

Nuovi biomarcatori nel trapianto renale

Maurizio Salvadori¹, Giuseppina Rosso²

¹Professore di Nefrologia già Direttore Nefrologia e Trapianto, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze - Italy

²Azienda Usl Toscana Centro, S.O.C. Nefrologia e Dialisi, Firenze 1 ed Empoli, Nuovo Ospedale San Giovanni di Dio, Firenze - Italy

New biomarkers in kidney transplant

Recently, new interesting and important novel biomarkers have allowed the evidence based medicine to move to a new field called precision medicine. In particular, this apply to organ transplantation and to the diagnosis of rejection.

Among these novel biomarkers are the study of donor-derived cell-free DNA when present in the blood of the recipients, the study of gene expression profiling again in the recipient, and the study of several urinary cytokines. All these novel biomarkers have several advantages over the old biomarkers. Indeed, they are non-invasive, are able to detect renal damage before the appearance of histological abnormalities, and are able to distinguish antibody-mediated rejection from cell-mediated rejection. The aim of this study is to identify the most recent findings on these biomarkers and to describe their utility and their limitations in particular in the field of kidney acute rejection.

Keywords: Acute kidney rejection, Biomarkers, Donor-derived cell-free DNA, Gene expression profiling, Subclinical rejection, Urinary cytokines

Le nostre conoscenze mediche sono passate attraverso fasi conoscitive sempre più avanzate. Dalla medicina basata sull'esperienza alla medicina basata sulle evidenze, fino alla medicina di precisione. Al momento attuale stiamo vivendo quest'ultimo passaggio dovuto allo sviluppo delle nuove tecnologie e in particolare allo sviluppo di nuovi biomarcatori.

Nuovi biomarcatori nel campo del trapianto renale permettono di predire o di diagnosticare precocemente lo sviluppo di un rigetto acuto sia celluloso-mediato che anticorpo-mediato. In questo modo permettono di stratificare il rischio di ogni singolo paziente trapiantato, di porre una diagnosi tempestiva, quando il danno istologico è ancora non significativo, e di individuare i riceventi del trapianto a elevato rischio di rigetto acuto. Come già accennato, i nuovi biomarcatori permettono, a livello molecolare, di rilevare anomalie nelle risposte dell'immunità innata e adattiva, molto prima che tali anomalie determinino danni e si estrinsechino a livello istologico.

Un biomarcatore è una caratteristica che è oggettivamente misurata e valutata come indicatore di un normale processo biologico, di un processo patologico o di una risposta farmacologica a un intervento terapeutico. I biomarcatori vengono studiati attraverso procedimenti di proteomica, genomica, trascrittomica e metabolomica (1).

Le principali caratteristiche dei biomarcatori applicati al trapianto renale sono di avere valori predittivi in termini di sensibilità e di specificità e di avere valori predittivi in termini di falsi positivi e di falsi negativi. Devono essere non invasivi e la loro validazione è essenziale a causa delle variazioni inter-individuali e delle variazioni fra un laboratorio e l'altro.

Hanno sostituito i tradizionali metodi di monitoraggio degli eventi clinici che comportavano una serie di errori o di interpretazioni non chiare.

Per esempio, il dosaggio della creatinina sierica è un marker non specifico di danno renale. Parimenti l'esame delle urine è non specifico, come non specifico è lo studio con ultrasuoni. Anche il monitoraggio dei livelli farmacologici degli immunosoppressori è non specifico. La biopsia renale è stata a lungo considerata il gold standard diagnostico. Tuttavia non è esente da complicazioni, è soggetta a variazioni difformi fra gli operatori ed è soggetta a errori di campionamento.

In questa analisi verranno in particolare analizzati nuovi biomarcatori nel trapianto renale come il DNA libero di cellule del donatore, presente nel ricevente, il profilo dell'espressione genica nel ricevente e i biomarcatori rivelabili nelle urine.

La presenza di DNA libero di cellule del donatore presente nel ricevente è dovuta al fatto che un qualsiasi danno a carico del rene donato porta a un incremento del DNA nel circolo del ricevente (2). È un attendibile marker di danno delle cellule endoteliali e può essere elevato in caso di rigetto, di infezioni o di danno del trapianto indotto da farmaci (3).

È ancora dibattuto il reale significato della presenza di DNA libero di cellule del donatore e diverse questioni restano aperte come risulta dalla Tabella 1 (3).

