



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
DIPARTIMENTO DI *SALUTE DELLA DONNA E DEL
BAMBINO*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA
DELLO SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE
SANITARIA

INDIRIZZO di ONCO-EMATOLOGIA, GENETICA, MALATTIE
RARE e MEDICINA PREVENTIVA
CICLO: XXXI°

**INDIVIDUAZIONE DI UN POTENZIALE PROFILO DI
miRNA PREDITTIVI DI RIGETTO SUBCLINICO IN
PAZIENTI PEDIATRICI TRAPIANTATI DI RENE**

Tesi redatta con il contributo finanziario dell'associazione il Sogno di Stefano

Coordinatore: Ch.mo Prof. Carlo Giaquinto

Supervisore: Dott.ssa Luisa Murer

Co-Supervisore: Dott.ssa Susanna Negrisolò

Dottorando: Andrea Carraro

INDICE

Pag.

1. ABSTRACT	5
2. ABSTRACT (Inglese)	8
3. INTRODUZIONE	11
3.1 Il trapianto di rene in età pediatrica	12
3.2 Il Rigetto nel trapianto di rene	14
3.2.1 <u>Indici di funzionalità renale</u>	14
3.2.2 <u>La biopsia renale</u>	15
3.2.3 <u>ABMR (Antibody mediated rejection)</u>	17
3.2.4 <u>TCMR (T-cell mediated rejection)</u>	18
3.3 Il Rigetto subclinico	19
3.4 La biopsia renale di protocollo	19
3.5 Anticorpi anti-HLA DSA	20
3.6 Biomarcatori di danno renale	25
3.6.1 <u>I microRNA</u>	25
3.6.2 <u>Le vescicole extracellulari</u>	29
4. SCOPO	34
5. MATERIALI E METODI	36
5.1 Selezione e arruolamento pazienti	37
5.2 Modalità di raccolta e conservazione dei campioni	37
5.3 Disegno dello studio	38
5.4 STUDIO RETROSPETTIVO	39
5.4.1 Creazione e compilazione database trapianti	39
5.4.2 Schema riassuntivo degli esperimenti	41
5.4.3 Isolamento vescicole extracellulari sieriche	42
5.4.4 Estrazione RNA totale da tessuto bioptico e da EVs sieriche	43

5.4.5	Valutazione qualitativa e quantitativa dei miRNA estratti	44
5.4.6	NGS sequencing	47
5.4.6.1	<u>Schema riassuntivo del sequenziamento NGS</u>	48
5.4.6.2	<u>SMARTer smRNA-Seq: Poliadenilazione</u>	48
5.4.6.3	<u>SMARTer smRNA-Seq: Sintesi del cDNA</u>	49
5.4.6.4	<u>SMARTer smRNA-Seq: PCR e Cleanup</u>	50
5.4.6.5	<u>Validazione delle Librerie</u>	51
5.4.6.6	<u>Sequenziamento</u>	53
5.5	Analisi bioinformatica e statistica dei dati	55
5.5.1	<u>Read trimming</u>	55
5.5.2	<u>miRBase</u>	55
5.5.3	<u>Analisi statistica</u>	55
6	RISULTATI	57
6.1	Compilazione del database	58
6.2	Qualità e concentrazione dei miRNA	59
6.3	miRNA identificati nei tessuti	60
6.4	miRNA identificati nel siero	63
7	DISCUSSIONE e CONCLUSIONI	64
8.	PROSPETTIVE FUTURE	73
8.1	MATERIALI E METODI	73
8.1.1	Preparazione dei campioni urinari	74
8.1.2	Isolamento delle vescicole extracellulari urinarie (uEVs)	74
8.1.2.1	<u>Norgen Urine Exosome RNA Isolation Kit (modificato)</u>	74
8.1.2.2	<u>ExoQuick-TC™ Exosome Precipitation Solution</u>	74
8.1.2.3	<u>Qiagen exoEasy Maxi Kit</u>	75
8.1.2.4	<u>Ultracentrifugazione con filtri Amicon® filter</u>	75

8.1.2.5	<u>Izon qEVsingle Size Exclusion Column</u>	75
8.1.3	Purificazione delle uEVs	76
8.1.4	Quantificazione della frazione proteica vescicolare	76
8.1.5	Caratterizzazione delle uEVs: quantità e dimensioni	76
8.2	RISULTATI	77
8.2.1	Messa a punto di un sistema efficace di estrazione delle vescicole extracellulari da urine	77
8.2.2	Conclusioni	79
9.	BIBLIOGRAFIA	81

1. ABSTRACT

Il trapianto di rene rappresenta il trattamento ottimale per la cura dell'insufficienza renale terminale. La sopravvivenza dell'organo trapiantato nei pazienti pediatrici mostra un tasso percentuale a 5 anni del 83% nel caso di donatore vivente, e del 70%, nel caso di donatore cadavere.

La causa principale di disfunzione del *graft* con conseguente perdita è il rigetto renale. Sebbene la terapia immunosoppressiva abbia ridotto l'insorgenza di rigetto, la durata dell'organo trapiantato può ancora essere migliorata, considerando le aspettative di vita di un bambino. Attualmente la procedura standard usata per la diagnosi dello stato di salute del rene trapiantato è l'ago-biopsia renale, anche se rimane comunque una pratica invasiva per il paziente con possibile insorgenza, seppure in rari casi, di complicanze come infezioni o sanguinamento. Inoltre, la biopsia renale risulta utile nel monitoraggio del trapianto, ma non riesce a evitare l'insorgenza di danno istologico.

L'interesse verso nuovi possibili biomarcatori utili nella prevenzione del rigetto renale è tutt'ora rilevante. Tra i possibili candidati troviamo i microRNA (miRNA), corte sequenze di RNA non codificante lunghe 21 - 23 nt, coinvolti nella regolazione di diverse vie di segnalazione post-trascrizionali. I miRNA sono coinvolti in diversi processi come la sopravvivenza cellulare, lo sviluppo, la differenziazione, la proliferazione, e la modulazione della risposta immunitaria. A livello renale, sembrano avere un coinvolgimento nella regolazione dello sviluppo, in diversi processi fisiologici e patologici. Diversi studi hanno dimostrato come l'espressione dei miRNA possa variare nei fluidi biologici e in campioni tissutali di adulti trapiantati di rene. Per questo motivo, i miRNA sono attualmente studiati come

possibili marker diagnostici/prognostici e potenziali targets terapeutici nel trapianto di rene.

Un'altra interessante risorsa di biomarker di rigetto renale, sembrano essere le vescicole extracellulari (EVs). Le EVs sono nanoparticelle sferiche costituite da strato fosfolipidico e rilasciate da tutte le tipologie cellulari. Queste particelle possono agire sulle cellule bersaglio in diversi modi, inclusa la stimolazione cellulare, il trasferimento di proteine, lipidi e materiale genetico, come RNA messaggero (mRNA) e miRNA, interagendo anche a lunga distanza.

Basandoci su questi dati si è deciso di effettuare uno studio retrospettivo dei miRNA espressi in campioni bioptici e vescicolari sierici di pazienti pediatrici trapiantati. In particolare, è stato selezionato un gruppo di 20 pazienti, 10 con diagnosi istologica normale (CONT) e 10 con diagnosi di rigetto renale subclinico (SCR), ad 1 anno dal trapianto. La frazione di miRNA ottenuta aveva un *range* di concentrazione di 0,7 – 7 ng/ μ l nei campioni di tessuto renale e di 0,06 – 0,52 ng/ μ l nei campioni vescicolari. I miRNA estratti sono stati sequenziati con tecnologia NGS. I risultati dell'analisi statistica post sequenziamento hanno evidenziato 5 miRNA (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-101-3p, miR-106b-3p and miR-185-5p) significativamente sovraespressi nei campioni tissutali di pazienti SCR (p-value <0,05), mentre lo stesso *trend* non è osservabile nelle EVs sieriche. Anche se i campioni vescicolari non hanno sottolineato differenze d'espressione dei miRNA statisticamente significative, nel *pool* identificato tramite sequenziamento sono stati rilevati 4 dei 5 miRNA sovraespressi nei tessuti dei CONT (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-101-3p and miR-185-5p).

Sarebbe interessante proseguire la ricerca verificando gli stessi miRNA anche in campioni di EVs urinarie di pazienti pediatrici

trapiantati di rene. Infine, questo studio può contribuire ad ottenere un test di laboratorio pratico e utile nella predizione d'insorgenza di rigetto renale in pazienti pediatrici e migliorare la terapia personalizzata.

2. ABSTRACT (Inglese)

Kidney transplantation represents the optimal treatment for renal failure. The survival kidney graft rates about 83% (deceased donor) and 70% (living donor) in the pediatric transplanted patients at five years post transplantation.

The major cause of the delayed graft function and loss of the kidney is the rejection. Although the immunosuppressive therapy has reduced the onset of rejection, the endurance of the graft could further be improved, considering the life expectancy of a child. Currently, the standard procedure used in the diagnosis is the renal needle biopsy. Though the incidence of serious complications it has been reduced, needle biopsy remains an invasive practice for the patients and could lead to different risks such as infection or bleeding. Furthermore, kidney biopsy it is useful to improve kidney monitoring, however it does not avoid the histological damage.

The interest in new possible biomarkers useful in the prevention of kidney rejection is still notable. Among all the possible candidates, they have been identified the microRNAs (miRNAs), short noncoding RNA sequence of about 21 – 23 nucleotide long, involved in the mediation of several post transcriptional pathways. The miRNAs are involved in different processes such as cellular survival, development, differentiation, proliferation as well as to modulate the immunity. In the kidney, they seem to be involved in the regulation of renal development and in various physiological and pathological processes. Different studies have shown how the expression of miRNAs may change in biologic fluids and tissues in adult kidney transplanted patients. Therefore, miRNAs are currently being investigated as diagnostic/prognostic markers and possible therapeutic targets in kidney transplantation.

Another interesting source of biomarkers in the kidney rejection, it seems to be extracellular vesicles. Extracellular vesicles (EVs) are lipid bound nanoparticles release from all cell type. These particles act on target cells in different ways, including cell stimulation, transfer of proteins, lipids, genetic material, such as messenger RNA (mRNA) and miRNAs, to target cells, interacting even at a long distance.

Based on these evidences, we performed a retrospective miRNA screening on biopsies and serum extracellular vesicles samples of pediatric transplanted patients. Particularly, we selected a pool of twenty patients, 10 without histological diagnosis of rejection (CONT) and 10 with histological diagnosis of subclinical rejection (SCR), at 1-year post transplantation. The miRNAs fraction showed a different range of concentration between tissue samples (0,7 e 7 ng/ μ l) and vesicles samples (0,06 e 0.52 ng/ μ l). The different levels of concentration are probably due to the isolation method of the vesicles, leading to a high dilution of the samples (resulting in the loss of a miRNA fraction). The miRNAs extracted were subsequently sequenced by NGS technology. The results of post-sequencing statistical analysis have highlighted five miRNAs (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-101-3p, miR-106b-3p and miR-185-5p) significantly overexpressed on tissue' samples of SCR patients (p-value <0.05%), whereas the same trend is not observed in serum EVs. Although the EVs samples did not show a different statistical expression of miRNAs, in the pool of vesicles, four out of the five miRNAs (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-101-3p e miR-185-5p) expressed in the tissues of SCR patients, they were found.

It would be interesting to continue the research by checking the same miRNAs also in urinary EVs samples from pediatric transplanted kidney patients. Finally, this study could contribute to obtain a new

laboratory test, useful to predict the onset of kidney rejection in pediatric patients and ameliorate the medical personalized therapy.

3. INTRODUZIONE

3.1 Il trapianto di rene in età pediatrica

Le malattie renali con evoluzione in insufficienza renale cronica terminale (ESRD) rappresenta una delle maggiori cause di grave morbidità e rischio di mortalità in età infantile e pediatrica (0-18 anni). Infatti ogni anno 5 bambini su 10 affetti da malattie renali progrediscono verso lo stadio di ESRD aumentando il rischio di mortalità di 30 volte rispetto alla popolazione pediatrica generale [1]. Allo stesso modo i dati dell'*United States Renal Data System* evidenziano come 1 paziente pediatrico su 65000 sani sviluppi ESRD. Attualmente il metodo elettivo per il trattamento dell'insufficienza renale terminale è il trapianto di rene da donatore cadavere e/o vivente. I dati di letteratura mostrano infatti come il trapianto renale permetta una maggior longevità e qualità di vita per i pazienti pediatrici affetti da malattia renale, rispetto agli stessi sottoposti a trattamento dialitico. Negli ultimi anni alcuni studi hanno messo in luce come il trapianto di rene *preemptive*, ossia trapianto di rene preventivo (senza un pregresso trattamento dialitico), riscontri risultati migliori sulla sopravvivenza sia del paziente che dell'organo trapiantato. Tra i vantaggi emersi dai dati su pazienti pediatrici trapiantati *preemptive* vanno considerati: la riduzione nel numero di trasfusioni pre trapianto, il miglioramento della "sopravvivenza" dell'organo a lungo termine, la riduzione dei casi di *delayed graft function* post operatori e una notevole riduzione di insorgenza di rigetti acuti [2, 3, 4]. Oltre a ciò va considerata la ridotta età media dei riceventi in ambito pediatrico, sottolineando come l'intervento *preemptive* venga di solito preferito per evitare le possibili complicanze dovute al trattamento dialitico. Il riconoscimento effettivo dei benefici apportati dal trapianto *preemptive* è dimostrato da un incremento generale nella sua pratica in ambito trapiantologico renale, mostrando tassi percentuali compresi tra il 9% e il 21% degli interventi sul totale di pazienti trapiantati di rene [5, 6].

Come specificato sopra quindi il trapianto renale risulta la migliore strategia terapeutica per contrastare l'insufficienza renale terminale. A partire dal primo trapianto di rene eseguito da Joseph Murray nel 1954 sono stati compiuti molti progressi, soprattutto in ambito medico post trapiantologico, migliorando i *target* terapeutici immunosoppressivi. L'iniziale terapia post trapianto eseguita fino agli anni '80 prevedeva la combinazione di glucocorticoidi ed azatioprina con una sopravvivenza media del ricevente del 50%. In seguito a partire dagli anni '90 lo sviluppo farmacologico ha portato ad un aumento progressivo della sopravvivenza dei pazienti. Tra i farmaci che più hanno caratterizzato l'ambito trapiantologico renale e che ancora oggi sono essenziali nel trattamento post intervento vanno menzionati: il tacrolimus (TAC), il micofenolato mofetile, alcuni importanti agenti biologici anticorpali come le ATG, il basiliximab, l'everolimus, il sirolimus, il rituximab e l'eculizumab (diffusi a partire dagli anni 2000). L'impiego di questi farmaci ha minimizzato il rischio di rigetto acuto aumentando i tassi di sopravvivenza ad 1 anno, con percentuali superiori al 90%. Nonostante questi innumerevoli progressi la medicina ad oggi non ha chiarito ancora completamente tutte le cause che portano alla perdita dell'organo trapiantato, né attualmente è possibile preservare la "salute" del *graft* per tutta la vita nel ricevente. Queste considerazioni fanno riflettere e sono di particolare importanza in ambito pediatrico, considerando la vita media presunta dei pazienti. Attualmente i dati raccolti sulla popolazione pediatrica internazionale, sottoposta a trapianto di rene, mostrano tassi di sopravvivenza dell'organo del 85% a 10 anni post trapianto con una diminuzione progressiva fino al 65% a 20 anni post intervento [7].

