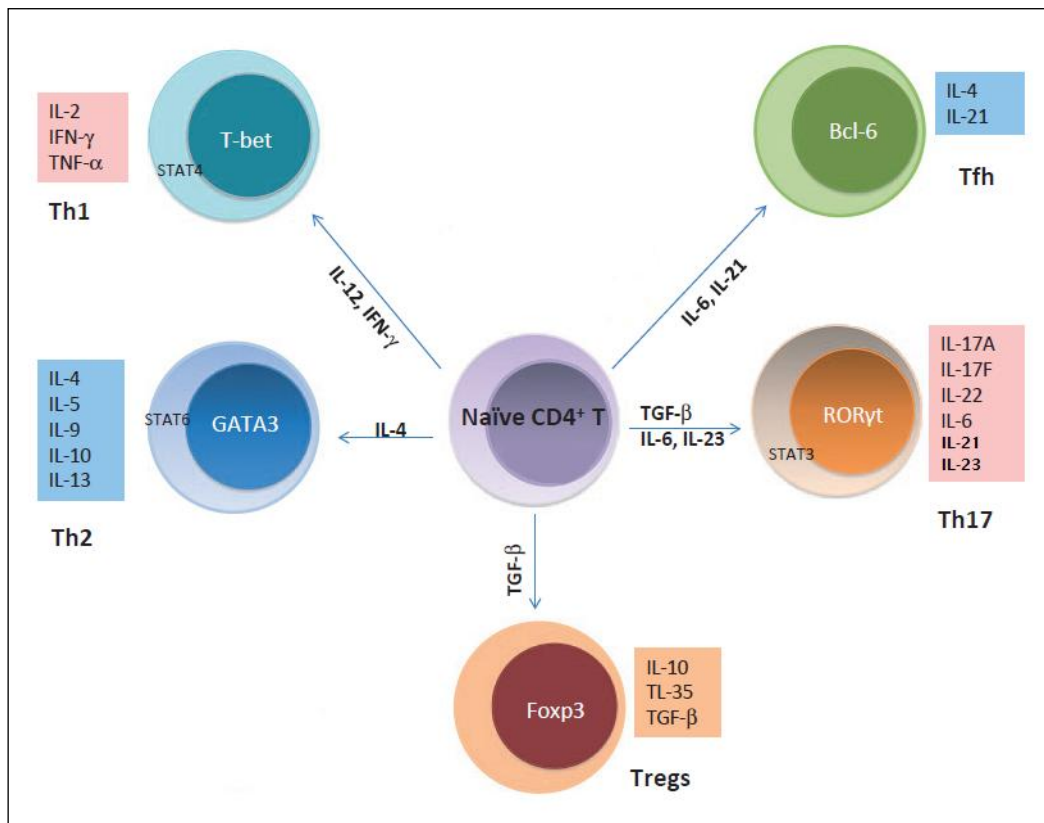


Figura 2: diferenciación celular de las células Th0 a sus células activas. Adaptado de *CD4⁺ T-cell subsets in transplantation*.⁶⁶.

4. Rechazo Inmunológico del Injerto

Hemos revisado las bases moleculares del reconocimiento de péptidos alogénicos y las células implicadas en los mecanismos que median el rechazo inmunológico. El rechazo de un órgano por parte del receptor es la consecuencia de la activación del sistema inmunitario frente al donante; clásicamente el rechazo se ha clasificado por sus características histopatológicas y su evolución temporal, en lugar de los mecanismos inmunológicos. Nosotros nos centraremos en las características inmunológicas, ya que las distintas manifestaciones pueden ser consecuencia de las de las variantes genéticas que subyacen en el rechazo⁹².

4.1. Rechazo hiperagudo

Este rechazo se caracteriza por iniciarse en los primeros minutos u horas del trasplante y conlleva la oclusión trombótica del injerto mediada por anticuerpos preexistentes en el receptor (DSAs frente al HLA o anticuerpos frente a los grupos ABO) que son capaces de detectar rápidamente los antígenos del donante desencadenando una cascada de inflamación mediada por el complemento y las células innatas inflamatorias. Suele conducir a la pérdida del injerto por una necrosis isquémica irreversible⁹³.

4.2. Rechazo agudo

El rechazo agudo (RA) es un proceso inmuno-histológico de lesión del parénquima del injerto y los vasos sanguíneos, que está mediado por células T y anticuerpos alorreactivos. Para que se dé este rechazo, se necesita un tiempo de generación de las células T y los anticuerpos, que está definido dentro de los 3 primeros meses⁶¹. Aunque

con los avances de la inmunosupresión, este tiempo se ha alterado pudiendo desencadenarse la lesión por rechazo en cualquier periodo post-trasplante y por causas como la falta de compromiso con el tratamiento^{6,14}.

4.2.1. Rechazo agudo mediado por células

Los principales mecanismos que causan este rechazo agudo mediado por células (RAC) son la inflamación generada por la secreción de citocinas por las células Th y la destrucción celular del injerto a causa de los linfocitos Tc. Los linfocitos Th fundamentalmente son Th1 que contribuyen a la inflamación por la secreción de INF- γ , IL-12 y TNF- α , y los Th17 que secretaran IL-17 y IL-21; estas citocinas estimulan el choque celular inflamatorio potenciando el daño en el endotelio vascular e intersticial^{6,93,94}. La confirmación se hace mediante el análisis de las biopsias según los criterios de Banff⁹⁵.

4.2.2. Rechazo mediado por anticuerpos

En el rechazo mediado por anticuerpos (RMA), los aloanticuerpos del receptor reconocen los antígenos del donante, especialmente los aloantígenos del HLA que se encuentran en los endotelios vasculares renales, esto provoca una lesión endotelial junto a una trombosis intravascular que daña al injerto e inicia una respuesta inmunológica creciente. Esta unión anticuerpo-antígeno permite la unión del complemento que va a lisar las células, emitiendo señales no específicas de inflamación que reclutan a neutrófilos, NK y macrófagos expandiendo la inflamación dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*)⁸. Como en el rechazo celular su confirmación se realiza en las biopsias de los injertos renales según los criterios de Banff⁹⁵. Este tipo de rechazo puede evolucionar frecuentemente a rechazo crónico o pérdida del injerto⁹⁶.

4.3. Rechazo crónico

El rechazo crónico lo provoca una activación residual, frente al donante, de los linfocitos y de los anticuerpos presentes en el receptor¹⁴. Se manifiesta a partir del tercer al sexto mes en adelante pudiendo progresar de un rechazo agudo o no⁹⁷. Se caracteriza por la activación de células aloreactivas que van a secretar citocinas que estimulan el crecimiento celular del endotelio, y de las células del parénquima. Esto, junto con el daño procedente de los DSA producidos *de novo*, van a conducir al injerto renal a una fibrosis/esclerosis isquémica del parénquima que poco a poco lo deja afuncional^{94-96, 98}.

5. Factores de riesgo implicados en el fallo del injerto

Existen diversos factores que predisponen a tener un mayor índice de fracaso en la supervivencia del injerto. Estos factores se pueden clasificar como inmunológicos y no inmunológicos, y pueden darse tanto por separado como de forma sinérgica contribuyendo al fallo del órgano. No obstante, es de todos conocido que el papel de los factores inmunológicos es decisivo para la supervivencia del injerto^{99, 100}.

5.1. Factores no inmunológicos

Los factores no inmunológicos son aquellos cuya causa no depende de forma directa del sistema inmunitario o no es una consecuencia derivada de este. Entre los más significativos están: tipo de donante, edad del donante/masa renal asociada, síndrome isquemia-perfusión, retraso en la función del injerto (DGF, del inglés *delayed graft function*), toxicidad a causa del tratamiento inmunosupresor (IS), la infección vírica y la enfermedad recurrente de base (*Figura 3*).

5.1.1. Tipo de donante

Los donantes de riñones se pueden clasificar en dos ramas, donantes *de vivo* y donantes cadáveres. Esta procedencia marca la evolución del injerto en el receptor^{5, 101}. Está bien fundamentado que los órganos de donantes *de vivo*, tienen mejor supervivencia que aquellos que provienen de un cadáver esto se debe a que no sufren casi síndrome de isquemia-reperfusión y con ello no se genera necrosis tubular^{5, 102}. Los donantes cadáver se pueden subdividir en dos tipos, aquellos que provienen de muertes encefálicas (DME) (accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico, etc.) y los procedentes de muertes por parada cardio-circulatoria (DMC).

5.1.2. Edad del donante / masa renal funcional

La edad del donante es otro factor fundamental en la supervivencia del injerto¹⁰³. Esto puede explicarse por el envejecimiento de la masa renal efectiva, que produce una reducción de la misma por un exceso de uso (hiperfiltración) que avoca a una proteinuria y una glomeruloesclerosis del órgano¹⁰⁴.

5.1.3. Síndrome isquemia-reperfusión

El daño por isquemia del órgano y/o el daño de la reperfusión es otro factor crítico para el trasplante renal tanto para la aparición de DGF como para la supervivencia del injerto a largo plazo¹⁰⁵. En gran medida la reperfusión del órgano también contribuye al proceso pro-inflamatorio que junto con la isquemia van a desencadenar un aumento de la inmunogenicidad (una tormenta citocínica, expresión de moléculas de adhesión, expresión de moléculas co-estimuladoras y del HLA, etc.) que facilita el rechazo del órgano y la reducción de la supervivencia¹⁰⁶.

5.1.4. Retraso en la función del injerto

El DGF se define como la necesidad de diálisis en la primera semana post-trasplante, y es debido básicamente al proceso de manipulación del órgano. Este fenómeno se produce fundamentalmente por los tiempos de isquemia y el proceso de reperfusión sanguínea del órgano, que necrosan tejido funcional y elevan la inmunogenicidad¹⁰⁷. El DGF se valora mediante la elevación de la proteinuria y el descenso de la tasa estimada de filtración glomerular (eGFR).

5.1.5. Toxicidad a causa del tratamiento inmunosupresor

Los fármacos IS son fundamentales para la supervivencia del injerto a corto y largo plazo. Sin embargo, determinados fármacos IS, como los anti-calcineurínicos, causan nefrotoxicidad, lo que puede generar un fallo en el injerto por daño del órgano¹⁰⁸.

5.1.6. La infección vírica

La infección es una de las mayores causas de muerte en los pacientes trasplantados¹⁰⁹. Debido a la inmunosupresión los pacientes sufren infecciones oportunistas, dentro de las más prevalentes que causan pérdida del injerto son el CMV y el virus BK. El CMV se comporta como inmunomodulador que interfiere en el correcto funcionamiento inmunológico pudiendo desembocar en un rechazo¹¹⁰; mientras que el virus BK, genera una pérdida del injerto secundaria a la infección¹¹¹.

5.1.7. Recurrencia de enfermedad de base

Otra de las posibles causas de pérdida del injerto o de su función es la enfermedad renal recurrente de base; se ha demostrado mediante biopsias que los pacientes con estas patologías tienen mayor fallo en la función del aloinjerto a largo plazo¹¹².

5.2. Factores inmunológicos

Los factores inmunológicos son decisivos para la aparición de rechazo del injerto en el receptor. A continuación, comentaré los más importantes que causan fallo del órgano: discordancia HLA donante-receptor, sensibilización previa o *de novo* al HLA, no cumplimiento del tratamiento y episodios de rechazo (*Figura 3*).

5.2.1. Discordancia HLA donante-receptor

Como se ha comentado anteriormente, el incremento de incompatibilidades entre los alelos de HLA-A, HLA-B y HLA-DR del donante y receptor merma la supervivencia del injerto, y se asocia con un mayor riesgo de sufrir rechazo^{12, 14, 15, 24}. Este riesgo es directamente proporcional según aumentan las incompatibilidades en los alelos del HLA²⁵⁻²⁸. De hecho, el efecto beneficioso del emparejamiento HLA 100% compatible supera a los tiempos prolongados de isquemia fría¹¹³.

5.2.2. Sensibilización previa o de novo al HLA

La sensibilización a los grupos del HLA de clase I (A y B) y a la clase II (DR) genera anticuerpos frente a estos antígenos y pueden proceder de transfusiones, embarazos o trasplantes previos^{6, 114}. La presencia de estos anticuerpos sirve para calcular el PRA o panel de reacción a anticuerpo; que mide la posibilidad de trasplantar al paciente en dicha población¹¹⁵. Además, cuando estos anticuerpos se dirigen contra los grupos HLA del injerto se denominan DSA, como ya describimos. Se ha observado que aquellos pacientes con altos niveles de PRA, tienen mayor probabilidad de presentar DSAs; y como es lógico de rechazar el órgano^{5, 116}. Como se comentó, el riesgo de rechazo entre los receptores que no tienen DSAs es mucho menor que aquellos que tienen DSAs

preformados, al igual, que el riesgo es muy elevado en aquellos pacientes que generan DSA *de novo*, frente al injerto^{23, 24}.

5.2.3. No cumplimiento del tratamiento

El incumplimiento del tratamiento o su abandono tienen consecuencias catastróficas en el pronóstico de supervivencia del injerto¹¹⁷. Se conoce bien que las dosis subóptimas o el abandono total del tratamiento ceba el sistema inmunitario incrementando su efecto lesivo frente al injerto. Siendo ésta una causa de aumento del rechazo y pérdida del injerto, que según Butler *et al.* supone siete veces más riesgo para aquellos que no cumplen el tratamiento que aquellos que si lo hacen¹¹⁸.

5.2.4. Episodios de rechazo

Dentro de los factores inmunológicos, los rechazos agudos son el factor más importante para la supervivencia a largo plazo y la pérdida del injerto. Se ha observado que el rechazo post-trasplante a partir de los 60 días, los episodios de rechazo recurrentes y la gravedad de los mismos son factores de un peor pronóstico en la evolución del órgano injertado^{119, 120}. Los nuevos tratamientos inmunosupresores han conseguido que el riesgo de rechazo agudo en el primer año post-trasplante sea menor del 15%¹⁴. Sin embargo, los episodios de rechazo siguen ocurriendo y las tasas de supervivencia por encima de los 5 años permanecen inalteradas¹²¹.

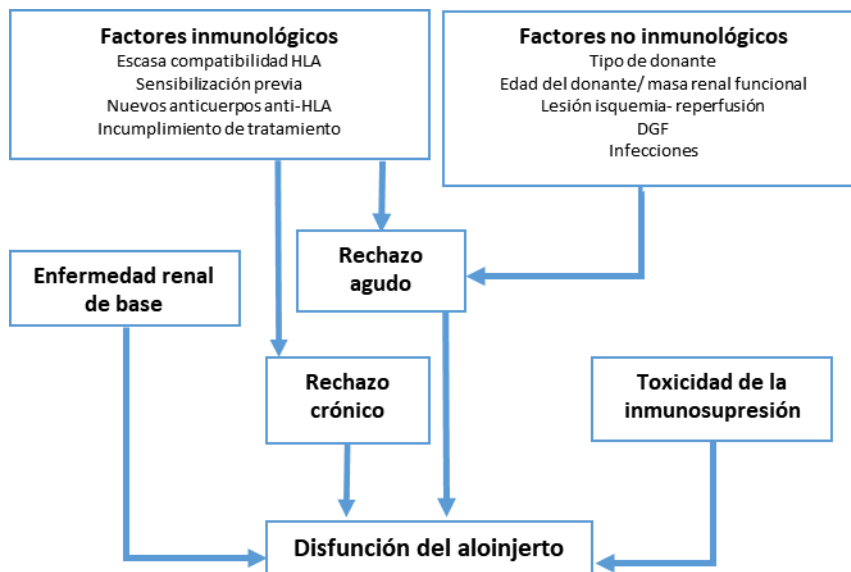


Figura 3: Factores de riesgos inmunológicos y no inmunológicos

En definitiva, a pesar de todos los progresos en el conocimiento del sistema inmune y en la terapia inmunosupresora, el rechazo sigue siendo una de las principales causas de pérdida del órgano y de que la supervivencia a largo plazo del injerto no haya mejorado. Es todavía necesario buscar biomarcadores no invasivos con suficiente poder pronóstico que nos ayuden no solo a prevenir el rechazo del órgano trasplantado, sino también a mejorar la supervivencia a largo plazo del mismo.

6. Polimorfismos asociados al trasplante renal

Como se viene describiendo, la opción terapéutica más eficiente para la enfermedad renal crónica terminal es el trasplante renal^{122, 123}, pero en la actualidad el clínico carece de las herramientas no invasivas con suficiente poder predictivo para el seguimiento y evolución del injerto¹²⁴. El estudio de biomarcadores genéticos que se asocien al pronóstico del trasplante nos parece una opción que cumple perfectamente estos requisitos¹²⁴. Hasta la fecha se han realizado diversos estudios basados en polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) localizados en la secuencia del gen o en sus regiones reguladoras de la expresión⁹². También estudios de barrido genómico o GWAS (del inglés *Genome-Wide Association Studies*) que han permitido localizar SNPs a lo largo del genoma y relacionar potenciales genes que causan la enfermedad, u otras modificaciones fenotípicas que conduzcan a la patología^{125, 126}. Por ello, algunos trabajos han intentado despejar las incógnitas genéticas del trasplante¹²⁶⁻¹²⁹.

Nosotros nos propusimos estudiar, en nuestra población de pacientes trasplantados caucásicos, diversos SNPs que pudiesen presentar una asociación causal con el trasplante y proponerlos como potenciales biomarcadores predictivos de la evolución del injerto. Agrupamos estas variantes polimórficas en dos grandes bloques:

1. Polimorfismos localizados en regiones con un papel crucial en la respuesta aloinmune, ya sea por su poder pro-inflamatorio o anti-inflamatorio.
2. Polimorfismos que se han encontrado asociados con la función renal, en pacientes no trasplantados y que vamos a valorar en nuestra población de pacientes trasplantados.

6.1. SNPs relacionados con respuesta aloinmune

Dado el papel crucial que tiene el rechazo en la supervivencia del injerto tanto a corto como a largo plazo, este abordaje nos pareció indispensable.

6.1.1. Polimorfismos localizados en factores de transcripción implicados en la primera señal de activación de linfocitos

El gen *NFKBIA* codifica para I κ B α , una de las proteínas responsables de la inhibición del factor de transcripción NF- κ B que actúa en la vía TCR que es la primera señal de activación¹³⁰⁻¹³³. Este represor, mantiene bloqueado a NF- κ B impidiendo su translocación al núcleo y expulsándolo del mismo, así I κ B α puede modular la actividad transcripcional de NF- κ B^{130-132, 134}. Por lo tanto, la fosforilación, ubiquitinación y degradación de I κ B α activa NF- κ B mandándolo al núcleo donde activará los genes necesarios para la inflamación, la diferenciación celular y la expresión de moléculas de adhesión^{130, 132, 134}. En el injerto renal post-trasplante, este gen también tiene repercusión, ya que se ha descrito que cuando hay daño tisular, las células renales expresan NF- κ B fomentando el estado pro-inflamatorio^{132, 133}. Por otro lado, se ha señalado que NF- κ B actúa regulando vías de *forkhead box P3* (FOXP3), que es un factor de transcripción que participa en la diferenciación de células Th0 a Treg^{133, 135-137}. Nos propusimos estudiar el SNP, rs696, que se localiza a +126 C/T en la región 3' UTR del gen *NFKBIA* que se ha visto implicado en la reducción de estabilidad, la exportación fuera del núcleo y la traducción del mRNA^{134, 138-140}. Por eso, este SNP se ha asociado a RA^{137, 140} por aumento de la inflamación.

La proporción de Treg en sangre periférica es aproximadamente del 5 al 10% de las células T CD4^{82, 84, 141}. Estas células son indispensables para mantener la tolerancia reduciendo la inflamación y con ella una mejor adaptación del injerto en el

receptor^{84, 86, 137}. Como comentábamos anteriormente en el desarrollo y función de las células Treg, el factor de transcripción FOXP3 tiene un papel destacado por lo que el estudio del gen *FOXP3* nos parece esencial para el conocimiento de estas células^{82, 86, 87}. Se ha descrito que varios polimorfismos situados en el promotor del gen *FOXP3* pueden afectar a su expresión ya que se encuentran en sitios de unión para factores de transcripción, y con ello, pueden alterar las funciones de las Treg^{137, 142-147}. Así, nos propusimos estudiar dos SNPs del gen *FOXP3* que se localizan en la región promotora. Uno de ellos, rs3761548, situado a -3251 G/T ha sido descrito por varios autores asociado a RA^{137, 141, 147} y otros no encuentran dicha asociación^{143, 145, 148}. El otro SNP, rs2232365, se encuentra en la posición -924 T/C. Igualmente, hay controversia respecto a la asociación con el RA^{137, 143, 147}.

6.1.2. Polimorfismos localizados en moléculas que participan en la segunda señal de activación de Linfocitos

En este grupo nos propusimos estudiar diversos SNPs localizados en los genes *CD28*, *CD86* y *CTLA4*. La molécula *CD28* es un receptor activador que facilita la transducción de señales co-estimuladoras³⁹. Está presente de forma constitutiva en las membranas de todas las células T CD4⁺, tanto vírgenes como activadas, y en el 50% de las células T CD8⁺¹⁴⁹. Esta molécula contacta con las APC, mediante *CD80* y *CD86*, aumentando la proliferación celular mediante la expresión de la citocina proliferativa IL-2 y aumentando la supervivencia celular^{39, 150, 151} (*Figura 4*). Nosotros nos propusimos estudiar dos SNPs, uno relacionado con *CD28* (rs3116496) y otro asociado con *CD86* (rs1129055). El SNP rs3116496 T/C se localiza en tercer intrón del gen *CD28* y se ha descrito que puede afectar de alguna forma al splicing del gen¹⁵². El otro SNP, rs1129055 se localiza en el exón 8 del gen de *CD86* y da lugar a una transición de +1057 G/A que provoca una mutación *missense* de una alanina³⁰⁴ (GCC) por una

treonina³⁰⁴ (ACC) lo que genera un punto de fosforilación nuevo¹⁵³ que puede afectar de forma considerable a la función de la APC modificando su capacidad de inducir respuesta aloimmune¹⁵⁴.

Localizado también en la membrana de los linfocitos T, se encuentra CTLA-4 (CD152) que es un co-estimulador negativo con la capacidad de unirse con alta afinidad, de 10 a 100 veces más que CD28¹⁵⁵, a sus ligandos CD80 y CD86^{156, 157}. En el gen de *CTLA4* seleccionamos dos SNPs, rs231775 y rs3087243, que se han visto relacionados con la expresión de la molécula y el trasplante. El SNP rs231775 se encuentra en el exón 1 del gen de *CTLA4* en la posición +49 A/G, esta variante provoca un cambio *missense*, el alelo A codifica para un codón de treonina¹⁷ (ACC) y el alelo G para uno de alanina¹⁷ (GCC)¹⁵⁸. Este cambio genera un desequilibrio en el balance habitual de la expresión y el mantenimiento de CTLA-4 en la membrana celular (fCTLA-4) lo cual implica una bajada de los niveles de fCTLA-4 y con ello una desregulación del sistema inmunitario para la supresión de señales activadoras (*Figura 4*). El SNP rs3087243 se localiza en +6411 G/A (rs3087243) en la región 3' UTR, también llamado en la literatura CT60. Este SNP se ha correlacionado con la secreción de bajos niveles de la forma soluble de CTLA-4 (sCTLA-4)^{158, 159}. Ya que CTLA-4 se regula a nivel post-transcripcional por splicing alternativo; así, en fCTLA-4 se transcribe todo el gen mientras que en sCTLA-4 se elimina el exón 3 generando la forma alternativa soluble¹⁶⁰ (*Figura 5*).

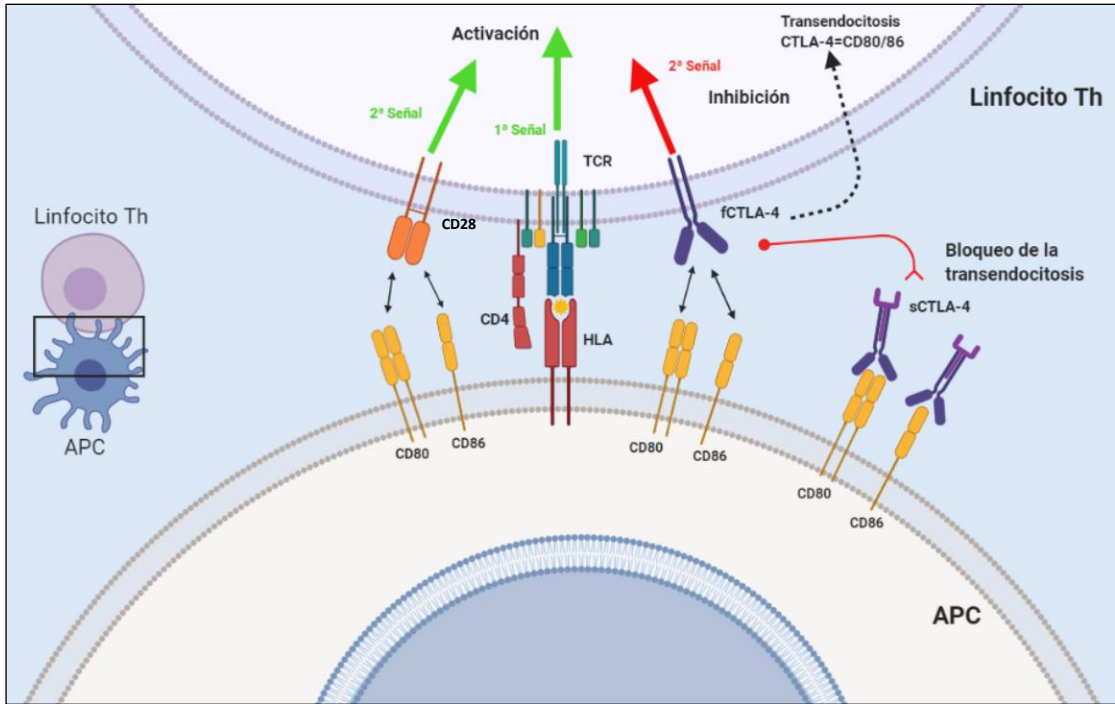


Figura 4: representación de las vías activación/inhibición de la segunda señal donde participan CD28 CD86 y CTLA-4. CD28 entra en contacto con CD80 y CD86 para producir activación celular. Mientras que fCTLA-4 participa en la inhibición al contactar con sus ligandos. También vemos representada la vía inhibitoria por la transendocitosis de CD80/86 y su bloqueo mediante sCTLA-4.

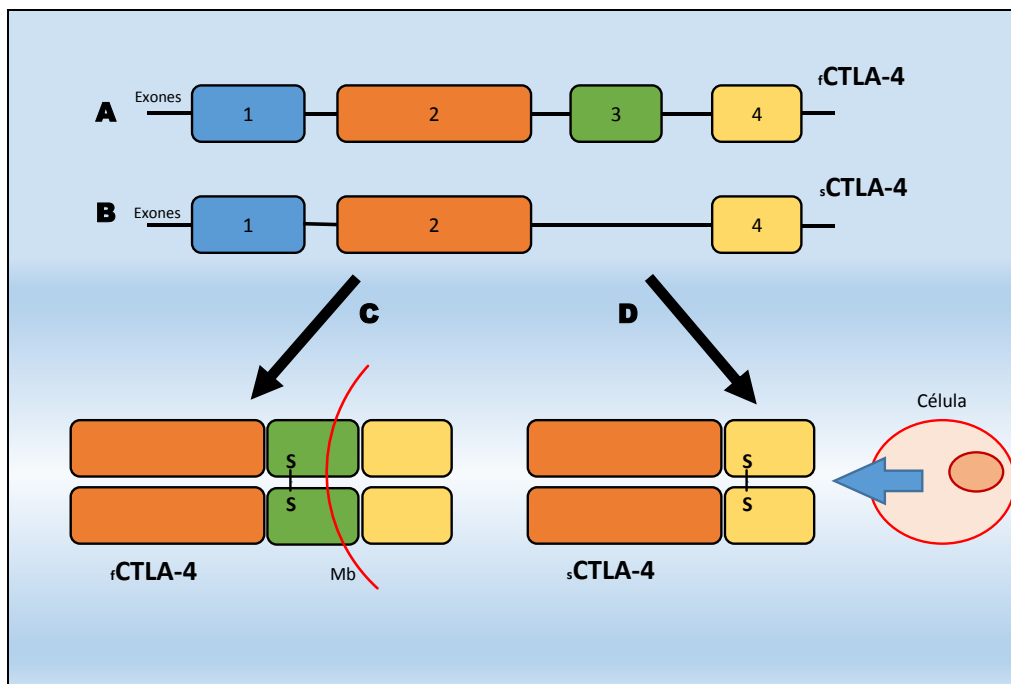


Figura 5: A. Exones que determinan la isoforma fCTLA-4. B. Exones que determinan la isoforma sCTLA-4. C. Expresión de la isoforma fCTLA-4 en membrana (Mb). D. Expresión de la isoforma sCTLA-4 extracelular.

6.1.3. Polimorfismos localizados en citocinas y receptores que participan en la tercera señal de activación de Linfocitos

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que tiene efectos pleiotrópicos tanto locales como sistémicos¹⁶¹. Induce la síntesis en el hígado de otros mediadores inflamatorios (proteínas reactantes en fase aguda), estimula la producción de neutrófilos en la médula ósea, la proliferación y secreción de anticuerpos en las células B, y promueve la diferenciación a linfocitos Th17⁶. Es sintetizada por fagocitos mononucleares, por células linfoides (Th2 y B), por las células endoteliales vasculares y por los fibroblastos^{6, 43}. En trasplante, debido a su poder pro-inflamatorio, se han estudiado biopsias de pacientes con rechazo renal viendo altos niveles de mRNA de *IL6*¹⁶² y asociándolo con altos niveles de IL-6 en sangre en pacientes con RA¹⁶³. Nosotros nos propusimos estudiar rs1800795, este SNP se encuentra localizado a -174 G/C en la región promotora de *IL6*. Se ha visto que la transición del alelo G al C provoca una reducción de los niveles de mRNA y con ello una bajada de la producción de IL-6^{164, 165}.

La IL-21 es una citocina pro-inflamatoria producida por células T activadas, especialmente Th2, Th17 y células Th foliculares. Sus efectos son pleotrópicos tanto en la respuesta innata como adaptativa¹⁶⁶. En concreto, la IL-21 activa e incrementa la citotoxicidad a las NK, las CD8⁺¹⁶⁷ y a las Th17¹⁶⁸; estas últimas la secretan vía autocrina, sobre-estimándose⁶ (*Figura 6*). Por otro lado, la secreción de esta citocina por las células Tfh, estimula la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas en los centros germinales y facilita el cambio de isotipo de los anticuerpos naturales a IgG⁷⁹. En el trasplante, IL-21 actúa de forma dual mediante la vía celular potenciando el incremento de Th7¹⁶⁸ y la citotoxicidad de CD8⁺ y NK; lo cual puede desembocar en

un rechazo celular¹⁶⁹. Y mediante la vía humoral facilitando la producción de anticuerpos⁷⁹. En base a su relación con el trasplante¹⁶⁸, nos propusimos estudiar los SNPs de *IL21*, rs2055979 y rs4833837. El primero, rs2055979, se localiza a +1472 G/T en una región intrónica y el rs4833837 se localiza a +5250 G/A en el exón 3, el cual genera un cambio sinónimo de una cisteína¹⁶⁸ que puede estar afectando a la estabilidad del mRNA alterando su expresión¹⁷⁰.

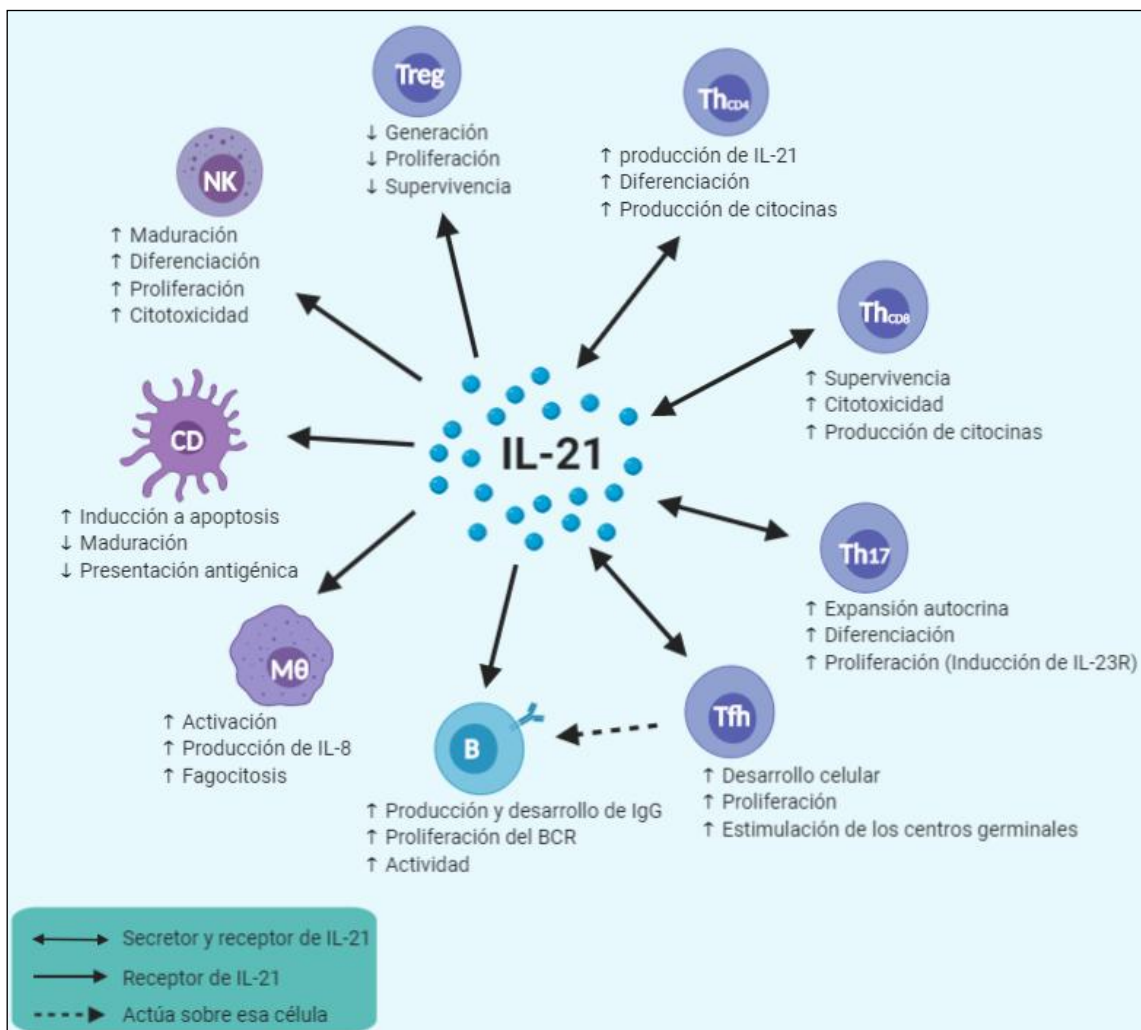


Figura 6: funciones de IL-21, adaptada de *The role of IL-21 in immunity and cancer*¹⁶⁶.