Received: October 22, 2024

Accepted: October 29, 2024

Published online: November 21, 2024

Indirizzo per la corrispondenza:

Maurizio Salvadori

email: maurizio.salvadori1@gmail.com



TABELLA 1 - Benefici e limiti dell'uso del DNA del donatore nel ricevente

| Potenziali benefici | Limiti ed errori |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biomarcatore non invasivo | Possibili errori dovuti alla copresenza di DNA del ricevente insieme al DNA del donatore |
| Applicabile a tutti gli organi solidi | Spesso non è diagnostico per rigetto dovuto a cellule T |
| Un incremento si può avere anche 30 giorni prima della comparsa di danni istologici | Elevato anche in patologie diverse dal rigetto |
| L'assoluta quantificazione del DNA del donatore non è influenzata da modifiche del DNA del ricevente | L'uso non è raccomandabile nel periodo precoce post-trapianto |
| Evita l'impiego di biopsie protocollari | Non è raccomandabile l'uso nelle 24 ore post-biopsia |
| Evita l'uso di biopsie non necessarie | In gravidanza fornisce risultati ambigui |
| Diagnosi non invasiva di rigetto mediato da anticorpi | Possibile confusione nei ritrapianti e nei trapianti multiorgano |
| Valutazione dell'efficacia di una terapia antirigetto | |
| Indicatore per il trattamento farmacologico del rigetto cronico attivo | |

Due recenti meta-analisi hanno comunque ben documentato l'importanza del DNA del donatore nella diagnosi di rigetto (4,5). In entrambe le meta-analisi è ben documentato che i livelli di DNA del donatore sono significativamente più elevati nei pazienti con rigetto mediato da anticorpi, mentre tale significatività non si ha nel rigetto mediato da cellule T. Una spiegazione di questo fatto è che nel rigetto mediato da anticorpi si ha un danno della micro-vascolatura con liberazione di DNA dall'endotelio (6), mentre il rigetto mediato da cellule T è essenzialmente un danno interstiziale in assenza di lesioni endoteliali (7).

Il DNA del donatore, oltre a essere diagnostico, ha anche valore prognostico ed è stato documentato come pazienti con elevati livelli di DNA del donatore abbiano un più elevato rischio di cattiva evoluzione del trapianto sul lungo termine (8,9). Una riduzione del filtrato glomerulare, lo sviluppo di anticorpi donatore specifici e la recidiva di rigetto sono maggiori nei pazienti con elevati livelli di DNA del donatore, come documentato nella Tabella 2.

In uno studio chiamato ADMIRAL sono stati studiati 1.094 pazienti (10). È stato eseguito un controllo del DNA del donatore per tre anni dopo il trapianto; inoltre sono state monitorizzate la comparsa di anticorpi contro il donatore, l'evoluzione del filtrato glomerulare e la comparsa di rigetti. Lo studio ADMIRAL ha confermato che livelli di DNA persistentemente elevati sono associati a una riduzione del filtrato > 25% nell'arco di tre anni, allo sviluppo di anticorpi contro il donatore e alla più frequente comparsa di rigetti anche subclinici.

In conclusione, il DNA del donatore presente nel ricevente ha certamente importanti benefici, ma anche limiti fra i quali quello di non distinguere spesso rigetti mediati da cellule T e il fatto di poter essere elevato in patologie diverse dal rigetto acuto.

Diversi studi hanno riconosciuto l'importanza del profilo genico nella diagnostica della flogosi precoce e del rigetto subclinico dopo trapianto renale.

Profilo dell'espressione genica come biomarcatore

Il profilo dell'espressione genica sia nelle urine che in circolo può essere significativo per la diagnosi di rigetto acuto. Lo studio CTOT-04 (11) ha documentato come il profilo di 3 particolari geni nei campioni urinari sia capace di svelare reazioni di rigetto. Parimenti, lo studio CTOT-01 (12) ha documentato come la presenza nelle urine della proteina CXCL9 di derivazione genica sia indicativa di rigetto. Lo studio successivo CTOT-08 (13), analizzando l'espressione genica di 120 geni, ha documentato come l'aumento o la riduzione di questi era in grado di distinguere soggetti con trapianto ben funzionante da soggetti con rigetto subclinico. Uno studio genico particolarmente importante è stato quello di Zhang et al. (14) che, in 191 pazienti trapiantati di rene, ha individuato un profilo di 17 geni che è in grado di documentare un rigetto subclinico con elevata significatività. La Tabella 3 riporta i geni con la loro significatività.