3.2 Il Rigetto nel trapianto di rene

La principale causa di perdita dell'organo trapiantato (circa nel 60% dei casi) è il rigetto, una risposta immunitaria esacerbata da parte del corpo del ricevente nei confronti dell'organo che viene riconosciuto come “*non self*” (elemento estraneo al corpo e quindi da eliminare) dall'organismo stesso. Il rigetto del rene trapiantato si manifesta clinicamente con aumento della creatinina sierica, azotemia e riduzione del filtrato glomerulare (e-GFR) associato a proteinuria e in alcuni casi ematuria. Le manifestazioni cliniche però evidenziano già un rigetto in corso, con danno renale conclamato, quindi risulta necessario identificare precocemente la possibile insorgenza di danno renale da rigetto, per permettere il mantenimento del *graft*.

3.2.1 Indici di funzionalità renale

Storicamente, il primo marker adottato in ambito nefrologico per il monitoraggio della funzionalità renale è stato il dosaggio dell'urea. In particolare, risale al 1827 (Richard Bright) il primo studio di correlazione tra l'accumulo di urea ematica e la sua diminuzione nelle urine in individui con malattie renali [8]. Agli inizi del '900 la valutazione della funzionalità renale iniziò ad essere monitorata tramite il BUN test (*Blood Urea Nitrogen test*) il quale venne successivamente sostituito (a metà secolo) dal dosaggio della creatinina sierica. Quest'ultimo risulta il test più diffuso per la valutazione della velocità di filtrazione glomerulare stimata (e-GFR) [9, 10]. La stima dell'e-GFR è stata perfezionata negli anni attraverso lo sviluppo di formule di calcolo che valutino diverse variabili individuali come altezza, peso, età e sesso. Attualmente le principali formule di calcolo della e-GFR sono: la formula di *Schwartz*, la formula MDRD, la CKD-EPI e la formula di *Cockcroft-gault*. In ambito pediatrico la più diffusa è la formula di *Schwartz* (filtrazione glomerulare: $e\text{-GFR} = [k * \text{altezza}] / \text{Creatinina}$) la quale, oltre ad

altezza e creatinina, valuta tramite la costante k le variabili peso e sesso del paziente. Le altre tre formule, la MDRD, la CKD-EPI la formula di *Cockcroft-gault* vengono usate principalmente per il calcolo della e-GFR nell'adulto a partire dalla fine della fase adolescenziale (circa 19 anni di età). Ad oggi il dosaggio della creatinina sierica unito alla valutazione della e-GFR, rappresentano il *gold standard* per la valutazione clinica della funzionalità renale. Tuttavia questi indici non risultano essere degli indicatori completi né totalmente perfetti di valutazione della "salute" renale a causa della loro notevole variabilità al variare di diversi fattori tra cui: la dieta del paziente, la sua massa muscolare e il metabolismo, il genere, i farmaci, lo stato di idratazione [11] e le possibili variabili fisiopatologiche connesse alla situazione clinica personale. Va inoltre aggiunto che questi indicatori non sono predittivi o prognostici di insorgenza di danno renale in quanto le loro alterazioni sono manifestazioni cliniche di un danno nefrologico già in atto.

3.2.2 La biopsia renale

La biopsia renale è la tecnica d'elezione per la diagnosi del rigetto e il trattamento delle nefropatie (principale causa di rigetto). Può essere effettuata in fase acuta come conferma istologica, o programmata (biopsia di protocollo) ai follow-up, per l'identificazione del rigetto subclinico. Questa pratica consiste nel prelievo di uno o più frustoli di tessuto renale tramite ago, sotto guida ecografica e in ambito pediatrico in sedazione profonda.

L'indicazione all'esecuzione varia in base al centro medico, in presenza di un alterato quadro clinico (aumento dei livelli ematici di creatinina, urea e della e-GFR). La diagnosi della biopsia renale viene eseguita basandosi sulle linee guida internazionali della classificazione di Banff. Questa classificazione, considera le diverse caratteristiche morfologiche, istologiche, citologiche e immunologiche

del tessuto renale del trapianto. Tali criteri di diagnosi vennero introdotti per la prima volta durante il *meeting* internazionale sulle patologie renali post trapianto, tenuto a Banff, in Canada, il 2-4 agosto del 1991 [12]. Da allora la *Banff classification* viene periodicamente aggiornata per permettere una diagnosi il più possibile dettagliata ed efficace per migliorare i target terapeutici.

Di seguito viene riportata la revisione della classificazione di Banff 2015 (Tabella 1) [13].

Category 1: Normal biopsy or nonspecific changes

Category 2: Antibody-mediated changes

Acute/active ABMR

All three features must be present for diagnosis. Biopsies showing histological features plus evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium or DSA, but not both, may be designated as suspicious for acute/active ABMR. Lesions may be clinically acute or smoldering or may be subclinical; it should be noted if the lesion is C4d-positive or C4d-negative, based on the following criteria:

1 Histologic evidence of acute tissue injury, including one or more of the following:

- Microvascular inflammation (g >0 in the absence of recurrent or *de novo* glomerulonephritis, and/or ptc >0)
- Intimal or transmural arteritis (v >0)¹
- Acute thrombotic microangiopathy in the absence of any other cause
- Acute tubular injury in the absence of any other apparent cause

2 Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following:

- Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections or C4d >0 by IHC on paraffin sections)
- At least moderate microvascular inflammation ((g + ptc) ≥2), although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection; ptc ≥2 alone is not sufficient, and g must be ≥1
- Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated

3 Serologic evidence of DSAs (HLA or other antigens)

- Biopsies suspicious for ABMR on the basis of meeting criteria 1 and 2 should prompt expedited DSA testing

Chronic active ABMR²

All three features must be present for diagnosis. As with acute/active ABMR, biopsies showing histological features plus evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium or DSA, but not both, may be designated as suspicious, and it should be noted if the lesion is C4d-positive or C4d-negative, based on the criteria listed:

1 Histologic evidence of chronic tissue injury, including one or more of the following:

- TG (cg >0), if no evidence of chronic thrombotic microangiopathy; includes changes evident by EM only (cg1a; Table 4)
- Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (requires EM)³
- Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes; leukocytes within the sclerotic intima favor chronic ABMR if there is no prior history of biopsy-proven TCMR with arterial involvement but are not required

2 Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following:

- Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d >0 by IHC on paraffin sections)
- At least moderate microvascular inflammation ((g + ptc) ≥2), although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, ptc ≥2 alone is not sufficient and g must be ≥1
- Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated

3 Serologic evidence of DSAs (HLA or other antigens):

- Biopsies suspicious for ABMR on the basis of meeting criteria 1 and 2 should prompt expedited DSA testing

C4d staining without evidence of rejection

All three features must be present for diagnosis⁴

1 Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d >0 by IHC on paraffin sections)

2 g = 0, ptc = 0, cg = 0 (by light microscopy and by EM if available), v = 0; no TMA, no peritubular capillary basement membrane multilayering, no acute tubular injury (in the absence of another apparent cause for this)

3 No acute cell-mediated rejection (Banff 1997 type 1A or greater) or borderline changes

Category 3: Borderline changes

Suspicious for acute TCMR

- Foci of tubulitis (t1, t2, or t3) with minor interstitial inflammation (i0 or i1) or interstitial inflammation (i2, i3) with mild (t1) tubulitis; retaining the i1 threshold for borderline from Banff 2005 is permitted although this must be made transparent in reports and publications
- No intimal arteritis (v = 0)

Category 4: TCMR	
Acute TCMR Grade	IA. Significant interstitial inflammation (>25% of nonsclerotic cortical parenchyma, i2 or i3) and foci of moderate tubulitis (t2) IB. Significant interstitial inflammation (>25% of nonsclerotic cortical parenchyma, i2 or i3) and foci of severe tubulitis (t3) IIA. Mild to moderate intimal arteritis (v1) with or without interstitial inflammation and tubulitis IIB. Severe intimal arteritis comprising >25% of the luminal area (v2) with or without interstitial inflammation and tubulitis III. Transmural arteritis and/or arterial fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells with accompanying lymphocytic inflammation (v3)
Chronic active TCMR	Chronic allograft arteriopathy (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell infiltration in fibrosis, formation of neointima); note that such lesions may represent chronic active ABMR as well as TCMR; the latter may also be manifest in the tubulointerstitial compartment
Category 5: Interstitial fibrosis and tubular atrophy	
Grade	I. Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy (≤25% of cortical area) II. Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy (26–50% of cortical area) III. Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy (>50% of cortical area)
Category 6: Other changes	not considered to be caused by acute or chronic rejection BK virus nephropathy Posttransplant lymphoproliferative disorders Calcineurin inhibitor nephrotoxicity Acute tubular injury Recurrent disease <i>De novo</i> glomerulopathy (other than transplant glomerulopathy) Pyelonephritis Drug-induced interstitial nephritis

Tabella 1: In tabella vengono riportate le categorie secondo la Classificazione Banff 2015. Categoria 1) Non sono evidenti cambiamenti del tessuto renale, biopsia “normale” o Banff 1. Categoria 2) Sono evidenti cambiamenti del tessuto renale mediati da anticorpi: *acute/active ABMR* o rigetto anticorpo mediato acuto, *chronic active ABMR* o rigetto anticorpo mediato cronico, positività per c4d senza presenza di rigetto. Categoria 3) Le caratteristiche del campione sono borderline tra una condizione “normale” e patologica: sospetto di *TCMR (T-Cell mediated rejection)* rigetto mediato da cellule T. Categoria 4) *TCMR (T-Cell mediated rejection)* rigetto mediato da cellule T acuto o cronico. Categoria 5) *IF-TA (Interstitial fibrosis and tubular atrophy)* fibrosi interstiziale e atrofia tubulare. Categoria 6) Questa categoria riguarda tutti i cambiamenti rilevabili nel campione biotipico la cui causa non è riconducibile ad una delle categorie precedenti.

Secondo le linee guida di Banff 2015 è dunque possibile identificare due principali categorie di rigetto: *ABMR (Antibody mediated rejection)* o rigetto anticorpo mediato e il *TCMR (T-cell mediated rejection)*, entrambi di natura cronica o acuta,

3.2.3 ABMR (Antibody mediated rejection)

Il rigetto umorale o anticorpo mediato, è caratterizzato da danni a carico dell’endotelio vascolare e dalla presenza o meno a livello ematico di anticorpi donatore specifici (DSA) anti-HLA o non. Il quadro istologico che si presenta è diverso tra ABMR acuto o cronico. Nel primo caso si osservano note di capillarite peritubulare, glomerulite e positività per il marcatore C4d; nel secondo caso si osserva una progressiva transizione endoteliale con aumento della

produzione di collagene, conseguente deposito a livello interstiziale e alterazione della normale struttura parenchimale (Figura 1A).

3.2.4 TCMR (*T-cell mediated rejection*)

In questo tipo di rigetto si osserva un danno acuto o cronico a carico del tessuto renale dovuto all'azione dei linfociti T. In caso di rigetto acuto è possibile osservare infiammazione a livello dell'interstizio e tubulite di grado moderato o severo. In caso di rigetto cronico invece è possibile individuare manifestazioni di arteriopatia cronica con fibrosi dell'intima arteriolare e infiltrato infiammatorio mononucleare (Figura 1B).

A queste due tipologie di rigetto si aggiunge l'IF/TA, fibrosi interstiziale associata a atrofia tubulare, molto diffusa nel post trapianto (Figura 1C). Tra le cause di danno renale con possibile rigetto del trapianto sono facilmente riscontrabili anche infezioni da BK virus ed Epstein-Barr virus, oltre a danni da inibitori della calcineurina (principali farmaci immunosoppressori, ma nefrotossici, utilizzati nella terapia post trapianto) (Figura 1D).

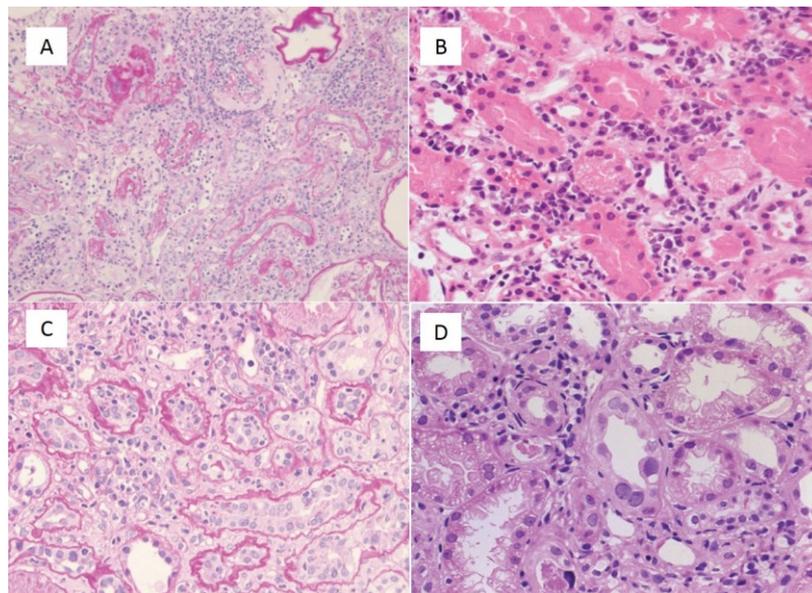


Figura 1: A) ABMR: si osserva in particolare dilatazione peritubulare dei capillari associata a infiltrazione mononucleare diffusa. B) TCMR: è visibile l'infiltrato

cellulare mononucleare. C) IF/TA: visibile infiltrato di cellule mononucleate all'interno dei tubuli atrofici e fibrosi interstiziale [14]. D) Infezione da BK virus [15]

3.3 Il rigetto subclinico

Il termine rigetto subclinico venne coniato per la prima volta negli anni 90' [16] sta ad indicare una condizione di danno del *graft*, verificabile tramite biopsia. È definito come la presenza di lesioni istologiche caratterizzate da fibrosi interstiziale e atrofia tubulare, in un organo funzionalmente stabile [17], ovvero in assenza di variazioni cliniche quali: pressione arteriosa, oliguria, creatinina sierica, velocità di filtrazione glomerulare, ematuria e proteinuria. Attualmente il rigetto subclinico si presenta con un tasso d'incidenza generale compreso tra il 15% e il 50% [18, 19] nei pazienti trapiantati, tuttavia l'associazione con comparsa di danno renale o disfunzione del rene trapiantato a lungo termine, ha richiesto un ulteriore decennio di indagini dalla sua scoperta. Inizialmente si riteneva che il rigetto subclinico fosse attribuibile unicamente al rigetto cellulo-mediato (TCMR), mentre recenti studi hanno messo in luce la possibile presenza anche di rigetto subclinico anticorpo mediato (ABMR) [20]. Alcuni studi hanno evidenziato come il rigetto subclinico e in particolare quello anticorpo mediato (ABMR) correlino con il declino della funzionalità del *graft*, favorendo inoltre, lo sviluppo di un danno cronico [20, 21, 22]. Risulta quindi essenziale identificare prima possibile l'insorgenza del rigetto subclinico, per poterlo trattare precocemente. Attualmente l'unico mezzo per poterlo identificare è la biopsia di protocollo.