La IL-17A (CD217), es una citocina que actúa como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa¹⁷¹ fomentando un estado pro-inflamatorio que estimula la producción de factores como la IL-1, IL-6, CCL-8, IL-21, TNF- α y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)⁷⁶. Es secretada principalmente por las células Th17 después de haber sido estimulada por otras citocinas inflamatorias como IL-23^{75, 171, 172}, aunque también IL-17 es producida por otras células como las T- $\alpha\beta$, las T- $\gamma\delta$, NK, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas^{76, 171}. Su principal misión es generar un estado de activación de la inflamación coordinando a los neutrófilos y los macrófagos para que protejan de la agresión de patógenos bacterianos y fúngicos¹⁷³. Esta actividad inflamatoria tiene repercusión sobre los pacientes trasplantados, ya que la IL-17 activa vías de expresión del HLA-I, así como el factor NF κ B¹⁷⁴. Además, estimula a las células T y las síntesis de anticuerpos en células B^{80, 174}, estimula las células endoteliales de los túbulos y recluta a neutrófilos; que, en suma, fomentará un microentorno pro-inflamatorio desfavorable para el trasplante promoviendo el rechazo^{75, 76, 81, 173, 175}. Nosotros nos propusimos estudiar el SNP, rs2275913, el cual se sitúa en la región promotora del gen *IL17A* a -197 A/G. Esta variante se ha visto asociada a cambios en la expresión de IL-17A^{80, 176}, por lo que se la ha asociado como factor de riesgo para el RA⁸⁰.

IL-12 es una citocina pro-inflamatoria que se compone de dos subunidades, IL-12p40 codificada por el gen *IL12B* y IL-12p35 el gen *IL12A*, ambos en diferentes cromosomas (cromosoma 5 y cromosoma 3, respectivamente)¹⁷⁷. Es interesante mencionar que la subunidad IL-12p40 es compartida con otra interleucina, IL-23, la cual tiene un poder inflamatorio por la activación de la vía de las células Th17. IL-12 es secretada por las células de la inmunidad innata, macrófagos y células dendríticas, que son capaces de

activar a las células de la inmunidad adaptativa, células T y NK¹⁷⁸. Esta citocina, sirve de puente de unión entre las dos respuestas. Su misión es generar la diferenciación celular de Th0 a Th1 mediante la tercera señal bloqueando a su vez la de las células Th2, además su efecto es generar un incremento de interferón- γ que induce más activación celular y expansión clonal. Estos fenómenos van a potenciar las vías dependientes de contacto celular como puede ser la eliminación de patógenos intracelulares¹⁷⁹. Siguiendo esta línea en el trasplante, la IL12 participa en el rechazo celular, ya que el inicio del RA depende de células Th1 primo-activadas¹⁸⁰ y al estimular mediante el interferón- γ está potenciando la vía inflamatoria, que va en detrimento del injerto¹⁸¹. Nosotros nos propusimos estudiar el SNP, rs3212227, el cual se sitúa en la región 3' UTR del gen *IL12B* a +1188 T/G se cree que el cambio de T por G genera una disminución de la producción de citocina¹⁸², ya que reduce la estabilidad de los mRNA en células transfectadas y la producción en células mononucleadas en sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cell*)¹⁸¹.

Por otro lado, la IL-23 producida por macrófagos y células dendríticas, tiene un efecto activador de la diferenciación hacia las células Th17 que fomentarán la secreción de IL-17 en los pacientes trasplantados^{81, 183}. Nos propusimos estudiar el efecto de algunas variantes polimórficas de su receptor (IL-23R) en trasplante. Así, estudiamos rs10889677, que se encuentra a +2199 A/C en la región 3'UTR del gen *IL23R*^{184, 185}. Esta variante se localiza en un sitio de unión al microRNA, *let-7f*¹⁸⁶, que causa desestabilización de la molécula reduciendo de la expresión de IL-23R^{184, 185, 187}. En relación al trasplante el análisis de este polimorfismo ha sido contradictorio^{168, 183, 187}. Por lo que decidimos ampliar el estudio de este gen con otros dos polimorfismos, rs12070470 C/T y rs7528924 A/G, que se encuentran en el intrón 7 de *IL-23R*¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

6.1.4. Replicación de SNPs asociados con rechazo agudo en trasplante renal

En el año 2017 un estudio GWAS identificó dos polimorfismos localizados en los genes *PTPRO* y *DEUPI* (*CCDC67*) asociados con RA en pacientes trasplantados renales¹²⁵. Nosotros nos propusimos replicar este estudio en nuestra población caucásica española. *PTPRO* es un receptor con dominios fosfatasa cuyo gen se localiza en cromosoma 12¹⁹¹. Presenta dos isoformas que se regulan por splicing alternativo, la completa (*PTPRO_f*) se encuentra en la membrana apical de los podocitos renales, mientras que la truncada (*PTPRO_t*) se localiza principalmente en los linfocitos B naïve^{125, 192} y otras células inflamatorias¹⁹³. La forma truncada regula la señalización del BCR mediante la desfosforilación y modula la respuesta celular mediada por las proteínas tirosina cinasa, como Lyn cinasa y ZAP-70^{125, 194}, además puede participar en las vías de NFκB^{193, 195} regulando el balance de linfocitos T efectores y reguladores¹⁹⁵. El SNP, rs7976329 T/C, encontrado por Ghisdal *et al.* se encuentra en el primer intrón del gen *PTPRO* y se asocia con incremento del riesgo de RA¹²⁵.

El otro SNP asociado con rechazo, rs10765602 G/T se encuentra *up-stream* del inicio del gen *DEUPI* (*CCDC67*). Este gen está involucrado en la generación de microtúbulos derivados del centriolo^{125, 196, 197} lo cual se ha visto que puede ser necesario para la generación de la sinapsis inmune en linfocitos T citotóxicos, la secreción de citocinas y el correcto posicionamiento en la membrana plasmática de las moléculas asociadas al sistema inmunitario^{33, 34}.

6.2. SNPs asociados a función renal en pacientes con enfermedad renal crónica en no trasplantados

La reducción de la tasa de filtrado glomerular, medida en eGFR, y el aumento de la excreción de albúmina, medida por la ratio albúmina/creatinina en orina; son los factores que mejor definen la enfermedad renal crónica^{123, 198}, la cual se produce por la pérdida progresiva de nefronas en el riñón^{123, 199}. Diversos estudios GWAS han identificado múltiples loci asociados con función renal en pacientes con esta enfermedad^{127, 200-202}. Uno de estos estudios, asoció 53 *loci* con una baja eGFR y todos ellos se localizaban en genes que tenían relación con vías funcionales de la actividad renal²⁰². Por ello, nos propusimos replicar las asociaciones de varios de estos polimorfismos asociados con eGFR en pacientes con enfermedad renal crónica, en nuestra cohorte de pacientes de trasplante renal para poder encontrar potenciales biomarcadores predictivos de la función del aloinjerto y su relación inmunológica.

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

- **Los polimorfismos genéticos pueden predecir el curso del trasplante renal y convertirse en biomarcadores trasladables a la práctica clínica.**

2. Objetivos

2.1. Objetivo primario

- Conocer los polimorfismos genéticos asociados con el rechazo y con una peor función renal en los pacientes con trasplante renal.

2.2. Objetivos secundarios

1. Determinar qué polimorfismos genéticos son capaces de predecir la respuesta al tratamiento de inducción.
2. Correlacionar los polimorfismos genéticos estudiados en este trabajo que están asociados con riesgo de sufrir rechazo del trasplante renal con los hallazgos histopatológicos en las biopsias.

Material y métodos

1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio de cohortes retrospectivo, a partir de una base de datos prospectiva de los pacientes trasplantados en el Servicio de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos y remitidos al Servicio de Inmunología.

El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital (código 14/438-E) (*Anexo 1*) y ha sido realizado siguiendo las directrices de las Guías de Buena Práctica Clínica y de acuerdo a la Declaración de Helsinki (MRC 11998) sobre los principios éticos para la investigación con seres humanos. A todos los pacientes se les informó de los objetivos y firmaron el Consentimiento Informado aprobado por el comité ético (*Anexo 2*).

Se incluyeron 869 pacientes consecutivos que recibieron un trasplante renal en nuestro centro entre el 1 de enero de 2005 y el 31 de diciembre de 2016. Se definieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

1. Criterios de inclusión:

1. Pacientes mayores de 18 que recibieron un trasplante renal en el Hospital Clínico San Carlos en el periodo del estudio.
2. Pacientes con el consentimiento informado debidamente firmado.

2. Criterios de Exclusión:

1. Pacientes que perdieron el injerto en los tres meses posteriores al trasplante por causa no inmunológica.
2. Pacientes que no son de origen no caucásico.
3. Pacientes que murieron en el inmediato postrasplante.
4. Otros: no consentimiento y mala calidad del DNA.

La muestra final que se incluyó para el estudio fue de 641 pacientes (*Figura 7*).

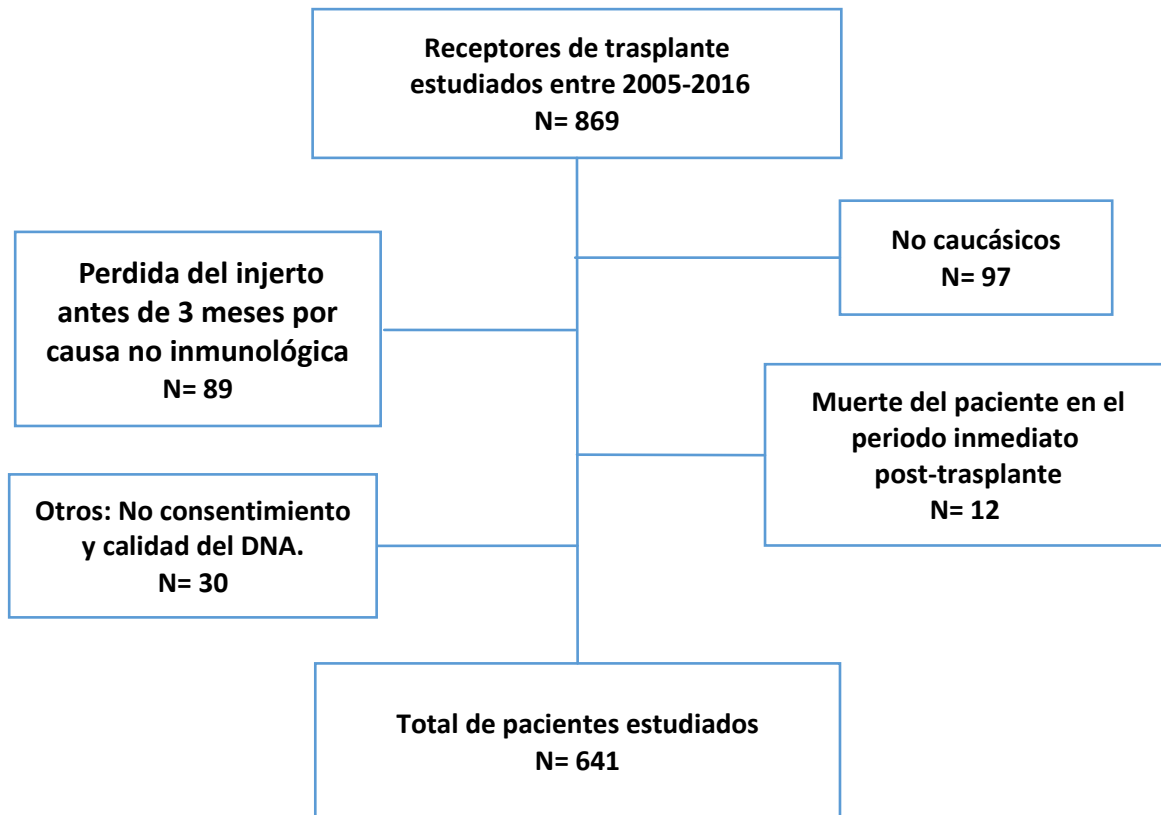


Figura 7: diagrama de flujo del número de pacientes estudiados

2. Variables

Las principales variables fueron las siguientes:

- Características demográficas: descritas en la *Tabla 1*.
- Los pacientes fueron estratificados en base a los SNPs evaluados, para poder analizar la repercusión de los mismos en la incidencia de eventos clínicos relevantes.
- La función renal del injerto, que se valoró mediante la tasa estimada de filtración glomerular (eGFR) a partir de la creatinina sérica con la fórmula del CKD-EPI²⁰³ expresando los valores en ml/min/1,73m³. Además analizamos el cociente Proteína/Creatinina²⁰⁴.
- La aparición de algún tipo de rechazo (rechazo agudo celular, rechazo agudo celular <2 en la clasificación de Banff, rechazo agudo celular ≥2 en la clasificación de Banff y rechazo mediado por anticuerpos), confirmado mediante biopsia por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos según los criterios de clasificación de patología en el trasplante renal del grupo de trabajo de Banff 2018⁹⁵ (*Anexo 3*).
- Tratamiento inmunosupresor en el inmediato postrasplante: pacientes que recibieron tratamiento de inducción con Timoglobulina.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de la cohorte de pacientes trasplantados.

Características	N = 641
Edad de los receptores, años, media \pm SD	52,9 \pm 12,9
Receptores masculinos, N (%)	415 (64,7%)
Causas del fallo renal crónico, N (%)	
Glomerulonefritis	208 (32,4%)
Nefropatía tubulo-intersticial crónica	87 (13,6%)
Nefroangioesclerosis	32 (5,0%)
Enfermedad poliquística del riñón	102 (15,9%)
Nefropatía diabética	78 (12,2%)
Enfermedad congénita/hereditaria	14 (2,2%)
Causa desconocida	96 (15,0%)
Otros	24 (3,7%)
Edad del donante, años, media \pm SD	45,3 \pm 14,3
Donantes masculinos, N (%)	453 (70,7%)
Tipo de donante, N (%)	
Muerte cerebral	261 (40,7%)
Muerte por parada cardio-circulatoria	375 (58,5%)
Donantes vivos	5 (0,8%)
Tratamiento inmunosupresor inicial, N (%)	
CsA	21 (3,3%)
MMF	616 (96,1%)
^{im} TOR	19 (3,0%)
FK	607 (94,7%)
α -IL2R	179 (27,9%)
Terapia de inducción con Timoglobulina, N (%)	358 (55,9%)
Tiempo de seguimiento, meses (mediana [Rango Intercuartílico])	109,5 (72,5-146,8)
Tiempo del rechazo, días (mediana [Rango Intercuartílico])	10 (7-16)
HLA-A mismatch \geq 1, N (%)	335 (52,3%)
HLA-B mismatch \geq 1, N (%)	275 (42,9%)
HLA-DR mismatch \geq 1, N (%)	371 (57,9%)
PRA >50%	58 (9,0%)
Historia de trasplantes previos (>1), N (%)	100 (15,6%)
Pérdidas del injerto, N (%)	89 (13,9%)
Muertes, N (%)	12 (1,9%)

CMV, Citomegalovirus. CsA, Ciclosporina A. FK, Tacrolimus. α -IL2R, antagonista del receptor de la IL-2. imTOR, inhibidor del mTOR (del inglés, mammalian target of rapamycin inhibitors). MMF, Micofenolato de Mofetilo.

3. Genotipado de SNPs

3.1. Aislamiento y cuantificación de DNA

Se realizó en primer lugar el aislamiento del DNA a partir de muestras de sangre anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)²⁰⁵ procedente del banco de sangre y de los pacientes trasplantados. La extracción de DNA se realizó por dos métodos:

1. Mediante precipitación salina o *salting out*. Que consiste en un proceso físico-químico basado en las interacciones electrolito-no electrolito, en la cual altas concentraciones de un componente salino (que eleva la fuerza iónica) y algunos solutos como las macromoléculas orgánicas precipitan por la atracción de las fuerzas hidrofóbicas que acontecen entre ellas. De esta manera conseguimos precipitar las proteínas quedándonos con el DNA del paciente. En primer lugar, procedemos a eliminar los residuos celulares que carecen de material genético, los eritrocitos, mediante lisis por osmosis lo cual nos deja con los leucocitos. A esto se les va a solubilizar las membranas plasmáticas y nucleares mediante un detergente como es el laurilsulfato sódico también conocido como dodecilsulfato sódico (SDS), y se degradan los restos de proteínas por acción de la proteinasa K. Posteriormente, por adición de una sal altamente concentrada a 6 molar precipitan las proteínas dejando en la fase líquida el DNA soluble, el cual vamos a extraer mediante isopropanol que deshidrata y compacta el DNA por fuerzas hidrofóbicas siendo este capaz de ser recogido y disuelto para su conservación en tampón Tris-HCl-EDTA pH8 (TE). Nosotros, realizamos este proceso de la siguiente forma:

- Lisar las células carentes de material genético, los eritrocitos, mediante 25 ml de buffer STMT (Sacarosa 0,32M; Mg₂Cl 0,005mM; Tris·HCl pH7,5 1mM; Triton X-100 1%). Centrifugamos tres veces 30 minutos a 4°C a 2300xg, cada vez que centrifugamos nos quedamos con el pellet y repetimos la operación.
 - Eliminar los restos proteicos y acondicionamiento salino mediante 5 ml de buffer B (NaCl 0,075M; EDTA 0,024M pH8) y vorteamos un minuto. Al resultado adicionamos 65 µl de SDS 20% y 65 µl de proteinasa K y lo dejamos en agitación suave a 51° C toda la noche.
 - Precipitar restos proteicos mediante la adición de 1000 µl de NaCl 6M, esto se vortea y se centrifuga una vez 40 minutos a 4 °C a 2300xg. El sobrenadante se transfiere a un soporte nuevo, evitando coger el pellet.
 - Precipitar el DNA mediante isopropanol, a partes iguales.
 - Recoger con una pipeta de vidrio el DNA y limpiarlo con etanol 70° y dejar evaporar a temperatura ambiente.
 - Resuspender el DNA en 500 µl de buffer TE (Tris·HCl 0,01M pH8; EDTA 1mM pH8) toda la noche.
- Para las extracciones en las que no se sacaba DNA por fallo de la precipitación salina una vez incorporado el isopropanol, procedíamos de la siguiente forma:
 - Precipitar el DNA mediante 40 minutos de centrifugación a 4 °C a 2300xg, y nos quedamos con el pellet de DNA.

- Resuspender el pellet en 200 μ l de etanol 70° y transferir a un tubo de capacidad 1,5 ml. Centrifugar un minuto a 10000xg y descartar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol a temperatura ambiente.
 - Resuspender en 200 μ l de TE.
2. Extracción de DNA mediante métodos automáticos por el sistema *MagNA Pure Compact Instrument (Roche Molecular Systems, Inc)*. A partir de sangre completa anticoagulada en EDTA el sistema procede a lisar las membranas mediante una sal caotrópica de cloruro de guanidinio y digerir las proteínas por acción de la proteinasa K. Posteriormente, el DNA se une a unas partículas de cristal magnetizadas que atrapan electrostáticamente al ácido nucleico lo que permite eliminar los restos celulares y demás componentes que pudieran interferir en la calidad del producto. Llegados a ese punto, mediante altas temperaturas se eluye el DNA en una solución de TE, de las partículas que quedan retenidas magnéticamente en otro compartimiento. Obteniéndose así la muestra de DNA. Nosotros, realizamos este proceso de la siguiente forma:
- Encender el extractor automático y colocar en las posiciones indicadas por la máquina los siguientes elementos: la tira de reactivos de *MagnaPure Compact Isolation Kit I Large Volume (ROCHE)*, el kit de puntas proporcionado en el mismo pack, un tubo de eluyente y un tubo con 1 ml de sangre completa anticoagulada con EDTA del paciente.
 - Programar con “1 ml” de “sangre” en muestra y “200 μ l” de volumen de elución.
 - Extraer el tubo de elución.

A continuación, se realizó la cuantificación y determinación de la pureza del DNA aislado en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 3.7 (Thermo Fisher Scientific)*. Esta metodología se basa en la capacidad de las bases nitrogenadas del DNA de absorber luz en una longitud de onda exacta de 260 nm, la cual será directamente proporcional a la concentración dada en ng/μl. Mientras que los parámetros de pureza se examinan mediante los coeficientes de absorbancia 260/230 el cual describe la concentración de DNA respecto a la de sales que deberá estar en torno a dos; y el coeficiente 260/280, que nos indica la pureza de la muestra en relación a la concentración de proteínas que al igual que el caso anterior debe oscilar en torno a dos.

Una vez conocida la concentración se realizaba una dilución a 10 ng/μl para poder trabajar con un pool de muestras a la concentración deseada. El DNA original era almacenado a -80 °C.

3.2. Tipaje de SNPs

El análisis de los *SNPs* se realizó mediante la tecnología *TaqMan*[®] (Tabla 2) en un sistema

RT-PCR del inglés *Real Time-Polymerase Chain Reaction*, 7900HT (*Applied Biosystems*[™]) y mediante *iPLEX Gold Assay* (Tablas 3 y 4) y su software *Typer Software Module (Sequenom, inc.)*:

- Los ensayos *TaqMan*[®] se basan en la actividad exonucleasa 5'→3' de la enzima termorresistente Taq polimerasa para escindir una sonda marcada previamente hibridada a la secuencia diana. Esta escisión de la sonda provoca una liberación de la fluorescencia que permite obtener una medida cuantitativa de la acumulación del producto durante los ciclos de PCR. El sistema consiste en una sonda específica que contiene un fluorocromo indicador en el extremo 5' y un inhibidor de fluorescencia

(*quencher*) en el extremo 3'. Éste último absorbe la fluorescencia emitida por el fluorocromo mientras ambos permanecen unidos a la sonda y próximos entre sí. Durante los sucesivos ciclos de la PCR, la sonda se hibrida con las regiones del DNA que contengan las secuencias específicas complementarias para el SNP a genotipar. El colorante indicador del extremo 5' se desprende por la acción de la actividad exonucleasa 5'→3' de la DNA-polimerasa Taq a medida que ésta copia la cadena complementaria. La separación del indicador y del *quencher* provoca un aumento de la señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de productos de amplificación que se genera en la mezcla de reacción. Como la actividad nucleasa-5' de la DNA-polimerasa Taq es específica de doble cadena, toda la sonda libre permanece intacta. La gran ventaja de la sonda *TaqMan*[®] es que aumenta significativamente la especificidad de la detección. Por lo tanto, la fluorescencia detectada en el termociclador de la PCR cuantitativa es directamente proporcional a la del fluoróforo liberado y la cantidad de ADN molde presente en la PCR (*Figura 8*). Nosotros procedimos de la siguiente forma:

- Realizar una mezcla con todos los reactivos necesarios para amplificar, en un tubo de 1,5 ml, por cada muestra añadimos 2,5 µl de H₂O, 0,045 µl (40x) o 0,03 µl (80x) de *TaqMan*[®] SNP Genotyping Assays (*Applied biosystems*[™]) que contienen las sondas con los SNP específicos las cuales tienen marcados cada alelo con los fluorocromos FAM o VIC. Y por último añadimos 1,3 µl de *TaqMan*[®] Gene Expression Master Mix (*Applied biosystems*[™]) que contiene la DNA Taq-polimerasa, los desoxinuclotidos activados dNTPs (con dUTP), la uracil-DNA glicosilasa (enzima que reconoce y cataliza la destrucción de cadenas de DNA que contienen desoxiuridina, que actúa

previo al proceso de PCR para eliminar los amplicones que se hayan formado inespecíficamente), un marcador de fluorescencia pasiva de referencia ROX[®], cloruro de magnesio y un buffer estabilizador del medio.

- Añadir 1,3 µl de las muestras de DNA que se encuentran previamente a una concentración de 10 ng/µl.
- Sellar la placa con un film adhesivo óptico que permite la recogida de la fluorescencia por los detectores de los fluorocromos excitados por el láser.
- Centrifugar la placa unos segundos para evitar las burbujas.
- Programar el 7900HT (*Applied Biosystems*TM) introduciendo los datos de las muestras que vamos a examinar, también debemos indicar los detectores de las sondas que vamos a usar (FAM y/o VIC). Programar 45 repeticiones de ciclo, para 5 µl de volumen de muestra que tengan las siguientes condiciones (activación de la polimerasa a 95°C, 10 minutos inicial; 45 ciclos de desnaturalización a 95°C, 15 segundos; 45 ciclos de anillamiento/extensión 60°C 1 minutos).
- Hacer la discriminación alélica pos-PCR en el 7900HT (*Applied Biosystems*TM) introduciendo los marcadores.

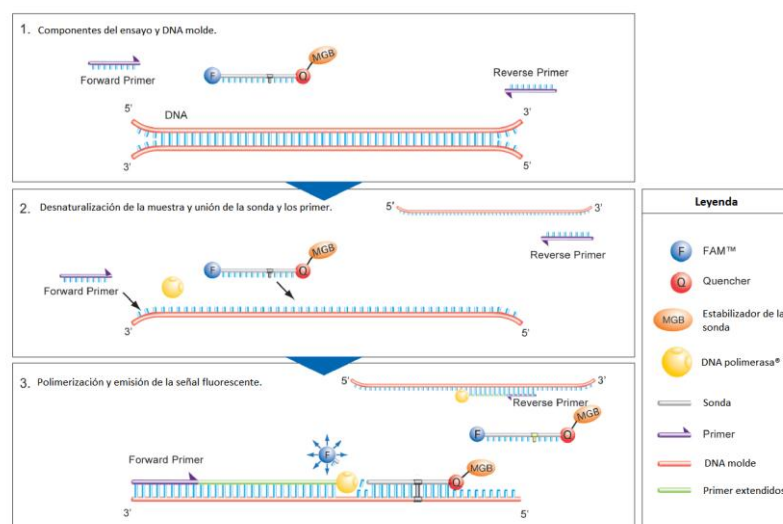


Figura 8: imagen adaptada de *TaqMan[®] Gene Expression Assay solutions 2012 Life Technologies Corporation*.

Tabla 2. SNP genotipados por sondas *TaqMan*[®]

<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	SNP	FAM*	HGVS**	Referencia comercial
IL6	Chr.7: 22727026	rs1800795 G>C	0,35 (C)	NC_000007.14:g.22727026 (región intrónica)	C__1839697_20
IL12B	Chr.5: 159315942	rs3212227 T>G	0,22 (G)	NM_002187.2:c.*159 (3' UTR <i>downstream</i>)	C__2084293_10
IL17A	Chr.6: 52186235	rs2275913 A>G	0,37 (A)	NC_000006.12:g.52186235 (5' UTR <i>upstream</i>)	C__15879983_10
IL21	Chr.4: 122619586	rs2055979 G>T	0,22 (A)	NM_021803.4:c.204+1115 (Región intrónica)	C__1597496_10
	Chr.4: 122615808	rs4833837 A>G	0,29 (G)	NM_021803.4:c.234 (p.Cys78=)	C__25473096_10
IL23R	Chr.1: 67259437	rs10889677 A>C	0,35 (A)	NM_144701.2:c.*309 (3' UTR <i>downstream</i>)	C__11283764_10
	Chr.1: 67231588	rs12070470 C>T	0,12 (C)	NM_144701.2:c.956-5125 (Región intrónica)	C__31222844_10
	Chr.1: 67223353	rs7528924 A>G	0,21 (G)	NM_144701.2:c.955+3623 (Región intrónica)	C__2990015_10
CD28	Chr.2: 203729789	rs3116496 T>C	0,24 (C)	NM_006139.3:c.534+17 (Región intrónica)	C__25922478_10
CD86	Chr.3: 122119472	rs1129055 G>A	0,28 (A)	NM_175862.4:c.928 (p.Ala310Thr)	C__7504226_10
CTLA4	Chr.2: 203867991	rs231775 A>G	0,29 (G)	NM_005214.5:c.49 (p.Thr17Ala)	C__2415786_20
	Chr.2: 203874196	rs3087243 G>A	0,47 (G)	NC_000002.12:g.203874196 (3' UTR <i>downstream</i>)	C__3296043_10
DEUP1	Chr.11: 93314999	rs10765602 G>T	0,22 (G)	NC_000011.10:g.93314999 (Región intergénica)	C__26701015_10
PTPRO	Chr.12: 15449705	rs7976329 T>C	0,32 (C)	NM_030667.2:c.76-34269 (Región intrónica)	C__1612937_10

*Frecuencia del Alelo Minoritario en población ibérica (1000 Genomes Project).

**Nomenclatura de la *Human Genome Variation Society*: varnomen.hgvs.org

- Mediante la tecnología *iPLEX Gold Assay* (*Sequenom, inc.*) se realizó el análisis de 14 SNPs de los 18 que se enviaron, para ello seleccionamos los polimorfismos de genes que tuvieran una frecuencia alélica del alelo minoritario (FAM) mayor a 0,2 en la población europea, con el fin de tener suficiente potencia estadística. Por ejemplo, de los 53 *loci*²⁰² descritos por Pattaro *et al.* analizamos 14 *loci*, los cuales superaban el FAM mayor a 0,2. De estos 14 SNP, al final pudimos valorar 11 *loci*, debido a que 3 de ellos no pasaron el corte de calidad del genotipado de *iPLEX Gold Assay*. De los 14 SNPs finales, se estudiaron 3 SNPs relacionados con rechazo (*Tabla 3*) y 11 SNPs relacionados con la función renal (*Tabla 4*). La tecnología

iPLEX Gold Assay permitió genotipar varios polimorfismos de una misma muestra al mismo tiempo. Esta técnica se basa en la espectrometría de masas *MALDI-TOF* para la detección de los productos de la reacción para la discriminación alélica. El proceso de genotipado consta de dos reacciones. En primer lugar, se amplifican los fragmentos de DNA que contienen los SNPs de interés mediante una PCR multiplex y, a continuación, se lleva a cabo la reacción de discriminación alélica, extensión por cebadores. En la tecnología *iPLEX[®] Gold* todas las reacciones terminan tras una extensión de una única base (*Single Base Extension, SBE*) que genera una diferencia de masa en el producto de extensión según la base añadida. Esta diferencia de masa se detecta mediante espectrometría de masas *MALDI-TOF*. Las reacciones se realizan en placas de 384 pocillos y los productos son transferidos de forma automatizada mediante un robot a la superficie del *Spectrochip[®]*, que será leído en el espectrómetro de masas (*Figura 9*).

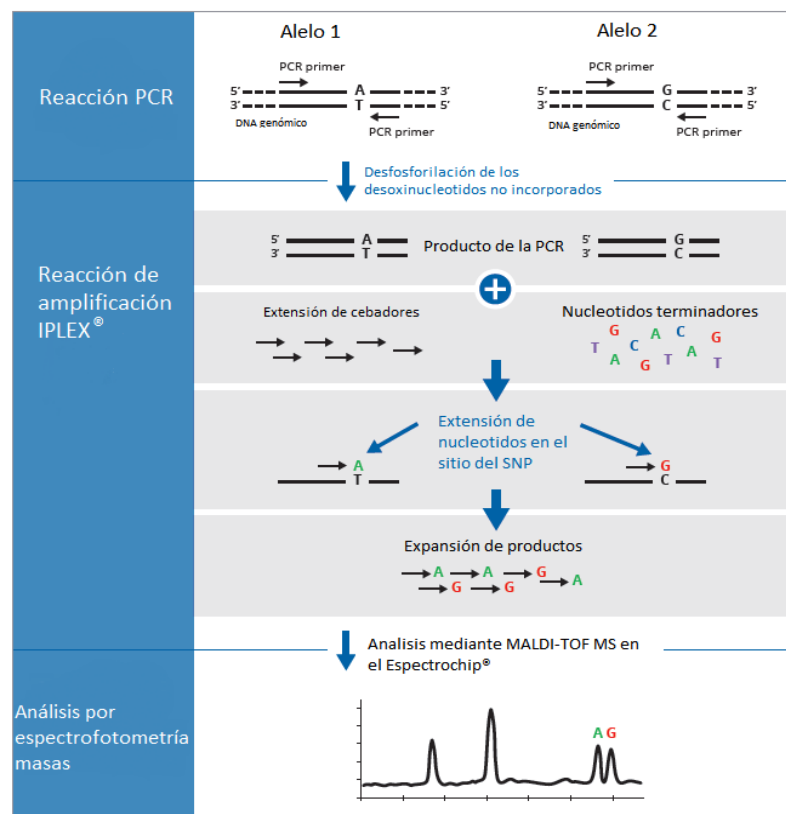


Figura 9: imagen adaptada de *iPLEX CHEMISTRY COMPANY*.

Tabla 3. SNPs genotipados por tecnología *iPLEX Gold Assay* relacionados con rechazo.