TABELLA 2 - I Pazienti con DNA > 0,5% sono a maggior rischio dei pazienti con DNA < 0,5%

| | Statistica | Basso DNA (< 0,5%) | Elevato DNA (> 0,5%) | p |
|------------------------------------|------------|--------------------|----------------------|-----------|
| Livello di DNA | Media | 0,25 | 1,76 | |
| % Modificazioni del filtrato | Media | -0,40 | -8,64 | 0,004 |
| Presenza di atc contro il donatore | | 1/37 (2,7%) | 17/42 (40,5%) | < 0,00001 |
| Ricorrenza di rigetto | | 0/37 (0,0%) | 9/42 (21,4%) | 0,0028 |



TABELLA 3 - Set di 17 geni per la diagnostica del rigetto acuto

| Simbolo | Sequenza | Nome | p |
|-----------|--------------|------------------------------------------------------------|---------|
| ZMAT1 | NM_001011657 | Zinc finger, matrin type 1 | 0,01 |
| ETA A1 | NM_019002 | Ewing tumor, associated antigen 1 | 0,04 |
| ZNF493 | NM_001076678 | Zinc finger protein 493 | 0,002 |
| CCDC82 | NM_024725 | Coiled-coil domain containing 82 | 0,02 |
| NFYB | NM_006166 | Nuclear transcription factor Y, β | 0,03 |
| SENP7 | NM_001077203 | SUNO1/sentrin specific peptidase 7 | < 0,001 |
| CLK1 | NM_001162407 | CDC-like kinase 1 | 0,01 |
| SENP6 | NM_001100409 | SUMO1/sentrin specific peptidase 6 | 0,01 |
| C1GALT1C1 | NM_001011551 | C1GALT1C1-specific chaperone 1 | 0,01 |
| SPCS3 | NM_021928 | Signal peptidase complex subunit 3 homolog (6, cerevisiae) | 0,03 |
| MAP1A | NM_002373 | Microtubule-associated protein 1 A | 0,01 |
| EFTUD2 | NM_001142605 | Elongation factor Tu GTP binding domain containing 2 | 0,001 |
| AP1M1 | NM_001130524 | Adaptor-related protein complex 1, mu 1 subunit | > 0,001 |
| ANXA5 | NM_001154 | Annexin A5 | < 0,001 |
| TSC22D1 | NM_001243797 | TSC22 domain family, member 1 | 0,01 |
| F13A1 | NM_000129 | Coagulation factor XIII, A1 polypeptide | 0,02 |
| TUBB1 | NM_030773 | Tubulin, β 1 class VI | 0,03 |

Forse il più importante studio mediante la valutazione del profilo genico è il TruGraf, che è un algoritmo che utilizza l'espressione genica di 120 geni (15). Un importante studio che ha utilizzato il TruGraf è stato condotto in modo prospettico in 240 pazienti trapiantati di rene (16). La coesistenza di molti dei 120 geni era associata a un peggioramento degli aspetti istologici con un ridotto filtrato glomerulare e con una maggiore perdita dell'organo trapiantato. È stata utilizzata anche la combinazione del profilo dell'espressione genica con il reperto di più elevate quantità del DNA del donatore (17). I due metodi usati insieme assumono un più elevato valore diagnostico nella diagnostica del rigetto subclinico. In particolare il profilo genico è più efficace nella diagnostica del rigetto cellulare, mentre i livelli di DNA del donatore sono più efficaci nella diagnostica del rigetto mediato da anticorpi.

Profilo dell'RNA urinario nella diagnostica del rigetto

Anche lo studio del profilo dell'RNA urinario ha dimostrato di essere un biomarcatore utile nella diagnostica precoce del rigetto del trapianto renale.

Aumentati livelli di mRNA perforina e di mRNA granzyme sono presenti nelle urine in corso di rigetto acuto (18).

In un altro studio (19) è stato studiato l'RNA messaggero in 485 pazienti trapiantati ed è stato documentato che nelle cellule urinarie i livelli di mRNA di CD ϵ perforina, di proteina 10 interferone inducibile (IP-10) di 18SrRNA erano diagnostici per rigetto acuto.

Anche i livelli di mRNA per *FOXP3* e per CD25 erano diagnostici per rigetto acuto in un altro studio (20). L'utilità delle citochine urinarie per la diagnostica del rigetto acuto è tuttavia discussa. Uno studio francese (21) e uno studio

recente (22) non hanno documentato in effetti l'utilità del monitoraggio citochinico urinario nella diagnostica del rigetto.

In conclusione, il profilo urinario dell'RNA sembra importante nella diagnostica del rigetto. Di particolare utilità sembrano la perforina, il granzyme B e IP-10, mentre sono discussi CXCL9 e CXCL10.

In conclusione, molteplici nuovi biomarcatori non invasivi stanno cambiando la facilità e la rapidità nella diagnostica del rigetto e permettono un più precoce ed efficace trattamento con gli immunosoppressori.

Disclosures

Conflict of interest: The Authors declare no conflict of interest.