3.4 La biopsia renale di protocollo

Attualmente la tecnica capace di identificare il rigetto prima delle manifestazioni cliniche, è l'ago-biopsia renale di protocollo. Essa viene effettuata ai tempi precisi e prestabiliti dal follow-up, anche in condizioni cliniche stabili del paziente. Il centro di nefrologia pediatrica, dialisi e trapianto, di Padova ad oggi è uno dei 3 centri

Europei che promuovono l'utilizzo della biopsia protocollare nel post trapianto pediatrico. La sua applicazione infatti, ha mostrato negli anni un miglioramento nella tempestività di intervento terapeutico con un riscontro positivo nell'incremento di vitalità del *graft* e riduzione dell'insorgenza di rigetti subclinici. L'esperienza del centro di trapianto pediatrico di Padova ha dimostrato l'efficacia della biopsia renale di protocollo con un recupero completo delle lesioni istologiche identificate ad 1 anno di follow-up nel 67% dei casi [23].

L'adozione della biopsia di protocollo post trapianto renale, è entrata negli ultimi anni in un acceso dibattito scientifico. Infatti, seppur estremamente utile in ambito trapiantologico, questa tecnica rimane comunque invasiva e come tale non esente da rischi quali: sanguinamento, danno tissutale e possibili infezioni delle vie urinarie. In nefrologia pediatrica, l'incidenza di gravi complicazioni a seguito di biopsia renale è stata progressivamente ridotta grazie all'adozione di dispositivi automatizzati e alla pratica ecografica [24]. Inoltre, non esistendo attualmente indici o biomarcatori efficaci e predittivi di danno renale, essa risulta ad oggi il *gold standard* per la diagnosi precoce di danno renale e il miglioramento del piano terapeutico personalizzato. Rimane quindi aperta la ricerca di nuove strategie per la prevenzione del rigetto renale e per l'aumento della sopravvivenza del *graft*.

Recentemente, la valutazione dello stato di salute del rene trapiantato ha visto l'introduzione dei dosaggi immunologici, in particolare il dosaggio degli anticorpi anti-HLA (*Human Leucocyte Antigen*) che sembrano essere correlati all'insorgenza sia del rigetto umorale che di quello cellulo-mediato.

3.5 Anticorpi anti-HLA DSA

La patogenesi e l'insorgenza di rigetto del rene trapiantato, come anticipato precedentemente, sono soggetti a diverse possibili variabili

che ad oggi non sono ancora del tutto chiare. Nell'ultimo decennio sembra emergere tra le cause principali di rigetto, la risposta umorale compiuta ad opera degli anticorpi anti-HLA nei confronti dell'organo trapiantato [25]. In particolare si osserva un maggior rischio di perdita del rene trapiantato nei pazienti con valori sierici di anticorpi circolanti HLA donatore specifici (*DSA_Donor specific antibody*) [26]. Gli anticorpi anti HLA (*Human Leucocyte Antigen*_complesso maggiore di istocompatibilità) sono prodotti dal sistema immunitario e rivolti a colpire cellule presentanti sulla loro superficie epitopi antigenici HLA. La loro produzione è codificata da un gruppo di geni polimorfici rilevabili sul braccio corto del cromosoma 6 [27]. Questa regione cromosomica, conosciuta come *major histocompatibility complex* (MHC), in realtà contiene più di 200 geni, ma solo un gruppo ristretto di questi codifica per l'istocompatibilità della persona. Sono stati identificati 6 loci genici HLA codificati nell'area MHC (Figura 2).

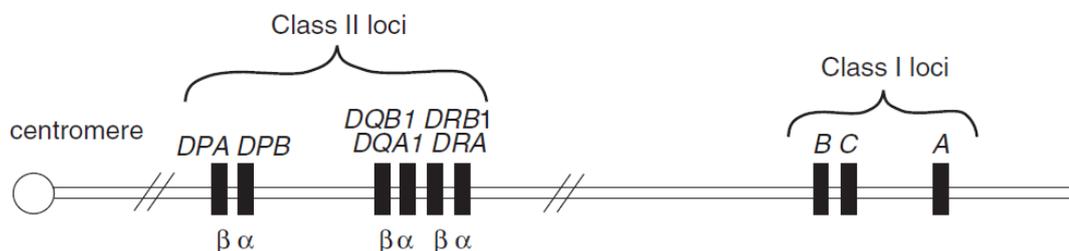


Figura 2: Schema semplificato del sistema maggiore di istocompatibilità umano (MHC)[28]

Questi geni codificano per molecole omologhe e sono classificabili in due cluster, HLA di classe I e classe II, in base alla loro struttura, distribuzione tissutale, e fonte di peptidi antigenici così come in relazione alla loro capacità interattiva con i linfociti T [28]. Questi due gruppi di molecole sono disposti in modo diverso sulla superficie delle cellule. Le molecole di classe I, suddivise a loro volta in A, B e C, sono presenti sulla superficie di quasi tutte le cellule nucleate e svolgono il compito di presentare antigeni di tipo endogeno, direttamente alle cellule linfocitarie T CD8⁺ ad azione citolitica. Le molecole di classe II,

suddivise nelle categorie DR e DQ, sono presenti sulla superficie delle cellule APC (*Antigen Presenting-cell*). Queste cellule (macrofagi, linfociti B, cellule dendritiche) sono in grado di esporre sulla loro superficie proteine esogene ai linfociti T-helper CD4+ i quali a loro volta attivano i linfociti CD8 (citotossici) e i linfociti B stimolando la produzione di immunoglobuline. Caratterizzando le diverse sottocategorie di anticorpi HLA A, B, DR e DQ appartenenti alle due tipologie molecolari di MHC è possibile calcolare il rischio presunto di perdita del *graft* a breve o lungo termine per incompatibilità (*mismatch*). Risulta quindi essenziale selezionare candidati donatori per il trapianto che presentino minime differenze di molecole HLA tra ricevente e donatore.

L'introduzione dei test per la verifica del "giusto appaiamento" HLA tra due individui diversi venne introdotto nel 1960 da Teraski et al., e da allora è ancora considerato il metodo di riferimento nella pratica clinica [29]. Questa prima tecnica, nota come CDCXM (*Cytotoxicity Assay Cross-Match*), che ha visto il suo affiancamento nel 1983 della FCXM (*Flow Cytometry Cross Match*), risulta insufficiente per individuare l'insorgenza di un possibile danno del *graft* mediato da anticorpi HLA-DSA, soprattutto se a basso titolo. Di più recente introduzione sono le tecniche di rilevamento chiamate *Solid Phase Assay*, come ELISA e LUMINEX, adottate per affiancare il *Cross-Match* classico e aiutare nella titolazione anticorpale. La tecnica LUMINEX (Figura 3), ultima arrivata, utilizza microsferi rivestite con diversi antigeni HLA (per effettuare uno screening) o uno solo (ricerca specifica). Ogni microsfera oltre agli epitopi HLA presenta anche un fluorocromo. Questa miscela di biglie coniugate con fluorocromo viene mescolata con il siero del ricevente. Quando anticorpi anti-HLA presenti nel siero si legano alle biglie e vengono rilevati da un anticorpo isotipo-specifico emettono una fluorescenza che può essere quantificata mediante citometria a flusso [30].

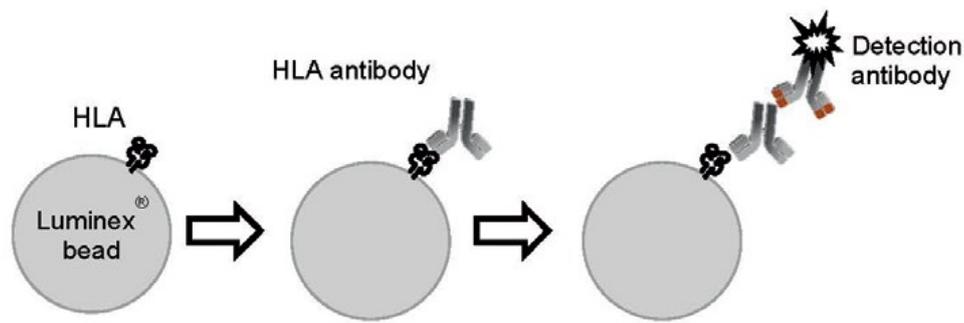


Figura 3: Principio di funzionamento del saggio LUMINEX per la rilevazione di anticorpi HLA [31].

I dosaggi HLA-DSA pre-trapianto permettono di identificare quali specie e sottocategorie anticorpali donatore specifiche siano presenti nel paziente, per garantire il migliore match con un possibile donatore. Dopo il trapianto invece, la titolazione dei DSA verrà eseguita periodicamente per verificare la possibile insorgenza di rigetto umorale.

L'adozione di questi saggi specifici per la rilevazione anticorpale, ha aumentato la conoscenza sul ruolo degli anticorpi HLA come causa principale di insorgenza di danno tissutale e perdita dell'organo trapiantato [32-40]. Inoltre, alcune ricerche hanno confermato come la presenza di anticorpi HLA-DSA positivi presenti nel post-trapianto correli con una ridotta sopravvivenza dell'organo trapiantato [41, 42, 43]. Sulla base di questi studi alcuni ricercatori, come Sawitzki, B. et al., hanno dimostrato che gli anticorpi HLA-DSA possono rappresentare dei possibili biomarcatori immunologici utili per la valutazione di danno renale nel post trapianto [37]. Tuttavia, sebbene questi test immunologici risultino ottimali nel completamento della diagnosi di danno istologico, soprattutto nel rigetto umorale, il dosaggio degli anticorpi HLA-DSA non sembra essere utile come indice prognostico o predittivo di danno renale.

In conclusione i dati clinici e immunologici danno informazioni sullo stato della funzionalità dell'organo trapiantato, mentre la biopsia è in

grado di fornire informazioni sull'istologia, evidenziando anche forme di rigetto sub-clinico.

Rappresentando il processo di rigetto dell'organo trapiantato come un "iceberg", l'alterazione dei valori di creatininemia e proteinuria sarebbe solo la manifestazione finale (punta dell'iceberg) di un processo che attualmente si può esplorare a livello sub-clinico mediante la biopsia di protocollo. Sarebbe interessante ampliare le conoscenze sui meccanismi molecolari che sottendono ai processi fisiologici del danno da rigetto.

La ricerca di nuovi biomarcatori predittivi di danno istologico, permetterebbe di monitorare più frequentemente lo stato dell'organo trapiantato e di intervenire ancora più precocemente (Figura 4).



Figura 4: L'iceberg rappresenta in modo ideale la problematica della diagnosi di rigetto di trapianto renale. I dati clinici (aumento e-GFR, proteinuria) e immunologici (aumento Ig anti DSA) rappresentano la punta, mentre la biopsia renale ne scalfisce la superficie, evidenziando il danno subclinico. Restano però da indagare i meccanismi molecolari alla base del processo di rigetto e la loro regolazione.

3.6 Biomarcatori di danno renale

Negli ultimi decenni molte ricerche si sono concentrate sull'identificazione di marker biologici (biomarcatori) utili nella pratica clinica. Il biomarcatore ideale è una molecola stabile, rilevabile all'interno di una popolazione da testare e in modo sicuro, con test affidabili e poco costosi. Tale biomarcatore ad oggi non esiste ancora in ambito trapiantologico renale (pediatrico), anche se molto si sta facendo per individuare il miglior indice predittivo di rigetto da poter affiancare alla pratica clinica. Tra i possibili biomarker proposti, rilevabili in campioni ematici e urinari, vi sono diverse proteine, quali: le chemochine CXCL9, CXCL10, CCL2, NGAL, l'interleuchina 18 (IL-18), la cistatina C, KIM1, TIM3 il granzima B, le perforine e FOXP3 [44, 45] che tuttavia risultano non sufficientemente sensibili o specifici in paragone al dato istologico.

Negli ultimi anni ha riscosso grande attenzione lo studio dei meccanismi regolatori che sottendono all'instaurarsi del rigetto. In particolare hanno attirato l'attenzione della comunità scientifica i micro RNA (miRNA); piccole sequenze di RNA coinvolte nei processi regolativi di diversi processi fisiologici.

3.6.1 I microRNA

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA endogeno, non codificante, lunghe 20–23 nucleotidi, a singolo filamento, coinvolte in diversi processi di regolazione dell'espressione genica post trascrizionale [46]. Degli oltre 2000 miRNA identificati attualmente nel genoma umano [47], solo una piccola parte di essi è in grado di regolare fino al 90% dei geni codificanti. Queste corte sequenze nucleotidiche, evolutivamente ben conservate, sono coinvolte in diversi processi biologici come lo sviluppo [48], la differenziazione, proliferazione e apoptosi cellulare, il metabolismo degli acidi grassi e

l'oncogene [49]. Inoltre è stato dimostrato il loro coinvolgimento nei processi che regolano lo sviluppo del sistema immunitario e la risposta adattativa o innata di quest'ultimo [50-53].

I miRNA svolgono la loro azione legando i loro *targets* nella regione 3' UTR (*Untranslated Region*) degli mRNA silenziandoli o modificandone la traduzione (Figura 5).