<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	SNP	FAM*	HGVS**	Referencia comercial
<i>NFKBIA</i>	Chr.14: 35401887	rs696 C/T	0,38 (T)	NM_020529.2:c.*126 (3' UTR <i>downstream</i>)	C__27475068_10
<i>FOXP3</i>	Chr.X: 49259429	rs2232365 T/C	0,34 (T)	NM_014009.3:c.-22-902 (5' UTR <i>upstream</i>)	C__15942641_10
	Chr.X: 49261784	rs3761548 T/G	0,43 (G)	NM_014009.3:c.-23+2882 (5' UTR <i>upstream</i>)	C__27476877_10

*Frecuencia del Alelo Minoritario en población ibérica (*1000 Genomes Project*),

**Nomenclatura de la *Human Genome Variation Society*: <http://varnomen.hgvs.org/>

Tabla 4. SNPs genotipados por tecnología *iPLEX Gold Assay* relacionados con función renal.

<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	SNP	FAM*	HGVS**	Referencia comercial
<i>SYLP2</i>	Chr.1: 109471548	rs12136063 G/A	0,28 (G)	NM_001040709.2:c.130-4033 (Región intrónica)	C__31433047_10
<i>CPS1</i>	Chr.2: 210675783	rs1047891 C/A	0,28 (A)	NM_001875.4:c.4217 (p.Thr1406Asn)	C__8793384_1_
<i>LRP2</i>	Chr.2: 169151996	rs4667594 T/A	0,44 (T)	NM_004525.3:c.12461+803 (región intrónica)	C__27882223_10
<i>MANBA</i>	Chr.4: 102640552	rs228611 G/A	0,43 (A)	NM_005908.3:c.1870-695 (Región intrónica)	C__804211_10
<i>SHROOM3</i>	Chr.4: 76447694	rs17319721 G/A	0,39 (A)	NM_020859.4:c.168+11474 (Región intrónica)	C__32612310_10
<i>SLC6A13</i>	Chr.12: 240132	rs10774021 C/T	0,42 (C)	NM_016615.5:c.479-2122 (Región intrónica)	C__26623722_20
<i>UBE2Q2</i>	Chr.15: 75866642	rs1394125 G/A	0,40 (A)	NM_173469.3:c.388-2309 (Región intrónica)	C__8874504_20
<i>DPEP1</i>	Chr.16: 89641884	rs164748 C/G	0,49 (G)	NC_000016.10:g.89641884	C__2928100_10
<i>UMOD</i>	Chr.16: 20356368	rs12917707 G/T	0,19 (T)	NC_000016.10:g.20356368	C__31122302_10
<i>NFATC1</i>	Chr.18: 79404243	rs8091180 G/A	0,39 (G)	NM_172387.2:c.88+3764 (Región intrónica)	C__43778892_10
<i>TP53INP2</i>	Chr.20: 34697249	rs6088580 G/C	0,40 (C)	NC_000020.11:g.34697249	C__29982073_20

*Frecuencia del Alelo Minoritario en población ibérica (*1000 Genomes Project*),

**Nomenclatura de la *Human Genome Variation Society*: <http://varnomen.hgvs.org/>

3.3. Estudio de anticuerpos anti-HLA

La determinación de los anticuerpos anti-HLA se realizó, primero, mediante kits *screening* multiplex (*LIFECODES[®] Lifescreen*) para hacer el escrutinio de los pacientes y así saber si tenían o no reactividad a los anticuerpos anti-HLA de clase I y/o clase II. Posteriormente, mediante los kits *single antigen* HLA clase I y/o HLA clase II (*LIFECODES[®] Lifescreen*) se realizó el estudio de las muestras positivas por *screening* para conocer frente a qué alelo concreto los anticuerpos eran reactivos. La técnica utiliza bolitas fluorescentes de poliestireno impregnadas de antígenos para los anticuerpos anti-HLA las cuales fueron analizadas posteriormente en un citómetro de tipo *Luminex 100[®]* (*Corporation TX, USA*). La particularidad de esta técnica es que el citómetro es capaz de detectar las esferas de 5.6 μm que llevan una proporción concreta de dos fluorocromos obteniéndose hasta 100 tipos de fluoroesferas en función de la concentración precisa de esos dos compuestos capaces de emitir en una longitud de onda específica asociada a una única reactividad antigénica o un grupo de ellas (*Figura 10*). Estas esferas se incubaron con suero del paciente, y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG humano marcado con ficoeritrina, el fluorocromo que determina la positividad de la prueba. Los datos se analizaron mediante el software *Match it Antibody* v1.102¹¹⁵.

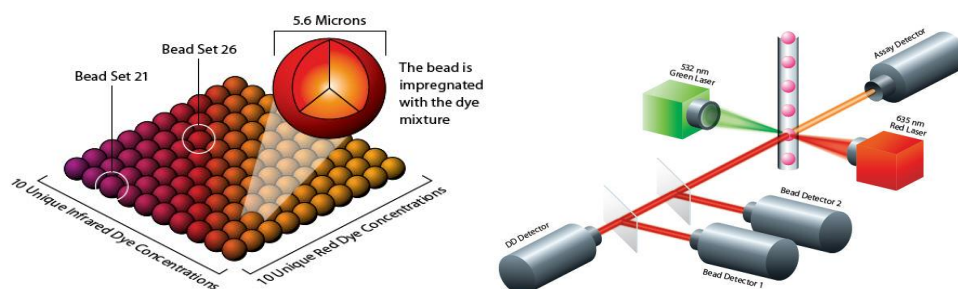


Figura 10: características de las fluoroesferas y del citómetro tipo *Luminex 100[®]*.

4. Análisis estadístico

4.1. Análisis de asociación de un polimorfismo con la enfermedad

El análisis de las variables estudiadas se realizó mediante el programa estadístico informático SSPS v 13.0 (Chicago, Illinois). La descripción de las variables cuantitativas se expresó mediante la media y desviación estándar en caso de distribución normal o bien por la mediana y el rango intercuartílico en caso de no normalidad. Comprobándose si estas variables seguían la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La asociación entre estas variables cualitativas se realizó mediante el test χ^2 o test exacto de Fisher (análisis de pruebas bilaterales). La variable cuantitativa normal se comparó usando el test la t de Student²⁰⁶ (la filtración renal mediante eGFR) y la variable cuantitativa analizada que no seguía la normalidad (la ratio P/C para la proteinuria) se comparó mediante test de la mediana.

Los diferentes análisis estadísticos utilizados para medir tanto la magnitud como la fuerza de la asociación entre las variables y así encontrar diferencias significativas se describen a continuación.

4.1.1. Modelos bivariable

El test χ^2 es una prueba estadística de contraste de hipótesis que se aplica para analizar datos recogidos en forma de observaciones en cada categoría, la cual compara proporciones²⁰⁶. De igual forma que el test exacto de Fisher, sin embargo, este puede aplicarse con independencia al número de observaciones de cada categoría²⁰⁶. Por ello, para evaluar la asociación de las variables se tomó el resultado de la p del contraste de hipótesis de la χ^2 o del exacto de Fisher, determinando que los valores eran estadísticamente significativos cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

Para calcular de la fuerza de asociación usamos la *odds ratio* (OR). Esta indica la frecuencia con la que se da un factor causante de una enfermedad o condición de salud, es decir, da una idea de cuántas veces es más frecuente o posible de ser hallada la enfermedad entre los expuestos que entre los no expuestos.

Los valores de la OR oscilan entre 0 e infinito y estos nos explican qué características tiene el factor estudiado frente a un grupo investigado. Siempre que la OR tome valores de 1 nos indica que no tiene repercusión dicho factor en lo analizado, o, dicho de otra manera, que ambos grupos tienen la misma probabilidad de padecer una enfermedad estén expuestos o no al factor de interés. Mientras que, si los valores están por debajo de 1, se le llama *factor protector*, e indica que el factor estudiado tiene una asociación negativa con la enfermedad. Es decir, los expuestos a él no presentan riesgos añadidos a desarrollar una enfermedad, sino que protege frente a la misma. Sin embargo, si la OR es superior a 1 se le denomina *factor de riesgo*, e implica que se tiene tantas veces esa probabilidad de desarrollar la enfermedad. Los datos de las ORs se expresaron con su intervalo de confianza al 95%.

Se utilizó el test t de Student para comparar dos muestras independientes²⁰⁶, de esta manera se valoró la filtración renal mediante eGFR. Para la proteinuria se utilizó el test de la mediana y se analizó mediante la ratio P/C en los grupos que presentaran o no el SNP indicado. Determinando que los valores eran estadísticamente significativos cuando el valor de p fuera inferior a 0,05. Algunas variables cuantitativas se dicotomizaron para la realización del análisis, así la eGFR se categorizó en menor o mayor de 50 ml/min (P50 de nuestra muestra) o el cociente P/C en orina mayor o menor de 300 mg/g (P75 de nuestra muestra).

4.1.2. Modelo Multivariable

Para el estudio de la asociación entre algunas variables se utilizó un modelo de multivariable. Este análisis se define como aquel que mediante cálculos estadísticos analiza dos o más variables de forma simultánea mediante modelos de regresión²⁰⁶. Para nuestro estudio se utilizó el modelo de regresión logística. Por ello, con el objeto de evaluar la asociación de las variables se tomó del análisis crudo de datos el resultado de la p del contraste de hipótesis de la χ^2 o del test exacto de Fisher cuando fuera inferior a 0,150 o se tratara de variables biológicamente relevantes en el estudio. Este modelo permitió identificar la relación entre un conjunto de variables y la probabilidad del evento estudiado (RAC, RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff, etc.). Los datos se presentaron en forma de *odds ratios* como estimador de la probabilidad del riesgo con su intervalo de confianza al 95%.

4.1.3. Análisis de carga genética

En algunos polimorfismos se podía esperar que existieran dependencias hereditarias ya fueran por ser alelos dominantes o recesivos, para ello se estudiaron los dos modelos de herencia. El modelo dominante asume que una única copia de un alelo es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de las 2 copias del polimorfismo lo modifica de la misma forma; es decir, heterocigotos y homocigotos tienen el mismo riesgo. Al contrario, el modelo recesivo supone que son necesarias 2 copias de un alelo para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos y homocigotos del alelo más dominante tienen el mismo riesgo²⁰⁷.

5. Inferencia de haplotipos

La construcción de haplotipos en nuestra población se hizo mediante dos herramientas estadísticas, el *LDlink* (<https://ldlink.nci.nih.gov/>) y el *Haploview 4.2*.

LDlink es una web diseñada para el análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs en distintas poblaciones control utilizando haplotipos de referencia de 26 grupos poblacionales diferentes extraídos del *1000 Genomes Project (1000G)*²⁰⁸ para producir tablas 2x2 de haplotipos observados con frecuencias genotípicas en la población de interés. En nuestro caso eran caucásicos europeos. El desequilibrio de ligamiento, es la probabilidad que tienen dos alelos de segregar juntos por causas no debidas al azar, que se genera entre ciertos SNPs y para medirla se utilizan los valores de D' (es la medida del nivel de heredabilidad conjunta de los dos polimorfismos en una determinada región cromosómica) y R^2 (que mide el nivel de correlación entre los haplotipos que derivan de analizar los polimorfismos de una región cromosómica)²⁰⁹.

El *Haploview 4.2* es un programa bioinformático diseñado para calcular el desequilibrio de ligamiento a partir de datos genéticos. En nuestra población se utilizó para ciertos SNPs estudiados que dada su proximidad en la región cromosómica de algunos genes se decidió hacer un análisis de haplotipos. Este programa permitió calcular el desequilibrio de ligamiento de los haplotipos generados con nuestros datos para comprobar que coincidían con los que aparecían en *LDlink*²¹⁰.

6. Limitaciones del estudio

6.1. Validez interna

- Sesgo de selección: los paciente se seleccionan de forma consecutiva, y aunque se produjo un pequeño porcentaje de pérdidas iniciales. Se trata de una población de pacientes muy controlada desde la unidad de trasplante. Existen mecanismos constantes de seguimiento del paciente.
- Sesgos de mala clasificación: se realiza una consulta protocolizada y sistematizada de recogida de datos y seguimiento de los pacientes. Generando alta validez y fiabilidad de las técnicas de determinación.
- Factores de confusión: dada la experiencia del equipo investigador en esta área, se conocen bastante bien los posibles factores de confusión del estudio y se hizo una recogida sistemática de los mismos mediante una anamnesis exhaustiva junto con las analíticas habituales de estos pacientes sobre el estado funcional del injerto.
- Se aceptó una significación inferior a 0,05 para algunos SNPs: ya que este trabajo se ha basado en estudios previos y se ha fundamentado en replicar algunos de estos estudios en nuestra población. Por otro lado, este trabajo pretende ser usado como discriminación de ciertos genes para futuros trabajos y validaciones mediante ensayos clínicos u otros estudios.

6.2. Validez externa

- Existe una elevada representatividad al ser todos consecutivos.

Resultados

1. Análisis de polimorfismos localizados en factores de transcripción implicados en la primera señal de activación de linfocitos

En muestra cohorte de pacientes trasplantados renales se estudiaron los siguientes SNPs: en el gen *NFKBIA* el SNP rs696 y en el gen *FOXP3*, los polimorfismos rs2232365 y rs3761548. Analizamos 572 pacientes de los cuales 124 (21,7%) sufrieron algún episodio de rechazo celular que en 36 de ellos (6,3%) fue de Grado <2 en la clasificación de Banff y en 90 (15,7%) fue de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff. El rechazo humoral fue encontrado en 41 pacientes (7,2%). En la *Tabla 5* se muestra el análisis para los episodios de RAC total, RAC de Grado <2 en clasificación de Banff, RAC Grado ≥ 2 y RMA, en modelo dominante y recesivo para el SNP rs696. Para los SNPs del gen *FOXP3* no se realizó el análisis según el modelo dominante debido a estar este gen en el cromosoma X.

Al analizar los datos encontramos una clara asociación del SNP rs696 del gen *NFKBIA* con el rechazo. En el modelo dominante de este SNP encontramos al alelo T como protector para el rechazo celular y una tendencia hacia la significación estadística en el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tabla 5*). Por otro lado, el alelo T también parece comportarse como un factor protector en el RMA (*Tabla 5*). En cuanto a los polimorfismos del gen *FOXP3*, no encontramos ninguna asociación en este grupo de pacientes (*Tabla 5*).

Tabla 5. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,60 (0,40-0,91)	0,014	TT	0,99 (0,57-1,73)	0,983
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	0,93 (0,60-1,43)	0,730
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,41 (0,95-2,12)	0,089
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,61 (0,31-1,21)	0,153	TT	1,11 (0,45-2,74)	0,826
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,27 (0,63-2,57)	0,503
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,11 (0,56-2,12)	0,770
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,64 (0,41-1,02)	0,058	TT	0,92 (0,48-1,73)	0,788
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	0,78 (0,47-1,28)	0,321
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,51 (0,96-2,37)	0,075
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,56 (0,30-1,02)	0,072	TT	1,14 (0,49-2,67)	0,756
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,46 (0,76-2,81)	0,256
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	0,99 (0,51-1,89)	0,963

A continuación, realizamos el mismo estudio estratificando nuestra cohorte por aquellos pacientes que habían recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina, 304 pacientes (53,1%), y los que no habían recibido este tratamiento, 268 pacientes (46,9%). En el grupo de pacientes que recibieron este tratamiento no encontramos ninguna asociación (Tabla 6). En los pacientes que no habían recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina observamos varias asociaciones significativas del SNP rs696 con el RAC total, el RAC de Grado <2 de la clasificación de Banff y el RAC de Grado ≥2 de la clasificación de Banff en modelo dominante todas ellas con efecto protector (Tabla 7). En esta misma Tabla 7 se puede observar una tendencia de asociación protectora del SNP rs2232365 del gen *FOXP3* en el modelo recesivo para el RAC de Grado ≥2 de la clasificación de Banff.

Tabla 6. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable en pacientes con tratamiento de inducción con Timoglobulina.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	1,16 (0,56-2,39)	0,693	TT	1,27 (0,52-3,07)	0,599
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,54 (0,78-3,08)	0,214
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,24 (0,62-2,46)	0,542
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	4,71 (0,59-37,70)	0,173*	TT	1,42 (0,29-6,91)	0,651*
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,41 (0,39-5,12)	0,732*
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,16 (0,32-4,20)	1,000*
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,81 (0,37-1,79)	0,600	TT	1,19 (0,42-3,29)	0,739
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,54 (0,71-3,37)	0,274
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,25 (0,57-2,72)	0,577
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,55 (0,25-1,20)	0,130	TT	1,25 (0,45-3,46)	0,591*
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,40 (0,63-3,11)	0,410
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	0,96 (0,43-2,15)	0,916

* Test exacto de Fisher.

Tabla 7. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable en pacientes sin tratamiento de inducción con Timoglobulina.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,39 (0,23-0,67)	0,001	TT	0,84 (0,41-1,73)	0,633
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	0,70 (0,38-1,24)	0,222
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,41 (0,83-2,37)	0,193
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,33 (0,14-0,75)	0,006	TT	0,98 (0,31-2,99)	1,000*
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,23 (0,55-3,02)	0,564
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	0,99 (0,44-2,25)	0,985
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,55 (0,31-0,99)	0,044	TT	0,77 (0,34-1,76)	0,532
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	0,50 (0,25-1,01)	0,051
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,55 (0,87-2,75)	0,133
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs696 (C/T)	<i>NFKB1A</i>	TT+CT	0,57 (0,19-1,76)	0,371*	AA	0,97 (0,21-4,58)	1,000*
rs2232365 (T/C)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,51 (0,48-4,77)	0,537*
rs3761548 (T/G)	<i>FOXP3</i>	-	-	-	TT	1,17 (0,38-3,58)	0,784

* Test exacto de Fisher

También realizamos el análisis multivariable mediante regresión logística para las variables de los polimorfismos que fueron significativas y las variables de interés biológico al ser factores de riesgo o protección descritos en la bibliografía. Las variables que se utilizaron para ajustar el modelo que evaluó la incidencia de RAC fueron donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA >50 y terapia de inducción (Timoglobulina). Así el SNP del rs696 de *NFKBIA*, mantuvo la significación estadística, de forma que los portadores del alelo T mostraron protección frente a desarrollar RAC total (Tabla 8) y frente al RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (Tabla 9).

Tabla 8. Análisis multivariable para el rechazo agudo celular total.

Variable	OR (95% IC)	p
Receptores totales*		
PRA >50		
Sí	2,64 (1,15-6,04)	0,022
No	1	
Re-trasplante		
Sí	1,97 (1,01-3,83)	0,047
No	1	
Terapia de inducción (Timoglobulina)		
Sí	0,21 (0,13-0,35)	<0,001
No	1	
rs696 (<i>NFKBIA</i>)		
TT + TC	0,60 (0,39-0,92)	0,020
TT	1	
Receptores <u>con</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Re-trasplante		
Sí	2,33 (0,98-5,53)	0,055
No	1	
PRA >50		
Sí	2,77 (1,10-6,94)	0,030
No	1	
Receptores <u>sin</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Donante >50		
Sí	1,72 (0,94-3,14)	0,078
No	1	
rs696 (<i>NFKBIA</i>)		
TT + TC	0,38 (0,22-0,66)	<0,001
TT	1	

* Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA >50 y terapia de inducción (Timoglobulina).

** Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante y PRA >50

Tabla 9. Análisis multivariable para el rechazo agudo celular Grado ≥ 2 (Banff)

Variable	OR (95% IC)	p
Receptores totales*		
PRA >50		
Sí	3,29 (1,32-8,20)	0,011
No	1	
Re-trasplante		
Sí	2,15 (1,03-4,50)	0,041
No	1	
Terapia de inducción (Timoglobulina)		
Sí	0,23 (0,13-0,40)	<0,001
No	1	
rs696 (NFKBIA)		
TT + TC	0,64 (0,40-1,04)	0,071
TT	1	
Receptores <u>con</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
PRA >50		
Sí	6,53 (2,86-14,89)	<0,001
No	1	
Receptores <u>sin</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
rs696 (NFKBIA)		
TT + TC	0,53 (0,30-0,96)	0,037
TT	1	

* Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y terapia de inducción (Timoglobulina).

** Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante y PRA>50

2. Análisis de polimorfismos localizados en genes de moléculas que participan en la segunda señal de activación de linfocitos

En nuestra cohorte de pacientes trasplantados ($n = 632$) observamos que un 21,4% presentaba algún episodio de rechazo, de los cuales un 5,7% tenía un RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff, un 16% tenía un RAC de Grado ≥ 2 y un 7,1% presentaba RMA. En el caso de los SNPs, rs3116496 del gen *CD28* y rs1129055 del gen *CD86*, no encontramos asociación con el rechazo inmunológico (*Tabla 10*). Sin embargo, para el gen *CTLA4* sí encontramos asociaciones del SNP rs3087243 en el modelo dominante; el cual presenta una asociación protectora en los portadores del alelo G con el rechazo celular total (*Tabla 10*), manteniéndose este carácter protector en el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tabla 10*).

Tabla 10. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs3116496 (T/C)	<i>CD28</i>	CC+CT	0,84 (0,56-1,26)	0,410	CC	0,76 (0,28-2,03)	0,579
rs1129055 (A/G)	<i>CD86</i>	AA+AG	0,82 (0,56-1,20)	0,311	AA	1,06 (0,54-2,07)	0,872
rs231775 (A/G)	<i>CTLA4</i>	GG+AG	0,78 (0,53-1,14)	0,197	GG	0,85 (0,41-1,73)	0,644
rs3087243 (G/A)	<i>CTLA4</i>	GG+AG	0,55 (0,36-0,84)	0,005	GG	0,80 (0,50-1,27)	0,333
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs3116496 (T/C)	<i>CD28</i>	CC+CT	1,02 (0,51-2,06)	0,948	CC	1,24 (0,28-5,43)	0,678*
rs1129055 (A/G)	<i>CD86</i>	AA+AG	0,82 (0,42-1,62)	0,569	AA	0,29 (0,04-2,18)	0,352*
rs231775 (A/G)	<i>CTLA4</i>	GG+AG	0,64 (0,31-1,27)	0,195	GG	1,40 (0,47-4,11)	0,532*
rs3087243 (G/A)	<i>CTLA4</i>	GG+AG	0,60 (0,29-1,22)	0,156	GG	0,76 (0,33-1,77)	0,519
Rechazo agudo celular Grado ≥ 2 (Banff)							
rs3116496 (T/C)	<i>CD28</i>	CC+CT	0,81 (0,52-1,28)	0,370	CC	0,60 (0,18-2,00)	0,603*
rs1129055 (A/G)	<i>CD86</i>	AA+AG	0,85 (0,55-1,30)	0,442	AA	1,57 (0,76-3,10)	0,191
rs231775 (A/G)	<i>CTLA4</i>	GG+AG	0,83 (0,54-1,28)	0,402	GG	0,65 (0,27-1,56)	0,333
rs3087243 (G/A)	<i>CTLA4</i>	GG+AG	0,57 (0,36-0,92)	0,019	GG	0,81 (0,48-1,36)	0,425
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs3116496 (T/C)	<i>CD28</i>	CC+CT	0,90 (0,47-1,71)	0,742	CC	0,46 (0,06-3,41)	0,713*
rs1129055 (A/G)	<i>CD86</i>	AA+AG	1,20 (0,66-2,21)	0,551	AA	1,05 (0,36-3,05)	0,788*
rs231775 (A/G)	<i>CTLA4</i>	GG+AG	1,08 (0,59-1,98)	0,808	GG	1,07 (0,37-3,12)	0,784*
rs3087243 (G/A)	<i>CTLA4</i>	GG+AG	0,95 (0,47-1,93)	0,887	GG	0,67 (0,31-1,48)	0,318

* Test exacto de Fisher.

También, se valoró en nuestra cohorte de pacientes trasplantados la relación de estos SNPs (rs231775, rs3087243, rs3116496, rs1129055) y su asociación con el rechazo, en función de que los pacientes hubiesen recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina o no. Del total de pacientes, 350 (55,4%) recibieron este tratamiento y en este grupo solo encontramos, considerando el modelo dominante, una tendencia a la asociación de carácter protector entre el polimorfismo rs231775 y el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff (*Tabla 11*). Posteriormente, al estudiar los 282 (44,6%) pacientes que no habían recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina, se apreciaba el mismo efecto protector observado en la cohorte total sin estratificar del SNP del gen *CTLA4* rs3087243 en el modelo dominante para el RAC total y para el RAC de Grado ≥ 2 (*Tabla 12*). Sin embargo, los SNPs de los genes *CD28* y *CD86* no mostraron ninguna asociación en ninguno de los dos grupos de pacientes (*Tabla 11* y *Tabla 12*).

Tabla 11. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable en pacientes con tratamiento de inducción con Timoglobulina.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs3116496 (T/C)	CD28	CC+CT	1,21 (0,62-2,35)	0,570	CC	0,57 (0,07-4,47)	1,000*
rs1129055 (A/G)	CD86	AA+AG	1,13 (0,59-2,16)	0,718	AA	0,98 (0,28-3,43)	1,000*
rs231775 (A/G)	CTLA4	GG+AG	0,71 (0,37-1,37)	0,305	GG	1,13 (0,37-3,41)	0,772*
rs3087243 (G/A)	CTLA4	GG+AG	0,67 (0,32-1,41)	0,291	GG	0,96 (0,45-2,04)	0,906
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs3116496 (T/C)	CD28	CC+CT	0,71 (0,18-2,79)	0,749*	CC	2,80 (0,33-23,73)	0,339*
rs1129055 (A/G)	CD86	AA+AG	1,61 (0,45-5,81)	0,533*	AA	1,40 (0,17-11,50)	0,543*
rs231775 (A/G)	CTLA4	GG+AG	0,23 (0,05-1,09)	0,056*	GG	Indefinido**	1,000*
rs3087243 (G/A)	CTLA4	GG+AG	0,59 (0,15-2,36)	0,435*	GG	Indefinido**	0,072*
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
rs3116496 (T/C)	CD28	CC+CT	1,42 (0,68-2,99)	0,351	CC	Indefinido**	0,623*
rs1129055 (A/G)	CD86	AA+AG	0,99 (0,47-2,08)	0,983	AA	0,85 (0,19-3,76)	1,000*
rs231775 (A/G)	CTLA4	GG+AG	1,01 (0,48-2,11)	0,983	GG	1,60 (0,52-4,92)	0,502*
rs3087243 (G/A)	CTLA4	GG+AG	0,72 (0,31-1,69)	0,450	GG	1,47 (0,66-3,26)	0,339
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs3116496 (T/C)	CD28	CC+CT	1,00 (0,47-2,13)	0,993	CC	0,77 (0,10-5,98)	1,000*
rs1129055 (A/G)	CD86	AA+AG	0,93 (0,45-1,92)	0,840	AA	0,38 (0,05-2,89)	0,492*
rs231775 (A/G)	CTLA4	GG+AG	1,08 (0,52-2,23)	0,840	GG	1,54 (0,50-4,72)	0,508*
rs3087243 (G/A)	CTLA4	GG+AG	1,44 (0,54-3,89)	0,468	GG	0,66 (0,26-1,67)	0,382

* Test exacto de Fisher.

**Debido a que en un grupo de pacientes el valor de análisis es 0 y no calcula la función para la OR.

Tabla 12. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable en pacientes sin tratamiento de inducción con Timoglobulina.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs3116496 (T/C)	CD28	CC+CT	0,73 (0,43-1,25)	0,246	CC	0,72 (0,22-2,31)	0,574
rs1129055 (A/G)	CD86	AA+AG	0,65 (0,40-1,07)	0,092	AA	0,94 (0,41-2,17)	0,888
rs231775 (A/G)	CTLA4	GG+AG	0,88 (0,54-1,45)	0,613	GG	0,73 (0,28-1,94)	0,530
rs3087243 (G/A)	CTLA4	GG+AG	0,57 (0,33-0,97)	0,038	GG	0,75 (0,41-1,39)	0,363
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs3116496 (T/C)	CD28	CC+CT	1,28 (0,56-2,94)	0,560	CC	0,69 (0,09-5,48)	1,000*
rs1129055 (A/G)	CD86	AA+AG	0,61 (0,27-1,39)	0,231	AA	Indefinido**	0,089*
rs231775 (A/G)	CTLA4	GG+AG	0,97 (0,43-2,18)	0,944	GG	2,40 (0,75-7,73)	0,131*
rs3087243 (G/A)	CTLA4	GG+AG	0,68 (0,29-1,61)	0,380	GG	1,32 (0,53-3,29)	0,556
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
rs3116496 (T/C)	CD28	CC+CT	0,62 (0,34-1,13)	0,119	CC	0,75 (0,20-2,73)	1,000*
rs1129055 (A/G)	CD86	AA+AG	0,75 (0,43-1,29)	0,301	AA	1,80 (0,79-4,10)	0,160
rs231775 (A/G)	CTLA4	GG+AG	0,81 (0,46-1,39)	0,445	GG	0,28 (0,06-1,24)	0,075
rs3087243 (G/A)	CTLA4	GG+AG	0,59 (0,33-1,05)	0,069	GG	0,57 (0,28-1,17)	0,125
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs3116496 (T/C)	CD28	CC+CT	0,59 (0,16-2,19)	0,554*	CC	Indefinido**	1,000*
rs1129055 (A/G)	CD86	AA+AG	2,37 (0,71-7,88)	0,148	AA	2,93 (0,76-11,34)	0,127*
rs231775 (A/G)	CTLA4	GG+AG	0,97 (0,32-2,97)	0,961	GG	Indefinido**	0,608*
rs3087243 (G/A)	CTLA4	GG+AG	0,42 (0,14-1,29)	0,198*	GG	0,62 (0,13-2,87)	0,739*

* Test exacto de Fisher

**Debido a que en un grupo de pacientes el valor de análisis es 0 y no calcula la función para la OR.

Se analizaron, también, los haplotipos generados por los SNPs rs231775 y rs3087243 del gen *CTLA4* y su asociación con el rechazo inmunológico, tanto en los receptores de forma global como en aquellos pacientes que hubieron recibido o no tratamiento de inducción. Solo encontramos una tendencia a la asociación protectora del haplotipo G/G con el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff en el grupo de pacientes que habían recibido tratamiento de inducción (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis univariable de los haplotipos de rs231775 y rs3087243 de *CTLA4* para el rechazo inmunológico.

Haplotipos <i>CTLA-4</i>		OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>P</i>
		Receptores totales		Receptores con Timoglobulina		Receptores sin Timoglobulina	
Rechazo agudo celular total							
A	A	1,26 (0,79-2,00)	0,333	1,05 (0,49-2,23)	0,906	1,33 (0,72-2,45)	0,363
A	G	0,76 (0,51-1,14)	0,181	1,20 (0,62-2,32)	0,587	0,61 (0,36-1,04)	0,066
G	G	0,78 (0,53-1,14)	0,197	0,71 (0,37-1,37)	0,305	0,88 (0,54-1,45)	0,613
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
A	A	1,32 (0,57-3,07)	0,519	Indefinido**	0,072*	0,76 (0,30-1,90)	0,556
A	G	0,80 (0,39-1,62)	0,529	1,52 (0,43-5,34)	0,529*	0,62 (0,25-1,54)	0,303
G	G	0,64 (0,32-1,27)	0,195	0,23 (0,05-1,09)	0,056*	0,97 (0,43-2,18)	0,944
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
A	A	1,24 (0,73-2,08)	0,425	0,68 (0,31-1,51)	0,339	1,74 (0,85-3,57)	0,125
A	G	0,79 (0,50-1,23)	0,297	1,09 (0,52-2,31)	0,818	0,69 (0,39-1,24)	0,215
G	G	0,83 (0,54-1,28)	0,402	1,01 (0,48-2,11)	0,983	0,81 (0,47-1,39)	0,445
Rechazo mediado por anticuerpos							
A	A	1,49 (0,68-3,27)	0,318	1,51 (0,60-3,79)	0,382	1,61 (0,35-7,48)	0,739*
A	G	0,79 (0,42-1,51)	0,478	0,89 (0,42-1,89)	0,762	0,52 (0,14-1,92)	0,388*
G	G	1,08 (0,59-1,98)	0,808	1,08 (0,52-2,23)	0,840	0,97 (0,32-2,97)	0,961

*Test exacto de Fisher.

**Debido a que en un grupo de pacientes el valor de análisis es 0 y no calcula la función para la OR.

Por último, realizamos el análisis multivariable mediante regresión logística para las variables de los polimorfismos que fueron significativas y las variables de interés biológico al ser factores de riesgo o protección descritos en la bibliografía. Las variables que se utilizaron para ajustar el modelo que evaluó la incidencia de RAC fueron donante>50, receptor>60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y terapia

de inducción (Timoglobulina). Así el SNP rs3087343 del gen *CTLA4*, mantuvo la significación estadística, de forma que los portadores del alelo T tuvieron protección frente a desarrollar RAC total (Tabla 14). Al igual, que seguía manteniendo la significación para la protección frente al RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (Tabla 15).

Tabla 14. Análisis Multivariable para el rechazo agudo celular total.

Variable	OR (95% IC)	p
Receptores totales*		
PRA >50		
Sí	2,25 (1,01-5,01)	0,047
No	1	
Sexo donante		
Mujer	1,69 (1,07-2,67)	0,025
Hombre	1	
Re-trasplante		
Sí	2,50 (1,34-4,66)	0,004
No	1	
Terapia de inducción (Timoglobulina)		
Sí	0,18 (0,11-,29)	<0,001
No	1	
rs3087343 (<i>CTLA4</i>)		
GG + AG	0,54 (0,35-0,85)	0,007
AA	1	
Receptores con tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Re-trasplante		
Sí	2,38 (1,02-5,53)	0,045
No	1	
Sexo receptor		
Mujer	1,98 (0,94-4,19)	0,074
Hombre	1	
PRA >50		
Sí	2,42 (0,98-5,96)	0,055
No	1	
Receptores sin tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Sexo donante		
Mujer	1,83 (1,04-3,22)	0,036
Hombre	1	
Receptor >60		
Sí	1,66 (0,98-2,91)	0,080
No	1	
rs3087343 (<i>CTLA4</i>)		
GG + AG	0,56 (0,32-0,98)	0,042
AA	1	

* Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y terapia de inducción (Timoglobulina).

** Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, y PRA>50

Tabla 15. Análisis Multivariable para el rechazo agudo celular Grado ≥ 2 (Banff)

Variable	OR (95% IC)	p
Receptores totales*		
PRA >50		
Sí	2,78 (1,15-6,73)	0,023
No	1	
Sexo donante		
Mujer	1,66 (0,99-2,77)	0,054
Hombre	1	
Re-trasplante		
Sí	2,74 (1,39-5,40)	0,004
No	1	
Terapia de inducción (Timoglobulina)		
Sí	0,19 (0,11-0,33)	<0,001
No	1	
rs3087343 (CTLA4)		
GG + AG	0,55 (0,34-0,91)	0,019
AA	1	
Receptores con tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
PRA >50		
Sí	5,30 (2,40-11,72)	<0,001
No	1	
Receptores sin tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Sexo donante		
Mujer	1,80 (0,95-3,40)	0,071
Hombre	1	
Re-trasplante		
Sí	3,18 (1,20-8,43)	0,019
No	1	
rs3087343 (CTLA4)		
GG + AG	0,51 (0,28-0,93)	0,029
AA	1	

* Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y terapia de inducción (Timoglobulina).

** Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, y PRA>50

3. Análisis de polimorfismos localizados en citocinas y receptores que participan en la tercera señal de activación de linfocitos

En nuestra cohorte total de pacientes trasplantados ($n = 632$) se estudiaron varios polimorfismos situados en genes de citocinas pro-inflamatorias o receptores de estas. En este grupo el 20,6% de los sujetos presentaron algún tipo de RAC, de estos el 5,4% fue de Grado <2 en la clasificación de Banff y el 15,3% de los casos fue de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff. Analizamos también el rechazo humoral que se encontró en el 7,1% de los receptores.

Como se observa en la *Tabla 16* encontramos asociación con el rechazo en varios SNPs tanto en el análisis de los modelos dominantes como en los recesivos; el primero que hemos descrito es la variante polimórfica rs4833837 del gen de *IL21*. La cual presentaba para el modelo dominante en los portadores del alelo G una clara asociación protectora para el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff. Para este mismo SNP encontrábamos una tendencia de asociación de riesgo para el RMA en el mismo modelo. El siguiente polimorfismo rs3212227 del gen *IL12B*, presentaba una asociación de riesgo en el modelo dominante para el RAC total y una tendencia a la asociación para el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tabla 16*). Por último, se observaron varias asociaciones de los polimorfismos localizados en el gen de *IL23R*. En el modelo dominante se observa una asociación protectora entre rs12070470 y el RAC, además vemos una tendencia a la asociación de carácter protector entre rs7528924 y el RAC. Y de perfil protector también se manifestaron las asociaciones con el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff tanto de rs12070470 como de rs7528924. Por otro lado, en el modelo recesivo vimos que el rs10889677 presentaba una asociación de riesgo para el RAC total que posteriormente se evidenciaba con una tendencia de asociación para el

RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff. También se observó en este modelo una clara asociación de carácter protector con el rs7528924 (Tabla 16).

Tabla 16. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	1,14 (0,58-2,23)	0,701	GG	0,91 (0,62-1,34)	0,632
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	0,89 (0,60-1,30)	0,542	TT	0,62 (0,27-1,42)	0,257
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	0,87 (0,59-1,29)	0,493	GG	1,03 (0,54-1,96)	0,935
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	1,12 (0,76-1,66)	0,545	AA	1,11 (0,59-2,09)	0,732
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,57 (1,07-2,31)	0,022	GG	0,89 (0,38-2,09)	0,798
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	1,01 (0,68-1,49)	0,944	AA	1,89 (1,07-3,34)	0,026
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,55 (0,30-1,00)	0,050	CC	Indefinido**	0,586*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,65 (0,43-0,99)	0,043	GG	0,48 (0,16-1,39)	0,169
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	1,07 (0,32-3,60)	1,000*	GG	1,24 (0,62-2,48)	0,542
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	0,89 (0,44-1,77)	0,730	TT	0,73 (0,17-3,15)	1,000*
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	0,46 (0,22-0,98)	0,040	GG	0,27 (0,04-1,99)	0,238*
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	0,75 (0,37-1,50)	0,418	AA	1,60 (0,59-4,30)	0,371*
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,41 (0,70-2,81)	0,327	GG	1,60 (0,47-5,51)	0,441*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	0,95 (0,47-1,89)	0,879	AA	1,56 (0,58-4,22)	0,375*
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	1,09 (0,44-2,71)	0,847	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,87 (0,42-1,78)	0,697	GG	1,71 (0,49-5,90)	0,426*
Rechazo agudo celular Grado ≥ 2 (Banff)							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	1,17 (0,54-2,60)	0,689	GG	0,84 (0,54-1,30)	0,426
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	0,93 (0,60-1,43)	0,726	TT	0,61 (0,23-1,57)	0,298
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	1,10 (0,71-1,70)	0,740	GG	1,37 (0,70-2,68)	0,357
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	1,33 (0,86-2,07)	0,198	AA	0,91 (0,43-1,91)	0,805
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,51 (0,98-2,32)	0,063	GG	0,65 (0,23-1,89)	0,430
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	1,01 (0,65-1,56)	0,952	AA	1,81 (0,97-3,39)	0,058
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,41 (0,19-0,88)	0,018	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,60 (0,37-0,97)	0,035	GG	0,15 (0,02-1,13)	0,035
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	1,48 (0,44-4,91)	0,789*	GG	0,81 (0,43-1,49)	0,490
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	1,19 (0,65-2,19)	0,566	TT	0,53 (0,13-2,28)	0,566*
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	1,80 (0,97-3,34)	0,060	GG	1,46 (0,59-3,60)	0,431*
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	0,89 (0,48-1,63)	0,708	AA	0,19 (0,02-1,42)	0,074*
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,11 (0,60-2,05)	0,723	GG	1,16 (0,34-3,94)	0,741*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	0,61 (0,33-1,14)	0,117	AA	0,62 (0,19-2,04)	0,608*
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,62 (0,23-1,60)	0,316	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,79 (0,41-1,49)	0,464	GG	0,78 (0,18-3,36)	1,000*

* Test exacto de Fisher

**Debido a que en un grupo de pacientes el valor de análisis es 0 y no calcula la función para la OR.

Al igual que en los anteriores análisis, también se estratificaron los pacientes según hubiesen recibido o no tratamiento de inducción con Timoglobulina. En el grupo que si recibió esta terapia ($n = 355$). Observamos una fuerte asociación protectora del SNP rs4833837 del gen de *IL21* para el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff (*Tabla 17*). En relación a las otras asociaciones que encontramos en la cohorte total, el SNP rs3212227 del gen *IL12B* no mostró ninguna asociación en ninguno de los grupos ni en ninguno de los modelos (*Tabla 17*). Por lo que respecta al efecto protector de los polimorfismos rs12070470 y rs7528924 situados en el gen *IL23R*, no se evidenció en este grupo de pacientes. Ahora bien, ninguno de los portadores del alelo G del rs7528924 que se asociaba significativamente con efecto protector para el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff en el grupo total, sufrió ningún tipo de RAC (*Tabla 17*).

Tabla 17. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable en pacientes con tratamiento de inducción con Timoglobulina.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	2,22 (0,51-9,64)	0,401*	GG	1,22 (0,63-2,35)	0,556
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	0,72 (0,36-1,40)	0,325	TT	0,27 (0,04-2,07)	0,344*
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	0,64 (0,33-1,30)	0,199	GG	1,18 (0,43-3,21)	0,787*
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	1,01 (0,56-2,12)	0,784	AA	1,18 (0,39-3,59)	0,766*
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,56 (0,80-3,02)	0,183	GG	1,02 (0,30-3,60)	1,000*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	0,75 (0,39-1,45)	0,400	AA	1,88 (0,73-4,88)	0,241*
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,55 (0,20-1,61)	0,268	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,72 (0,36-1,45)	0,360	GG	Indefinido**	0,236*
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	Indefinido**	0,607*	GG	1,20 (0,34-4,21)	1,000*
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	0,47 (0,12-1,84)	0,344*	TT	Indefinido**	1,000*
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	0,12 (0,02-0,95)	0,022	GG	0,90 (0,11-7,28)	1,000*
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	0,88 (0,25-3,11)	1,000*	AA	2,72 (0,55-13,43)	0,214*
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,50 (0,43-5,28)	0,532*	GG	3,34 (0,67-16,62)	0,161*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	0,95 (0,27-3,33)	1,000*	AA	1,09 (0,13-8,85)	1,000*
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,57 (0,07-4,62)	1,000*	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,17 (0,02-1,33)	0,096*	GG	Indefinido**	1,000*
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	1,58 (0,36-7,00)	0,753*	GG	1,21 (0,57-2,56)	0,616
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	0,84 (0,40-1,78)	0,647	TT	0,38 (0,05-2,90)	0,492*
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	0,98 (0,47-2,10)	0,966	GG	1,28 (0,42-3,90)	0,758*
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	1,18 (0,55-2,50)	0,671	AA	0,73 (0,16-3,21)	1,000*
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,54 (0,73-3,25)	0,257	GG	0,41 (0,05-3,16)	0,712*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	0,70 (0,33-1,50)	0,364	AA	2,12 (0,75-5,97)	0,179*
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,56 (0,16-1,90)	0,443*	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	1,04 (0,48-2,23)	0,921	GG	Indefinido**	1,000*
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	1,10 (0,32-3,82)	1,000*	GG	0,87 (0,42-1,78)	0,698
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	1,81 (0,87-3,76)	0,109	TT	0,73 (0,16-3,24)	1,000*
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	1,40 (0,68-2,86)	0,365	GG	0,79 (0,23-2,73)	1,000*
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	1,07 (0,52-2,20)	0,848	AA	Indefinido**	0,096*
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,26 (0,64-2,60)	0,525	GG	1,30 (0,37-4,58)	0,722*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	0,51 (0,24-1,07)	0,072	AA	0,61 (0,14-2,65)	0,754*
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,93 (0,34-2,51)	0,882	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	1,60 (0,56-2,40)	0,686	GG	1,32 (0,30-6,04)	0,665*

* Test exacto de Fisher

**Debido a que en un grupo de pacientes el valor de análisis es 0 y no calcula la función para la OR.

En aquellos pacientes que no habían recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina ($n = 277$). También encontramos diversas asociaciones (*Tabla 18*). En el modelo dominante observamos una clara asociación del rs4833837 de *IL21* con aquellos pacientes que había sufrido un RMA. Este mismo SNP presentó una tendencia a la asociación de riesgo para el RMA en el modelo recesivo (*Tabla 18*). De los SNPs analizados en el gen *IL23R*, el rs12070470 se vio una tendencia de asociación con el RAC que se observa posteriormente con el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff del modelo dominante. También, el rs7528924 se asoció con el RMA y el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff en el modelo dominante (*Tabla 18*). En todos los casos la asociación fue de carácter protector.

Tabla 18. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable en pacientes sin tratamiento de inducción con Timoglobulina.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	0,78 (0,33-1,86)	0,584	GG	0,78 (0,47-1,30)	0,347
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	1,00 (0,61-1,66)	0,982	TT	0,82 (0,31-2,18)	0,690
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	1,05 (0,63-1,74)	0,850	GG	1,19 (0,45-2,74)	0,806
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	1,11 (0,67-1,85)	0,677	AA	0,94 (0,42-2,07)	0,873
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,52 (0,92-2,53)	0,100	GG	1,20 (0,34-4,20)	0,752*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	1,21 (0,73-2,00)	0,462	AA	1,84 (0,86-3,93)	0,110
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,51 (0,24-1,07)	0,072	CC	Indefinido**	0,553*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,61 (0,35-1,04)	0,072	GG	0,56 (0,18-1,80)	0,336
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	0,63 (0,17-2,30)	0,448*	GG	1,30 (0,56-3,00)	0,539
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	1,16 (0,50-2,68)	0,725	TT	1,12 (0,25-5,12)	0,701
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	0,68 (0,29-1,62)	0,390	GG	Indefinido**	0,238*
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	0,67 (0,29-1,56)	0,352	AA	1,10 (0,31-3,92)	0,747*
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,30 (0,56-3,00)	0,539	GG	1,06 (0,13-8,62)	1,000*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	0,95 (0,41-2,18)	0,897	AA	1,67 (0,53-5,26)	0,324*
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	1,32 (0,47-3,73)	0,574*	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	1,46 (0,62-3,38)	0,380	GG	2,26 (0,60-8,46)	0,196*
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	0,95 (0,36-2,51)	0,923	GG	0,69 (0,39-1,21)	0,203
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	0,98 (0,57-1,70)	0,955	TT	0,72 (0,23-2,22)	0,567
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	1,19 (0,69-2,07)	0,521	GG	1,76 (0,71-4,36)	0,215
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	1,40 (0,80-2,47)	0,232	AA	0,86 (0,36-2,10)	0,745
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	1,42 (0,82-2,48)	0,204	GG	1,18 (0,31-4,60)	0,731*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	1,23 (0,71-2,14)	0,456	AA	1,58 (0,70-3,55)	0,266
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	0,32 (0,12-0,85)	0,017	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,43 (0,23-0,81)	0,008	GG	0,17 (0,02-1,31)	0,083*
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs1800795 (G/C)	IL6	GG + GC	Indefinido**	0,608*	GG	0,62 (0,18-2,11)	0,445
rs2055979 (G/T)	IL21	TT + TG	0,37 (0,10-1,39)	0,126	TT	Indefinido**	0,609*
rs4833837 (A/G)	IL21	GG + GA	3,73 (1,00-14,11)	0,038	GG	4,08 (1,02-16,29)	0,067*
rs2275913 (A/G)	IL17A	AA + AG	0,57 (0,18-1,85)	0,347	AA	0,69 (0,86-5,50)	1,000*
rs3212227 (T/G)	IL12B	GG + GT	0,90 (0,28-2,92)	0,865	GG	Indefinido**	1,000*
rs10889677 (A/C)	IL23R	AA + AC	0,95 (0,30-3,01)	0,929	AA	0,71 (0,89-5,71)	1,000*
rs12070470 (C/T)	IL23R	CC + CT	Indefinido**	0,229*	CC	Indefinido**	1,000*
rs7528924 (A/G)	IL23R	GG + AG	0,14 (0,02-1,12)	0,035*	GG	Indefinido**	1,000*

* Test exacto de Fisher.

**Debido a que en un grupo de pacientes el valor de análisis es 0 y no calcula la función para la OR.

También no propusimos analizar los haplotipos formados por los polimorfismos de los genes *IL21* y *IL23R*. Estos haplotipos se estudiaron en relación al rechazo inmunológico tanto en pacientes de forma global, como en pacientes estratificados según hubiesen recibido o no tratamiento de inducción con el fármaco deplector de linfocito T. Así en la *Tabla 19* se puede ver el análisis de los haplotipos de los polimorfismos de *IL21*, donde se observaba que, para los receptores analizados de forma global, el haplotipo rs2055979-rs4833837 G/G presentaba una asociación de carácter protector con el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff. Mientras que ese mismo haplotipo presentaba una tendencia a la asociación de riesgo para el RMA (*Tabla 19*). En los receptores de trasplante que habían recibido tratamiento de inducción se observó que el haplotipo rs2055979-rs4833837 G/G presentaba una asociación de carácter protector para el RAC de Grado <2 (*Tabla 19*). Por último, en los pacientes que no habían recibido ese tratamiento de inducción con Timoglobulina, pudimos observar una tendencia de asociación del mismo haplotipo con el riesgo de padecer un RMA.

Tabla 19. Análisis de haplotipos de *IL21*:rs2055979 (G/T) / rs4833837 (A/G) para el rechazo inmunológico.

Haplotipos IL-21		OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>P</i>
Receptores totales				Receptores con Timoglobulina		Receptores sin Timoglobulina	
Rechazo agudo celular total							
T	A	0,89 (0,60-1,31)	0,542	0,72 (0,36-1,40)	0,325	1,00 (0,60-1,66)	0,982
G	A	0,95 (0,63-1,43)	0,799	1,50 (0,70-3,19)	0,289	0,76 (0,45-1,28)	0,304
G	G	0,87 (0,59-1,29)	0,493	0,64 (0,33-1,26)	0,199	1,05 (0,63-1,74)	0,850
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
T	A	0,89 (0,44-1,77)	0,730	0,47 (0,12-1,84)	0,344*	1,16 (0,50-2,68)	0,725
G	A	1,19 (0,56-2,53)	0,655	4,44 (0,55-35,50)	0,177*	0,82 (0,34-1,97)	0,670
G	G	0,46 (0,22-0,98)	0,040	0,12 (0,02-0,95)	0,022*	0,69 (0,29-1,63)	0,390
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
T	A	0,93 (0,60-1,43)	0,726	0,84 (0,40-1,78)	0,647	0,98 (0,56-1,70)	0,955
G	A	0,89 (0,57-1,41)	0,626	1,13 (0,50-2,55)	0,770	0,80 (0,45-1,43)	0,457
G	G	1,10 (0,71-1,69)	0,678	0,98 (0,46-2,08)	0,966	1,20 (0,69-2,07)	0,521
Rechazo mediado por anticuerpos							
T	A	1,19 (0,65-2,19)	0,566	1,80 (0,87-3,76)	0,109	0,37 (0,10-1,39)	0,126
G	A	0,72 (0,39-1,34)	0,294	0,71 (0,34-1,49)	0,367	0,70 (0,21-2,25)	0,544*
G	G	1,80 (0,97-3,34)	0,060	1,40 (0,68-2,86)	0,365	3,74 (1,00-14,11)	0,038

*Test exacto de Fisher

Por lo que respecta a los haplotipos de *IL23R*, encontrábamos que para el análisis de todos los receptores de trasplante y para aquellos que no habían recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina había asociaciones de carácter protector entre el haplotipo rs10889677-rs12070470-rs7528924 C/C/G y el RAC. Además, también lo observábamos con el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de haplotipos de *IL23R*: rs10889677 (A/C) / rs12070470 (C/T) / rs7528924 (A/G) para el rechazo inmunológico.

Haplotipos IL-23		OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>P</i>	
Receptores totales			Receptores con Timoglobulina		Receptores sin Timoglobulina			
Rechazo agudo celular total								
A	T	A	1,02 (0,70-1,50)	0,912	0,76 (0,40-1,48)	0,421	1,20 (0,73-2,00)	0,462
A	T	G	1,01 (0,66-1,55)	0,955	1,30 (0,60-2,83)	0,518	1,04 (0,61-1,79)	0,877
C	C	G	0,55 (0,30-1,00)	0,050	0,55 (0,20-1,60)	0,268	0,50 (0,24-1,07)	0,072
C	T	G	0,80 (0,50-1,27)	0,351	0,81 (0,37-1,77)	0,601	0,84 (0,46-1,55)	0,585
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)								
A	T	A	0,95 (0,48-1,91)	0,894	0,96 (0,27-3,37)	1,000*	0,95 (0,41-2,19)	0,897
A	T	G	0,75 (0,36-1,55)	0,441	3,37 (0,42-27,00)	0,300*	0,55 (0,23-1,27)	0,157
C	C	G	1,09 (0,44-2,71)	0,847	0,57 (0,07-4,61)	1,000*	1,32 (0,47-3,73)	0,598
C	T	G	0,93 (0,42-2,11)	0,873	Indefinido**	0,069*	1,76 (0,72-4,32)	0,214
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)								
A	T	A	1,02 (0,66-1,57)	0,925	0,72 (0,34-1,52)	0,381	1,23 (0,71-2,14)	0,456
A	T	G	1,16 (0,72-1,90)	0,537	1,00 (0,43-2,34)	0,990	1,45 (0,78-2,67)	0,231
C	C	G	0,41 (0,19-0,88)	0,018	0,55 (0,16-1,90)	0,443*	0,32 (0,12-0,85)	0,017
C	T	G	0,76 (0,45-1,29)	0,313	1,25 (0,55-2,84)	0,594	0,58 (0,28-1,19)	0,136
Rechazo mediado por anticuerpos								
A	T	A	0,61 (0,33-1,14)	0,122	0,51 (0,25-1,09)	0,078	0,95 (0,30-3,01)	0,929
A	T	G	1,73 (0,81-3,66)	0,150	1,40 (0,60-3,33)	0,450	2,52 (0,54-11,80)	0,348*
C	C	G	0,61 (0,24-1,60)	0,316	0,93 (0,34-2,51)	0,882	Indefinido**	0,229*
C	T	G	1,12 (0,56-2,22)	0,749	1,48 (0,691-3,20)	0,307	0,29 (0,37-2,30)	0,307*

*Test exacto de Fisher

**Debido a que en un grupo de pacientes el valor de análisis es 0 y no calcula la función para la OR.

Por último, realizamos el análisis multivariable mediante regresión logística para las variables de los polimorfismos que fueron significativas y las variables de interés biológico al ser factores de riesgo o protección descritos en la bibliografía. Para ajustar el modelo que evaluó la incidencia de RAC utilizamos las variables: donante>50, receptor>60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y Terapia de inducción (Timoglobulina). Así el SNP del rs3212227 de *IL12B*, mantuvo la significación estadística, de forma que los portadores del alelo T tuvieron más riesgo de desarrollar RAC (Tabla 21). Mientras que el resto de SNPs estudiados mantuvieron una tendencia

de asociación: a la protección en rs3212227 y de riesgo en caso de rs10889677 (Tabla 21). El polimorfismo rs7528924 fue el único que mostró una tendencia a la protección en el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (Tabla 22).

Tabla 21. Análisis Multivariable para el rechazo agudo celular total.

Variable	OR (95% IC)	p
Receptores totales*		
Re-trasplante		
Sí	2,47 (1,32-4,61)	0,005
No	1	
Sexo donante		
Mujer	1,72 (1,07-2,75)	0,024
Hombre	1	
PRA >50		
Sí	2,27 (1,01-5,13)	0,048
No	1	
Terapia de inducción (Timoglobulina)		
Sí	0,18 (0,11-0,30)	<0,001
No	1	
rs3212227 (IL12B)		
GG + GT	1,64 (1,08-2,49)	0,020
TT	1	
rs12070470 (IL23R)		
CC + CT	0,56 (0,30-1,06)	0,076
TT	1	
rs10889677 (IL23R)		
AA	1,83 (0,94-3,39)	0,058
CC + CA	1	
Receptores <u>con</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Re-trasplante		
Sí	2,50 (1,06-5,93)	0,037
No	1	
PRA >50		
Sí	2,37 (0,94-5,95)	0,067
No	1	
Receptores <u>sin</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Donante >50		
Sí	1,89 (1,03-3,48)	0,039
No	1	
Sexo donante		
Mujer	1,81 (1,01-3,25)	0,048
Hombre	1	
rs3212227 (IL12B)		
GG + GT	1,71 (1,02-2,89)	0,043
CC	1	

* Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y Terapia de inducción (Timoglobulina).

** Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante y PRA>50.

Tabla 22. Análisis Multivariable para el rechazo agudo celular Grado ≥ 2 (Banff)

Variable	OR (95% IC)	p
Receptores totales*		
Re-trasplante		
Sí	1,84 (1,08-3,12)	0,024
No	1	
Terapia de inducción (Timoglobulina)		
Sí	0,50 (0,33-0,75)	0,001
No	1	
Receptores <u>con</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
PRA >50		
Sí	2,12 (1,04-4,35)	0,040
No	1	
Receptores <u>sin</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Re-trasplante		
Sí	2,89 (1,11-7,52)	0,030
No	1	
rs7528924 (IL23R)		
GG + GA	0,57 (0,32-1,03)	0,062
AA	1	

* Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y Terapia de inducción (Timoglobulina).

** Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante y PRA>50.

4. Análisis de replicación de SNPs asociados con rechazo en trasplante renal

En nuestra cohorte de pacientes trasplantados de riñón analizamos dos SNPs: rs10765602 y rs7976329 localizados en los genes *DEUP1* (*CCDC67*) y *PTPRO*, respectivamente. En esta cohorte de 641 pacientes, 135 (21,1%) sufrieron algún tipo de rechazo celular, de los cuales en 36 (5,6%) fue de Grado <2 en la clasificación de Banff y en 101 (15,8%) fue de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff. También se recogieron los datos de rechazo humoral, que se constató en 46 pacientes (7,2%) del total.

Cuando se analizaron estos polimorfismos en relación al rechazo, encontramos una clara asociación con el riesgo de RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff. Así, podemos ver en la *Tabla 23* que el genotipo CC del SNP rs7976329 se asocia con un aumento del riesgo del RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff y también se observa una tendencia a la asociación con el RAC total.

Tabla 23. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	1,15 (0,78-1,69)	0,477	CC	1,70 (0,99-2,92)	0,052
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	0,89 (0,60-1,30)	0,541	GG	0,97 (0,41-2,28)	0,945
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	1,68 (0,82-3,42)	0,150	CC	3,78 (1,78-8,06)	0,001*
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	0,83 (0,42-1,66)	0,603	GG	2,40 (0,80-7,21)	0,116*
Rechazo agudo celular Grado ≥ 2 (Banff)							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	0,97 (0,63-1,49)	0,892	CC	1,04 (0,53-2,01)	0,908
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	0,93 (0,61-1,43)	0,745	GG	0,70 (0,24-2,04)	0,511
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	0,88 (0,48-1,61)	0,682	CC	0,71 (0,25-2,05)	0,530
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	1,02 (0,56-1,87)	0,952	GG	0,38 (0,05-2,83)	0,502*

* Test exacto de Fisher

Por otro lado, cuando estratificamos a los pacientes según hubieran recibido o no tratamiento de inducción con Timoglobulina, como se ve en la *Tabla 24*, en aquellos pacientes que habían recibido este tratamiento ($n = 358$), se observa una tendencia a la asociación de riesgo para el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff por parte del genotipo CC de *PTPRO*. Esta asociación, también es claramente significativa para ambos SNPs en aquellos pacientes que no habían recibido el tratamiento de inducción con Timoglobulina ($n=283$) (*Tabla 25*).

Tabla 24. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariable en pacientes con tratamiento de inducción con Timoglobulina.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	<i>p</i>	Modelo recesivo	OR (95% IC)	<i>p</i>
Rechazo agudo celular total							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	1,19 (0,62-2,30)	0,605	CC	1,33 (0,49-3,64)	0,576*
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	1,11 (0,58-2,14)	0,742	GG	1,06 (0,30-3,71)	1,000*
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	1,96 (0,50-7,72)	0,522*	CC	4,23 (1,04-17,17)	0,064*
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	1,16 (0,33-4,08)	1,000*	GG	1,50 (0,18-12,34)	0,520*
Rechazo agudo celular Grado ≥ 2 (Banff)							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	1,00 (0,48-2,11)	0,992	CC	0,61 (0,14-2,69)	0,754*
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	1,09 (0,52-2,28)	0,814	GG	0,91 (0,21-4,06)	1,000*
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	0,66 (0,32-1,36)	0,260	CC	0,92 (0,27-3,17)	1,000*
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	0,73 (0,35-1,52)	0,399	GG	0,39 (0,05-2,99)	0,716*

* Test exacto de Fisher

Tabla 25. Estudio de asociación de los SNPs con rechazo inmunológico mediante análisis bivariante en pacientes sin tratamiento de inducción con Timoglobulina.

SNP	Nombre Locus	Modelo dominante	OR (95% IC)	p	Modelo recesivo	OR (95% IC)	p
Rechazo agudo celular total							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	1,13 (0,68-1,86)	0,638	CC	1,68 (0,84-3,34)	0,138
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	0,90 (0,54-1,50)	0,691	GG	1,64 (0,43-6,24)	0,486*
Rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	1,58 (0,68-3,67)	0,286	CC	3,24 (1,30-8,08)	0,015*
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	0,81 (0,35-1,91)	0,641	GG	5,46 (1,28-23,26)	0,040*
Rechazo agudo celular Grado ≥2 (Banff)							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	0,94 (0,55-1,61)	0,817	CC	1,06 (0,49-2,30)	0,888
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	0,98 (0,57-1,71)	0,953	GG	0,86 (0,18-4,27)	1,000*
Rechazo mediado por anticuerpos							
rs7976329 (T/C)	<i>PTPRO</i>	CC+TC	1,86 (0,56-6,17)	0,307	CC	0,51 (0,06-4,03)	1,000*
rs10765602 (G/T)	<i>DEUP1</i>	GG+TG	1,89 (0,62-5,78)	0,257	GG	Indefinido**	1,000*

* Test exacto de Fisher.

**Debido a que en un grupo de pacientes el valor de análisis es 0 y no calcula la función para la OR.

Por último, realizamos el análisis multivariable mediante regresión logística para las variables de los polimorfismos que fueron significativas y las variables de interés biológico al ser factores de riesgo o protección descritos en la bibliografía. Las variables que se utilizaron para ajustar el modelo que evaluó la incidencia de RAC fueron donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA >50 y Terapia de inducción (Timoglobulina). Encontramos que se mantenía la significación estadística en los dos SNPs, de tal forma que los portadores del genotipo CC de rs7976329 del gen *PTPRO* tenía en torno a 3 veces más de riesgo de presentar un RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff, tanto en los receptores totales como en los pacientes estratificados por Timoglobulina, mientras que los portadores del genotipo GG del SNP rs10765602 del gen *DEUP1* presentaban 4,6 veces más riesgo de presentar un RAC de Grado <2, solo en el grupo sin tratamiento de inducción con Timoglobulina (Tabla 27).

Tabla 26. Análisis Multivariable para el rechazo agudo celular total.

Variable	OR (95% IC)	p
Receptores totales*		
Re-trasplante		
Sí	2,33 (1,26-4,34)	0,007
No	1	
Sexo donante		
Hombre	1,63 (1,03-2,57)	0,036
Mujer	1	
PRA >50		
Sí	2,36 (1,07-5,24)	0,034
No	1	
Terapia de inducción (Timoglobulina)		
Sí	0,18 (0,11-0,29)	<0,001
No	1	
rs7976329 (PTPRO)		
CC	1,69 (0,95-3,02)	0,076
TT +TC	1	
Receptores <u>con</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Re-trasplante		
Sí	2,38 (1,02-5,54)	0,045
No	1	
Sexo receptor		
Hombre	1,98 (0,94-4,19)	0,074
Mujer	1	
PRA >50		
Sí	2,42 (0,98-5,96)	0,055
No	1	
Receptores <u>sin</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
Donante >50		
Sí	1,77 (0,99-3,19)	0,056
No	1	
Sexo donante		
Hombre	1,70 (0,96-2,98)	0,067
Mujer	1	

* Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y Terapia de inducción (Timoglobulina).

** Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, y PRA>50.

Tabla 27. Análisis Multivariable para el rechazo agudo celular Grado <2 (Banff)

Variable	OR (95% IC)	p
Receptores totales*		
Receptor >60		
Sí	2,11 (0,90-4,99)	0,087
No	1	
Terapia de inducción (Timoglobulina)		
Sí	0,34 (0,19-0,72)	0,005
No	1	
rs7976329 (PTPRO)		
CC	3,63 (1,67-7,90)	0,001
TT + TC	1	
Receptores <u>con</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
rs7976329 (PTPRO)		
CC	4,29 (1,05-17,44)	0,042
TT + TC	1	
Receptores <u>sin</u> tratamiento de inducción con Timoglobulina**		
rs7976329 (PTPRO)		
CC	3,10 (1,21-7,93)	0,019
TT + TC	1	
rs10765602 (DEUP1)		
GG	4,64 (1,03-20,90)	0,046
TT + TG	1	

* Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, PRA>50 y terapia de inducción (Timoglobulina).

** Ajustada por donante >50, receptor >60, re-trasplante, sexo receptor, sexo donante, y PRA>50.

5. Análisis de polimorfismos asociados a función renal en enfermedad renal crónica realizado en pacientes con trasplante renal

Al analizar los 11 SNPs que nosotros habíamos seleccionado en relación con la tasa de filtración glomerular media expresada en eGFR y las medianas de los niveles de excreción de creatinina en orina mediante la ratio P/C pudimos ver dos SNPs asociados con estos dos parámetros. El rs1394125 localizado en el gen *UBE2Q2* y el rs12917707 situado en el gen *UMOD*. Ambos SNPs mostraban una asociación en el análisis univariable considerando el modelo recesivo para las medias de eGFR (*Tabla 28*) y las medianas de la ratio P/C (*Tabla 29*). El genotipo AA del SNP rs1394125, se asociaba significativamente con ambos parámetros; mientras que el genotipo TT del SNP rs12917707 presentaba una tendencia de asociación en el estudio de eGFR (*Tabla 28*), y una asociación claramente significativa para la ratio P/C (*Tabla 29*).

Los pacientes con el genotipo AA del SNP rs1394125 presentaban menor tasa de eGFR y mayor ratio P/C; en cambio los trasplantados homocigotos TT del SNP rs12917707 se asociaron con una mayor tasa de eGFR y menor ratio P/C.

Tabla 28. Estudio de asociación de los SNPs con la función renal para la media de eGFR mediante t de Student.