Financial support: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bibliografia

1. Anglicheau D, Naesens M, Essig M, Gwinner W, Marquet P. Establishing Biomarkers in Transplant Medicine: A Critical Review of Current Approaches. *Transplantation*. 2016;100(10):2024-2038. [CrossRef PubMed](#)
2. Gielis EM, Ledeganck KJ, De Winter BY, et al. Cell-Free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15(10):2541-2551. [CrossRef PubMed](#)
3. Graver AS, Lee D, Power DA, Whitlam JB. Understanding Donor-derived Cell-free DNA in Kidney Transplantation: An Overview and Case-based Guide for Clinicians. *Transplantation*. 2023;107(8):1675-1686. [CrossRef PubMed](#)
4. Wijtvlit VPWM, Plaeke P, Abrams S, et al. Donor-derived cell-free DNA as a biomarker for rejection after kidney

- transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transpl Int.* 2020;33(12):1626-1642. [CrossRef PubMed](#)
5. Xiao H, Gao F, Pang Q, et al. Diagnostic Accuracy of Donor-derived Cell-free DNA in Renal-allograft Rejection: A Meta-analysis. *Transplantation.* 2021;105(6):1303-1310. [CrossRef PubMed](#)
 6. Lefaucheur C, Loupy A. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med.* 2018;379(26):2580-2582. [PubMed](#)
 7. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant.* 2018;18(2):293-307. [CrossRef PubMed](#)
 8. Stites E, Kumar D, Olaitan O, et al. High levels of dd-cfDNA identify patients with TCMR 1A and borderline allograft rejection at elevated risk of graft injury. *Am J Transplant.* 2020;20(9):2491-2498. [CrossRef PubMed](#)
 9. Cooper JE, Gralla J, Chan L, Wiseman AC. Clinical significance of post kidney transplant de novo DSA in otherwise stable grafts. *Clin Transpl.* 2011;35:359-364. [PubMed](#)
 10. Bu L, Gupta G, Pai A, et al. Clinical outcomes from the Assessing Donor-derived cell-free DNA Monitoring Insights of kidney Allografts with Longitudinal surveillance (ADMIRAL) study. *Kidney Int.* 2022;101(4):793-803. [CrossRef PubMed](#)
 11. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, et al; Clinical Trials in Organ Transplantation 04 (CTOT-04) Study Investigators. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *Transplantation.* 2012;93:1136-1146.
 12. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, et al; CTOT-01 consortium. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant.* 2013;13(10):2634-2644. [CrossRef PubMed](#)
 13. Friedewald JJ, Kurian SM, Heilman RL, et al; Clinical Trials in Organ Transplantation 08 (CTOT-08). Development and clinical validity of a novel blood-based molecular biomarker for subclinical acute rejection following kidney transplant. *Am J Transplant.* 2019;19(1):98-109. [CrossRef PubMed](#)
 14. Zhang W, Yi Z, Keung KL, et al. A Peripheral Blood Gene Expression Signature to Diagnose Subclinical Acute Rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(8):1481-1494. [CrossRef PubMed](#)
 15. Marsh CL, Kurian SM, Rice JC, et al. Application of TruGraf v1: A Novel Molecular Biomarker for Managing Kidney Transplant Recipients With Stable Renal Function. *Transplant Proc.* 2019;51(3):722-728. [CrossRef PubMed](#)
 16. Heilman RL, Fleming JN, Mai M, et al. Multiple abnormal peripheral blood gene expression assay results are correlated with subsequent graft loss after kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2023;37(8):e14987. [CrossRef PubMed](#)
 17. Park S, Guo K, Heilman RL, et al. Combining Blood Gene Expression and Cellfree DNA to Diagnose Subclinical Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021;16(10):1539-1551. [CrossRef PubMed](#)
 18. Li B, Hartono C, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med.* 2001;344(13):947-954. [CrossRef PubMed](#)
 19. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, et al; Clinical Trials in Organ Transplantation 04 (CTOT-04) Study Investigators. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med.* 2013;369(1):20-31. [CrossRef PubMed](#)
 20. Ho J, Wiebe C, Gibson IW, Rush DN, Nickerson PW. Immune monitoring of kidney allografts. *Am J Kidney Dis.* 2012;60(4):629-640. [CrossRef PubMed](#)
 21. Tinel C, Devresse A, Vermorel A, et al. Development and validation of an optimized integrative model using urinary chemokines for noninvasive diagnosis of acute allograft rejection. *Am J Transplant.* 2020;20(12):3462-3476. [CrossRef PubMed](#)
 22. Hirt-Minkowski P, Handschin J, Stampf S, et al. Randomized Trial to Assess the Clinical Utility of Renal Allograft Monitoring by Urine CXCL10 Chemokine. *J Am Soc Nephrol.* 2023;34(8):1456-1469. [CrossRef PubMed](#)