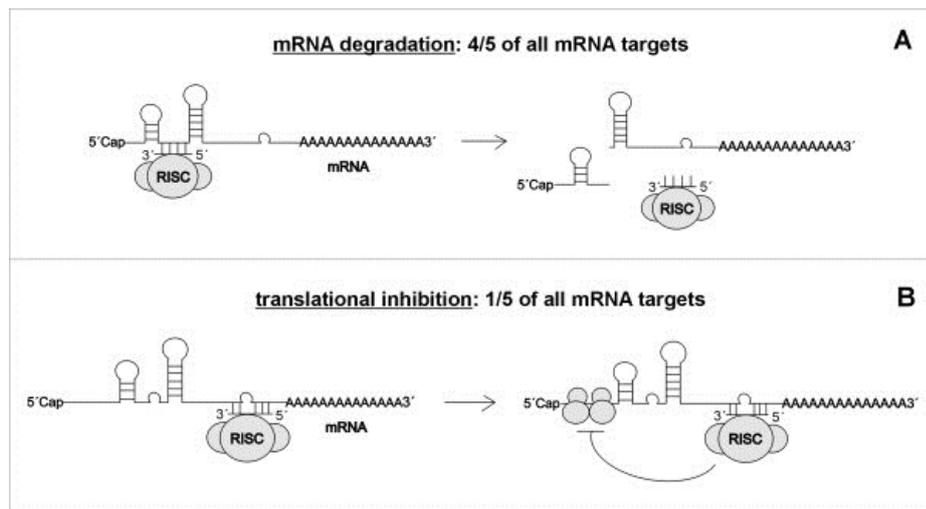


Figura 5: Meccanismo d'azione dei miRNA su mRNA bersaglio. In particolare vengono mostrate due modalità: A) Il miRNA è quasi perfettamente complementare con l mRNA bersaglio. Si instaura un processo di deadenilazione e conseguente degradazione del mRNA (meccanismo principale d'azione dei miRNA); B) Il miRNA è solo parzialmente complementare al suo mRNA bersaglio, si innesca un meccanismo di inibizione [54].

La genesi di queste corte sequenze nucleotidiche inizia grazie alla trascrizione della RNA polimerasi II a pri-microRNA, lunghi fino a 1000 nt, i quali vengono successivamente processati nel nucleo da un complesso enzimatico chiamato *Drosha/DGCR8* a pre-microRNA. I pre-microRNA, sequenze di circa 70 nt con una forma stem-loop, vengono traslocati nel citosol e li trasformati, mediante taglio enzimatico ad opera della RNase di tipo III (*Dicer*), a miRNA maturi (Figura 6).

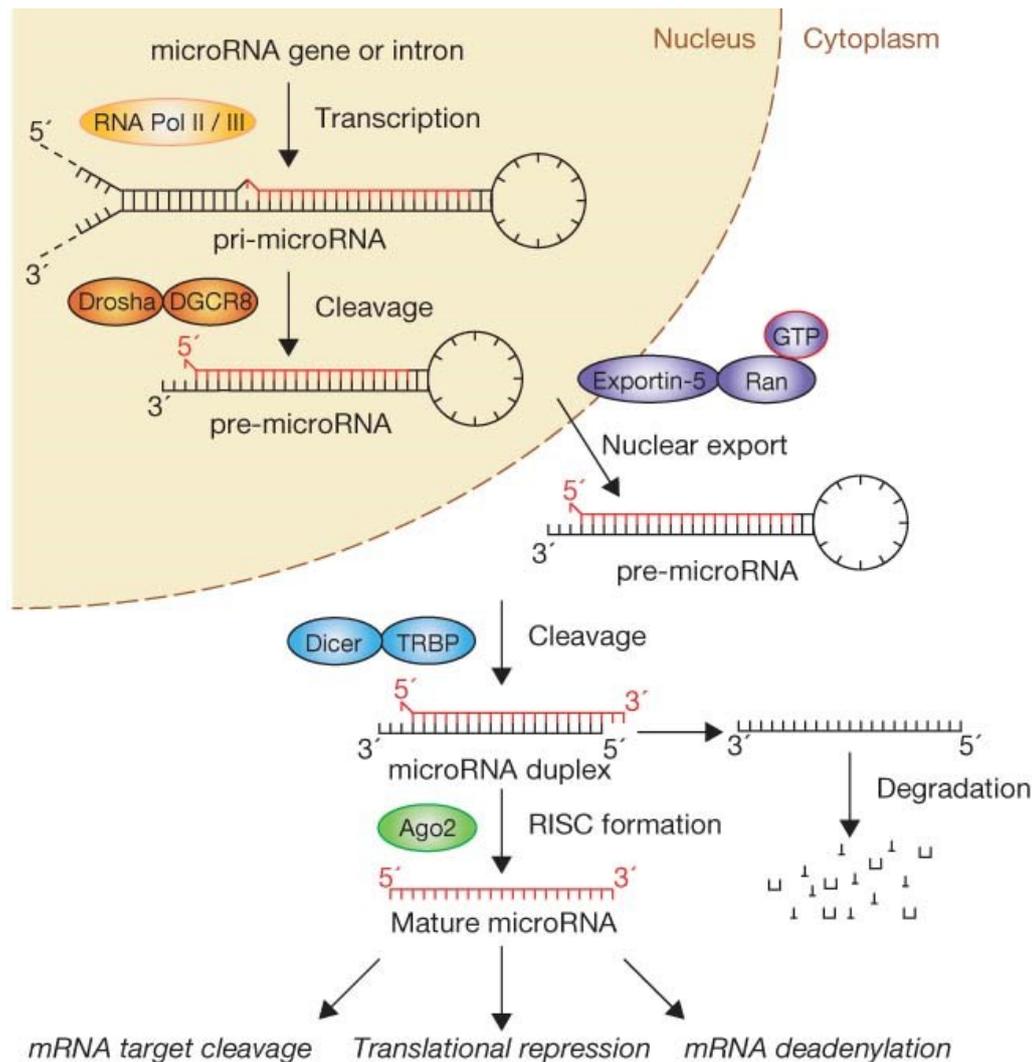


Figura 6: Processo di maturazione dei miRNA da pri-microRNA a micro RNA maturi [55]

In ambito nefrologico lo studio dei microRNA (miRNA) è cresciuto progressivamente negli ultimi 15 anni; soprattutto nella ricerca di nuovi biomarcatori in diversi processi biologici come l'organogenesi e l'omeostasi del rene, in condizioni fisiologiche e in diverse patologie. Il loro studio è cresciuto notevolmente anche in ambito trapiantologico renale, in particolare nella ricerca della prevenzione del rigetto con lo scopo finale di migliorare progressivamente il monitoraggio post trapianto del rene e introdurre nuovi possibili target terapeutici e diagnostici. Studi di espressione dei miRNA in adulti riceventi di trapianto renale hanno evidenziato panel di microRNA, candidati

come biomarcatori sia renali (es: miR-215, miR-146a e miR-886) mentre altri, come miR-192, miR-194, miR-21, presenti anche in altri organi [56, 57]. In ambito prettamente nefrologico lo studio del “*miRNA profiling*” sembra essere un ottimo mezzo per il miglioramento del monitoraggio del *graft* che attualmente, malgrado l’adozione di terapie immunosoppressive sempre più accurate, mostra ancora un rischio elevato di rigetto. Per primi, due importanti studi dell’ultimo decennio hanno mostrato differenti livelli di miRNA a livello tissutale in pazienti con rigetto acuto. In particolare l’incremento d’espressione intra organo di miR-142-5p, miR-155 e miR-223 e la riduzione di altri (miR-10b, miR-30a-3p) in cellule renali sembra essere indicatore di funzionalità renale post trapianto [58, 59]. Più recentemente sono stati individuati anche alcuni microRNA differentemente espressi in campioni biotici di pazienti adulti trapiantati e in campioni ematici di sangue periferico, mostrando un incremento di miR-142-3p e miR-142-5p in pazienti trapiantati di rene con rigetto acuto rispetto a pazienti stabili trapiantati [60, 61]. Lo stesso è stato rilevato in campioni biotici confrontati con prelevi urinari, rilevando miR-146a e miR-210 come possibili marker di danno renale in pazienti adulti trapiantati in fase di rigetto acuto [62, 63]. Queste premesse sono importanti e aprono nuove prospettive di ricerca di miRNA come biomarcatori di danno renale anche in ambito pediatrico post trapianto di rene. Bisogna infatti considerare che molte sono le differenze fra un paziente adulto e uno pediatrico, come: il diverso sviluppo ormonale, la composizione e maturazione del sistema immunitario, la diversa influenza di infezioni pregresse sul trapianto, le diverse vie di somministrazione della terapia immunosoppressiva adottata nel post trapianto e altri fattori fisiologici correlati alla crescita che possono o meno indurre l’espressione di alcuni microRNA rispetto ad altri [64]. Risulta quindi interessante capire se esistano dei miRNA non solo diversamente espressi nell’infante o paziente pediatrico, ma anche se questi vengano prodotti

tempestivamente prima dell'insorgenza di danno renale e quindi siano utili nella prevenzione del rigetto permettendo di migliorare e prolungare la sopravvivenza del *graft*.

Oltre ai miRNA, tra i più recenti biomarcatori, proposti per il monitoraggio funzionale del rene, vi sono le vescicole extracellulari.

3.6.2 Le vescicole extracellulari

L'ultimo decennio lo studio dei biomarcatori ha posto la sua attenzione anche sulle vescicole extracellulari e sulla loro possibile applicazione come *tool* di ricerca in ambito clinico-diagnostico. Le vescicole extracellulari (EVs) sono nanoparticelle sferiche rivestite da membrana fosfolipidica e rilasciate da diverse tipologie cellulari di un organismo. Queste piccole particelle vennero scoperte per la prima volta nel 1967 e descritte come “polvere piastrinica” [65]. Da questa prima apparizione lo studio e le conoscenze riguardanti le EVs sono aumentati notevolmente. In particolare la nascita di tre piattaforme online: *Exocarta*, *Vesiclepedia* e *EVpedia* [66-70] ha apportato un incremento notevole di informazioni riguardanti la loro caratterizzazione e ha aumentato la loro divulgazione scientifica. Questo gruppo eterogeneo di particelle viene attualmente definito in base a diversi fattori quali: dimensioni, densità, composizione e origine. Tali caratteristiche ci permettono di classificare le EVs in tre *cluster* principali, quali: gli esosomi, le microvescicole e i corpi apoptotici. Gli esosomi (EXs) rappresentano la categoria più piccola di EVs con dimensioni che raggiungono al massimo i 100 nm di diametro ed una densità compresa tra 1.13 e 1.19 g/ml [71]. Gli EXs maturano all'interno di corpi multivescicolari (MVB), nel citoplasma cellulare, i quali fondendosi con la membrana plasmatica li rilasciano all'esterno della cellula (Figura 7a). Le microvescicole sono particelle di dimensioni maggiori comprese fra 100 e 1000 nm di diametro e con densità compresa fra quella esosomiale e quella dei corpi

apoptotici. A differenza degli esosomi quest'ultime particelle maturano libere nel citoplasma cellulare e vengono rilasciate direttamente dalla cellula attraverso processi di esocitosi dalla membrana plasmatica (72_Figura 7b). Infine i corpi apoptotici rappresentano le particelle di dimensioni maggiori fra i tre gruppi mostrando un diametro compreso fra 800 e 5000 nm ed una densità di 1.16 – 1.28 g/ml. Queste particelle vengono rilasciate durante i processi di apoptosi cellulare e possono contenere anche organelli in fase di degradazione (Figura 7c).

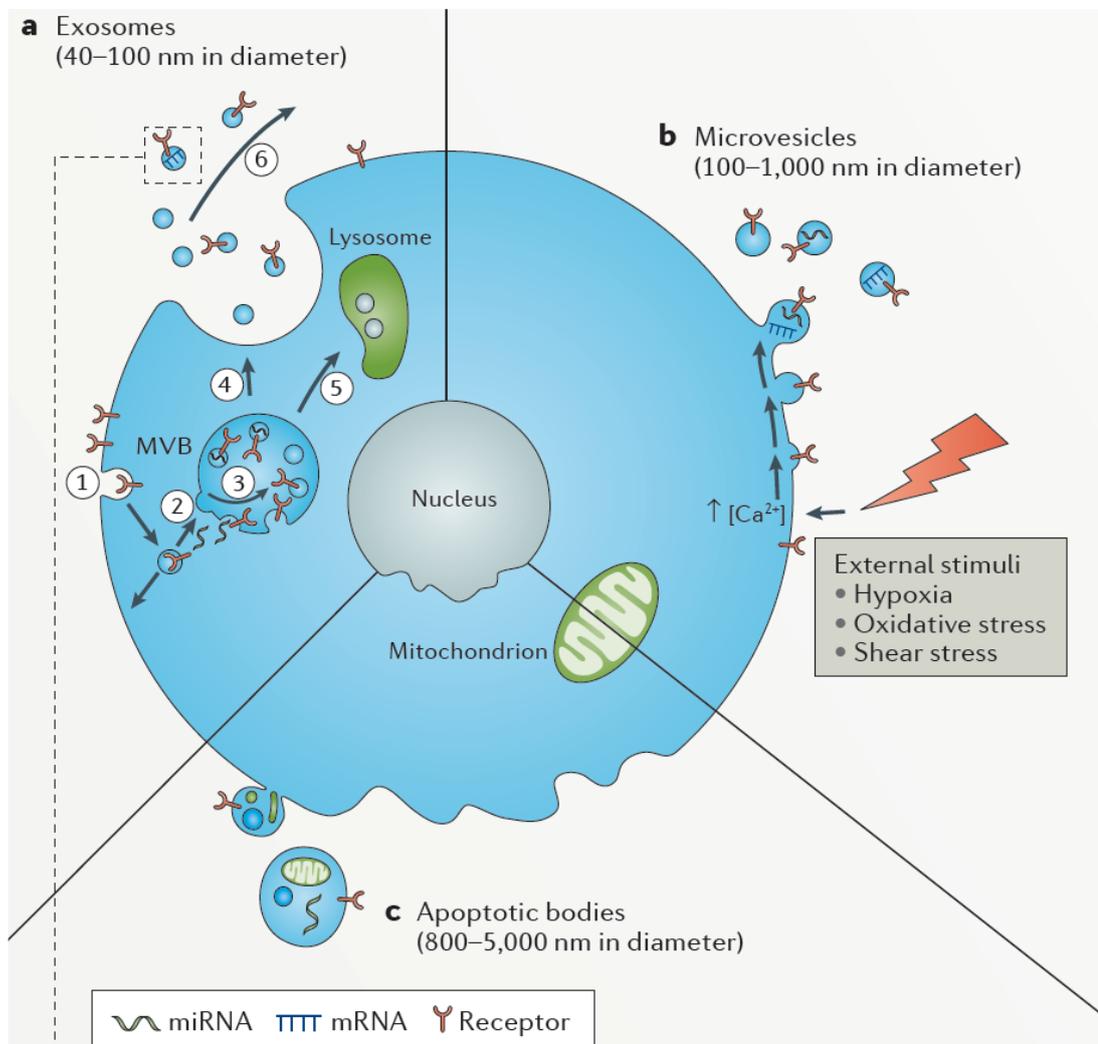


Figura 7: Meccanismo di formazione e rilascio delle vescicole extracellulari dalla cellula [73].