SNP	Nombre locus	Modelo dominante	p	Modelo recesivo	p
rs12136063 (G/A)	<i>SYPL2</i>	GG+AG	0,484	GG	0,593
rs1047891 (C/A)	<i>CPS1</i>	AA+AC	0,667	AA	0,565
rs4667594 (T/A)	<i>LRP2</i>	TT+AT	0,249	TT	0,923
rs228611 (G/A)	<i>MANBA</i>	AA+AG	0,773	AA	0,468
rs17319721 (G/A)	<i>SHROOM3</i>	AA+AG	0,146	AA	0,623
rs10774021 (C/T)	<i>SLC6A13</i>	CC+CT	0,774	CC	0,369
rs1394125 (G/A)	<i>UBE2Q2</i>	AA+AG	0,251	AA	0,022*
rs164748 (C/G)	<i>DPEP1</i>	CC+CG	0,637	CC	0,263
rs12917707 (G/T)	<i>UMOD</i>	TT+GT	0,922	TT	0,068**
rs8091180 (G/A)	<i>NFATC1</i>	GG+AG	0,439	GG	0,121
rs6088580 (G/C)	<i>TP53INP2</i>	CC+CG	0,891	CC	0,767

* 48,5 ±17,0 vs 53,2 ±15,6 ml/min/1,73m³

** 49,4 ±16,9 vs 41,3 ±15,2 ml/min/1,73m³

Tabla 29. Estudio de asociación de los SNPs con la función renal para la mediana de la ratio P/C mediante test de la mediana.

SNP	Nombre locus	Modelo dominante	<i>p</i>	Modelo recesivo	<i>p</i>
rs12136063 (G/A)	<i>SYPL2</i>	GG+AG	0,154	GG	0,433
rs1047891 (C/A)	<i>CPS1</i>	AA+AC	0,844	AA	0,193
rs4667594 (T/A)	<i>LRP2</i>	TT+AT	0,724	TT	0,388
rs228611 (G/A)	<i>MANBA</i>	AA+AG	0,715	AA	0,073
rs17319721 (G/A)	<i>SHROOM3</i>	AA+AG	0,271	AA	0,280
rs10774021 (C/T)	<i>SLC6A13</i>	CC+CT	0,550	CC	0,907
rs1394125 (G/A)	<i>UBE2Q2</i>	AA+AG	0,312	AA	0,015*
rs164748 (C/G)	<i>DPEP1</i>	CC+CG	0,141	CC	0,767
rs12917707 (G/T)	<i>UMOD</i>	TT+GT	0,228	TT	0,011**
rs8091180 (G/A)	<i>NFATC1</i>	GG+AG	0,581	GG	0,888
rs6088580 (G/C)	<i>TP53INP2</i>	CC+CG	0,779	CC	0,859

* 27,1% vs 14,1%

** 24,4% vs 53,3%

Discusión

1. Influencia de polimorfismos localizados en factores de transcripción implicados en la primera señal de activación de linfocitos

En el proceso de presentación antigénica para la activación de los linfocitos, la primera señal de reconocimiento llevada a cabo por los receptores celulares (TCR y BCR) es esencial para la respuesta inmunitaria¹⁹. Por eso, el análisis de los factores implicados en este mecanismo puede ser de ayuda para abordar el rechazo en el trasplante. Nosotros nos centramos en dos genes cuyos SNPs previamente han sido descritos como participantes en la respuesta inmunitaria frente al injerto y en el rechazo: *NFKBIA*^{139, 140, 211} y *FOXP3*^{141, 147, 148, 212}.

1.1. NFKBIA

El SNP rs696 C/T se localiza en la región 3' UTR del gen *NFKBIA*. Está implicado en la estabilidad de la molécula de mRNA, en la exportación fuera del núcleo y en la traducción del mRNA de su proteína I κ B α ^{134, 138-140}. Esta proteína es responsable de la inhibición del factor de transcripción NF- κ B¹³⁰⁻¹³³. Este represor, mantiene bloqueado a NF- κ B impidiendo su translocación al núcleo, así I κ B α puede modular la capacidad transcripcional de NF- κ B^{130-132, 134}. Song *et al.* describen mediante estudios funcionales que el genotipo TT del SNP rs696 está implicado en una mayor estabilidad del mRNA lo que implica una mayor cantidad de proteína I κ B α en el citosol¹³⁹. En nuestro estudio pudimos observar que los pacientes portadores del alelo T presentan una mayor protección frente a algunos rechazos (*Tabla 5*). Así, al analizar el rechazo inmunológico en la *Tabla 5* vemos una fuerte asociación protectora en el RAC total, mientras que en el RAC de Grado ≥ 2 el en la clasificación de Banff vemos una tendencia de asociación. Estos datos subyacen a lo descrito por Song *et al.* en cuanto a la traducción del gen; así,

el alelo T otorga protección frente a los rechazos debido a que proporciona una mayor estabilidad del mRNA del gen *NFKBIA* en su región 3' UTR lo que implica una mayor producción de proteína inhibidora ($I\kappa B\alpha$) de NF- κB ¹³⁹. Esto va a reflejarse de forma directa en una disminución de la inflamación por la disminución de la producción de citocinas pro-inflamatorias y una reducción de la activación/diferenciación celular^{132, 133}. Nuestros datos coinciden también con lo publicado por el grupo de Misra *et al.*, los cuales describen que, en pacientes con trasplante renal, el alelo C estaba asociado a un mayor riesgo de tener rechazo y una menor supervivencia¹³⁷. En cambio, el grupo de Kramer *et al.* para una cohorte de pacientes trasplantados de hígado, asegura que el genotipo TT presenta un mayor riesgo de rechazos múltiples¹⁴⁰. Este riesgo solo lo encuentran al comparar el “trasplante hepático y múltiples rechazos”, pero no al comparar “rechazo frente no rechazo” en estos pacientes¹⁴⁰. No obstante, ellos mismo indican que se deben realizar estudios funcionales para comprobar que el alelo T genera una reducción de la proteína $I\kappa B\alpha$ ¹⁴⁰. Sin embargo, estudios funcionales realizados previamente por Song *et al.*, no fueron revisados por el grupo de Kramer; e invalidaría el razonamiento que ellos presentan, ya que como hemos dicho antes, el alelo T presenta una mayor estabilidad del mRNA y con ello una mayor carga proteica¹³⁹. Por otro lado, también en nuestro estudio estratificamos a los pacientes según habían recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina o no. De estos resultados se puede apreciar que el efecto genético es mayor sobre el componente celular inmunitario en los pacientes que no recibieron el fármaco deplector de linfocitos T, ya que vemos varias asociaciones protectoras con una alta significación (*Tabla 7*). Concretamente vemos ese efecto para el RAC total, el RAC de Grado <2 y el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tabla 7*). Esto puede ser debido, a que los pacientes que presentan el alelo T del SNP tienen una mayor producción de la proteína $I\kappa B\alpha$ la cual reprime al factor NF-

κ B y esto genere una caída de la actividad pro-inflamatoria. Esta caída puede estar mediada por dos vías fundamentalmente, la primera es la falta de producción de células Th17 pro-inflamatorias^{137, 213}; y la segunda, por reducción de la producción de las citocinas pro-inflamatorias dependientes del factor NF- κ B como son IL-2, IL-6, IL-12 y TNF- α , las cuales conducen a una menor respuesta Th1 dependiente^{140, 214}. En ambos casos, al reducir el componente celular tenemos una mejor respuesta al rechazo mediado por células.

Por último, al realizar el estudio de rs696 mediante análisis multivariable, se comprueba que este SNP se comporta como factor independiente para el rechazo celular. De tal manera, que los portadores del alelo T presentan protección frente al RAC de forma global y específicamente en los pacientes que pueden sufrir un RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tablas 8 y 9*). Se observa que los receptores que no reciben tratamiento de inducción presentan una mejor protección (*Tablas 8 y 9*). Estos datos vienen a apoyar lo anteriormente expuesto respecto al SNP rs696 de *NFKBIA*.

1.2. FOXP3

En este gen nos propusimos estudiar dos SNPs que se localizan en la región promotora. Uno de ellos, rs3761548 T/G, se asocia con la capacidad transcripcional del factor FOXP3. Se ha descrito que esta variante polimórfica se encuentra en una secuencia consenso de “GGGCGG” para la unión del factor de transcripción sp-1^{137, 145}. Este factor, sp-1, es una proteína de expresión ubicua implicado en procesos de diferenciación celular, crecimiento celular y respuesta inmunitaria¹⁴⁷. Contiene un dominio proteico basado en “dedos de zinc” que se une a *FOXP3* e incrementa su transcripción²¹⁵. El otro SNP, rs2232365 G/T también se asocia a la capacidad

transcripcional del gen, concretamente se sitúa en la región *cis* de unión de NF- κ B^{135, 216}. La actividad transcripcional relacionada con estos polimorfismos se asocia de forma directa con la producción de células Treg que como se comentó anteriormente son indispensables para mantener la tolerancia reduciendo la inflamación, y con ello una mejor adaptación del injerto en el receptor^{84, 86, 137}. Para el SNP rs3761548 no observamos ninguna asociación con el rechazo inmunológico (*Tablas 5, 6 y 7*). En nuestro estudio vemos lo mismo que los grupos de Adamek *et al.*¹⁴⁸, Verma *et al.*¹⁴⁵ y Qiu *et al.*¹⁴³ que no encuentran significación al analizar este SNP en el primer año postrasplante. Sin embargo, los grupos de Thude *et al.*¹⁴⁷ y Khuja *et al.*¹⁴¹ ven que el alelo T es potencialmente de riesgo para el rechazo, posiblemente se debe a que estos grupos tienen un menor número de pacientes estudiados respecto a nuestro grupo, presentando datos con menor potencia estadística.

En relación al otro SNP estudiado, rs2232365, observamos una asociación protectora para el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff en aquellos pacientes que no habían sido tratados con Timoglobulina (*Tabla 7*). Estos resultados se podrían explicar por la capacidad transcripcional de la región promotora en la que se sitúa el SNP rs2232365. Diversos autores demuestran que en la región promotora del gen *FOXP3* se encuentran unas secuencias potenciadoras de la transcripción, a las cuales se puede unir NF- κ B estimulando la expresión de *FOXP3*^{135, 136, 217}. Por ello, el alelo T posiblemente genere una mejor afinidad por NF- κ B, y esto implique una mejor producción de Treg¹³⁵. Este efecto se observa fundamentalmente en los pacientes sin Timoglobulina y en el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff porque las células T no son eliminadas por el fármaco y estas responden a los estímulos de agresión inflamatoria severa¹³³. De esta manera, para compensar esta excesiva inflamación se estimularía el factor *FOXP3*, el cual genera las Treg para reducir dicha inflamación a modo de *feed-back*. En nuestro

estudio, al igual que el grupo de Misra *et al.* vemos una asociación protectora del alelo T; sin embargo, otros autores no encuentran ninguna asociación de este SNP con el rechazo^{143, 147} posiblemente porque presentan cohortes de pacientes más pequeñas, que al estratificar entre rechazo y no rechazo, o como en el caso de Thude *et al.* entre rechazo temprano o tardío, pierden la potencia estadística.

2. Implicación de polimorfismos localizados en genes de moléculas que participan en la segunda señal de activación de linfocitos

El sistema inmunitario necesita una precisa regulación que le permita estar en óptimas condiciones para responder a las agresiones externas. Para ello, múltiples sistemas participan controlando su activación o su represión, dependiendo de las condiciones a las que se vea expuesto⁶. Uno de los mayores retos es conocer de forma exhaustiva las vías que conllevan a esa activación/desactivación del sistema inmunitario y de la genética implicada. En el proceso de activación de los linfocitos T, la segunda señal es una vía indispensable para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario. Estas señales se reciben en moléculas de superficie, tales como CD28, CD86 y CTLA-4, que participan transduciendo los mensajes, modulando así la respuesta inmunitaria^{150, 151}.

2.1. CD28 y CD86

CD28 es un receptor activador cuya función es transmitir mensajes de progresión de la respuesta inmunitaria, generando señales estimuladoras²¹⁸. Esta segunda señal es producida tras la primera inducción que se genera por el contacto TCR-HLA. La molécula CD28 se une a dos ligandos distintos de la familia de las inmunoglobulinas de B7: CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). El primero se expresa poco en superficie, pero aumenta su expresión después de ser inducido tras la activación celular. Sin embargo, CD86 es una molécula constitutiva de la membrana celular que rápidamente es sobre-expresada en respuesta a la primera señal activadora. Este desequilibrio entre ambas moléculas implica que CD86 sea más necesario en la culminación de la activación celular inicial mientras que CD80 estaría encargada del mantenimiento de la respuesta inmunitaria²¹⁸. Estos ligandos están muy restringidos en su localización ya que sólo se

expresan en las APCs en la respuesta inmunitaria¹¹ y participan de forma activa en el desarrollo de la respuesta aloimmune. Se ha visto como CD28 en el trasplante se expresa hasta dos veces más cuando la célula es activada mediante la primera señal³⁹. Por ello, la sobre-expresión que se sufre en el trasplante debido a la estimulación constante del injerto lleva al incremento de la producción de IL-2, a la activación y diferenciación de células T (Th1 y Th2)^{150, 151}.

En nuestro estudio analizamos dos SNPs, uno relacionado con *CD28* (rs3116496) y otro localizado en *CD86* (rs1129055). La variante polimórfica rs3116496 está localizada en el tercer intrón del gen *CD28*¹⁵². Respecto a su relación con el trasplante, hay cierta controversia al consultar los estudios, algunos autores afirman que el alelo C otorga riesgo frente al rechazo^{40, 152}. También, se ha descrito que el genotipo CT puede asociarse a con mayor riesgo de rechazo²¹⁹. Sin embargo, otros trabajos no encuentran asociación²²⁰⁻²²³. Al igual que estos últimos grupos, no encontramos asociación del SNP con el rechazo, tanto celular como humoral (*Tabla 10*), ni cuando se estratifican a los pacientes por su tratamiento de inducción con Timoglobulina (*Tablas 11 y 12*).

El otro SNP, rs1129055 se localiza en el exón 8 del gen de *CD86*¹⁵³. Martin *et al.* han evidenciado que el genotipo AA y el alelo A se relacionaban con un mejor pronóstico en la supervivencia del injerto hepático¹⁵⁴. También se ha encontrado la asociación entre el SNP y un menor riesgo de rechazo renal^{152, 154, 224}. Sin embargo, Reuver *et al.* han descrito que el rs1129055 no se asocia con rechazo en población caucásica, siendo confirmado por Liu *et al.* en su meta-análisis^{40, 225}. Nosotros, al igual que Reuver *et al.* y Liu *et al.*, no encontramos asociación del SNP con el rechazo renal, ni celular ni humoral (*Tabla 10*), ni cuando se analizó estratificando por aquellos pacientes que habían recibido tratamiento de inducción (*Tablas 11 y 12*).

Estos controvertidos resultados, tanto en el caso del polimorfismo de *CD28* como el de *CD86*, pueden ser explicados debido al bajo número de pacientes analizados, ya que los estudios que encuentran una asociación, su cohorte está entorno a los 200 pacientes. En nuestro caso, poseemos una mayor potencia estadística que respaldaría el hecho de que no hay asociación.

2.2. CTLA-4

La otra molécula implicada en la segunda señal es CTLA-4. En este caso se trata de un coestimulador negativo que posee la capacidad de unirse con alta afinidad, hasta 100 veces más que CD28 a sus ligando CD80 y CD86¹⁵⁵. Debido a esta capacidad supresora de la segunda señal estimuladora no se expresa de manera constitutiva. Su actividad es esencial para frenar la activación del sistema inmunitario ya sea por medio de la reducción de la inflamación, como la inducción a la tolerancia, o la depleción de células T después de un evento dañino para el organismo como puede ser un rechazo del injerto¹¹. La capacidad de generar tolerancia es una característica interesante de CTLA-4, ya que las células T diferenciadas que velan por la tolerancia periférica, las Treg, expresan altas concentraciones de este receptor^{156, 157}. Además, actúa reduciendo la expresión de moléculas coestimuladoras mediante la transendocitosis de sus moléculas complementarias²²⁶⁻²²⁸ y reduciendo las citocinas pro-inflamatorias, como IL-6 y TNF- α ¹¹. Como CTLA-4 se expresa en células T activadas, en el trasplante renal su rol es actuar bloqueando la segunda señal impidiendo la unión CD28 \leftrightarrow B7 lo que conlleva una reducción de la activación, proliferación y la supervivencia de células T activadas^{155, 229, 230}.

En nuestro estudio nos propusimos analizar dos SNP en el gen *CTLA4* que se han visto relacionados con trasplante, rs231775 y rs3087243. El primero se encuentra en el exón

1 del gen de *CTLA4*¹⁵⁸, el cual genera un desequilibrio en la expresión en la membrana celular de CTLA-4^{231, 232}. Así, los linfocitos T que tienen el genotipo AA expresan un nivel normal de CTLA-4 en sus membranas, sin embargo, aquellos que tienen el genotipo GG expresaban un tercio menos^{231, 232}.

Fue interesante observar que los portadores del alelo G del SNP rs231775 en nuestra cohorte de pacientes que habían recibido tratamiento de inducción seguían una tendencia a la asociación con un menor RAC de Grado <2 de la clasificación de Banff (*Tabla 11*). Se puede llegar a pensar que al expresar menos CTLA-4 en membrana esto condujera aun mayor rechazo celular, sin embargo, según nuestros resultados el alelo G de menor expresión es protector frente al RAC, al estratificar los pacientes por su tratamiento. Se han descrito varios trabajos sobre la asociación del rechazo en el trasplante y el SNP rs231775 donde se pone de manifiesto cierta controversia entre los autores. Unos, al igual que nuestro grupo, encuentran que el alelo G otorga protección frente a rechazo^{225, 233}. Otros en cambio le dan validez a que el alelo A es el protector^{152, 211, 232}. También, se ha descrito que el genotipo AG era protector²³⁴. En cambio, otros autores no han evidenciado asociación entre el rs231775 y el rechazo agudo^{37, 222, 223, 235-237}. Hay que destacar que el número de pacientes en todos los trabajos mencionados estaba en torno a 200 pacientes. Nuestros resultados, con una mayor potencia estadística, vienen a confirmar el hecho ya señalado que la función de CTLA-4 no es solo transmitir señales inhibitorias sino regular en cierta forma la acción de CD28. Así una menor expresión en membrana de CTLA-4 va a hacer que el acceso de CD28 a sus ligandos sea más efectiva y se activen mejor los linfocitos Treg²²⁷. Se sabe que la proliferación de los Treg es más eficiente cuando CD28 está libre y no se bloquea su expansión por la vía de CTLA-4²³⁸, diversos autores apoyan que al bloquear CTLA-4 mediante anticuerpos, la expansión de Treg es más pronunciada^{239, 240}. Esto, también es

apoyado por el grupo de Paterson que vieron este incremento de la proliferación de Treg cuando generaban deleciones en *CTLA4* y se expresaba menos en la membrana celular²⁴¹. Por eso, este efecto protector que describimos lo vemos en el grupo que recibe tratamiento de inducción con RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff (*Tabla 11*) ya que como bien se conoce el uso de Timoglobulina derivada de conejo tiene un efecto de expansión sobre las células Treg y no sobre el resto de linfocitos T²⁴². Además, estas células T al tener menos CTLA-4 en la superficie se activan por la vía constitutiva de CD28, proliferando y fomentando la protección mediante Treg.

Por otro lado, el SNP rs3087243, también llamado en la literatura CT60, se localiza en +6411 G/A en la región 3' UTR. El genotipo GG de este SNP se ha correlacionado con la secreción de bajos niveles de la forma soluble de CTLA4 (s CTLA-4)^{158, 159}. Esta molécula, tiene la capacidad de unirse con mayor afinidad a CD80 y a CD86 que el CTLA-4 de membrana (m CTLA-4)²⁴³, modulando de esta manera la capacidad de supresión de la forma completa, f CTLA-4^{244, 245}. Además, se expresa de forma constitutiva en las células T no activadas, sin embargo, baja su producción en los linfocitos T activados²⁴³. También, se ha descrito que puede unirse a las moléculas B7 de las APCs evitando así la transducción de la segunda señal por vía de f CTLA-4²¹¹. En relación al trasplante, algunos estudios han descrito que el alelo A confiere riesgo para el rechazo agudo²³⁴, otros asocian el riesgo de rechazo con el alelo G^{211, 246}. En cambio, en un meta-análisis sobre CT60 no encontraron asociación con el rechazo agudo¹⁵².

En nuestra cohorte de pacientes trasplantados, el alelo G de este SNP, rs3087243, parece mostrar un efecto protector en el rechazo celular total y en el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tabla 10*). Además, encontramos el mismo efecto protector en aquellos pacientes que no había recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina (*Tabla 12*). Esto nos indica que el efecto genético del alelo G recae

principalmente sobre las células T, ya que en aquellos pacientes a los que se les administró tratamiento de inducción no vemos el efecto protector. Esto puede deberse, según lo que dice el grupo de Oaks a que el s CTLA-4 se secreta en principalmente por las células T naïve²⁴⁷, y por lo tanto, al tener expandidas y diferenciadas las Treg en mayor medida, no lo vemos. Es decir, las células Treg, ya han sufrido el proceso de activación y por lo cual van a producir menos s CTLA-4 dejando más funcional el r CTLA-4 de sus membranas, lo que no nos permite valorar en estos pacientes que han recibido tratamiento de inducción el SNP regulador de s CTLA-4 (rs3087243), no viéndose ninguna significación. Sin embargo, el efecto que causa rs3087243 en los pacientes que no han recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina puede ser visible, ya que según lo que dice el grupo de Saverino *et al.*²⁴⁸, s CTLA-4 puede estar favoreciendo bloqueos de la activación mediante la interrupción de CD28 en las etapas tempranas del proceso pero posteriormente puede estar interfiriendo en la inhibición de la respuesta mediante el bloqueo de la vía de r CTLA-4, ya que se ha encontrado altos niveles de s CTLA-4 en pacientes con enfermedades autoinmunes respecto a controles sanos, lo que le indica a Saverino *et al.* que niveles elevados de s CTLA-4 pueden estar impidiendo la homeostasis y fomentando la inflamación²⁴⁸. Así, este efecto protector puede ser explicado por dos hechos que se producen en los pacientes trasplantados que no han recibido tratamiento de inducción. Por un lado, al ser portadores del alelo G de rs3087243 se genera una menor expresión de s CTLA-4^{158, 159} por lo que no va a impedir el bloqueo de la vía desactivadora de r CTLA-4 en células T activas (tanto Th como Tc). Por otro lado, en el trasplante la mayoría de los linfocitos T de los pacientes se encuentran en constante activación y como hemos dicho, en las células T activadas se produce menos s CTLA-4²⁴³. Estos dos fenómenos hacen que la forma soluble de CTLA-4 se una menos a sus ligandos CD80 y CD86, con lo que r CTLA-4 puede unirse

libremente a ellos y retirarlos de la superficie de las APCs mediante transendocitosis por parte de las Treg^{157, 227}. Además, de permitir la desactivación intrínseca de las células T efectoras (Th y Tc) por la vía de \uparrow CTLA-4. Optimizando así la reducción de la activación celular generando un efecto protector en el paciente.

También, hemos estudiado la asociación de los haplotipos formados por estos dos SNPs, rs231775 y rs3087243. En los trabajos publicados hay de nuevo controversia, en algunos se asocia al haplotipo A/A como factor de riesgo para el rechazo agudo²³⁴ y en cambio otros apuntan al haplotipo G/G como factor de riesgo²¹¹. Por otro lado, Cassoni *et al.* plantea que el haplotipo A/G es protector²³⁴ mientras que el haplotipo A/A protege según el grupo de Misra²¹¹. El grupo de Cassoni *et al.* y Misra *et al.* analizaron un total de 68 y 190 pacientes respectivamente y se caracterizan por haber recibido tratamiento de inducción, pero no estratifican por tipos de rechazo. En nuestro trabajo observamos una tendencia a la asociación de carácter protector en el grupo de pacientes que recibieron tratamiento de inducción con el haplotipo G/G para el RAC de Grado <2 según la clasificación de Banff (*Tabla 13*), en contraste de lo que dicen Cassoni *et al.* y Misra *et al.* Esta asociación en realidad parece ser debida al efecto protector del alelo G del SNP rs231775, el cual sólo puede ir acompañado del alelo G de rs3087243 por desequilibrio de ligamiento.

Por último, al realizar el estudio mediante análisis multivariable, se comprueba que el SNP rs3087343 se comporta como factor independiente para el rechazo celular. De tal manera, que los portadores del alelo G presentan protección frente al RAC de forma global y específicamente en los pacientes que pueden sufrir un RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tablas 14 y 15*). Estas asociaciones se observan también en los receptores que no reciben tratamiento de inducción (*Tablas 14 y 15*). Estos hallazgos, en

definitiva, vienen a apoyar lo que anteriormente se ha comentado respecto al SNP rs3087343 de *CTLA4*.

3. Papel de polimorfismos localizados en citocinas y receptores que participan en la tercera señal de activación de linfocitos

Las citocinas, también conocidas como linfocinas o interleucinas, son proteínas de bajo peso molecular glicosiladas que actúan como eje central de la comunicación entre las células del sistema inmunitario y otros tejidos⁴¹. La síntesis de estas citocinas tienen diversos fines una vez secretadas al medio extracelular; así, participan en procesos de inmunidad e inflamación (crecimiento, proliferación y diferenciación celular) o regulando la amplitud y la duración de las respuestas^{41, 249}. La acción de estas proteínas es muy potente, son secretadas a razón de picogramos, pero a pesar de estas bajas concentraciones tienen la capacidad de unirse a sus receptores y alterar el patrón en la expresión del material genético. Esto implica cambios de regulación en el sistema inmunitario y en la homeostasis, modificando comportamientos celulares subyacentes a esos cambios^{41, 249, 250}. Las citocinas interactúan en una red extremadamente compleja, de manera que, una o varias de ellas inducen a otra u otras, también pueden modular la expresión de sus receptores, así como interactuar de forma sinérgica, aditiva o antagónica sobre la misma célula^{41, 249, 250}. Lo que hace complejo su estudio e investigación.

En este estudio nos propusimos analizar la repercusión de ciertos polimorfismos genéticos en los genes que codifican estas citocinas en los pacientes trasplantados por sus implicaciones en la tercera señal de activación en los linfocitos y otras células inmunitarias. El trasplante es un fenómeno que implica una fuerte agresión al sistema inmunitario y a la homeostasis. Este hecho genera una liberación de muchas citocinas que influyen de forma directa e indirecta en el rechazo/tolerancia del órgano, que va a

condicionar a corto y largo plazo la supervivencia del injerto. Las citocinas que estudiamos fueron IL-6, IL-21, IL-17A, IL-12B y el receptor de IL-23.

3.1. IL-6

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que tiene efectos pleiotrópicos tanto locales como sistémicos¹⁶¹. Induce la proliferación de neutrófilos, la secreción de anticuerpos y la diferenciación a linfocitos Th17⁶. En este trabajo estudiamos el polimorfismo rs1800795, este SNP se encuentra localizado a -174 G/C en la región promotora de *IL6*. Se ha visto que la transición del alelo G al C provoca una reducción de los niveles de mRNA y con ello una bajada de la producción de IL-6 *in vivo*^{164, 165}. Así, siendo el genotipo GG un potenciador de la expresión de IL-6^{164, 251}, podría incrementar la inflamación devenida del proceso del trasplante, generando un posible rechazo inmunológico²⁵². Sin embargo, al realizar los estudios de asociación no vimos ningún resultado concluyente (*Tablas 16, 17 y 18*). En nuestra cohorte de pacientes caucásicos no encontramos asociaciones significativas entre rs1800795 y el rechazo al igual que varios estudios realizados por diversos autores^{165, 253-258}. En contra, Karimi *et al.*²⁵¹ afirman que en su cohorte iraní el genotipo GG se asocia con tener tres veces más riesgo de rechazo agudo. Esto puede ser debido al número de pacientes analizado, este grupo contó con 100 pacientes trasplantados iraníes. Al contar con una cohorte caucásica mucho más extensa, nos permitió tener mayor potencia estadística y validar los trabajos realizados anteriormente que describen lo mismo que nosotros encontramos.

3.2. IL-21

La IL-21 es una interleucina pro-inflamatoria producida por los linfocitos T activados, especialmente Th2, Th17 y células Th foliculares (Tfh). Sus efectos son pleiotrópicos tanto en la respuesta innata como adaptativa¹⁶⁶. Esta citocina ejerce su función sobre las

células linfocitarias generalmente activándolas y de forma dual sobre las células de la protección innata. Así, mientras que a los macrófagos los activa, a las células dendríticas (las mejores células presentadoras de antígenos), las inhibe^{166, 259, 260}. Por otro lado, es importante destacar que la secreción de esta citocina por parte de las células Tfh, estimula la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas en los centros germinales y facilita el cambio de isotipo a IgG^{78, 79}. De esta manera, en el trasplante puede facilitar un RMA por la producción de anticuerpos derivada del estímulo de IL-21^{78, 79}. Nos propusimos analizar dos SNPs en el gen de esta citocina. El primero, rs2055979, se localiza a +1472 G/T en una región intrónica. El otro SNP, rs4833837 G/A se localiza en el exón 3, este genera un cambio sinónimo de una cisteína¹⁶⁸ que puede estar afectando a la estabilidad del mRNA, alterando su expresión¹⁷⁰.

En nuestro estudio de asociación entre el SNP rs2055979 y el rechazo en pacientes trasplantados renales no encontramos ninguna asociación significativa. De la misma forma que Karimi *et al.* y Hejr *et al.* en sus estudios realizados en pacientes trasplantados^{168, 261}. Sin embargo, con el otro SNP estudiado, rs40833837, sí encontramos asociaciones con el rechazo (*Tablas 16, 17 y 18*), en contra de lo que afirman en sus estudios los grupos de Karimi y Hejr^{168, 261}. Esto, posiblemente, sea debido a la potencia estadística que poseemos al contar con una cohorte mucho mayor de pacientes trasplantados, ya que ellos analizan 250 y 200 pacientes, respectivamente.

La variante polimórfica rs40833837 ha sido descrita como un potencial modificador de la expresión génica. Así, Chatterjee *et al.*¹⁷⁰ usando un programa de análisis de estabilidad de mRNA *in silico* comprobó que el alelo A era más inestable debido a la formación de estructuras secundarias del mRNA, como ya se había visto en otros genes con cambios sinónimos en sus codones^{262, 263}. Por lo tanto, el alelo G provoca una

mayor estabilidad del material genético y con ello una mayor producción de IL-21. Este fenómeno nos ayuda a comprender los datos que hemos obtenido en nuestro estudio de asociación. Ciertamente, al analizar los pacientes que tenían RAC de Grado <2 según los criterios de la clasificación de Banff encontramos una asociación de carácter protector tanto en los pacientes analizados de forma global como en aquellos que habían recibido tratamiento de inducción (*Tablas 16 y 17*). Esto se podría explicar por el efecto de la sobreproducción de IL-21 sobre las células dendríticas. Ya que como se ha comentado con anterioridad, IL-21 produce una inhibición de la activación de las células dendríticas. De tal forma, que pierden sus capacidades de APCs de alta eficiencia. Ya que se ha descrito que reducen en gran medida la capacidad presentadora mediante la inhibición del HLA de clase II en la superficie, además reducen las moléculas co-estimuladoras por excelencia CD80 y CD86²⁵⁹. También se ha descrito que provoca la retención de los antígenos en el interior de las células dendríticas evitando su presentación y la caída de secreción de citocinas pro-inflamatorias²⁵⁹. Estos factores hacen presagiar que el poder protector visto en los pacientes que han sufrido un RAC leve y han recibido tratamiento de inducción, es debido al efecto de la IL-21, más la suma de la depleción de los linfocitos T por parte de la Timoglobulina (*Tablas 16, 17 y 18*). Cabe explicar, que no se puede apreciar esta asociación protectora en los RAC de mayor gravedad ya que cuando el sistema se desborda y sufre un rechazo de mayor magnitud, los linfocitos presentes en el sistema inmunitario tienen una capacidad de respuesta mucho más eficiente y severa¹⁹. Estos linfocitos y otras células inmunitarias generan un remanente de citocinas, como IL-15 y IL-2, que probablemente anulan las capacidades de IL-21 sobre las dendríticas^{78, 259, 264}.

La otra asociación que hemos descrito se da entre el SNP rs40833837 y el RMA, en este caso el alelo G, implicado en una mayor producción de IL-21, confiere riesgo para este

tipo de rechazo. Esto puede ser debido, básicamente, al fenómeno de producción de anticuerpos IgG estables frente a antígenos no propios que se da a nivel de los centros germinales en los ganglios^{19, 49-51}. En este paso se necesita la coordinación entre las células Tfh y los linfocitos B, para ello IL-21 tiene un papel decisivo en ambas células¹⁹. Por un lado, la IL-21 aumenta la proliferación, la diferenciación y la actividad de la función de los Tfh en los centros germinales lo cual va a aumentar de forma directa la activación y cambio de isotipo en los linfocitos B^{166, 265, 266}. Al mismo tiempo, en las células B, IL-21 genera una mayor expresión del BCR, facilita la expresión de CD40, aumenta la diferenciación a células plasmáticas y lo más interesante al nivel que nos ocupa, IL-21 genera una mayor producción antigénica enfocada al isotipo IgG^{166, 265, 266}. Se ha demostrado en estudios anteriores que bloqueos del gen de *IL21R*, el gen del receptor de IL-21, mediante tecnología genética *knock-out* generaba una caída de los valores de IgG²⁶⁰, por lo que, en pacientes con una genética normal, el SNP rs40833837 G de mayor producción de IL-21¹⁷⁰ puede generar una mayor secreción de IgG reactiva al injerto y con ello un aumento de los RMA en los pacientes. Nosotros, en nuestro estudio, apreciamos una tendencia de asociación de riesgo entre el alelo G del SNP y el RMA en los pacientes analizados de forma global pero no se ve esa asociación en los que habían recibido tratamiento de inducción (*Tablas 16 y 17*). Esto es debido a que según lo que anteriormente se ha comentado, el riesgo se manifiesta en aquellos pacientes que poseen el alelo G y presentan células Tfh para responder al rechazo y no en los pacientes que tienen deplecionada la línea celular de los linfocitos T. En cambio, encontramos una asociación clara en los que no habían recibido esa pauta terapéutica, lo que explica por qué en la cohorte global solo vemos una tendencia (*Tablas 16 y 18*).

Por último, estudiamos las asociaciones entre los haplotipos formados por los polimorfismos rs2055979-rs4833837 y los distintos rechazos inmunológicos

(Tabla 19). Observamos los mismos patrones de asociación que presentaba en SNP rs4833837, y esto era así porque los haplotipos que daban susceptibilidad para el riesgo o la protección en el SNP rs4833837, asociados con el alelo G, siempre se heredan por desequilibrio de ligamiento con el alelo G del SNP rs2055979, y no genera ninguna otra posibilidad de herencia.

3.3. IL-17A

La IL-17A es una citocina que actúa como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa¹⁷¹ cuya principal misión es fomentar un estado pro-inflamatorio en el sistema inmunitario^{76, 174}. Es secretada principalmente por las células Th17, aunque también puede ser sintetizada por otras células del sistema inmunitario, como células NK, neutrófilos, macrófagos y células dendritas^{75, 76, 171}.

Se estudió el SNP de *IL17A*, rs2275913 A/G, el cual se sitúa en la región promotora del gen *IL17A* en la posición -197. Al analizar los resultados para el rechazo no pudimos encontrar ninguna asociación en nuestra amplia cohorte de pacientes trasplantados (Tablas 16, 17 y 18). Esta variante había sido descrita asociada a cambios en la expresión de IL-17A, concretamente el alelo A^{80, 267}, por lo cual el grupo de Romanowski *et al.* la había estudiado encontrado una asociación con el RA⁸⁰. Sin embargo, en estudios posteriores Haouami *et al.*⁸¹ no encontraron ninguna asociación significativa entre el rechazo y este SNP. Ambos grupos contaban con cohortes de estudio más discretas en cuanto al número de individuos que nosotros, de esta manera a la vista de nuestros resultados podemos suponer que este SNP no presenta una clara asociación con el rechazo inmunológico, a pesar de que pueda aumentar los niveles de IL-17A.

3.4. IL-12B

IL-12 es una citocina pro-inflamatoria secretada por las células de la inmunidad innata, macrófagos y células dendríticas, que activa a las células T y NK¹⁷⁸. Su misión es generar la diferenciación celular de Th0 a Th1 mediante la tercera señal, bloqueando a su vez la diferenciación de las células Th2 y además generar un incremento de interferón- γ en las células secretoras de este¹¹. Estos fenómenos tienen como objetivo potenciar las vías dependientes de eliminación de patógenos intracelulares¹⁷⁹.

En este trabajo estudiamos el SNP rs3212227, el cual se sitúa en la región 3' UTR del gen *IL12B* que codifica para la subunidad IL-12p40. Se encuentra a +1188 T/G y se sabe que el cambio de T por G genera una disminución de la producción de esta citocina¹⁸². Se ha visto que reduce la estabilidad de los mRNA en células transfectadas y la producción de IL-12 en células mononucleadas de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cell*)¹⁸¹. Al realizar el análisis de este SNP en nuestra cohorte total de pacientes trasplantados, encontramos en el modelo dominante una asociación de riesgo con el RAC total y una tendencia a la asociación para el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tabla 16*). Estos resultados pueden ser debidos al que el alelo G del SNP rs3212227 producía una reducción de los niveles de IL-12 y con ello una caída de los niveles de INF- γ asociados a la respuesta de IL-12. *A priori*, podemos pensar que este puede ser beneficioso para el trasplante, pero a la vista de nuestros resultados suponemos que hay que tener en cuenta el papel de las vías *downstream* que derivan de IL-12, concretamente en la vía del INF- γ . Se ha evidenciado que caídas en la producción de INF- γ provocaban aumentos en la diferenciación de células Th17 con incrementos en la síntesis de sus respectivas citocinas^{64, 268-270}. Además, es conocido que se necesita el INF- γ para mantener y desarrollar el remanente de células Treg^{271, 272}. Estos fenómenos nos hacen pensar, que una caída de la IL-12

provocaría un efecto cadena en sus citocinas derivadas que modularían la respuesta inmunitaria hacia las células Th17 y hacía la caída de las células reguladoras de la tolerancia (Treg)^{268, 270-272} lo que potenciaría un efecto pro-inflamatorio sistémico en el trasplante.

3.5. IL-23R

IL-23 es una citocina importante en la respuesta inmunitaria producida por macrófagos y células dendríticas que tiene un efecto activador de la diferenciación hacia las células Th17^{81, 183}. Como ya hemos mencionado con anterioridad, estas células Th17 tienen la capacidad de producir IL-21⁷⁷, lo cual es necesario para la generación de linfocitos foliculares y el desarrollo de anticuerpos mediante la estimulación de los linfocitos B en los centros germinales^{74, 78, 79}. Por eso, se estudió el efecto de algunas variantes polimórficas de su receptor (IL-23R) en trasplante. Así, estudiamos rs10889677, que se encuentra a +2199 A/C en la región 3'UTR del gen *IL23R*^{184, 185}. También investigamos otros dos polimorfismos de este gen, rs12070470 C/T y rs7528924 A/G, que se encuentran en el intrón 7 de *IL23R*¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

La variante polimórfica rs10889677 ha sido descrita por varios autores como un modificador de la expresión génica^{184, 185, 187, 273}. Al estar localizada en la región 3' UTR afecta a la estabilidad del transcrito genético. Ya que, en esta región pueden interactuar diversos factores reguladores que condicionan de forma directa la expresión de la molécula. En este caso, rs10889677 es clave para la unión del microRNA, *let-7f*^{184, 185, 187, 273}. Un microRNA es una pequeña molécula de RNA endógena, de cadena sencilla y no codificante, que actúa post-transcripcionalmente regulando la traducción proteica, generalmente inhibiéndola^{274, 275}. Se ha descrito que el alelo C de la variante polimórfica

rs10889677 tienen una mayor capacidad de unión al microRNA *let-7f*, lo que desemboca en una mayor desestabilización del mRNA de *IL23R* y con ello una menor expresión del receptor en la superficie^{184, 185, 187, 273}. Y de forma contraria, el alelo A al tener menor afinidad molecular permite una mayor expresión del gen. En nuestro estudio observamos que el genotipo AA de este polimorfismo tenía una clara asociación de riesgo con aquellos pacientes que habían sufrido RAC y una tendencia a la asociación en aquellos que habían sufrido un RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tabla 16*). Esto puede ser debido al microRNA, como antes se ha mencionado. Ya que como se ha visto el alelo A genera una mejor y más eficiente expresión del receptor en superficie^{184, 185, 187, 273}, esto permite desembocar en un mejor mantenimiento de la respuesta Th17. En éstas células la citocina IL-23 es la encargada de mantener y expandir las células estabilizando el factor de diferenciación *ROR γ T*¹⁷²; además, tiene la capacidad de potenciar la respuesta celular mediante la producción de INF- γ en las NK²⁷⁶⁻²⁷⁸. Estas dos vías son fundamentales para el rechazo mediado por células pues van a mantener el estado de inflamación lesiva y a su vez van a fomentar la destrucción del injerto¹⁹. También se sabe la capacidad que tiene IL-23 de mantener un estado de inflamación constante y de potenciar la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ de memoria, que dependen de la vía de secreción del INF- γ y que correlaciona de forma directa con el receptor de IL-23²⁷⁹⁻²⁸¹. Esto podría explicar la tendencia observada en el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff, ya que en el rechazo de mayor gravedad se han consolidado los mecanismos propios de la inmunidad frente al injerto, generando células T de memoria y con ello un estado de agresión constante¹⁹. Posiblemente no veamos datos significativos en las *Tablas 17 y 18* debido a la pérdida de poder estadístico al estratificar a los pacientes por su tratamiento. Esta asociación ha sido

descrita por el grupo de Ciliaio *et al.* y el de Karimi *et al.* que observaron en sus cohortes la asociación del SNP con el rechazo^{168, 187}.

Por otro lado, también estudiamos los SNPs rs12070470 y rs7528924. Estos SNPs no han sido estudiados por otros autores en referencia al trasplante. Nosotros nos propusimos investigar su asociación con el rechazo inmunológico en los pacientes trasplantados renales y observamos que ambos presentan un carácter protector tanto en los pacientes analizados de forma global, como en aquellos que fueron estratificados por no haber recibido tratamiento de inducción (*Tablas 16 y 18*). Esto nos indica que las asociaciones y tendencias que vemos se deben a efectos genéticos derivados de los SNPs estudiados. En los portadores del alelo C del SNP rs12070470 encontramos una asociación protectora en el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff de todos los pacientes y de aquellos que no recibieron tratamiento de inducción (*Tablas 16 y 18*). Del mismo modo en los portadores del alelo G del SNP rs7528924 presenta una asociación protectora para RAC total en los grupos mencionados anteriormente, así como en el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff y en el RMA en los pacientes que no habían recibido tratamiento de inducción (*Tablas 16 y 18*). Los datos podrían indicar que estos SNPs localizados en regiones intrónicas profundas^{189, 190} podrían estar afectando de alguna manera a la expresión de la molécula, de tal forma, que se expresara menos en la superficie. Esto explicaría que en los rechazos celulares una disminución de este receptor en las células que median este rechazo las impidiera activarse y mantener su actividad como anteriormente se ha citado. Por este principio, vemos que tenemos protección de los SNPs en los pacientes sin tratamiento de inducción y este desaparece en aquellos que han sufrido depleción celular, evitándonos ver el efecto protector. En el caso de la asociación protectora del alelo G del SNP rs7528924 para el RMA en los pacientes que no han recibido tratamiento de inducción,

puede ser debido por lo que anteriormente se comentó, es decir, que al manifestar posiblemente menos IL-23R en la superficie de las células Th17, éstas tienen menos capacidad de activación y con ello menos capacidad de producción de IL-21. Esto reduciría el cambio de isotipo y la producción de IgG^{166, 265, 266}, lo que protegería frente al RMA.

Por último, se analizaron los haplotipos formados por los polimorfismos rs10889677 A/C, rs12070470 C/T y rs7528924 A/G (*Tabla 20*). Se observó en los receptores totales, los cuales eran portadores del haplotipo C/C/G, una asociación de carácter protector para los RAC total y el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff. Posiblemente este venga marcado por los alelos C y G de los SNPs rs12070470 y rs7528924, respectivamente. Además de la ausencia del alelo A del rs10889677 que daba riesgo de padecer RAC de Grado ≥ 2 . Lo mismo evidenciamos en aquello paciente que no habían recibido tratamiento de inducción. Lo que nos indica que aquellos portadores de este haplotipo tendrán menor riesgo de desarrollar un RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff a pesar de no haber recibido tratamiento de inducción.

3.6. Análisis multivariable de los SNPs

Al realizar el estudio de los distintos SNPs de las citocinas mediante análisis multivariable, se comprueba que varios SNPs se comportan como factores independientes para el rechazo celular. De tal manera, que los portadores del alelo G de rs3212227 de *IL12B* presentan un mayor riesgo frente al RAC de forma global y específicamente en los pacientes que no reciben tratamiento de inducción (*Tabla 21*). También, los portadores del genotipo AA de rs10889677 del gen *IL23R* poseen un mayor riesgo de padecer RAC de forma global (*Tabla 21*). Mientras, que se observa que

los portadores del alelo C de rs12070470 del gen de *IL23R* se encontraban protegidos de padecer un RAC (*Tabla 21*). También el SNP rs7528924 de *IL23R* se presenta como factor independiente de protección frente al RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff (*Tabla 22*). Estos datos dan mayor peso a lo anteriormente comentado respecto a los SNPs de las citocinas estudiadas.

4. Efecto de SNPs previamente asociados con rechazo en trasplante renal

En el año 2017 un estudio GWAS identificó dos polimorfismos localizados en los genes *PTPRO* y *DEUPI (CCDC67)* asociados con RAC en pacientes trasplantados renales¹²⁵. Este grupo, se concentró en una cohorte de pacientes europeos caucásicos con bajo riesgo inmunológico descartando aquellos pacientes que tuvieran más de un trasplante renal y que presentasen anticuerpos anti-HLA¹²⁵. Nosotros nos propusimos replicar este estudio en nuestra población caucásica española aplicando nuestros criterios de selección.

4.1. PTPRO

El primer SNP, rs7976329 T/C de *PTPRO*, se encuentra en el primer intrón del gen y se asocia a un incremento del riesgo de RAC¹²⁵. Este gen expresa en la membrana plasmática un receptor con dominios fosfatasa¹⁹¹ que puede presentar dos isoformas que se regulan por splicing alternativo: la isoforma completa (*PTPRO_f*) se encuentra en los podocitos renales, mientras que la truncada (*PTPRO_t*) se localiza en los linfocitos B naïve^{125, 192} y otras células inflamatorias innatas, como los macrófagos^{193, 282}. La forma truncada regula la transducción de señales mediante la desfosforilación de las tirosinas modulando la respuesta celular mediada por las proteínas tirosina cinasa, como SYK, Lyn y ZAP-70^{125, 194, 283}; además puede participar en las vías de NFκB^{193, 195}. En nuestra cohorte de pacientes pudimos observar una asociación de riesgo asociado a aquellos pacientes que presentan un RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff, tanto en el análisis de los pacientes totales como en aquellos que han sido estratificados por recibir o no tratamiento de inducción con Timoglobulina. Si bien es cierto, en aquellos que han

recibido el tratamiento observamos una tendencia de asociación indicativa de riesgo aumentado (*Tabla 24*). Esto se podría explicar mediante el análisis de la forma PTPRO_t, que se encuentra en linfocitos B y macrófagos^{125, 192, 193, 195}. Los macrófagos están gobernados por varias señales metabólicas que regulan su activación y su función en el trasplante^{284, 285}; una de estas vías pro-inflamatorias está regulada por PTPRO_t, la cual genera un *feed-back* con el factor inflamatorio de transcripción NFκB que los mantiene activos provocando sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias activadoras de la vía celular de los linfocitos Th1, tales como TNF-α, IL-1 y IL-6^{193, 282}. De esta manera, el alelo C del SNP rs7976329 podría provocar un aumento de la expresión del receptor PTPRO_t, ya que en la forma truncada este SNP queda en la región 5' reguladora del transcrito^{192, 286}. Esto generaría una mayor inflamación en las primeras etapas del proceso lo cual conduciría a un mayor riesgo de rechazo celular, que en este caso, se debería fundamentalmente a los macrófagos responsable de un rechazo celular más leve, al no estar implicados los Linfocitos T¹⁹ (*Tablas 23, 24 y 25*). Por otro lado, aunque PTPRO_t está presente en los linfocitos B no vemos una esperable asociación con el RMA debido a que este receptor mantiene las células B en quiescencia^{192, 194, 283, 287}. Se ha documentado que en los linfocitos B naïve inactivos o en quiescencia, presentan altos valores de esta proteína mientras que los linfocitos B de memoria y los de los centros germinales la expresión de PTPRO_t es prácticamente inexistente^{192, 287}. Por lo tanto, según los datos recogidos, se avalaría nuestra teoría de que el SNP aumenta la expresión del receptor PTPRO_t favoreciendo la no aparición del RMA. Ya que PTPRO_t ayuda a la desactivación de las señales de transducción del BCR dependientes de SYK cortando su ruta metabólica, lo que implica una caída de la activación y proliferación de los linfocitos B naïve^{192, 194, 283}. En definitiva, tanto el estudio de Ghisdal *et al.*¹²⁵ como el nuestro confirman la asociación de este polimorfismo del gen *PTPRO* con el riesgo

de rechazo, concretamente con el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff. Este aumento del riesgo lo observamos también en los pacientes que han recibido tratamiento de inducción con Timoglobulina ya que nuestra hipótesis es que el rechazo es debido a los macrófagos y estas células no se ven influenciadas por el fármaco.

4.2. DEUP1

El otro SNP asociado con rechazo, rs10765602 G/T se encuentra *up-stream* del inicio del gen *DEUP1* (*CCDC67*), que está involucrado en la generación de microtúbulos derivados del centriolo^{125, 196, 197}. Además, se ha descrito como necesario para la generación de la sinapsis inmune en linfocitos T citotóxicos^{33, 34}, la secreción de proteínas citolesivas en los CD8⁺²⁸⁸ y la correcta polaridad celular, con un adecuado posicionamiento en la membrana plasmática de las moléculas asociadas al sistema inmunitario²⁸⁹. En nuestro estudio pudimos ver como en los portadores del alelo G de este SNP del gen *DEUP1* presentaban una significativa asociación de riesgo para el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff en aquellos pacientes que no habían sido tratados con Timoglobulina (*Tabla 25*). Esto nos condujo a pensar que dicho SNP podría influenciar en la sinapsis inmunológica, de tal forma, que al estar en posición *up-stream* del ATG del gen podría estar participando como un centro de intensificación (*enhancer*) de la producción y estabilización de microtúbulos. Si bien esto no está descrito, si está demostrada la participación del gen en la formación microtubular^{33, 34, 196, 197}, nosotros creemos que cuanto mejor sea la polarización del linfocito hacia la célula del injerto²⁸⁹, y mejor sea la eficiencia de transporte de las citocinas y proteínas citotóxicas por los microtúbulos para su secreción lesiva²⁸⁸ mayor será el riesgo de rechazo celular. Que este hallazgo se produzca en aquellos pacientes con un rechazo de menor levedad no es tan extraño. Nuestra hipótesis es que, al usar principalmente la sinapsis inmunológica, la vía fundamental de actuación son los linfocitos citotóxicos

activados los cuales están presentes en menor concentración en la sangre humana²⁹⁰ y su representación en el rechazo no es tan significativa como la de los linfocitos CD4⁺ según concluye Cobbold²⁹¹. Nuestra teoría, que apoya esta eficiencia celular por parte de los linfocitos CD8⁺ en los pacientes portadores del alelo G para rs10765602, se ve reafirmada al estratificar a los pacientes por el uso o no del tratamiento de inducción (Tabla 24 y 25). Ya que cuando estratificamos a los individuos y comparamos ambos grupos, aquellos que ha recibido el fármaco no presentan riesgo de asociación con el gen. Esto nos indica claramente que el componente genético está actuando sobre las células implicadas en el rechazo y no otros factores exógenos.

4.3. Análisis multivariable de los SNPs

Al realizar el estudio de los dos SNPs de *PTPRO* y *DEU1* mediante análisis multivariable, se comprueba que ambos SNPs se comportan como factores independientes para el rechazo celular. De tal manera, que los portadores del genotipo CC de rs7976329 de *PTPRO* presentan un mayor riesgo frente al RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff en todos los receptores, reciban o no tratamiento de inducción (Tabla 27). También, los portadores del genotipo GG de rs10765602 del gen *DEU1* poseen un mayor riesgo de padecer RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff cuando no reciben tratamiento de inducción con Timoglobulina (Tabla 27). Estos datos dan mayor peso a lo anteriormente comentado respecto a los SNPs de las citocinas estudiadas y confirman los estudios de asociación multivariable que realizó Ghisdal *et al.*¹²⁵. Aunque se debe destacar que en las asociaciones de estos dos genes con el aumento del riesgo de RAC descritas por el grupo de Ghisdal *et al.* no se especificaba el grado de rechazo según la clasificación de Banff^{125, 292}.

5. Efecto de polimorfismos asociados a función renal en enfermedad renal crónica realizado en pacientes con trasplante renal

En nuestra cohorte de pacientes trasplantados caucásicos estudiamos una serie de *loci* según lo descrito en el GWAS realizado por Pattaro *et al.*²⁰². De todos los SNPs que seleccionamos, dos polimorfismos mostraron una asociación significativa con la función renal al valorar eGFR y la ratio P/C en los pacientes.

5.1. UBE2Q2

El primero, rs1394125 está localizado en el gen de la *enzima conjugadora de ubiquitina E2 Q2 (UBE2Q2)*²⁰² en el cromosoma 15q24.2. Este gen, codifica para una proteína de la familia de las enzimas de marcaje para degradación por el proteosoma dependiente de ubiquitina cuya ruta metabólica juega un papel esencial en el control del ciclo celular y la proliferación celular. De hecho, el 80% de las proteínas que se degradan en la célula lo hacen por esta vía por lo que tiene un papel destacado en la regulación de la homeostasis celular^{293, 294}. Se ha descrito la asociación del SNP rs1394125 con la función renal y la enfermedad renal crónica^{202, 295, 296}. Al analizar los pacientes trasplantados de riñón, encontramos este SNP asociado con la eGFR y con la ratio P/C al estudiar el modelo recesivo (homocigotos AA). Estos pacientes, al igual que ocurría en el GWAS, presentaban una tasa de filtración glomerular más baja (eGFR) (*Tabla 28*) y una proteinuria más elevada (ratio P/C) (*Tabla 29*) frente a los pacientes portadores del alelo G. Esto podría explicarse, debido a que el alelo A generase una mayor expresión de la proteína UBE2Q2 lo que conduciría a una mayor degradación de proteínas de forma sistémica que podrían provocar una peor función del injerto. Al igual

que ocurre en el síndrome de desgaste proteico-energético donde un aumento del eje de activación del sistema proteolítico ubiquitina-proteasoma en pacientes con enfermedad renal crónica genera una peor respuesta con mayores tasas de proteinuria y mayor inflamación sistémica^{297, 298}. Y debido a esto, sumado a la inflamación ya existente en este tipo de pacientes trasplantados, creemos que quizás es debida la caída de la filtración medida en los valores de eGFR y un aumento de la proteinuria medida en la ratio P/C.

5.2. UMOD

El otro SNP, rs12917707, se encuentra en el promotor del gen *UMOD*²⁰² en el cromosoma 16p12.3. Este gen codifica para la uromodulina o proteína de Tamm-Horsfall, la proteína más abundante en la orina de individuos sanos²⁹⁹. Es una proteína que se expresa de manera exclusiva en el riñón, concretamente en la región apical del epitelio del túbulo del asa ascendente de Henle y el primer segmento del túbulo distal donde es excretada³⁰⁰; aunque en inflamación también se ha descrito en el intersticio²⁹⁹. En el estudio GWAS, el alelo T de la variante polimórfica rs12917707 del gen *UMOD*, fue asociado con un 20% menos de riesgo de padecer enfermedad renal crónica²⁹⁶. En nuestra cohorte de pacientes trasplantados, encontramos que los homocigotos TT de este SNP se asociaban con una mejor tasa de eGFR (*Tabla 28*) y menor ratio P/C (*Tabla 29*); que es la misma tendencia que encontraron varios trabajos de asociación por GWAS de Köttgen *et al.* para la función renal^{202, 295, 296}. La expresión restringida de la uromodulina en riñón podría hacer pensar que la genética del receptor no tuviese un papel destacado. Creemos que no es así por dos motivos: el primero es que Algharably *et al.* han demostrado que el polimorfismo rs12917707 de *UMOD* analizado en

donantes no tiene papel en la función renal del receptor³⁰¹. En este trabajo se estudiaron 393 pacientes caucásicos trasplantados tratados con ciclosporina, en el que no encontraron asociación con el alelo T de rs12917707 del donante con los niveles de creatinina sérica. Estos datos parecen indicar que otros factores generados fuera del riñón pueden influir en su síntesis, ya que nosotros encontramos asociación del genotipo TT del receptor con la función renal y en cambio Algharably *et al.* no la encuentran con el alelo T del donante. Por otro lado, este efecto podría deberse a que la regeneración celular del tejido epitelial de los túbulos puede ser intrínseca al riñón y/o por células progenitoras provenientes de la médula ósea del receptor³⁰²⁻³⁰⁵. Además, Olden *et al.* describieron en un meta-análisis que los portadores del alelo G de la variante rs12917707 presentaban menores tasas de eGFR y dos veces más niveles de uromodulina en orina que los no portadores³⁰⁶. Este dato ha sido corroborado recientemente en un trabajo en el que estudiaron más de un millón de pacientes con enfermedad renal crónica y en el que observaron que en la región túbulo-intersticial una mayor expresión genética de *UMOD* se asociaba con menor eGFR³⁰⁷. En nuestro estudio parece que el genotipo TT podría tener un efecto beneficioso para el paciente trasplantado en cuanto a la función renal, ya que presentaban mayor tasa de eGFR y menor ratio P/C. Esto podría atribuirse a la regeneración celular por parte de las células de la médula ósea que revisten y proliferan en los túbulos del riñón, que al presentar el alelo T de este SNP presumiblemente producirían menos uromodulina.

6. Figuras resumen de la implicación de los polimorfismos analizados

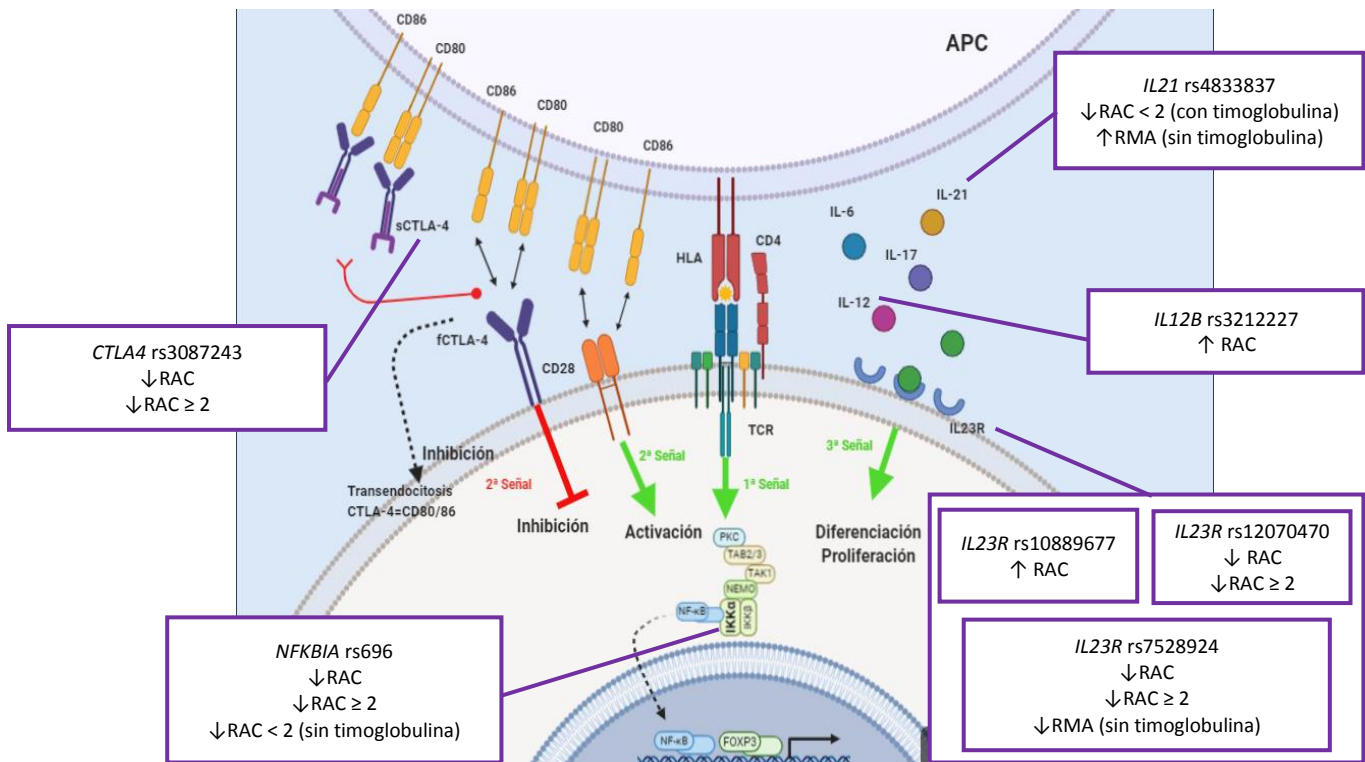


Figura 11: Resumen de los SNPs implicados en la primera, segunda y tercera señal inmunológica y las asociaciones significativas que tienen con el rechazo inmunológico.

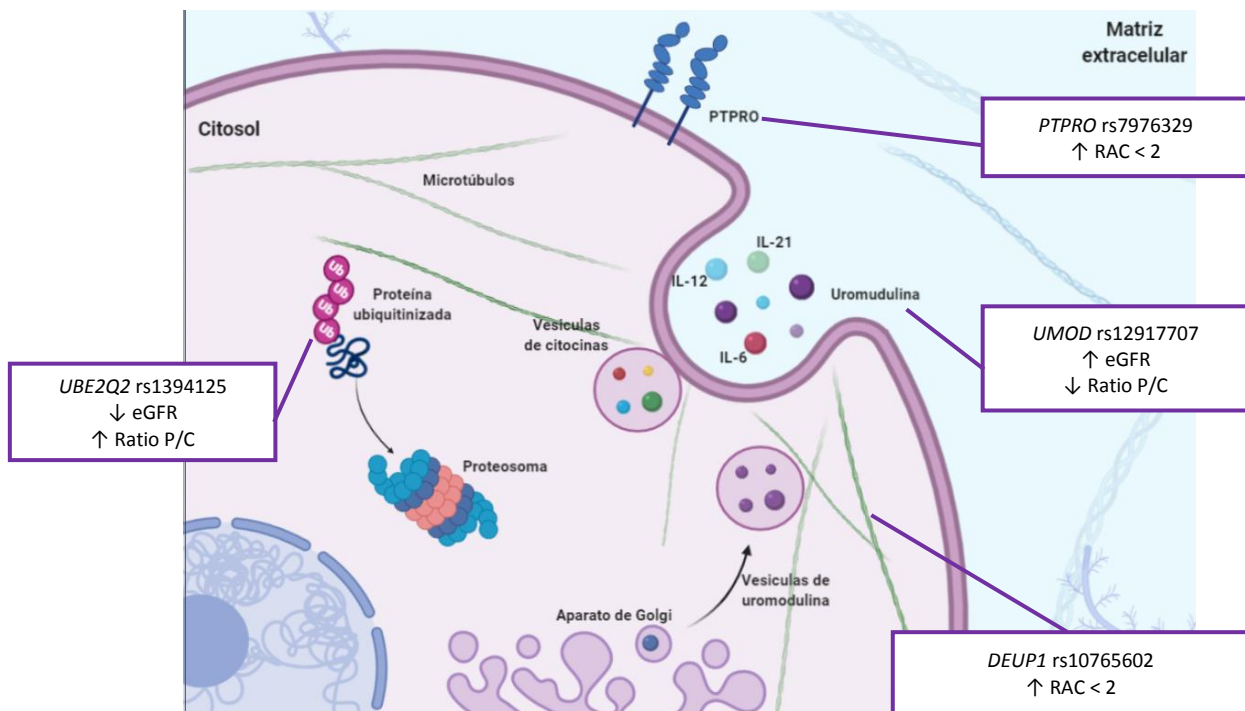


Figura 12: Resumen de los SNPs que hemos replicado y las asociaciones significativas que tienen con el rechazo inmunológico en el caso de PTPRO y DEUP1 o en la función renal en pacientes trasplantados en el caso de UBE2Q2 y UMOD.

Conclusiones

1. Los polimorfismos rs696 del gen *NFKBIA*, rs2232365 de *FOXP3*, rs3087343 y rs231775 de *CTLA4*, rs4833837 de *IL21*, rs3212227 de *IL12B* y rs12070470, rs10889677 y rs7528924 de *IL23R* implicados en la activación de los linfocitos T, están asociados con distintos grados de rechazo inmunológico según la clasificación de Banff, en función de que los pacientes hayan recibido o no tratamiento de inducción con Timoglobulina.
2. Se confirma en nuestra cohorte de pacientes caucásicos españoles con trasplante renal, que los SNPs, rs7976329 de *PTPRO* y rs10765602 de *DEUP1* estudiados por el grupo de Ghisdal et al, están asociados con el rechazo inmunológico en concreto en aquellos pacientes que presentan rechazos celulares de Grado <2 en la clasificación de Banff independientemente del tratamiento de inducción con Timoglobulina.
3. Los SNPs rs696 de *NFKBIA*, rs3087343 de *CTLA4*, rs3212227 de *IL12B*, rs12070470, rs10889677 y rs7528924 de *IL23R* son factores que parecen asociarse independientemente con el RAC total y el RAC de Grado ≥ 2 en la clasificación de Banff. Mientras que el rs7976329 de *PTPRO*, y el rs10765602 de *DEUP1* son factores que se asocian independientemente con el RAC de Grado <2 en la clasificación de Banff.
4. De los *loci* descritos como implicados en función renal en pacientes con enfermedad renal crónica no trasplantados, solo los polimorfismos rs1394125 de *UBE2Q2* y rs12917707 de *UMOD* parecen tener importancia en trasplante. El polimorfismo rs1394125 de *UBE2Q2* se asocia con peor función renal y mayor proteinuria, mientras que el polimorfismo rs12917707 de *UMOD* se relaciona con mejor filtración glomerular y menor proteinuria en los pacientes con trasplante renal.