Queste diverse tipologie vescicolari vengono rilasciate nei fluidi corporei come: saliva, sangue, latte materno, urine, liquido seminale etc. [74, 75].

Attualmente è risaputo che le EVs ricoprono un ruolo fondamentale nelle vie di segnalazione inter e intracellulare [76, 77]. Infatti esse riescono a interagire con le cellule bersaglio in diversi modi, inclusa la stimolazione cellulare e il trasferimento di proteine, lipidi e materiale genetico, RNA messaggeri e microRNA. Considerando che gli RNA e soprattutto i miRNA risultano essere molecole facilmente degradabili; pur essendo stati rinvenuti come liberi in fluidi biologici quale sangue o urine, ci si aspetterebbe che la loro concentrazione intra vescicolare sia maggiore rispetto a quella libera. Questo spiegherebbe un'ulteriore funzionalità delle vescicole nel proteggere l'informazione veicolata alle cellule bersaglio. Le vescicole extracellulari vengono rilasciate attraverso la membrana plasmatica cellulare e per tal motivo presenteranno sulla loro superficie proteine tipiche delle cellule da cui vengono esocitate. Questa caratteristica risulta estremamente utile nell'ambito clinico-diagnostico in quanto permetterebbe, una volta ottimizzato, di capire non solo la tipologia di segnale che sottende ad alcune patologie, ma anche la diversa origine cellulare di una determinata malattia e come queste cellule interagiscono tra di loro. In ambito nefrologico in particolare, le vescicole extracellulari urinarie (uEVs) rappresentano un modello ottimale per lo studio di possibili anomalie renali e/o delle vie urinarie; essendo l'urina un prodotto diretto dell'apparato escretore. Negli ultimi anni alcune pubblicazioni hanno sottolineato come la caratterizzazione proteica membranosa delle UEVs potrebbe essere utile a identificare la loro origine nefrologica in alcune patologie renali (Figura 8_78, 79). Inoltre, per specificare quale via di segnalazione venga indotta dal loro rilascio, si può studiare e caratterizzarne il contenuto, in particolare di miRNA.

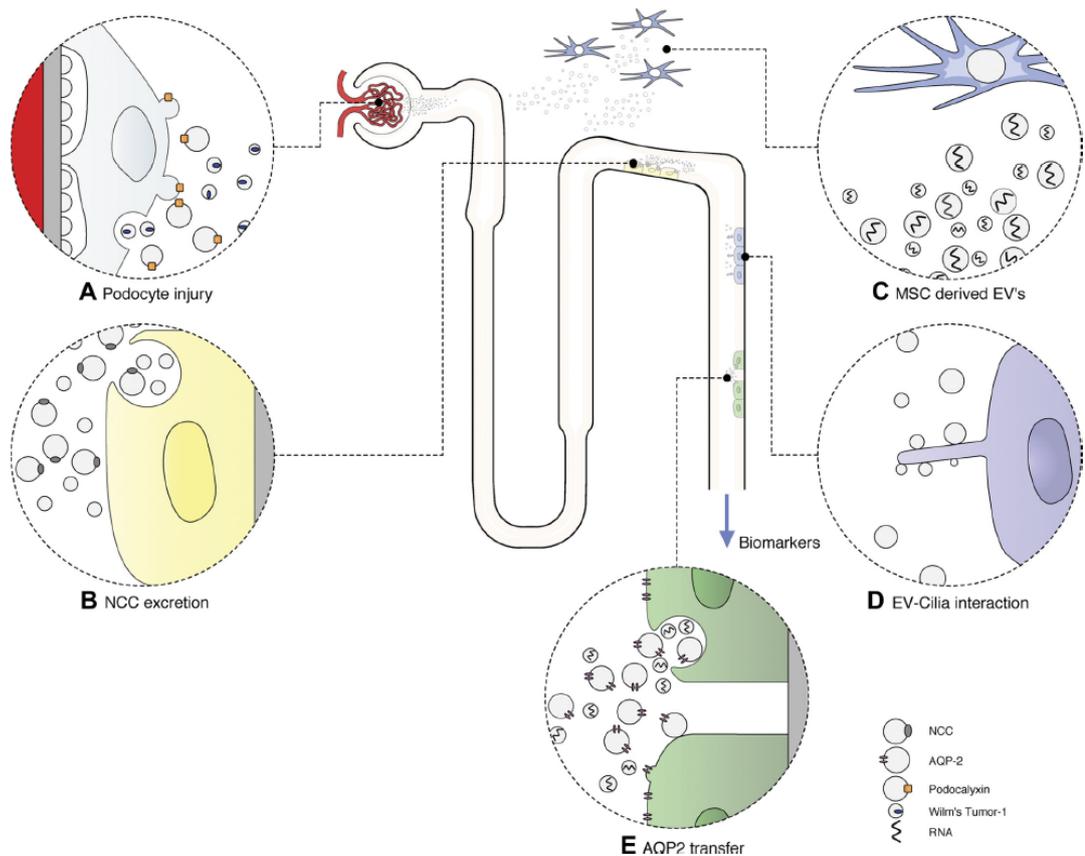


Figura 8: Illustrazione dell'origine di diverse UEVs in ambito nefrologico [78].

Attualmente, la caratterizzazione vescicolare sia di membrana che di contenuto mostra ancora molti lati oscuri e necessita perciò di maggiori ricerche, ma sicuramente rimane una delle nuove vie maggiormente sfruttabili nella ricerca di marker utili per la prevenzione di danno renale in diverse patologie nefrologiche e nel rigetto renale.

Allo scopo di definire meglio la “condizione di salute” del rene trapiantato, sarebbe ottimale affiancare allo studio delle vescicole urinarie e del loro contenuto anche quello delle vescicole extracellulari ematiche/sieriche. Lo studio delle EVs sia a livello sistemico che urinario e del loro carico, potrebbe essere un indicatore predittivo ottimale di danno renale, utile per la produzione di un possibile test diagnostico da affiancare alla già consolidata pratica clinica nefrologica. Queste caratteristiche, unite alla praticità di

prelievo di campioni urinari ed ematici, rendono le vescicole extracellulari ottime candidate, ideali nella ricerca di nuovi biomarcatori predittivi di danno renale post trapianto.

4. SCOPO

Lo scopo dello studio è individuare nuovi possibili marker biologici predittivi di rigetto subclinico nel trapianto di rene pediatrico. In letteratura molti autori hanno affrontato la tematica tuttavia non si è ancora raggiunto un'unanimità dei risultati e la maggior parte della casistica oggetto di studio è relativa a pazienti adulti. Considerando le diverse caratteristiche fisiologiche e di sviluppo che si osservano tra pazienti adulti e pediatrici risulta chiara la necessità di approfondire tale ricerca anche in ambito pediatrico. La necessità di ottenere nuovi biomarcatori predittivi di danno è spinta dal miglioramento dell'outcome trapiantologico pediatrico. Il rilevamento di biomarcatori precoci in campioni biotici ed ematici di bambini trapiantati di rene, permetterebbe non solo di intervenire tempestivamente sul paziente, migliorando la qualità della vita e riducendo l'ospedalizzazione e i trattamenti terapeutici, ma anche di ridurre il numero di secondi trapianti. I microRNA sono candidati ideali in quanto è già noto in letteratura che le loro variazioni in concentrazione sia nei fluidi corporei che in tessuti possa riflettere le condizioni fisiopatologiche del soggetto trapiantato. Inoltre, considerando la loro instabilità biologica si è optato per isolarli all'interno delle vescicole extracellulari che li veicolano nel circolo ematico.

Lo studio è stato condotto su una popolazione iniziale di 20 pazienti pediatrici con funzione renale stabile ad 1 anno dal trapianto: 10 con istologia normale e 10 in fase di rigetto subclinico. In particolare sono stati valutati:

1. I diversi livelli d'espressione di microRNA in biopsie di protocollo al follow-up di 1 anno
2. I diversi livelli di espressione di microRNA in vescicole sieriche degli stessi pazienti al follow-up di 1 anno
3. I confronti tra l'espressione di miRNA tissutali e sierici con i dati clinici e immunologici dei pazienti.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Selezione e arruolamento pazienti

Sono stati inclusi nello studio pazienti pediatriche, bambini e adolescenti, sottoposti a trapianto di rene presso l'U.O.S.D. di Nefrologia Pediatrica, Dialisi e Trapianto del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova che avessero i seguenti criteri di inclusione:

- un frammento di biopsia renale di controllo ad un anno dal trapianto conservato in RNAlater a -80°C,
- un prelievo ematico sierato e conservato a -80°C prelevato in occasione del follow-up ad 1 anno dal trapianto
- Consenso informato rilasciato dai genitori per la conservazione del materiale biologico e per il suo utilizzo a scopo di ricerca.

A partire da 30 biopsie di pazienti reclinabili, dopo estrazione e valutazione dell'RNA, sono stati selezionati un totale di 20 pazienti idonei alla prosecuzione dello studio con sequenziamento di nuova generazione (NGS). In dettaglio sono stati selezionati 10 pazienti con biopsia indicativa di istologia normale classificabile come Banff 1 e 10 pazienti con biopsia indicativa di rigetto acuto/cronico cellulare, umorale o misto con classificazione Banff 2, 3, 4. La classificazione istologica è stata eseguita riferendosi alle linee guida di Banff 2015 [13]. Tutti i pazienti arruolati in questo studio sono stati ben caratterizzati dal punto di vista anamnestico e clinico.

5.2 Modalità di raccolta e conservazione dei campioni

I pazienti trapiantati di rene presso l'U.O.S.D. di Nefrologia Pediatrica, Dialisi e Trapianto dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova sono sottoposti a controlli di follow-up a 6/12/24 mesi dal trapianto che prevedono oltre alle indagini ematochimiche, la valutazione istologica dell'organo trapiantato. L'ago-biopsia utilizzata per la diagnosi istologica viene prelevata con procedura eco-assistita in sedazione profonda. Durante tale procedura, da uno dei frustoli

renali prelevati e osservati al microscopio invertito, viene tagliato un piccolo frammento (circa 1 mm) e immerso in una soluzione contenente un enzima inibitore delle RNasi. Questa piccola porzione di tessuto corticale viene conservata in provette contenenti RNA-later; stabilizzante (soluzione concentrata di solfato d'ammonio), in grado di conservare e proteggere l'RNA cellulare dalla degradazione. Dopo un primo periodo di 24 ore a +4°C, la conservazione del campione continua a -80°C (stoccaggio in una banca del tessuto), presso il laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del rene del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova.

Il campione di siero viene ottenuto da un prelievo ematico eseguito lo stesso giorno della biopsia. Una volta centrifugato a 3000 g per 10 minuti il siero ottenuto viene aliquotato e conservato a -80°C nella banca sieri dei trapiantati sempre presso il laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del rene del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova.

5.3 Disegno dello studio

Lo studio retrospettivo svolto in questi tre anni di dottorato prevedeva (Figura 9):

- La creazione e compilazione di un database in Access contenente i dati anamnestici e clinici dei pazienti pediatrici trapiantati presso la nefrologia pediatrica di Padova.
- L'identificazione dei pattern d'espressione di microRNA in biopsie renali e vescicole sieriche, su campioni già raccolti e stoccati ad un anno dal trapianto.
- La correlazione ei dati e l'analisi statistica.

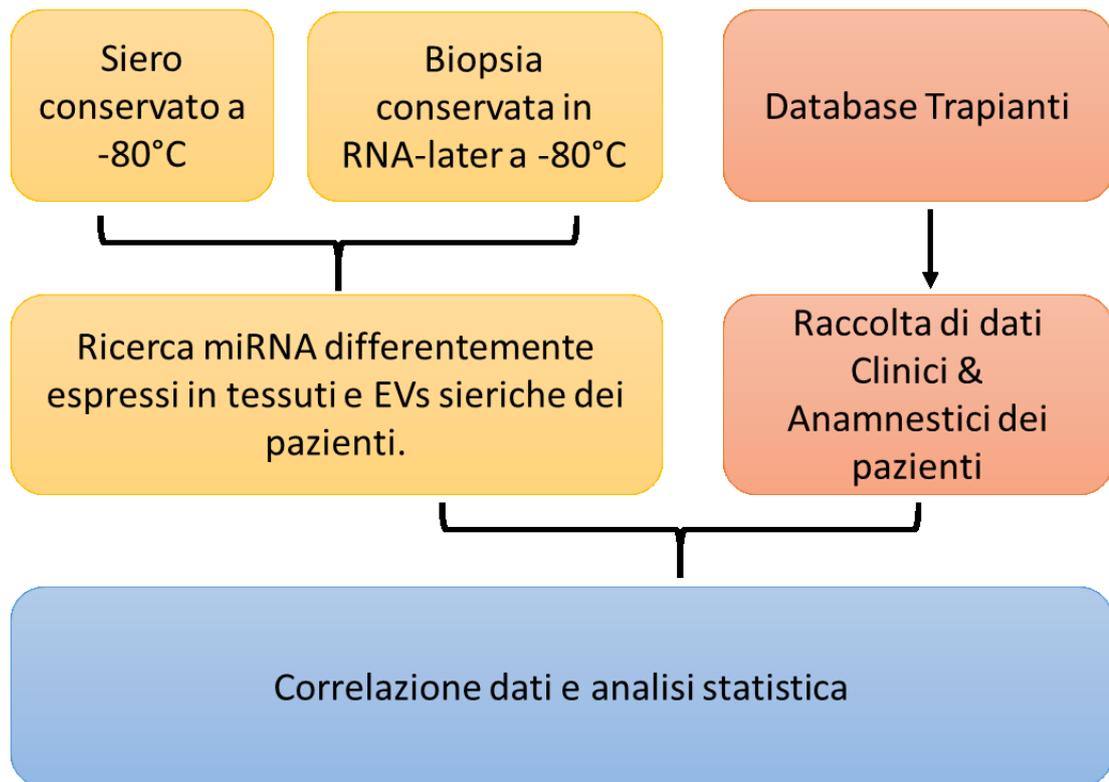


Figura 9: Flow-chart dello studio

È inoltre iniziata una fase prospettica (vedi appendice PROSPETTIVE FUTURE) che prevede l'isolamento e la valutazione delle vescicole extracellulari urinarie (uEVs), compreso il loro contenuto in miRNA. Di quest'ultima fase è stata programmata e iniziata la raccolta e lo stoccaggio di campioni di urine a tempi di follow-up prestabiliti e condotta la messa a punto del metodo di isolamento delle uEVs.