Referencias

1. Schnuelle, P.; Lorenz, D.; Trede, M., *et al.*, 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* (11), 2135-41.
2. Hariharan, S.; Johnson, C. P.; Bresnahan, B. A., *et al.*, Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *The New England journal of medicine* **2000**, *342* (9), 605-12.
3. McCaughan, J. A.; Courtney, A. E., The clinical course of kidney transplant recipients after 20 years of graft function. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2015**, *15* (3), 734-40.
4. Those 2019 data are based on the Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT) data. <http://www.transplant-observatory.org/>.
5. Memoria anual de 2019 del trasplante renal de la ONT. <http://www.ont.es>.
6. Abbas A, L. A., Pillai S, *Inmunología celular y molecular*. 8Th ed.; Elsevier: Barcelona, **2015**.
7. Alegre, M. L.; Lakkis, F. G.; Morelli, A. E., Antigen Presentation in Transplantation. *Trends Immunol* **2016**, *37* (12), 831-843.
8. Cozzi, E.; Colpo, A.; De Silvestro, G., The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* **2017**, *56* (4), 498-505.
9. Klein, J.; Sato, A., The HLA system. First of two parts. *The New England journal of medicine* **2000**, *343* (10), 702-9.
10. Montgomery, R. A.; Tatapudi, V. S.; Leffell, M. S., *et al.*, HLA in transplantation. *Nature Reviews Nephrology* **2018**, *14* (9), 558-570.
11. Owen J, P. J., Stranford S, Jones P, Ribera Muñoz B, *Kuby inmunología*. 7th ed.; McGraw Hill Interamericana: Mexico, **2014**.
12. Williams, R. C.; Opelz, G.; McGarvey, C. J., *et al.*, The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation* **2016**, *100* (5), 1094-102.
13. Erickson, R. P., Natural history of the major histocompatibility complex. *American Journal of Human Genetics* **1987**, *40* (5), 468-469.
14. Nankivell, B. J.; Alexander, S. I., Rejection of the Kidney Allograft. *The New England journal of medicine* **2010**, *363* (15), 1451-1462.
15. Kosmoliaptsis, V.; Gjorgjimajkoska, O.; Sharples, L. D., *et al.*, Impact of donor mismatches at individual HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ loci on the development of HLA-specific antibodies in patients listed for repeat renal transplantation. *Kidney international* **2014**, *86* (5), 1039-48.

16. Lion, J.; Taflin, C.; Cross, A. R., *et al.*, HLA Class II Antibody Activation of Endothelial Cells Promotes Th17 and Disrupts Regulatory T Lymphocyte Expansion. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2016**, *16* (5), 1408-20.
17. Safinia, N.; Afzali, B.; Atalar, K., *et al.*, T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction. *Kidney international* **2010**, *78*, S2-S12.
18. Bharat, A.; Mohanakumar, T., Allopeptides and the alloimmune response. *Cellular immunology* **2007**, *248* (1), 31-43.
19. Wood, K. J.; Goto, R., Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* **2012**, *93* (1), 1-10.
20. Siu, J. H. Y.; Surendrakumar, V.; Richards, J. A., *et al.*, T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* **2018**, *9* (2548).
21. Sa, H.; Leal, R.; Rosa, M. S., Renal transplant immunology in the last 20 years: A revolution towards graft and patient survival improvement. *International reviews of immunology* **2017**, *36* (3), 182-203.
22. Felix, N. J.; Allen, P. M., Specificity of T-cell alloreactivity. *Nature Reviews Immunology* **2007**, *7*, 942.
23. Susal, C.; Opelz, G., Current role of human leukocyte antigen matching in kidney transplantation. *Current opinion in organ transplantation* **2013**, *18* (4), 438-44.
24. Redondo-Pachon, D.; Perez-Saez, M. J.; Mir, M., *et al.*, Impact of persistent and cleared preformed HLA DSA on kidney transplant outcomes. *Hum Immunol* **2018**, *79* (6), 424-431.
25. Opelz, G.; Wujciak, T.; Dohler, B., *et al.*, HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Reviews in immunogenetics* **1999**, *1* (3), 334-42.
26. Moen, T.; Albrechtsen, D.; Flatmark, A., *et al.*, Importance of HLA-DR matching in cadaveric renal transplantation: a prospective one-center study of 170 transplants. *The New England journal of medicine* **1980**, *303* (15), 850-4.
27. Persijn, G. G.; Cohen, B.; Lansbergen, Q., *et al.*, Effect of HLA-A and HLA-B matching on survival of grafts and recipients after renal transplantation. *The New England journal of medicine* **1982**, *307* (15), 905-8.
28. Held, P. J.; Kahan, B. D.; Hunsicker, L. G., *et al.*, The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants. *The New England journal of medicine* **1994**, *331* (12), 765-70.
29. Davis, S.; Cooper, J. E., Acute antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* **2017**, *31* (1), 47-54.
30. Valdes, R. H.; Sonora, M., Nonimmunologic factors in the progression of chronic dysfunction in renal allografts. *Transplantation proceedings* **1999**, *31* (7), 2967-9.

31. Bia, M. J., Nonimmunologic causes of late renal graft loss. *Kidney international* **1995**, 47 (5), 1470-80.
32. Becker, L. E.; Morath, C.; Suesal, C., Immune mechanisms of acute and chronic rejection. *Clin Biochem* **2016**, 49 (4-5), 320-3.
33. Finetti, F.; Paccani, S. R.; Rosenbaum, J., *et al.*, Intraflagellar transport: a new player at the immune synapse. *Trends in Immunology* **2011**, 32 (4), 139-145.
34. de la Roche, M.; Ritter, A. T.; Angus, K. L., *et al.*, Hedgehog Signaling Controls T Cell Killing at the Immunological Synapse. *Science (New York, N.Y.)* **2013**, 342 (6163), 1247-1250.
35. Cemerski, S.; Shaw, A., Immune synapses in T-cell activation. *Current opinion in immunology* **2006**, 18 (3), 298-304.
36. Abbas, A. K.; Murphy, K. M.; Sher, A., Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **1996**, 383 (6603), 787-93.
37. Gao, J. W.; Guo, Y. F.; Fan, Y., *et al.*, Polymorphisms in cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 influence the rate of acute rejection after renal transplantation in 167 Chinese recipients. *Transplant immunology* **2012**, 26 (4), 207-11.
38. Ford, M. L., T Cell Cosignaling Molecules in Transplantation. *Immunity* **2016**, 44 (5), 1020-33.
39. Crepeau, R. L.; Ford, M. L., Challenges and opportunities in targeting the CD28/CTLA-4 pathway in transplantation and autoimmunity. *Expert opinion on biological therapy* **2017**, 17 (8), 1001-1012.
40. Liu, K.; Gu, S.; Liu, X., *et al.*, Impact of inducible co-stimulator gene polymorphisms on acute rejection in renal transplant recipients: An updated systematic review and meta-analysis. *Meta Gene* **2017**, 12, 118-124.
41. Pirenne, J.; Pirenne-Noizat, F.; de Groote, D., *et al.*, Cytokines and organ transplantation. A review. *Nuclear medicine and biology* **1994**, 21 (3), 545-55.
42. Crescioli, C., Chemokines and transplant outcome. *Clin Biochem* **2016**, 49 (4-5), 355-62.
43. Magno, A. L.; Herat, L. Y.; Carnagarin, R., *et al.*, Current Knowledge of IL-6 Cytokine Family Members in Acute and Chronic Kidney Disease. *Biomedicines* **2019**, 7 (1), 19.
44. Soysa, R.; Wu, X.; Crispe, I. N., Dendritic cells in hepatitis and liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* **2017**, 23 (11), 1433-1439.
45. Guery, J. C.; Adorini, L., Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **1995**, 154 (2), 536-44.
46. Mirzakhani, M.; Shahbazi, M.; Oliaei, F., *et al.*, Immunological biomarkers of tolerance in human kidney transplantation: An updated literature review. *Journal of cellular physiology* **2019**, 234 (5), 5762-5774.

47. Spahn, J. H.; Li, W.; Kreisel, D., Innate immune cells in transplantation. *Current opinion in organ transplantation* **2014**, *19* (1), 14-19.
48. dos Santos, D. C.; de Andrade, L. G.; de Carvalho, M. F., *et al.*, Mononuclear inflammatory infiltrate and microcirculation injury in acute rejection: role in renal allograft survival. *Renal failure* **2013**, *35* (5), 601-6.
49. Hoffman, W.; Lakkis, F. G.; Chalasani, G., B Cells, Antibodies, and More. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **2016**, *11* (1), 137-54.
50. Clatworthy, M. R., B-cell regulation and its application to transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **2014**, *27* (2), 117-28.
51. Koenig, A.; Mariat, C.; Mousson, C., *et al.*, B Cells and Antibodies in Transplantation. *Transplantation* **2016**, *100* (7), 1460-4.
52. Dunn, T. B.; Noreen, H.; Gillingham, K., *et al.*, Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2011**, *11* (10), 2132-43.
53. Tsai, E. W.; Rianthavorn, P.; Gjertson, D. W., *et al.*, CD20+ lymphocytes in renal allografts are associated with poor graft survival in pediatric patients. *Transplantation* **2006**, *82* (12), 1769-73.
54. Adams, E. J.; Gu, S.; Luoma, A. M., Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. *Cellular immunology* **2015**, *296* (1), 31-40.
55. Chang, J. T.; Wherry, E. J.; Goldrath, A. W., Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nature immunology* **2014**, *15* (12), 1104-15.
56. Park, B. V.; Pan, F., Metabolic regulation of T cell differentiation and function. *Molecular immunology* **2015**, *68* (2 Pt C), 497-506.
57. McCaughan, J.; Xu, Q.; Tinckam, K., Detecting donor-specific antibodies: the importance of sorting the wheat from the chaff. *Hepatobiliary surgery and nutrition* **2019**, *8* (1), 37-52.
58. Nagata, T.; Koide, Y., Induction of Specific CD8 T Cells against Intracellular Bacteria by CD8 T-Cell-Oriented Immunization Approaches. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, *2010*, 764542.
59. Barry, M.; Bleackley, R. C., Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature reviews. Immunology* **2002**, *2* (6), 401-9.
60. Gorski, A.; Nowaczyk, M.; Maldyk, M., *et al.*, Rejection-associated upregulation of the alpha/beta-T cell receptor expression on T cells of renal allograft recipients. *Journal of clinical & laboratory immunology* **1990**, *31* (2), 99-100.
61. Skorecki, K.; Chertow, G. M.; Marsden, P. A., *et al.*, *Brenner y Rector, el riñón*. 10 ed.; Elsevier España: Madrid, **2018**.

62. Lund, F. E.; Garvy, B. A.; Randall, T. D., *et al.*, Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. *Current directions in autoimmunity* **2005**, *8*, 25-54.
63. Vazquez, M. I.; Catalan-Dibene, J.; Zlotnik, A., B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* **2015**, *74* (2), 318-26.
64. Harrington, L. E.; Hatton, R. D.; Mangan, P. R., *et al.*, Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* **2005**, *6* (11), 1123-32.
65. Wadia, P. P.; Tambur, A. R., Yin and yang of cytokine regulation in solid organ graft rejection and tolerance. *Clinics in laboratory medicine* **2008**, *28* (3), 469-79, vii-viii.
66. Liu, Z.; Fan, H.; Jiang, S., CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunological reviews* **2013**, *252* (1), 183-91.
67. Podesta, M. A.; Cucchiari, D.; Ponticelli, C., The diverging roles of dendritic cells in kidney allotransplantation. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* **2015**, *29* (3), 114-20.
68. Mosmann, T. R.; Coffman, R. L., TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* **1989**, *7*, 145-73.
69. D'Elios, M. M.; Josien, R.; Manghetti, M., *et al.*, Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney international* **1997**, *51* (6), 1876-84.
70. Walker, J. A.; McKenzie, A. N. J., TH2 cell development and function. *Nature reviews. Immunology* **2018**, *18* (2), 121-133.
71. Goldman, M.; Le Moine, A.; Braun, M., *et al.*, A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends Immunol* **2001**, *22* (5), 247-51.
72. Nocera, A.; Tagliamacco, A.; De Palma, R., *et al.*, Cytokine mRNA expression in chronically rejected human renal allografts. *Clinical transplantation* **2004**, *18* (5), 564-70.
73. Dallman, M. J., Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Current opinion in immunology* **1995**, *7* (5), 632-638.
74. Chung, B. H.; Yang, C. W.; Cho, M. L., Clinical significance of Th17 cells in kidney transplantation. *The Korean journal of internal medicine* **2018**, *33* (5), 860-866.
75. Turner, J. E.; Paust, H. J.; Steinmetz, O. M., *et al.*, The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney international* **2010**, *77* (12), 1070-5.
76. Cortvrintd, C.; Speeckaert, R.; Moerman, A., *et al.*, The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology* **2017**, *49* (3), 247-258.
77. Stadhouders, R.; Lubberts, E.; Hendriks, R. W., A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *Journal of autoimmunity* **2018**, *87*, 1-15.

78. Spolski, R.; Leonard, W. J., Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, *26* (1), 57-79.
79. Gharibi, T.; Majidi, J.; Kazemi, T., *et al.*, Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology* **2016**, *221* (2), 357-367.
80. Romanowski, M.; Kloda, K.; Osekowska, B., *et al.*, Influence of the IL17A and IL17F gene polymorphisms on the long-term kidney allograft function and return to dialysis after kidney transplantation. *Clinical transplantation* **2015**, *29* (12), 1187-94.
81. Haouami, Y.; Dhaouadi, T.; Sfar, I., *et al.*, The role of IL-23/IL-17 axis in human kidney allograft rejection. *Journal of leukocyte biology* **2018**, *104* (6), 1229-1239.
82. Alessandrini, A.; Turka, L. A., FOXP3-Positive Regulatory T Cells and Kidney Allograft Tolerance. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **2017**, *69* (5), 667-674.
83. Zuber, J.; Grimbert, P.; Blacho, G., *et al.*, Prognostic significance of graft Foxp3 expression in renal transplant recipients: a critical review and attempt to reconcile discrepancies. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2013**, *28* (5), 1100-11.
84. Martin-Moreno, P. L.; Tripathi, S.; Chandraker, A., Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **2018**, *13* (11), 1760-1764.
85. Shaban, E.; Bayliss, G.; Malhotra, D. K., *et al.*, Targeting Regulatory T Cells for Transplant Tolerance: New Insights and Future Perspectives. *Kidney Dis (Basel)* **2018**, *4* (4), 205-213.
86. Lu, L.; Barbi, J.; Pan, F., The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nature reviews. Immunology* **2017**, *17* (11), 703-717.
87. Hu, M.; Wang, Y. M.; Wang, Y., *et al.*, Regulatory T cells in kidney disease and transplantation. *Kidney international* **2016**, *90* (3), 502-14.
88. Gandolfo, M. T.; Jang, H. R.; Bagnasco, S. M., *et al.*, Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney international* **2009**, *76* (7), 717-29.
89. Hanidziar, D.; Koulmanda, M., Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant rejection and tolerance. *Current opinion in organ transplantation* **2010**, *15* (4), 411-415.
90. Liao, T.; Xue, Y.; Zhao, D., *et al.*, In Vivo Attenuation of Antibody-Mediated Acute Renal Allograft Rejection by Ex Vivo TGF-beta-Induced CD4(+)Foxp3(+) Regulatory T Cells. *Front Immunol* **2017**, *8*, 1334.
91. Prosser, A. C.; Kallies, A.; Lucas, M., Tissue-Resident Lymphocytes in Solid Organ Transplantation: Innocent Passengers or the Key to Organ Transplant Survival? *Transplantation* **2018**, *102* (3), 378-386.
92. Dorr, C. R.; Oetting, W. S.; Jacobson, P. A., *et al.*, Genetics of acute rejection after kidney transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **2018**, *31* (3), 263-277.

- 93.** Goldberg, R. J.; Weng, F. L.; Kandula, P., Acute and Chronic Allograft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. *The Medical clinics of North America* **2016**, *100* (3), 487-503.
- 94.** Brocker, V.; Mengel, M., Histopathological diagnosis of acute and chronic rejection in pediatric kidney transplantation. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **2014**, *29* (10), 1939-49.
- 95.** Roufosse, C.; Simmonds, N.; Clahsen-van Groningen, M., *et al.*, A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* **2018**, *102* (11), 1795-1814.
- 96.** Loupy, A.; Lefaucheur, C., Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *The New England journal of medicine* **2018**, *379* (12), 1150-1160.
- 97.** de Fijter, J. W., Rejection and function and chronic allograft dysfunction. *Kidney international* **2010**, *78*, S38-S41.
- 98.** Racusen, L. C.; Regele, H., The pathology of chronic allograft dysfunction. *Kidney international* **2010**, *78*, S27-S32.
- 99.** López-montenegro Soria, M. A.; Porta Oltra, B.; Jiménez Torres, N. V., *et al.*, Predicción de riesgo de rechazo agudo en pacientes con trasplante renal. *Farmacía Hospitalaria* **2009**, *33* (4), 194-201.
- 100.** Steiner, T.; Boehme, C.; Wolf, G., *et al.*, Impact of Immunologic and Nonimmunologic Variables on Long-Term Outcome After Kidney Transplantation. *Transplantation proceedings* **2009**, *41* (6), 2521-2523.
- 101.** Roldan-Reina, A. J.; Martin-Villen, L.; Palomo-Lopez, N., *et al.*, Living Donor in Renal Transplantation: Minimizing Risks. *Transplantation proceedings* **2018**, *50* (2), 543-545.
- 102.** Nath, J.; Hodson, J.; Canbilen, S. W., *et al.*, Effect of cold ischaemia time on outcome after living donor renal transplantation. *The British journal of surgery* **2016**, *103* (9), 1230-6.
- 103.** Summers, D. M.; Johnson, R. J.; Hudson, A., *et al.*, Effect of donor age and cold storage time on outcome in recipients of kidneys donated after circulatory death in the UK: a cohort study. *Lancet (London, England)* **2013**, *381* (9868), 727-34.
- 104.** Emiroglu, R.; Yagmurdur, M. C.; Karakayali, F., *et al.*, Role of donor age and acute rejection episodes on long-term graft survival in cadaveric kidney transplantations. *Transplantation proceedings* **2005**, *37* (7), 2954-6.
- 105.** Debout, A.; Foucher, Y.; Trebern-Launay, K., *et al.*, Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney international* **2015**, *87* (2), 343-9.
- 106.** Chandraker, A.; Takada, M.; Nadeau, K. C., *et al.*, CD28-b7 blockade in organ dysfunction secondary to cold ischemia/reperfusion injury. *Kidney international* **1997**, *52* (6), 1678-84.
- 107.** Gómez, E. G.; Hernández, J. P. C.; López, F. J. M., *et al.*, Long-term Allograft Survival After Kidney Transplantation. *Transplantation proceedings* **2013**, *45* (10), 3599-3602.

- 108.** Williams, D.; Haragsim, L., Calcineurin nephrotoxicity. *Advances in chronic kidney disease* **2006**, *13* (1), 47-55.
- 109.** Briggs, J. D., Causes of death after renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2001**, *16* (8), 1545-9.
- 110.** Humar, A.; Snyderman, D., Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2009**, *9 Suppl 4*, S78-86.
- 111.** Burgos, D.; Jironda, C.; Martin, M., *et al.*, [BK-virus-associated Nephropathy]. *Nefrologia* **2010**, *30* (6), 613-7.
- 112.** Briganti, E. M.; Russ, G. R.; McNeil, J. J., *et al.*, Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *The New England journal of medicine* **2002**, *347* (2), 103-9.
- 113.** Opelz, G., The benefit of exchanging donor kidneys among transplant centers. *The New England journal of medicine* **1988**, *318* (20), 1289-92.
- 114.** Terasaki, P. I.; Cecka, J. M.; Takemoto, S., *et al.*, Clinical transplants 1988. Overview. *Clinical transplants* **1988**, 409-34.
- 115.** Picascia, A.; Infante, T.; Napoli, C., Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clinical and experimental nephrology* **2012**, *16* (3), 373-81.
- 116.** Loupy, A.; Hill, G. S.; Jordan, S. C., The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nature reviews. Nephrology* **2012**, *8* (6), 348-57.
- 117.** Matas, A. J.; Humar, A.; Gillingham, K. J., *et al.*, Five preventable causes of kidney graft loss in the 1990s: a single-center analysis. *Kidney international* **2002**, *62* (2), 704-14.
- 118.** Butler, J. A.; Roderick, P.; Mullee, M., *et al.*, Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review. *Transplantation* **2004**, *77* (5), 769-76.
- 119.** Pallardo Mateu, L. M.; Sancho Calabuig, A.; Capdevila Plaza, L., *et al.*, Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2004**, *19 Suppl 3*, iii38-42.
- 120.** El-Zoghby, Z. M.; Stegall, M. D.; Lager, D. J., *et al.*, Identifying specific causes of kidney allograft loss. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2009**, *9* (3), 527-35.
- 121.** Meier-Kriesche, H. U.; Schold, J. D.; Srinivas, T. R., *et al.*, Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2004**, *4* (3), 378-83.

- 122.** Ghanta, M.; Jim, B., Renal Transplantation in Advanced Chronic Kidney Disease Patients. *The Medical clinics of North America* **2016**, *100* (3), 465-76.
- 123.** Webster, A. C.; Nagler, E. V.; Morton, R. L., *et al.*, Chronic Kidney Disease. *Lancet (London, England)* **2017**, *389* (10075), 1238-1252.
- 124.** Choi, J.; Bano, A.; Azzi, J., Biomarkers in Solid Organ Transplantation. *Clinics in laboratory medicine* **2019**, *39* (1), 73-85.
- 125.** Ghisdal, L.; Baron, C.; Lebranchu, Y., *et al.*, Genome-Wide Association Study of Acute Renal Graft Rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2017**, *17* (1), 201-209.
- 126.** Yang, J. Y. C.; Sarwal, M. M., Transplant genetics and genomics. *Nature Reviews Genetics* **2017**, *18*, 309.
- 127.** Boger, C. A.; Gorski, M.; Li, M., *et al.*, Association of eGFR-Related Loci Identified by GWAS with Incident CKD and ESRD. *PLoS genetics* **2011**, *7* (9), e1002292.
- 128.** Gorski, M.; Tin, A.; Garnaas, M., *et al.*, Genome-wide association study of kidney function decline in individuals of European descent. *Kidney international* **2015**, *87* (5), 1017-1029.
- 129.** Thio, C. H. L.; van der Most, P. J.; Nolte, I. M., *et al.*, Evaluation of a genetic risk score based on creatinine-estimated glomerular filtration rate and its association with kidney outcomes. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2018**, *33* (10), 1757-1764.
- 130.** Li, Q.; Verma, I. M., NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **2002**, *2* (10), 725-34.
- 131.** Pereira, S. G.; Oakley, F., Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2008**, *40* (8), 1425-30.
- 132.** Sanz, A. B.; Sanchez-Nino, M. D.; Ramos, A. M., *et al.*, NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* **2010**, *21* (8), 1254-62.
- 133.** Zhang, H.; Sun, S.-C., NF-kB in inflammation and renal diseases. *Cell & bioscience* **2015**, *5*, 63-63.
- 134.** Gao, J.; Pfeifer, D.; He, L. J., *et al.*, Association of NFKB1A polymorphism with colorectal cancer risk and prognosis in Swedish and Chinese populations. *Scandinavian journal of gastroenterology* **2007**, *42* (3), 345-50.
- 135.** Long, M.; Park, S. G.; Strickland, I., *et al.*, Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* **2009**, *31* (6), 921-31.
- 136.** Luo, C. T.; Li, M. O., Transcriptional control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol* **2013**, *34* (11), 531-9.

- 137.** Misra, M. K.; Mishra, A.; Pandey, S. K., *et al.*, Association of functional genetic variants of transcription factor Forkhead Box P3 and Nuclear Factor-kappaB with end-stage renal disease and renal allograft outcome. *Gene* **2016**, *581* (1), 57-65.
- 138.** Conne, B.; Stutz, A.; Vassalli, J.-D., The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nature Medicine* **2000**, *6*, 637.
- 139.** Song, S.; Chen, D.; Lu, J., *et al.*, NFκB1 and NFκBIA Polymorphisms Are Associated with Increased Risk for Sporadic Colorectal Cancer in a Southern Chinese Population. *PloS one* **2011**, *6* (6), e21726.
- 140.** Kramer, K.; Thye, T.; Treszl, A., *et al.*, Polymorphism in NFKBIA gene is associated with recurrent acute rejections in liver transplant recipients. *Tissue antigens* **2014**, *84* (4), 370-7.
- 141.** Khuja, Z.; Parry, M.; Rasool, R., *et al.*, Association of Forkhead Box P3 Gene Polymorphisms With Allograft Rejection Episodes in Kidney Transplant Patients: a Study From Kashmir, North India. *Iranian journal of kidney diseases* **2018**, *12* (5), 305-311.
- 142.** Chorley, B. N.; Wang, X.; Campbell, M. R., *et al.*, Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutation research* **2008**, *659* (1-2), 147-57.
- 143.** Qiu, X. Y.; Jiao, Z.; Zhang, M., *et al.*, Genetic association of FOXP3 gene polymorphisms with allograft rejection in renal transplant patients. *Nephrology (Carlton, Vic.)* **2012**, *17* (4), 423-30.
- 144.** Park, H.; Lee, N.; In, J. W., *et al.*, Association of Foxp3 Polymorphism With Allograft Outcome in Kidney Transplantation. *Annals of laboratory medicine* **2017**, *37* (5), 420-425.
- 145.** Verma, S.; Tanaka, Y.; Shimizu, S., *et al.*, Significant association between FOXP3 gene polymorphism and steroid-resistant acute rejection in living donor liver transplantation. *Hepatology communications* **2017**, *1* (5), 406-420.
- 146.** Wu, Z.; Xu, Q.; Qiu, X., *et al.*, FOXP3 rs3761548 polymorphism is associated with tacrolimus-induced acute nephrotoxicity in renal transplant patients. *European journal of clinical pharmacology* **2017**, *73* (1), 39-47.
- 147.** Thude, H.; Tiede, P.; Sterneck, M., *et al.*, Impact of TBX21, GATA3, and FOXP3 gene polymorphisms on acute cellular rejection after liver transplantation. *Hla* **2019**, *93* (2-3), 97-101.
- 148.** Adamek, M.; Dohler, B.; Hasan, K. K., *et al.*, Assessing the impact of FoxP3 and Vav1 gene polymorphisms on kidney allograft survival. *Hla* **2017**, *90* (2), 102-105.
- 149.** Frydecka, I.; Kosmaczewska, A.; Bocko, D., *et al.*, Alterations of the expression of T-cell-related costimulatory CD28 and downregulatory CD152 (CTLA-4) molecules in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Cancer* **2004**, *90* (10), 2042-2048.
- 150.** Esposito, P.; Grosjean, F.; Rampino, T., *et al.*, Costimulatory pathways in kidney transplantation: pathogenetic role, clinical significance and new therapeutic opportunities. *International reviews of immunology* **2014**, *33* (3), 212-33.

151. Malvezzi, P.; Jouve, T.; Rostaing, L., Costimulation Blockade in Kidney Transplantation: An Update. *Transplantation* **2016**, *100* (11), 2315-2323.
152. Han, F. F.; Fan, H.; Wang, Z. H., *et al.*, Association between co-stimulatory molecule gene polymorphism and acute rejection of allograft. *Transplant immunology* **2014**, *31* (2), 81-6.
153. Delneste, Y.; Bosotti, R.; Magistrelli, G., *et al.*, Detection of a polymorphism in exon 8 of the human CD86 gene. *Immunogenetics* **2000**, *51* (8-9), 762-3.
154. Marín, L. A.; Moya-Quiles, M. R.; Miras, M., *et al.*, Evaluation of CD86 gene polymorphism at +1057 position in liver transplant recipients. *Transplant immunology* **2005**, *15* (1), 69-74.
155. Wang, S.; Chen, L., T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cellular & molecular immunology* **2004**, *1* (1), 37-42.
156. Brunet, J. F.; Denizot, F.; Luciani, M. F., *et al.*, A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* **1987**, *328* (6127), 267-70.
157. Walker, L. S.; Sansom, D. M., The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nature reviews. Immunology* **2011**, *11* (12), 852-63.
158. Ueda, H.; Howson, J. M.; Esposito, L., *et al.*, Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **2003**, *423* (6939), 506-11.
159. Karabon, L.; Markiewicz, M.; Partyka, A., *et al.*, A CT60G>A polymorphism in the CTLA-4 gene of the recipient may confer susceptibility to acute graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunogenetics* **2015**, *67* (5-6), 295-304.
160. Ward, F. J.; Dahal, L. N.; Khanolkar, R. C., *et al.*, Targeting the alternatively spliced soluble isoform of CTLA-4: prospects for immunotherapy? *Immunotherapy* **2014**, *6* (10), 1073-84.
161. Kishimoto, T.; Akira, S.; Taga, T., Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science (New York, N.Y.)* **1992**, *258* (5082), 593-7.
162. Vandembroecke, C.; Caillat-Zucman, S.; Legendre, C., *et al.*, Differential in situ expression of cytokines in renal allograft rejection. *Transplantation* **1991**, *51* (3), 602-9.
163. Kutukculer, N.; Clark, K.; Rigg, K. M., *et al.*, The value of posttransplant monitoring of interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, and soluble CD23 in the plasma of renal allograft recipients. *Transplantation* **1995**, *59* (3), 333-40.
164. Fishman, D.; Faulds, G.; Jeffery, R., *et al.*, The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *The Journal of clinical investigation* **1998**, *102* (7), 1369-76.
165. Lv, R.; Hu, X.; Bai, Y., *et al.*, Association between IL-6 -174G/C polymorphism and acute rejection of renal allograft: Evidence from a meta-analysis. *Transplant immunology* **2012**, *26* (1), 11-18.
166. Davis, M. R.; Zhu, Z.; Hansen, D. M., *et al.*, The role of IL-21 in immunity and cancer. *Cancer letters* **2015**, *358* (2), 107-114.

- 167.** Gharibi, T.; Kazemi, T.; Aliparasti, M. R., *et al.*, Investigation of IL-21 gene polymorphisms (rs2221903, rs2055979) in cases with multiple sclerosis of Azerbaijan, Northwest Iran. *American journal of clinical and experimental immunology* **2015**, *4* (1), 7-14.
- 168.** Karimi, M. H.; Hejr, S.; Geramizadeh, B., *et al.*, Study of the relationships between IL-23R, IL-17, IL-21 polymorphisms and serum level of IL-17, IL-21 with acute graft rejection in iranian liver transplant recipients. *Immunological investigations* **2014**, *43* (1), 69-85.
- 169.** Kwiatkowska, E.; Domanski, L.; Kloda, K., *et al.*, IL2-IL21 gene cluster polymorphism is not associated with allograft function after kidney transplantation. *International urology and nephrology* **2014**, *46* (12), 2415-20.
- 170.** Chatterjee, R.; Batra, J.; Ghosh, B., A common exonic variant of interleukin21 confers susceptibility to atopic asthma. *International archives of allergy and immunology* **2009**, *148* (2), 137-46.
- 171.** Ghali, J. R.; Holdsworth, S. R.; Kitching, A. R., Targeting IL-17 and IL-23 in Immune Mediated Renal Disease. *Curr Med Chem* **2015**, *22* (38), 4341-65.
- 172.** Gaffen, S. L.; Jain, R.; Garg, A. V., *et al.*, The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature reviews. Immunology* **2014**, *14* (9), 585-600.
- 173.** Chen, K.; Kolls, J. K., Interleukin-17A (IL17A). *Gene* **2017**, *614*, 8-14.
- 174.** Huang, S. H.; Frydas, S.; Kempuraj, D., *et al.*, Interleukin-17 and the interleukin-17 family member network. *Allergy and asthma proceedings* **2004**, *25* (1), 17-21.
- 175.** Pekalski, M.; Jenkinson, S. E.; Willet, J. D., *et al.*, Renal allograft rejection: examination of delayed differentiation of Treg and Th17 effector T cells. *Immunobiology* **2013**, *218* (3), 303-10.
- 176.** Espinoza, J. L.; Takami, A.; Nakata, K., *et al.*, A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PloS one* **2011**, *6* (10), e26229.
- 177.** Huang, D.; Cancilla, M. R.; Morahan, G., Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes and immunity* **2000**, *1* (8), 515-20.
- 178.** Cooper, A. M.; Khader, S. A., IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends in Immunology* **2007**, *28* (1), 33-38.
- 179.** Murphy K, T. P., Walport M, Ehrenstein M, *Immunobiología de Janeway*. 7th ed.; McGraw-Hill Interamericana: Mexico, **2009**.
- 180.** Chin, G. K.; Adams, C. L.; Carey, B. S., *et al.*, The value of serum neopterin, interferon-gamma levels and interleukin-12B polymorphisms in predicting acute renal allograft rejection. *Clinical and experimental immunology* **2008**, *152* (2), 239-44.
- 181.** Hoffmann, T. W.; Halimi, J. M.; Buchler, M., *et al.*, Impact of a polymorphism in the IL-12p40 gene on the outcome of kidney transplantation. *Transplantation proceedings* **2009**, *41* (2), 654-6.