5.4 STUDIO RETROSPETTIVO

5.4.1 Creazione e compilazione database trapianti

La creazione e compilazione di un database si è resa necessaria al fine di poter usufruire velocemente di dati clinici e anamnestici dei pazienti pediatrici trapiantati presso la Nefrologia Pediatrica di Padova. Il database è stato creato con programma Office Access® e contiene i dati anamnestici, la storia clinica, gli eventuali interventi o

visite pre trapianto, i dati relativi alla dialisi (se effettuata) e quelli riguardanti le sierologie (inclusi i dosaggi anticorpali HLA-DSA).

Dalla schermata iniziale è possibile accedere a diverse pagine secondarie nelle quali sono raccolti i dati riguardanti: la terapia farmacologica pre e post trapianto, la donazione, le possibili visite specialistiche, l'immunosoppressione e i dati relativi alle viremie

Sempre dalla stessa schermata è possibile collegarsi a diverse pagine di raccolta dati riferiti a 5 tempi di ricovero dei pazienti trapiantati secondo programma di follow-up (momento del trapianto (TO), 6 mesi, 1 anno, 2 anni e a volte 5 anni). Infine è presente anche un'ulteriore pagina aggiuntiva (ALTRI CONTROLLI) nella quale è possibile aggiungere ulteriori dati per ricoveri extra follow-up degli stessi pazienti (solitamente dovuti a complicanze del trapianto).

5.4.2 Schema riassuntivo degli esperimenti

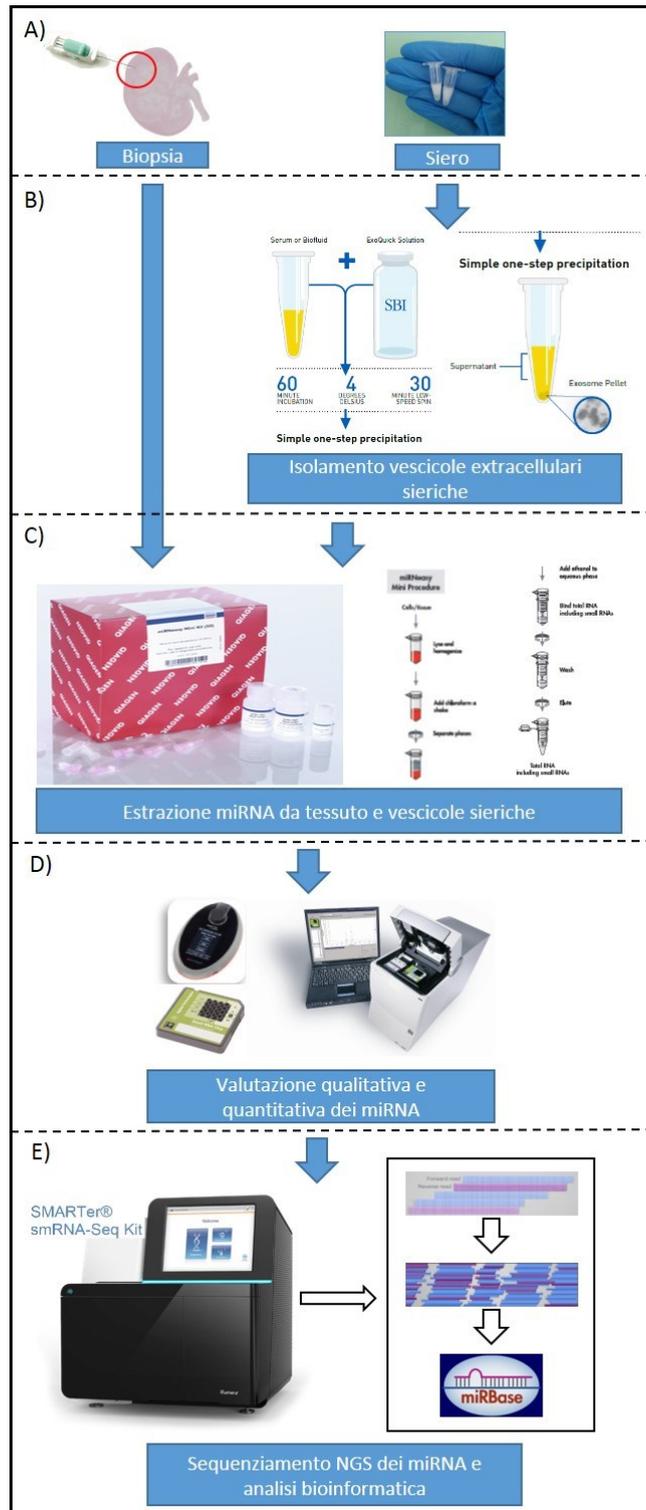


Figura 10: Schema riassuntivo degli esperimenti. A) Campionamento: raccolta tessuto biptico e siero; B) isolamento EVs sieriche; C) estrazione miRNA da tessuto e da EVs sieriche; D) Valutazione qualitativa e quantitativa miRNA; E) screening dei miRNA tramite sequenziamento NGS e analisi bioinformatica.

5.4.3 Isolamento vescicole extracellulari sieriche

I campioni sierici stoccati a -80°C sono stati processati per isolare le vescicole extracellulari sieriche adottando metodica di precipitazione *volume-excluding polymers* secondo kit ExoQuick™ (System Biosciences). Questo kit concentra le vescicole extracellulari facendole precipitare sul fondo della provetta, mentre trattiene in sospensione le altre particelle (trattenute mediante polimeri sintetici). Il campione sierico una volta scongelato viene centrifugato a bassa velocità ($3000 \times g$ per 15 min) per eliminare eventuali detriti cellulari che potrebbero inficiare l'esito dell'isolamento. Il surnatante collezionato in questa prima fase, viene addizionato con soluzione di precipitazione ExoQuick™ in rapporto 1:4 (1 volume di ExoQuick:4 volumi di siero) e lasciato riposare a 4°C per 30 minuti (Figura 11A), per concentrare le vescicole sospese nel fluido biologico. Dopo questa fase il campione viene centrifugato a $1500 \times g$ per 30 minuti e successivamente per ulteriori 5 minuti per far depositare le EVs che ancora sono in sospensione. Il *pellet* giallo pallido formatosi sul fondo, viene risospeso in 1/10 del volume iniziale del campione, usando acqua sterile o PBS (Figura 11B).

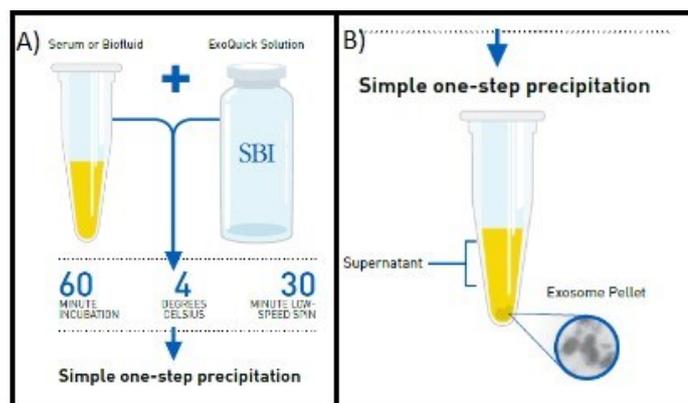


Figura 11: Protocollo ExoQuick™ (SDB)

5.4.4 Estrazione RNA totale da tessuto biotipico e da EVs sieriche

L'RNA totale, contenente la frazione di small RNA (inclusi i miRNA) è stato estratto dai campioni biologici a disposizione seguendo metodica QIAGEN miRNeasy Mini kit (Figura 12). La procedura prevede una prima fase di lisi cellulare/membranosa grazie all'utilizzo di reagente QIAzol. Dopo aver omogeneizzato meccanicamente i campioni in 1 ml di reagente QIAzol, l'aggiunta di cloroformio 99% (200 µl), separa il composto estratto in tre fasi: la fase superiore contenente RNA, quella intermedia proteine denaturate e DNA e quella inferiore contenente QIAzol, proteine, lipidi e altri possibili detriti cellulari. La fase acquosa, contenente gli RNA, viene miscelata con etanolo assoluto, e caricata in una colonnina QIAGEN (in dotazione con il kit), quindi centrifugata. Il filtro trattiene l'RNA totale, inclusi gli small RNA e subisce una serie di lavaggi con diversi buffer (in dotazione con il kit) prima di venire eluito in buffer di eluizione (o in alternativa in acqua sterile RNase-free).

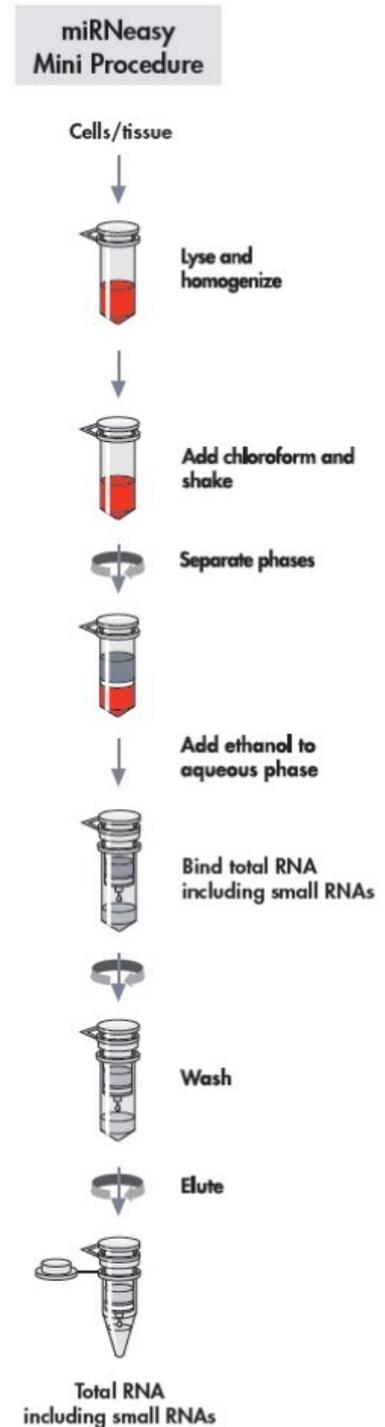


Figura 12: schema riassuntivo estrazione RNA con miRNeasy Mini Kit

Questo kit è stato scelto in quanto affianca la consolidata efficienza di estrazione del metodo classico fenolo/cloroformio ad una maggior qualità negli estratti di RNA ottenuti con metodica di estrazione su colonnina micro filtrante.

5.4.5 Valutazione qualitativa e quantitativa dei miRNA estratti

I campioni di miRNA ottenuti sono stati valutati quantitativamente e qualitativamente con due strumenti diversi: ThermoFisher Qubit e Agilent Bioanalyser 2100 (Figura 13).



Figura 13: Valutazione qualitativa e quantitativa dei miRNA

L'analisi con Qubit® ha permesso di stimare le concentrazioni dei campioni in ng/ μ l. La quantificazione viene eseguita aggiungendo al campione un colorante selettivo per RNA, capace di minimizzare la lettura di elementi contaminanti il campione. Dato che in letteratura sono riportate concentrazioni di miRNA da EVs sieriche molto basse, si è deciso di adottare questa tecnologia capace quantificare anche campioni poco concentrati. La quantificazione con Qubit® infatti riesce a valutare concentrazioni a partire da un minimo di 1 μ g di campione per raggiungere buoni livelli di accuratezza, anche con campioni molto diluiti.

Oltre alla quantità, è stata valutata anche l'integrità del RNA estratto e identificata la frazione di miRNA a disposizione. L'analisi è stata

condotta con strumento Agilent Bioanalyzer 2100 il quale definisce la qualità del RNA come RIN (*RNA Integrity Number*). Il RIN viene elaborato mediante un algoritmo matematico capace di definire l'integrità delle frazioni di RNA ribosomiale 28S e 18S. Queste due specie di RNA ribosomiale sono presenti e ben conservate in tutte le cellule eucarioti e rappresentano quindi un controllo positivo ottimale per l'RNA analizzato. Per la valutazione di RNA e miRNA estratti da campioni di tessuto biotico, sono stati utilizzati chip Pico e Small-RNA (Agilent). Entrambi i chip presentano un sistema microcapillare nel quale viene inserito una *gel-matrix* pre filtrata e coniugata con uno specifico *dye*. La *Gel-matrix* viene inserita nel microsistema capillare del chip, mediante la sua specifica *prime station* (Figura 14).



Figura 14: Prime station Agilent. La siringa spinge la *gel matrix* coniugata con il *dye* all'interno del chip.

Circa 1 μ l di campione viene mescolato al *Pico/Small green marker* specifico per chip. Questo marker si coniuga a diverse specie di RNA e viene rilevato dal sistema del Bioanalyzer 2100. Il segnale viene rielaborato e mostra come output l'elettroferogramma di ogni campione analizzato. L'elettroferogramma rivelerà i picchi di riferimento alle diverse dimensioni dei costrutti nucleotidici rilevabili (per il *ladder*) e la frazione di RNA presente nei campioni, compresi i

picchi riferiti agli RNA ribosomiali 28S e 18S (questo solo per il chip Pico-RNA_Figura 15A). L'analisi effettuata con chip Small-RNA non mostra la presenza degli RNA ribosomiali, in quanto rileva solo RNA a corte catene nucleotidiche (*small RNA species*) di cui fanno parte anche i miRNA (Figura 15B).