- 182.** Perovic, V.; Markovic, M.; Kravljaca, M., *et al.*, Cytokine Gene Polymorphism Profiles in Kidney Transplant Patients - Association of +1188A/C RS3212227 SNP in the IL12B Gene Prevents Delayed Graft Function. *Archives of medical research* **2018**, *49* (2), 101-108.
- 183.** Tsai, J. P.; Yang, S. F.; Wu, S. W., *et al.*, Association between interleukin 23 receptor polymorphism and kidney transplant outcomes: a 10-year Taiwan cohort study. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2011**, *412* (11-12), 958-62.
- 184.** Wu, H.; Zheng, J.; Deng, J., *et al.*, Functional genetic variations in the IL-23 receptor gene are associated with risk of breast, lung and nasopharyngeal cancer in Chinese populations. *Carcinogenesis* **2012**, *33* (12), 2409-2416.
- 185.** Zhou, S.; Ruan, Y.; Yu, H., *et al.*, Functional IL-23R rs10889677 genetic polymorphism and risk of multiple solid tumors: a meta-analysis. *PloS one* **2013**, *8* (11), e80627.
- 186.** Li, Z.; Wu, F.; Brant, S. R., *et al.*, IL-23 receptor regulation by Let-7f in human CD4+ memory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2011**, *186* (11), 6182-90.
- 187.** Ciliao, H. L.; Camargo-Godoy, R. B. O.; de Souza, M. F., *et al.*, Association of UGT2B7, UGT1A9, ABCG2, and IL23R polymorphisms with rejection risk in kidney transplant patients. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* **2017**, *80* (13-15), 661-671.
- 188.** DbSNP home page: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. (accessed 15 de Noviembre).
- 189.** Garcia, V. E.; Chang, M.; Brandon, R., *et al.*, Detailed genetic characterization of the interleukin-23 receptor in psoriasis. *Genes and immunity* **2008**, *9* (6), 546-55.
- 190.** Bérubé, J.-C.; Gaudreault, N.; Lavoie-Charland, E., *et al.*, Identification of susceptibility genes of adult asthma in french canadian women. *Canadian Respiratory Journal* **2016**, *2016*:3564341.
- 191.** Alonso, A.; Sasin, J.; Bottini, N., *et al.*, Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **2004**, *117* (6), 699-711.
- 192.** Aguiar, R. C.; Yakushijin, Y.; Kharbanda, S., *et al.*, PTPROt: an alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest. *Blood* **1999**, *94* (7), 2403-13.
- 193.** Liang, C.; Wang, X.; Hu, J., *et al.*, PTPRO Promotes Oxidized Low-Density Lipoprotein Induced Oxidative Stress and Cell Apoptosis through Toll-Like Receptor 4/Nuclear Factor κB Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2017**, *42* (2), 495-505.
- 194.** Motiwala, T.; Datta, J.; Kutay, H., *et al.*, Lyn kinase and ZAP70 are substrates of PTPROt in B-cells: Lyn inactivation by PTPROt sensitizes leukemia cells to VEGF-R inhibitor pazopanib. *Journal of cellular biochemistry* **2010**, *110* (4), 846-56.
- 195.** Hou, J.; Deng, L.; Zhuo, H., *et al.*, PTPROt maintains T cell immunity in the microenvironment of hepatocellular carcinoma. *Journal of molecular cell biology* **2015**, *7* (4), 338-50.
- 196.** Tang, T. K., Centriole biogenesis in multiciliated cells. *Nature Cell Biology* **2013**, *15* (12), 1400-2.

- 197.** Zhao, H.; Zhu, L.; Zhu, Y., *et al.*, The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. *Nature Cell Biology* **2013**, *15*, 1434.
- 198.** Levey, A. S.; Stevens, L. A.; Schmid, C. H., *et al.*, A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Annals of internal medicine* **2009**, *150* (9), 604-12.
- 199.** Chawla, L. S.; Eggers, P. W.; Star, R. A., *et al.*, Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *The New England journal of medicine* **2014**, *371* (1), 58-66.
- 200.** Kottgen, A.; Glazer, N. L.; Dehghan, A., *et al.*, Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet* **2009**, *41* (6), 712-7.
- 201.** Okada, Y.; Sim, X.; Go, M. J., *et al.*, Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations. *Nat Genet* **2012**, *44* (8), 904-9.
- 202.** Pattaro, C.; Teumer, A.; Gorski, M., *et al.*, Genetic associations at 53 loci highlight cell types and biological pathways relevant for kidney function. *Nature communications* **2016**, *7*, 10023.
- 203.** Canal, C.; Pellicer, R.; Facundo, C., *et al.*, Tables for estimating the glomerular filtration rate using the new CKD-EPI equation from serum creatinine concentration. *Nefrologia* **2014**, *34* (2), 223-9.
- 204.** Montero, N.; Soler, M. J.; Pascual, M. J., *et al.*, Correlation between the protein/creatinine ratio in spot urine and 24-hour urine protein. *Nefrologia* **2012**, *32* (4), 494-501.
- 205.** Sax, S. M., *Principles and Technics 2 Ed.* 2 ed.; Harper and Row Publisher: New York, **1975**; Vol. 21, p 1629.
- 206.** Martínez González M.A., S. V. A., Toledo Atucha E., Faulín Fajardo F.J., *Bioestadística amigable*. 3ª Ed. ed.; Elsevier España: **2014**; p 612.
- 207.** Iniesta, R.; Guinó, E.; Moreno, V., Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria* **2005**.
- 208.** The Genomes Project, C.; Auton, A.; Abecasis, G. R., *et al.*, A global reference for human genetic variation. *Nature* **2015**, *526*, 68.
- 209.** Machiela, M. J.; Chanock, S. J., LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2015**, *31* (21), 3555-3557.
- 210.** Barrett, J. C.; Fry, B.; Maller, J., *et al.*, Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2005**, *21* (2), 263-5.
- 211.** Misra, M. K.; Kapoor, R.; Pandey, S. K., *et al.*, Association of CTLA-4 gene polymorphism with end-stage renal disease and renal allograft outcome. *J Interferon Cytokine Res* **2014**, *34* (3), 148-61.
- 212.** Xu, Q. X.; Qiu, X. Y.; Jiao, Z., *et al.*, FOXP3 rs3761549 polymorphism predicts long-term renal allograft function in patients receiving cyclosporine-based immunosuppressive regimen. *Gene* **2018**, *644*, 93-100.

- 213.** Dong, C., TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature reviews. Immunology* **2008**, *8* (5), 337-48.
- 214.** Wei, J. F.; Zheng, S. S., NF-kappa B in allograft rejection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **2003**, *2* (2), 180-3.
- 215.** Kolell, K. J.; Crawford, D. L., Evolution of Sp transcription factors. *Mol Biol Evol* **2002**, *19* (3), 216-22.
- 216.** Ruan, Q.; Chen, Y. H., Nuclear factor-kappaB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. *Adv Exp Med Biol* **2012**, *946*, 207-21.
- 217.** Guckel, E.; Frey, S.; Zaiss, M. M., *et al.*, Cell-intrinsic NF-kappaB activation is critical for the development of natural regulatory T cells in mice. *PLoS one* **2011**, *6* (5), 18.
- 218.** Wojciechowski, D.; Vincenti, F., Challenges and opportunities in targeting the costimulation pathway in solid organ transplantation. *Seminars in immunology* **2011**, *23* (3), 157-64.
- 219.** Karimi, M. H.; Motazedian, M.; Abedi, F., *et al.*, Association of genetic variation in co-stimulatory molecule genes with outcome of liver transplant in Iranian patients. *Gene* **2012**, *504* (1), 127-32.
- 220.** Marder, B. A.; Schroppel, B.; Lin, M., *et al.*, The impact of costimulatory molecule gene polymorphisms on clinical outcomes in liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2003**, *3* (4), 424-31.
- 221.** Krichen, H.; Sfar, I.; Jendoubi-Ayed, S., *et al.*, Genetic polymorphisms of immunoregulatory proteins in acute renal allograft rejection. *Transplantation proceedings* **2009**, *41* (8), 3305-7.
- 222.** Kuzstal, M.; Kościelska-Kasprzak, K.; Drulis-Fajdasz, D., *et al.*, The influence of CTLA-4 gene polymorphism on long-term kidney allograft function in Caucasian recipients. *Transplant immunology* **2010**, *23*, 121-4.
- 223.** Niknam, A.; Karimi, M. H.; Yaghobi, R., *et al.*, The Association Between Viral Infections and Co-stimulatory Gene Polymorphisms in Kidney Transplant Outcomes. *Jundishapur journal of microbiology* **2016**, *9* (8), e31338.
- 224.** Krichen, H.; Sfar, I.; Bardi, R., *et al.*, CD86 +1057G>A polymorphism and susceptibility to acute kidney allograft rejection. *Iranian journal of kidney diseases* **2011**, *5* (3), 187-93.
- 225.** de Reuver, P.; Pravica, V.; Hop, W., *et al.*, Recipient ctla-4 +49 G/G genotype is associated with reduced incidence of acute rejection after liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2003**, *3* (12), 1587-94.
- 226.** Qureshi, O. S.; Zheng, Y.; Nakamura, K., *et al.*, Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)* **2011**, *332* (6029), 600-3.
- 227.** Walker, L. S.; Sansom, D. M., Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol* **2015**, *36* (2), 63-70.

- 228.** Ovcinnikovs, V.; Ross, E. M.; Petersone, L., *et al.*, CTLA-4-mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells. *Science Immunology* **2019**, *4* (35), eaaw0902.
- 229.** Walker, L. S. K., Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of autoimmunity* **2013**, *45* (100), 49-57.
- 230.** Murakami, N.; Riella, L. V., Co-inhibitory pathways and their importance in immune regulation. *Transplantation* **2014**, *98* (1), 3-14.
- 231.** Anjos, S.; Nguyen, A.; Ounissi-Benkalha, H., *et al.*, A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277* (48), 46478-86.
- 232.** Duan, Z.; Zhang, Y.; Pan, F., *et al.*, Association between CTLA4 gene polymorphisms and acute rejection of kidney transplantation: a meta-analysis. *J Nephrol* **2012**, *25* (6), 996-1002.
- 233.** Kim, H. J.; Jeong, K. H.; Lee, S. H., *et al.*, Polymorphisms of the CTLA4 gene and kidney transplant rejection in Korean patients. *Transplant immunology* **2010**, *24* (1), 40-4.
- 234.** Canossi, A.; Aureli, A.; Delreno, F., *et al.*, Influence of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 polymorphisms on acute rejection onset of cadaveric renal transplants. *Transplantation proceedings* **2013**, *45* (7), 2645-9.
- 235.** Dmitrienko, S.; Hoar, D. I.; Balshaw, R., *et al.*, Immune response gene polymorphisms in renal transplant recipients. *Transplantation* **2005**, *80* (12), 1773-82.
- 236.** Gendzekhadze, K.; Rivas-Vetencourt, P.; Montano, R. F., Risk of adverse post-transplant events after kidney allograft transplantation as predicted by CTLA-4 +49 and TNF-alpha -308 single nucleotide polymorphisms: a preliminary study. *Transplant immunology* **2006**, *16* (3-4), 194-9.
- 237.** Domanski, L.; Bobrek-Lesiakowska, K.; Kloda, K., *et al.*, The impact of rs231775 (+49AG) CTLA4 gene polymorphism on transplanted kidney function. *Annals of transplantation* **2012**, *17* (3), 29-35.
- 238.** Holt, M. P.; Punkosdy, G. A.; Glass, D. D., *et al.*, TCR Signaling and CD28/CTLA-4 Signaling Cooperatively Modulate T Regulatory Cell Homeostasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2017**, *198* (4), 1503-1511.
- 239.** Kavanagh, B.; O'Brien, S.; Lee, D., *et al.*, CTLA4 blockade expands FoxP3+ regulatory and activated effector CD4+ T cells in a dose-dependent fashion. *Blood* **2008**, *112* (4), 1175-83.
- 240.** Tang, A. L.; Teijaro, J. R.; Njau, M. N., *et al.*, CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4+ FoxP3+ T cell homeostasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2008**, *181* (3), 1806-13.
- 241.** Paterson, A. M.; Lovitch, S. B.; Sage, P. T., *et al.*, Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J Exp Med* **2015**, *212* (10), 1603-21.

- 242.** Feng, X.; Kajigaya, S.; Solomou, E. E., *et al.*, Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. *Blood* **2008**, *111* (7), 3675-83.
- 243.** Dahal, L. N.; Basu, N.; Youssef, H., *et al.*, Immunoregulatory soluble CTLA-4 modifies effector T-cell responses in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy* **2016**, *18* (1), 180.
- 244.** Perez-Garcia, A.; De la Camara, R.; Roman-Gomez, J., *et al.*, CTLA-4 polymorphisms and clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical sibling donors. *Blood* **2007**, *110* (1), 461-7.
- 245.** Hammrich, J.; Wittig, S.; Ernst, T., *et al.*, CTLA-4 polymorphisms: influence on transplant-related mortality and survival in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol* **2018**, *144* (3), 587-592.
- 246.** Muro, M.; Rojas, G.; Botella, C., *et al.*, CT60 A/G marker of the 3'-UTR of the CTLA4 gene and liver transplant. *Transplant immunology* **2008**, *18* (3), 246-9.
- 247.** Oaks, M. K.; Hallett, K. M.; Penwell, R. T., *et al.*, A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol* **2000**, *201* (2), 144-53. doi: 10.1006/cimm.2000.1649.
- 248.** Saverino, D.; Brizzolara, R.; Simone, R., *et al.*, Soluble CTLA-4 in autoimmune thyroid diseases: relationship with clinical status and possible role in the immune response dysregulation. *Clin Immunol* **2007**, *123* (2), 190-8.
- 249.** Turner, M. D.; Nedjai, B.; Hurst, T., *et al.*, Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and in fl ammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research* **2014**, *1843*.
- 250.** Altan-Bonnet, G.; Mukherjee, R., Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. **2019**.
- 251.** Karimi, M. H.; Daneshmandi, S.; Pourfathollah, A. A., *et al.*, A study of the impact of cytokine gene polymorphism in acute rejection of renal transplant recipients. *Molecular biology reports* **2012**, *39* (1), 509-15.
- 252.** Jordan, S. C.; Choi, J.; Kim, I., *et al.*, Interleukin-6, A Cytokine Critical to Mediation of Inflammation, Autoimmunity and Allograft Rejection: Therapeutic Implications of IL-6 Receptor Blockade. *Transplantation* **2017**, *101* (1), 32-44.
- 253.** Reviron, D.; Dussol, B.; Andre, M., *et al.*, TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. *Transplantation proceedings* **2001**, *33* (1-2), 350-1.
- 254.** Ligeiro, D.; Sancho, M. R.; Papoila, A., *et al.*, Impact of donor and recipient cytokine genotypes on renal allograft outcome. *Transplantation proceedings* **2004**, *36* (4), 827-9.
- 255.** Tajik, N.; Kazemi, T.; Delbandi, A., *et al.*, The Predictive Value of HLA-DR Matching and Cytokine Gene Polymorphisms in Renal Allograft Acute Rejection: a Living-unrelated Donor (LURD) Study. *Iranian journal of immunology : IJI* **2006**, *3* (4), 150-6.
- 256.** Canossi, A.; Piazza, A.; Poggi, E., *et al.*, Renal allograft immune response is influenced by patient and donor cytokine genotypes. *Transplantation proceedings* **2007**, *39* (6), 1805-12.

- 257.** Manchanda, P. K.; Mittal, R. D., Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. *Molecular and cellular biochemistry* **2008**, *311* (1-2), 57-65.
- 258.** Dhaouadi, T.; Sfar, I.; Bardi, R., *et al.*, Cytokine Gene Polymorphisms in Kidney Transplantation. *Transplantation proceedings* **2013**, *45* (6), 2152-2157.
- 259.** Brandt, K.; Bulfone-Paus, S.; Foster, D. C., *et al.*, Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* **2003**, *102* (12), 4090-8.
- 260.** Sondergaard, H.; Skak, K., IL-21: roles in immunopathology and cancer therapy. *Tissue antigens* **2009**, *74* (6), 467-79.
- 261.** Hejr, S.; Karimi, M. H.; Yaghoobi, R., *et al.*, Association of IL-17, IL-21, and IL-23R gene polymorphisms with HBV infection in kidney transplant patients. *Viral immunology* **2013**, *26* (3), 201-6.
- 262.** Carlini, D. B.; Chen, Y.; Stephan, W., The relationship between third-codon position nucleotide content, codon bias, mRNA secondary structure and gene expression in the drosophilid alcohol dehydrogenase genes Adh and Adhr. *Genetics* **2001**, *159* (2), 623-33.
- 263.** Duan, J.; Wainwright, M. S.; Comeron, J. M., *et al.*, Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* **2003**, *12* (3), 205-16.
- 264.** Leonard, W. J.; Zeng, R.; Spolski, R., Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age. *Journal of leukocyte biology* **2008**, *84* (2), 348-56.
- 265.** Croce, M.; Rigo, V.; Ferrini, S., IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. *J Immunol Res* **2015**, *2015*, 696578.
- 266.** Yuan, M. J.; Wang, T., Advances of the interleukin-21 signaling pathway in immunity and angiogenesis. *Biomed Rep* **2016**, *5* (1), 3-6.
- 267.** Espinoza, J. L.; Takami, A.; Onizuka, M., *et al.*, A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT. *Bone marrow transplantation* **2011**, *46* (11), 1455-63.
- 268.** Goriely, S.; Goldman, M., The interleukin-12 family: new players in transplantation immunity? *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2007**, *7* (2), 278-84.
- 269.** Goriely, S.; Goldman, M., Interleukin-12 family members and the balance between rejection and tolerance. *Current opinion in organ transplantation* **2008**, *13* (1), 4-9.
- 270.** Doodes, P. D.; Cao, Y.; Hamel, K. M., *et al.*, IFN-gamma regulates the requirement for IL-17 in proteoglycan-induced arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2010**, *184* (3), 1552-1559.
- 271.** Daniel, V.; Wang, H.; Sadeghi, M., *et al.*, Interferon-gamma producing regulatory T cells as a diagnostic and therapeutic tool in organ transplantation. *International reviews of immunology* **2014**, *33* (3), 195-211.

- 272.** Hall, B. M., CD4+CD25+ T Regulatory Cells in Transplantation Tolerance: 25 Years On. *Transplantation* **2016**, *100* (12), 2533-2547.
- 273.** Dong, K.; Xu, Y.; Yang, Q., *et al.*, Associations of Functional MicroRNA Binding Site Polymorphisms in IL23/Th17 Inflammatory Pathway Genes with Gastric Cancer Risk. *Mediators of inflammation* **2017**, *2017*, 6974696.
- 274.** Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **2004**, *116* (2), 281-97.
- 275.** Park, J. H.; Shin, C., MicroRNA-directed cleavage of targets: mechanism and experimental approaches. *BMB Rep* **2014**, *47* (8), 417-23.
- 276.** Langrish, C. L.; McKenzie, B. S.; Wilson, N. J., *et al.*, IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews* **2004**, *202*, 96-105.
- 277.** van de Wetering, D.; de Paus, R. A.; van Dissel, J. T., *et al.*, IL-23 modulates CD56+/CD3- NK cell and CD56+/CD3+ NK-like T cell function differentially from IL-12. *Int Immunol* **2009**, *21* (2), 145-53.
- 278.** Ziblat, A.; Nuñez, S. Y.; Raffo Iraolagoitia, X. L., *et al.*, Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- γ Secretion by CD56(bright) Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation. *Frontiers in immunology* **2018**, *8*, 1959-1959.
- 279.** Vanden Eijnden, S.; Goriely, S.; De Wit, D., *et al.*, IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur J Immunol* **2005**, *35* (2), 469-75.
- 280.** Li, Y.; Wang, H.; Lu, H., *et al.*, Regulation of Memory T Cells by Interleukin-23. *International archives of allergy and immunology* **2016**, *169* (3), 157-62.
- 281.** Hua, S.; Li, Y.; Yu, X., *et al.*, IL-23 and dendritic cells: What are the roles of their mutual attachment in immune response and immunotherapy? *Cytokine* **2019**, *120*, 78-84.
- 282.** Hou, J.; Xia, Y.; Jiang, R., *et al.*, PTPRO plays a dual role in hepatic ischemia reperfusion injury through feedback activation of NF- κ B. *Journal of Hepatology* **2014**, *60* (2), 306-312.
- 283.** Chen, L.; Juszczynski, P.; Takeyama, K., *et al.*, Protein tyrosine phosphatase receptor-type O truncated (PTPROt) regulates SYK phosphorylation, proximal B-cell-receptor signaling, and cellular proliferation. *Blood* **2006**, *108* (10), 3428-33.
- 284.** Jiang, R.; Chen, D.; Hou, J., *et al.*, Survival and Inflammation Promotion Effect of PTPRO in Fulminant Hepatitis Is Associated with NF- κ B Activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2014**, *193* (10), 5161-5170.
- 285.** Li, J.; Li, C.; Zhuang, Q., *et al.*, The Evolving Roles of Macrophages in Organ Transplantation. *J Immunol Res* **2019**, *2019*, 5763430.
- 286.** Juszczynski, P.; Chen, L.; O'Donnell, E., *et al.*, BCL6 modulates tonic BCR signaling in diffuse large B-cell lymphomas by repressing the SYK phosphatase, PTPROt. *Blood* **2009**, *114* (26), 5315-21.

- 287.** Kang, M. M.; Shan, S. L.; Wen, X. Y., *et al.*, Tumor-Suppression Mechanisms of Protein Tyrosine Phosphatase O and Clinical Applications. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **2015**, *16* (15), 6215-23.
- 288.** Stinchcombe, J. C.; Griffiths, G. M., Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2007**, *23*, 495-517.
- 289.** Stinchcombe, J. C.; Majorovits, E.; Bossi, G., *et al.*, Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* **2006**, *443* (7110), 462-5.
- 290.** Rich, R. R.; Fleisher, T. A.; Shearer, W. T., *et al.*, *Inmunología Clínica. Principios y práctica*. 5° ed.; **2019**; p 1392.
- 291.** Cobbold, S. P.; Martin, G.; Qin, S., *et al.*, Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* **1986**, *323* (6084), 164-6.
- 292.** Massart, A.; Ghisdal, L.; Viklicky, O., *et al.*, Reply to Hernandez et al. - GWAS of acute renal graft rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2018**, *18* (8), 2098-2099.
- 293.** Varshavsky, A., The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **1997**, *22* (10), 383-7.
- 294.** Hershko, A., The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* **2005**, *12* (9), 1191-7.
- 295.** Kottgen, A., Genome-wide association studies in nephrology research. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **2010**, *56* (4), 743-58.
- 296.** Kottgen, A.; Pattaro, C.; Boger, C. A., *et al.*, New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet* **2010**, *42* (5), 376-84.
- 297.** Gracia-Iguacel, C.; González-Parra, E.; Barril-Cuadrado, G., *et al.*, Defining protein-energy wasting syndrome in chronic kidney disease: prevalence and clinical implications. *Nefrología* **2014**, *34* (4), 507-519.
- 298.** Perez-Torres, A.; Gonzalez Garcia, M. E.; San Jose-Valiente, B., *et al.*, Protein-energy wasting syndrome in advanced chronic kidney disease: prevalence and specific clinical characteristics. *Nefrología* **2018**, *38* (2), 141-151.
- 299.** Rampoldi, L.; Scolari, F.; Amoroso, A., *et al.*, The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney international* **2011**, *80* (4), 338-47.
- 300.** Prajczek, S.; Heidenreich, U.; Pfaller, W., *et al.*, Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2010**, *25* (6), 1896-903.
- 301.** Abdel-Hady Algharably, E.; Beige, J.; Kreutz, R., *et al.*, Effect of UMOD genotype on long-term graft survival after kidney transplantation in patients treated with cyclosporine-based therapy. *Pharmacogenomics J* **2018**, *18* (2), 227-231.

- 302.** Masereeuw, R., Contribution of bone marrow-derived cells in renal repair after acute kidney injury. *Minerva Urol Nefrol* **2009**, *61* (4), 373-84.
- 303.** Li, B.; Cohen, A.; Hudson, T. E., *et al.*, Mobilized human hematopoietic stem/progenitor cells promote kidney repair after ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **2010**, *121* (20), 2211-20.
- 304.** Takaori, K.; Yanagita, M., Kidney regeneration and stem cells. *Anat Rec (Hoboken)* **2014**, *297* (1), 129-36.
- 305.** Borges, F. T.; Schor, N., Regenerative medicine in kidney disease: where we stand and where to go. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **2018**, *33* (9), 1457-1465.
- 306.** Olden, M.; Corre, T.; Hayward, C., *et al.*, Common variants in UMOD associate with urinary uromodulin levels: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* **2014**, *25* (8), 1869-82.
- 307.** Wuttke, M.; Li, Y.; Li, M., *et al.*, A catalog of genetic loci associated with kidney function from analyses of a million individuals. *Nat Genet* **2019**, *51* (6), 957-972.

Anexo

Anexo 1. Aprobación del Comité Ético del Hospital (código 14/438-E).

Informe Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica

C.P. - C.I. 14/438-E

21 de octubre de 2014

CEIC Hospital Clínico San Carlos

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Dra. Mar García Arenillas
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA


Que el proyecto de investigación titulado "**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES**" con código interno nº 14/438-E del que es Investigadora Principal la **Dra. Ana Sánchez Fructuoso** del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico San Carlos, ha sido estudiado por este Comité, no habiéndose realizado objeción alguna al mismo.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto.

Lo que firmo en Madrid, a 21 de octubre de 2014

Dra. Mar García Arenillas
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

Anexo 2. Consentimiento Informado aprobado por Comité Ético del Hospital.

	<h3>Consentimiento Informado</h3>
<p><u>Hoja de Información al Paciente y Consentimiento</u> Antes de proceder a la firma del consentimiento informado le rogamos lea la siguiente información.</p>	<p>Espacio para la etiqueta identificativa del paciente</p>
<p><u>Aspectos Generales</u> La participación en el estudio es completamente voluntaria y su decisión no afectará a su atención médica Los objetivos del estudio, riesgos, inconvenientes, molestias o cualquier otro tipo de información sobre el mismo que usted requiera le serán facilitados por su médico. Si usted da su consentimiento, en cualquier momento puede revocarlo e incluso solicitar la destrucción de las muestras obtenidas.</p>	
<p><u>Título del Estudio</u> Estudio de polimorfismos genéticos en pacientes trasplantados renales.</p>	
<p><u>Objetivo del Estudio</u> El objetivo principal es poder establecer marcadores genéticos que puedan ser predictores eficaces de la evolución del trasplante. Para el estudio, sólo se precisa la obtención de una muestra de sangre.</p>	
<p><u>Beneficios Esperados</u> Se espera poder profundizar en el conocimiento de las bases genéticas que puedan estar implicadas en supervivencia del injerto renal.</p>	
<p><u>Posibles Efectos Adversos Derivados del Estudio</u> En el caso de la extracción de una muestra de sangre, sólo se esperan las molestias y riesgos menores que puedan derivarse de su obtención mediante venopunción.</p>	
<p><u>Confidencialidad de los Datos y Seguridad de la Muestra e Información Clínica</u> De acuerdo con la normativa española y de la Comunidad Europea, su muestra de ADN, y su información clínica será guardada de forma independiente de su información personal, es decir, sus datos del estudio estarán codificados. La información que usted nos proporcione será manejada siguiendo las recomendaciones de la ley de protección de datos vigente (Ley orgánica de protección de datos de carácter personal (LOPD) 15/1999 de 13 de diciembre). Sus datos serán incluidos en un/unos fichero/s cuyo/s responsable/s son el Biobanco y/o el Hospital Clínico San Carlos. Usted podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, poniéndose en contacto con el Biobanco o con el Servicio de Nefrología.</p>	
<p>En el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser relevantes para su salud o la de su familia, tiene derecho a que le sean comunicados, si así lo desea. Si la información es relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo.</p>	
<p><u>Cesión de remanentes</u> Los remanentes de su muestra, podrán ser empleados en otros estudios de la misma línea de investigación del Servicio de Nefrología. Si NO desea ceder los remanentes al Servicio de Nefrología marque la siguiente casilla <input type="checkbox"/></p>	

	<h2>Consentimiento Informado</h2>
---	-----------------------------------

Cesión a estudios nacionales/internacionales

Su muestra o los remanentes, podrán ser cedidos para estudios nacionales/internacionales de la misma línea de investigación.

Si **NO** desea ceder su muestra/remanente para estudios nacionales/internacionales marque la siguiente casilla

Consentimiento
<p>Yo, (Nombre y Apellidos)..... con DNI</p> <p>Manifiesto que he leído con detenimiento el documento, he entendido todas las explicaciones y he podido realizar cuantas preguntas he estimado oportunas. Por ello doy mi consentimiento para participar en el estudio y para donar la muestra correspondiente.</p> <p>Fecha y Firma</p>

Firmado por del padre/madre o tutor en el caso de menores de edad

Nombre y firma del responsable que le ha proporcionado la información:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina
SE LE PROPORCIONARÁ UNA COPIA DE ESTE DOCUMENTO SI LO SOLICITA

Anexo 3. Clasificación de Banff 2018 (en inglés).

Banff Diagnostic Categories form the core of the Banff Classification of Renal Allograft Pathology

Category 1: Normal Biopsy Or Nonspecific Changes

Requires exclusion of any diagnosis from the Banff Diagnostic Categories 2-4, 6 below.

Category 2: Antibody-mediated changes

Use the Diagnostic Criteria Groups (right column) to reach 1 diagnosis (left column)

Diagnoses	Diagnostic Criteria Groups
<p>C4d Staining Without Evidence of Rejection Banff Lesion Score $C4d > 1$ (IF on fresh frozen tissue) OR $C4d > 0$ (IHC on paraffin-embedded tissue) AND Banff Lesion Scores $t0, v0$, no arterial intimal fibrosis with mononuclear cell inflammation in fibrosis and formation of neo-intima, no criterion from group 1 (AMR activity), no criterion from group 4 (histologic features of AMR chronicity), no increased expression of thoroughly validated gene transcripts/classifiers in the biopsy tissue strongly associated with AMR.</p>	<p>Criteria Group 1 AMR activity: - Banff Lesion Score $g > 0$ in the absence of glomerulonephritis and/or Banff Lesion Score. - $ptc > 0$ in the absence of TCMR or Borderline. - Banff Lesion Score $v > 0$. - Acute Thrombotic Microangiopathy In The Absence Of Any Other Cause. - Acute Tubular Injury In The Absence Of Any Other Apparent Cause.</p>
<p>Active AMR No criterion of AMR chronicity (Criteria Group 4) AND At least 1 criterion from Criteria Group 1 (AMR activity) AND At least 1 criterion from Criteria Group 2 (antibody interaction with tissue) AND At least 1 criterion from Criteria Group 3 (DSA or equivalents)</p>	<p>Criteria Group 2 Antibody interaction with tissue: - Banff Lesion Score $C4d > 1$ (IF on fresh frozen tissue) or $C4d > 0$ (IHC on paraffin-embedded tissue). - At least moderate MVI ($g + ptc > 1$) in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis; Borderline (Diagnostic Category 3) or acute T cell-mediated rejection (TCMR; Diagnostic Category 4). If Borderline, acute TCMR, or infection are present, (Banff Lesion Scores $g + ptc > 1$ is not sufficient and Banff Lesion Score $g > 1$ is required. - Increased Expression Of Thoroughly Validated Gene Transcripts/Classifiers In The Biopsy Tissue Strongly Associated With AMR</p>
<p>Chronic Active AMR At least 1 feature of AMR chronicity (Criteria Group 4) AND At least 1 criterion of antibody interaction with tissue (Criteria Group 2) AND At least 1 criterion of DSA or equivalents (Criteria Group 3)</p>	<p>Criteria Group 3 DSA or equivalents: - DSA (anti-HLA or other specificity) - Banff Lesion Score $C4d > 1$ (IF on fresh frozen tissue) or $C4d > 0$ (IHC on paraffin-embedded tissue) - Increased Expression Of Thoroughly Validated Gene Transcripts/Classifiers In The Biopsy Tissue Strongly Associated With AMR</p>
<p>Chronic AMR Banff 2017 permits the use of this term for biopsy specimens showing TG and/or peritubular capillary basement membrane multilayering in the absence of criterion of current/recent antibody interaction with the endothelium (Criteria Group 2) but with a prior documented diagnosis of Active or Chronic Active.</p>	<p>Criteria Group 4 Histologic features of AMR chronicity: - Banff Lesion Score $cg > 0$ (by LM or EM, if available), excluding biopsies with evidence of chronic thrombotic microangiopathy - 7 or more layers in 1 cortical peritubular capillary and 5 or more in 2 additional capillaries, avoiding portions cut tangentially by EM, if available (Severe Peritubular Capillary). - Basement Membrane Multilayering - Arterial Intimal Fibrosis Of New Onset, Excluding other Causes; Leukocytes Within The Sclerotic Intima Favour Chronic AMR If There Is No Prior History Of Biopsy-Proven TCMR but are not required</p>

Banff Diagnostic Categories form the core of the Banff Classification of Renal Allograft Pathology (Contin.)
Category 3: Suspicious (Borderline) For Acute TCMR:

Foci of Banff Lesion Score $t > 0$ AND Banff Lesions Score $i \leq 1$ (retaining the Banff Lesion Score $i1$ threshold from Banff 2005 is permitted but it must be made transparent in the methods section of reports and publications) OR Foci of Banff Lesion Score $t1$ AND Banff Lesion Score $i \geq 2$.

Category 4: TCMR
Acute TCMR IA

Banff Lesion Score $i \geq 2$

AND

Banff Lesion Score $t2$

Acute TCMR IB

Banff Lesion Score $i \geq 2$

AND

Banff Lesion Score $t3$

Acute TCMR IIA

Banff Lesion Score $v1$ regardless of Banff Lesion Scores i or t

Acute TCMR IIB

Banff Lesion Score $v2$ regardless of Banff Lesion

Acute TCMR III

Banff Lesion Score $v3$ regardless of Banff Lesion Scores i or t

Chronic Active TCMR Grade IA

Banff Lesion Score $ti \geq 2$

AND

Banff Lesion Score $i\text{-IFTA} \geq 2$, other known causes of $i\text{-IFTA}$ (e.g. pyelonephritis, etc.) ruled out

AND

Banff Lesion Score $t2$

Chronic Active TCMR Grade IB

Banff Lesion Score $ti \geq 2$

AND

Banff Lesion Score $i\text{-IFTA} \geq 2$, other known causes of $i\text{-IFTA}$ ruled out

AND

Banff Lesion Score $t3$

Chronic Active TCMR Grade II

Arterial intimal fibrosis with mononuclear cell inflammation in fibrosis and formation of neo-intima.

Category 5: IFTA
Grade I (Mild)

Banff Lesion Score $ci1$

OR

Banff Lesion Score $ct1$

Grade II (Moderate)

Banff Lesion Score $ci2$

OR

Banff Lesion Score $ct2$

Grade III (Severe)

Banff Lesion Score $ci3$

OR

Banff Lesion Score $ct3$

Category 6: Other changes not considered to be caused by acute or chronic rejection

BK-Virus Nephropathy

Post-transplant Lymphoproliferative Disorder Calcineurin Inhibitor Toxicity

Acute Tubular Injury Recurrent Disease

De Novo Glomerulopathy (Other Than TG) Pyelonephritis

Drug-Induced Interstitial Nephritis