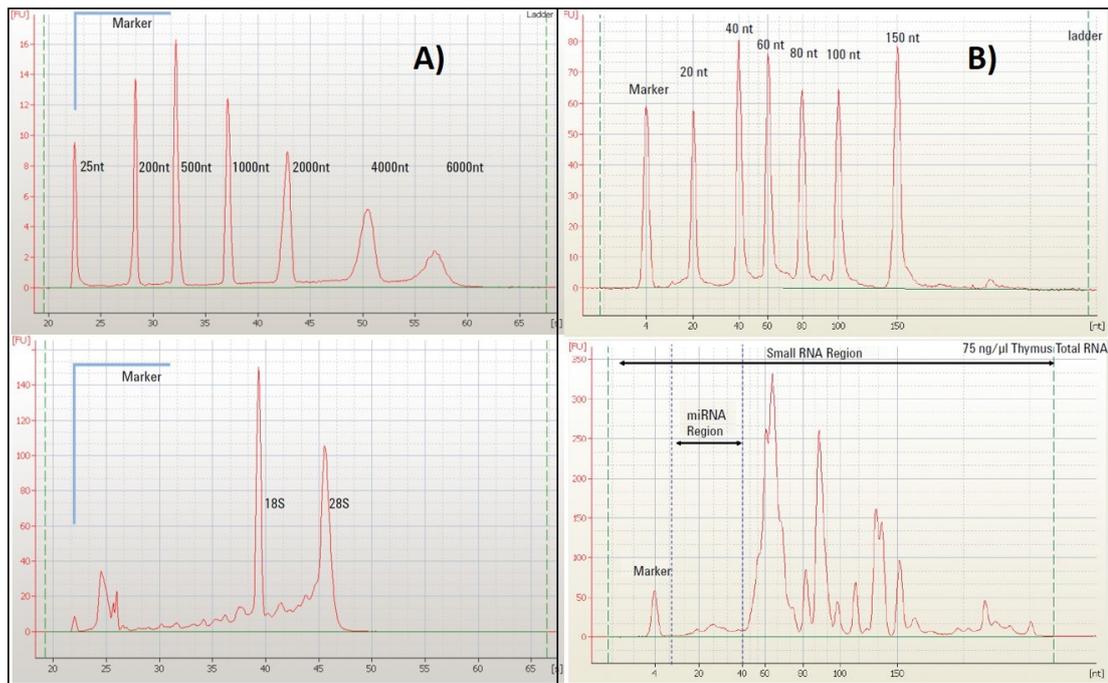


Figura 15: A) Elettroferogramma chip Pico RNA. In alto sono riportati i picchi corrispondenti alle frazioni nucleotidiche del ladder. In basso viene mostrato un campione di RNA in condizioni ottimali vista la conservazione delle frazioni di RNA ribosomiale 18S e 28S. B) Elettroferogramma chip Small RNA. In alto sono riportati i picchi corrispondenti alle frazioni nucleotidiche del ladder. In basso è riportata l'intera area di small RNA del campione e la piccola frazione di miRNA compresa tra i 10 e i 40 nucleotidi.

Questo chip permette quindi di poter individuare se il materiale estratto contenga anche una frazione di miRNA. L'associazione tra l'analisi con chip Pico e Small RNA permette dunque di evincere la qualità del RNA totale (oltre alla concentrazione) e sottolineare la presenza o meno di miRNA.

5.4.6 NGS sequencing

Dopo aver estratto l'RNA totale e valutata la qualità e concentrazione della frazione di miRNA, i campioni sono stati sottoposti a *miRNA-seq* mediante sequenziamento NGS (*Next Generation Sequencing*) tramite piattaforma illumina NextSeq 500 (Figura 16). Questa fase della sperimentazione ha permesso di evidenziare tutti i possibili miRNA espressi sia a livello tissutale renale che nelle EVs sieriche.



Figura 16: Piattaforma illumina NextSeq 500

Considerate le concentrazioni ridotte di miRNA estratti dai campioni si è deciso di usare il kit *SMARTer® smRNA-Seq* (Clontech) capace di generare librerie di sequenziamento per *small-RNA* su piattaforma Illumina, partendo da concentrazioni ridotte di RNA totale (1ng–2µg). Per la buona riuscita degli esperimenti è necessario che l'RNA usato presenti livelli adeguati di qualità e purezza (privo da contaminazioni) oltre ad essere stato ottenuto con metodiche che preservino la frazione di piccoli RNA (*small RNA_smRNA*). Tutti i kit adottati nelle fasi precedenti soddisfano questi requisiti. L'intero processo prevede l'uso di un controllo positivo, un microRNA noto: miR-163s.

5.4.6.1 Schema riassuntivo del sequenziamento NGS

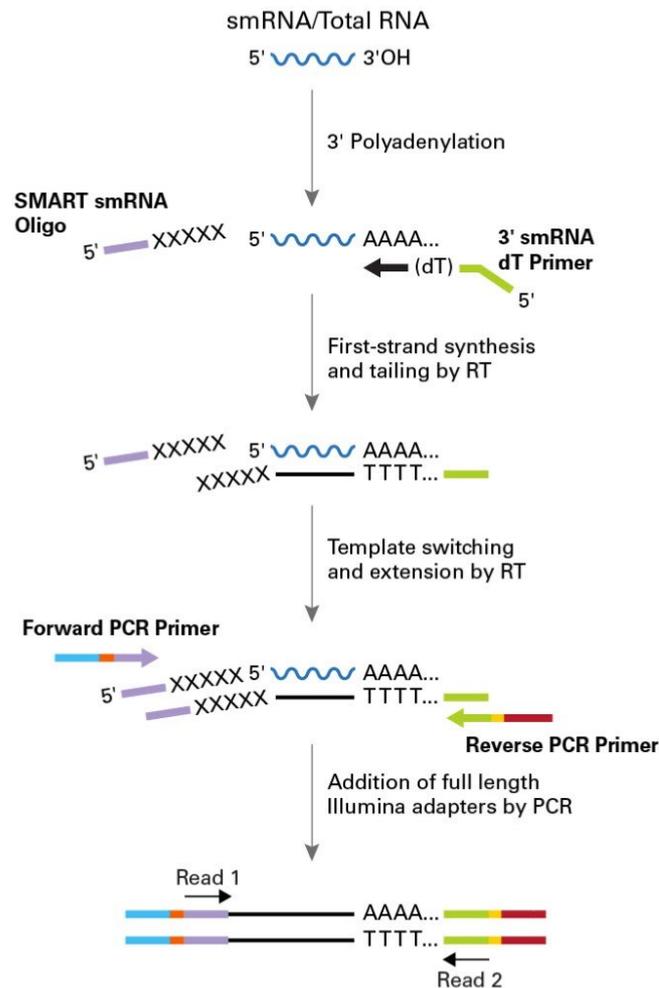


Figura 17: SMARTer smRNA-Seq Kit for Illumina. Il processo inizia con la poliadenilazione del RNA per facilitare l'innescio del primer oligo(dT) durante la sintesi di cDNA. In seguito l'enzima trascrittasi inversa (RT) aggiunge alla porzione 5' terminale nucleotidi coniugati con acidi nucleici "stabilizzati" (*locked nucleic acid-LNA*), prodotti appositamente per aumentare la sensibilità della reazione. Durante la successiva fase di *switch* del filamento stampo un'altra sequenza adattatrice viene aggiunta alla porzione 3' terminale di ogni molecola di cDNA a singolo filamento. Nella fase seguente di amplificazione (PCR) vengono aggiunti i restanti adattatori Illumina *full lenght* e i primer forward e reverse si legano rispettivamente alle sequenze congiunte alle terminazioni 3' e 5'. L'intero processo porta alla creazione di librerie di molecole di cDNA che verranno sequenziate e allineate durante l'analisi bioinformatica.

5.4.6.2 SMARTer smRNA-Seq: Poliadenilazione

La procedura inizia con la poliadenilazione del campione (aggiunta di catena costituita da Adenine tramite enzima Poly-A polimerasi) per

facilitare l'innescò dei primer durante la sintesi del cDNA. Per ogni campione di RNA si usa un volume di reazione massimo di 7µl al quale viene aggiunta la mix di reazione (3µl) composta da: enzima Poly-A, RNase Inhibitor (blocca l'azione delle RNAsi che potrebbero degradare il campione di RNA) e smRNA Mix1 (Figura 18). I campioni mescolati con la mix vengono incubati 5 min a 16°C.

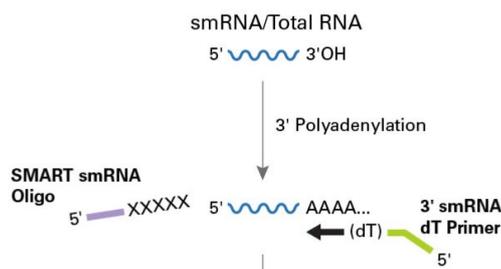


Figura 18: Poliadenilazione

5.4.6.3 SMARTer smRNA-Seq: Sintesi del cDNA

La fase di retrotrascrizione dell'RNA a cDNA procede con l'aggiunta ad ogni campione di 1µl di 3' smRNAdT Primer (incubazione a 72°C per 3 minuti) a cui segue l'aggiunta di 9µl di mix RT (smRNA Mix2, RNase Inhibitor, PrimeScript RT). I campioni mescolati con la mix RT (volume finale = 20 µl) vengono processati in termociclatore secondo il seguente schema:

Temperatura	Tempo
42°C	60 min
70°C	10 min
4°C	∞

Questa fase si conclude con l'aggiunta degli adattatori alle terminazioni 3' e 5' del singolo filamento di cDNA (Figura 19).

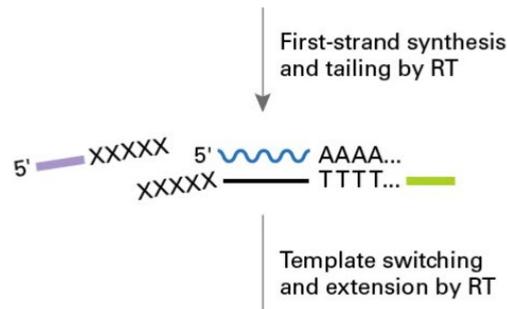


Figura 19: Sintesi del cDNA

5.4.6.4 SMARTer smRNA-Seq: PCR e *Cleanup*

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione viene amplificato tramite PCR. Ad ogni campione di cDNA vengono aggiunti 76µl di mix di reazione per PCR (acqua nuclease-free, buffer SeqAmp PCR 2X, enzima DNA polimerasi SeqAmp) e 2µl di primer forward e reverse. I campioni mescolati con la mix vengono velocemente denaturati a 98°C per 1 minuto prima di essere amplificati (Figura 20) secondo lo schema di PCR seguente:

Step PCR	Temperatura	Tempo	Cicli
denaturazione	98°C	10 sec	17
annealing	60°C	5 sec	
allungamento	68°C	10 sec	
mantenimento	4°C	∞	

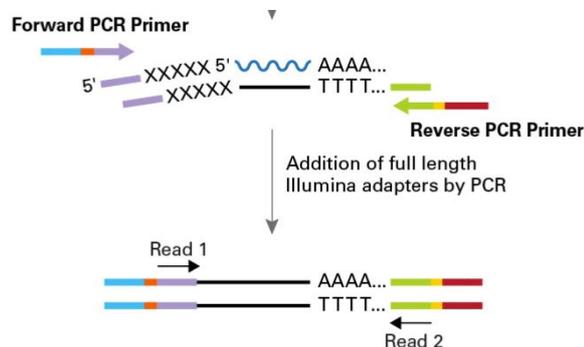


Figura 20: Amplificazione mediante PCR

I campioni amplificati vengono in seguito purificati con PCR Clean-Up kit ed eluiti in 30µl di NE buffer. Concluso il processo, le librerie di miRNA ottenute e purificate possono essere conservate a -20°C per lungo tempo.

5.4.6.5 Validazione delle Librerie

Per determinare se le librerie siano state prodotte correttamente e quindi siano sequenziabili, queste devono essere validate sia quantitativamente che qualitativamente. Nel primo caso le concentrazioni vengono rilevate mediante fluorometro ThermoFisher Qubit con kit *dsDNA HS Assay*, mentre nel secondo caso, la qualità viene rilevata tramite analisi con strumento Agilent Bioanalyzer 2100 utilizzando kit *High Sensitivity DNA*.

Le concentrazioni delle librerie dovrebbero essere indicativamente ≥ 10 ng/µl per i campioni di RNA, ≥ 14 ng/µl per il controllo positivo (miR-163s) mentre è tollerata una concentrazione approssimativa di 1–2 ng/µl per il controllo positivo (possibile dimerizzazione di adattatori).

La qualità delle librerie prodotte, analizzata tramite Bioanalyzer, deve riportare per ogni elettroferogramma di sequenza un picco corrispondente a circa 175 bp (controllo positivo_miR-163s), e un picco pari a 147 bp (controllo negativo). Sono identificabili anche piccoli picchi compresi tra 140 e 153 bp corrispondenti a dimeri di sequenze adattatrici (Figura 21).

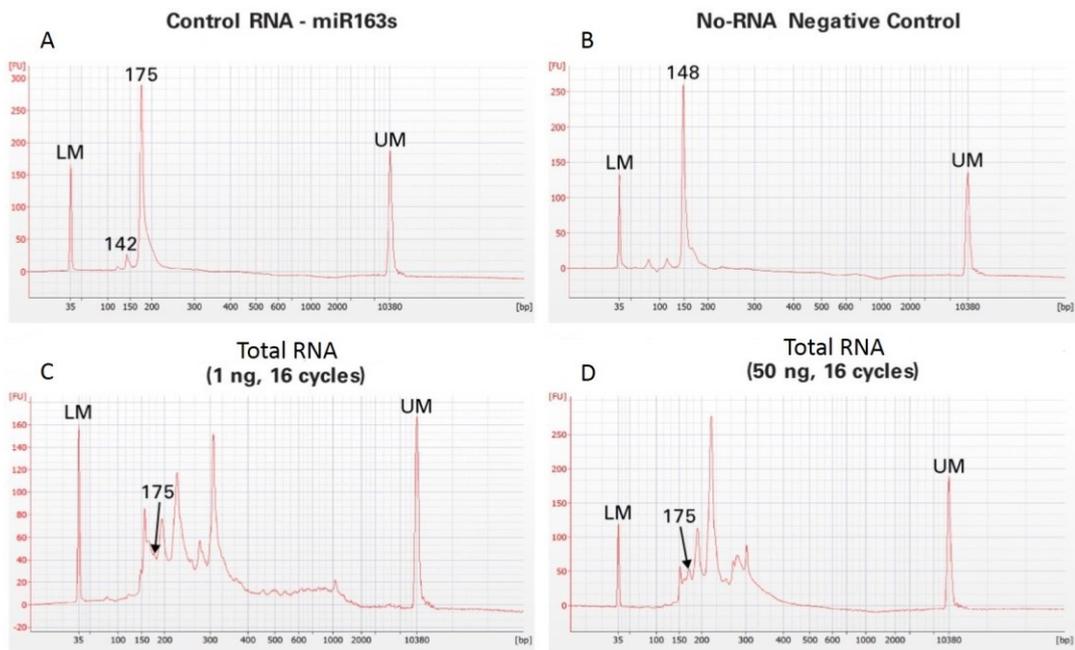


Figura 21: Esempio di elettroferogramma; librerie ottenute con smRNA-seq. A) Il picco a 175 bp corrisponde al controllo positivo (miR163s) mentre quello a 142 bp rappresenta dimeri di *primer*. B) Picco del controllo negativo. C)D) Profilo rilevabile da librerie ottenute con campioni di RNA di input pari a 1ng/50ng rispettivamente.

Al fine di massimizzare la resa del sequenziamento, evitando di processare anche frazioni di RNA o dimeri di primer e/o adattatori, si procede all'arricchimento dei campioni mediante esclusione con biglie magnetiche (*AMPure beads*) del materiale di scarto (Figura 22).

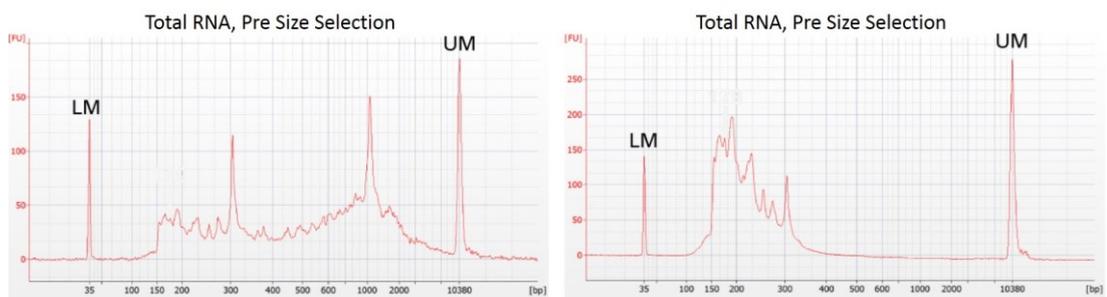


Figura 22: Esempio di elettroferogramma: I risultati delle librerie ottenute con smRNA-seq prima e dopo l'arricchimento tramite *size-selection* con biglie magnetiche.

5.4.6.6 Sequenziamento

Le librerie di DNA precedentemente prodotte e purificate sono state sequenziate su piattaforma illumina NextSeq 500. Questo strumento adotta un sistema di sequenziamento noto come *two-channel sequencing by synthesis (SBS) technology*.

Durante la produzione delle librerie vengono usate delle sequenze adattatrici che legandosi al DNA permettono l'aggancio dei primers specifici forward/reverse oltre a premettere la corretta adesione del DNA alla flow cell consentendo la corretta esecuzione della Bridge PCR. Questo sistema prevede l'aggiunta di nucleotidi coniugati con fluorocromi per sequenziare milioni di gruppi (cluster di DNA) amplificati in parallelo sulla superficie della flow cell ("piastra di caricamento"). Il processo può essere riassunto in due tappe principali:

- il primo step della processazione prevede l'amplificazione in parallelo di segmenti di DNA legati alla superficie vitrea della flow cell (suddivisa a sua volta in diverse *lanes*) tramite sequenze adattatrici. (Figura 23). Queste sequenze vengono amplificate/clonate milioni di volte tramite più cicli di *Bridge PCR* (Figura 23A).
- il secondo step che prevede l'incorporazione di nucleotidi marcati con fluorocromi (dNTPs). L'incorporazione dei dNTPs porta all'emissione di fluorescenza che viene percepita sul vetro della flow cell come un uno spot luminoso. L'insieme degli spot luminosi viene rilevato e rielaborato dal software dello strumento come una serie di stringhe di sequenze chiamate *reads* (Figura 23B).

I milioni di *reads* ottenuti vengono successivamente analizzate tramite *tools* bioinformatici e statistici.

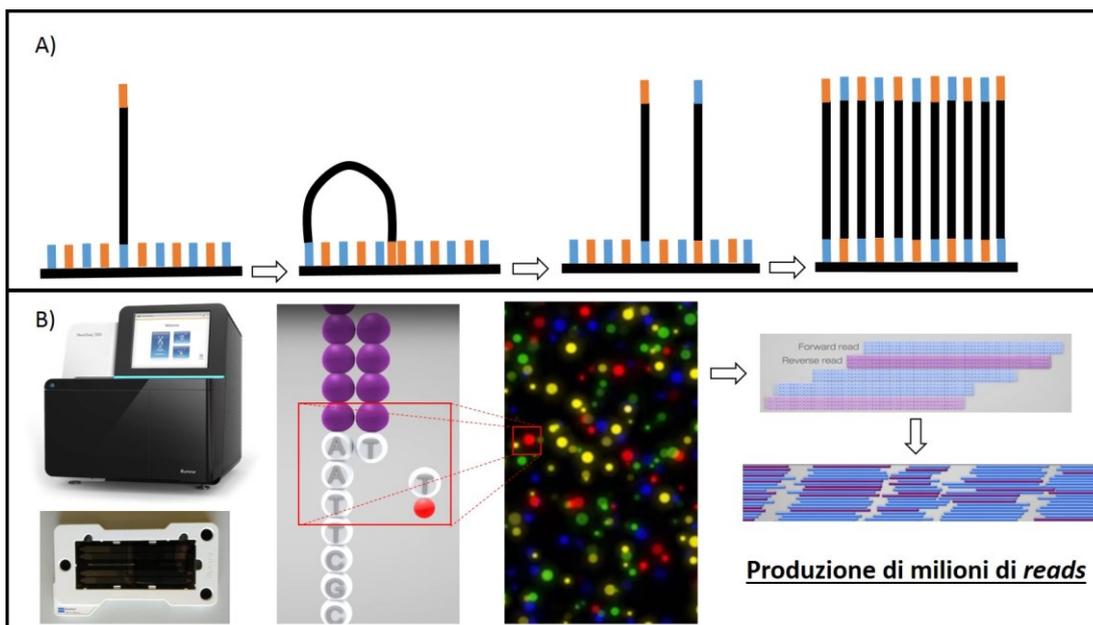


Figura 23: Schema sequenziamento con SBS Technology: A) amplificazione clonale delle librerie di DNA tramite Bridge PCR. B) produzione delle reads: i campioni caricati sulla flow cell vengono sequenziati. Gli spot luminosi rilasciati sul vetro della cella vengono rielaborati per la creazione di milioni di diverse reads.

5.5 Analisi bioinformatica e statistica dei dati

5.5.1 Read trimming

Prima di procedere all'allineamento delle sequenze su piattaforma online miRBase, i dati relativi alle *reads* ottenute sono stati rielaborati. In particolare è stato effettuato il *read trimming* delle sequenze, ossia l'eliminazione delle sequenze adattatrici. Le sequenze degli adattatori potrebbero infatti portare ad errori di allineamento, incrementando il numero di *reads* non lette, essendo sequenze sintetiche non rintracciabili nel genoma.

Considerando la taglia dei frammenti prodotti durante le processazioni per small RNA-seq, la probabilità di lettura errata di sequenze adattatrici è molto alta, di conseguenza l'utilizzo del *read trimming* è essenziale.

5.5.2 miRBase

miRBase (<http://www.mirbase.org/>) è un database utile alla consultazione delle informazioni relative ai miRNA. In particolare vengono riportate informazioni relative sia a porzioni di presunti trascritti di miRNA (chiamati *mir*), sia informazioni relative alle posizioni e alla sequenza dei miRNA maturi (chiamati *miR*) nonché le predizioni dei loro target putativi.

Dall'allineamento delle *reads* ottenute tramite sequenziamento è stata individuata la lista miRNA espressi nei campioni analizzati.

5.5.3 Analisi statistica

È stata condotta un'analisi statistica al fine di individuare quali sequenze di miRNA fossero differenzialmente espresse nel tessuto e nelle EVs sieriche dei campioni dei pazienti arruolati. A tal fine è stato utilizzato il software statistico *open source R*, programma

realizzato a fine anni '90 e ad oggi uno dei più diffusi e affidabili per analisi statistiche. Dato che la distribuzione di Poisson assume l'uguaglianza di media e varianza, e avendo un numero ridotto di campioni, è stato utilizzato un pacchetto specifico di R, più adatto alle nostre esigenze (edgeR). edgeR è usato per l'analisi differenziale d'espressione genica ed è molto diffuso per lo studio di dati ottenuti con RNA-seq. Questo pacchetto adotta metodi statistici basati sulla distribuzione binomiale negativa come possibile modello di valutazione della variabilità numerica, implementandoli con l'aggiunta di metodi empirici Bayesiani, il test t esatto e con modelli lineari generalizzati.

6. RISULTATI

6.1 Compilazione del database

Nel periodo relativo al mio progetto di dottorato è stato creato e periodicamente aggiornato, un database in Access. Sono stati inseriti dati clinici e anamnestici dei pazienti trapiantati e seguiti negli ultimi 7 anni presso la Nefrologia Pediatrica del Dipartimento Aziendale Integrato di Salute della Donna e Bambino di Padova. Tutti i dati relativi ai 30 pazienti valutati per lo studio sono stati estrapolati dal database.

Di seguito vengono riportate le caratteristiche della popolazione oggetto di studio, divisa nei due gruppi (Tabella 2): pazienti con rigetto subclinico (SCR) e controlli non rigettati (CONT).

Diagnosi istologica	Numero pazienti
Banff 1 (Istologia normale)	10
Banff 2 (rigetto anticorpo mediato)	3 (di cui un Banff 2a)
Banff 3 (Borderline_rigetto cellulare)	4
Banff 4 (rigetto cellulare)	3 (di cui 1 Banff 4 1a e 1 Banff 4 1b)

Tabella 2: Caratterizzazione istologica dei pazienti secondo la classificazione di Banff

I dati sono stati analizzati con statistica multivariata eseguendo test per dati non parametrici (Test U di Mann-Whitney per dati indipendenti) e categorici (test Chi-quadrato di Pearson con correzione secondo test esatto di Fisher). L'ipotesi nulla di una distribuzione omogenea dei valori osservati tra i due gruppi è stata sempre accettata (tutte le $p > 0,05$) (Tabella 3).

Caratteristiche osservate	SCR	CONT	<i>p-value</i>
Sesso			$p > 0,05$
Maschi	4	9	
Femmine	6	1	
Età	11 ± 4,7	10 ± 5,1	$p > 0,05$
Altezza	127 ± 25	133 ± 27	$p > 0,05$
Peso	37,5 ± 14,9	40 ± 17,1	$p > 0,05$

Terapia			<i>p</i> > 0,05
CsA	3	3	
FK506	7	7	
CellCept	6	6	
Myfortic	4	4	
PDN	9	10	
MPDN	1	0	
Creatinina sierica (µmol/l)	67 ± 27,5	70,5 ± 25,6	<i>p</i> > 0,05
Proteinuria (g/l)	0,135 ± 0,3	0,05 ± 0,06	<i>p</i> > 0,05
Proteinuria (g/24h)	0,195 ± 0,5	0,13 ± 0,08	<i>p</i> > 0,05
e-GFR (ml/min/1.73m ²)	82,3 ± 23,4	96,9 ± 19,2	<i>p</i> > 0,05
HLA-DSA positivi	1/10	4/10	<i>p</i> > 0,05

Tabella 3: Caratteristiche clinico anamnestiche della popolazione (vengono riportate le mediane e le deviazioni standard). I pazienti don dosaggi anticorpali HLA-DSA positivi presentavano anticorpi HLA di classe II (DQ2, DQ5, DQ9) con MFI (*Mean Fluorescence intensity*) comprese tra 2000 e 12000. Abbreviazioni: CsA = ciclosporina; FK506 = Tacrolimus; PDN = Prednisone; MPDN = Metilprednisolone; e-GFR = velocità di filtrazione glomerulare, HLA-DSA = human leucocyte antigen-donor specific antibody).

I campioni bioptici e sierici dei 20 pazienti idonei erano conservati adeguatamente presso il laboratorio di Immunopatologia e Biologia Molecolare del Rene, del Dipartimento di Salute Donna e Bambino di Padova.

6.2 Qualità e concentrazione dei miRNA

La valutazione del RNA totale dei campioni bioptici ha evidenziato quantità modeste di miRNA ricavabili dalla matrice renale. Le concentrazioni di miRNA rilevate dall'analisi quali/quantitativa erano comprese tra 0,7 e 7 ng/µl con un RIN adeguato in un *range* tra 7 – 8.5 (Figura 24 A). La stessa valutazione è stata eseguita su campioni vescicolari sierici. In questo caso le concentrazioni dei miRNA sono risultate esigue, con *range* compreso tra 0.06 e 0.52 ng/µl. Per quanto riguarda le vescicole sieriche, non è stato possibile ricavare un RIN in quanto tale tipologia di campioni non presenta le frazioni ribosomiali 18S e 28S, necessarie alla valutazione della qualità del RNA totale (Figura 24 B).

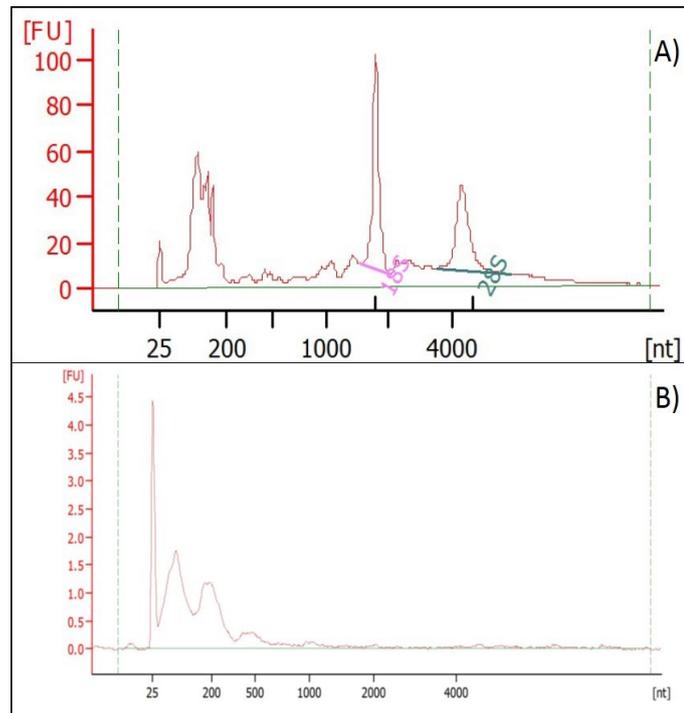


Figura 24: Chip Pico RNA. Si osserva la differente concentrazione di RNA totale ricavabile da le due tipologie di campione: A) Campione bioptico: sono visibili la frazione di miRNA (25 – 200 nt) e i picchi di RNA ribosomiale 18S e 28S. B) Campione di EVs sieriche. È visibile la frazione di miRNA (25 – 200 nt). Non sono visibili i picchi di RNA ribosomiale.

6.3 miRNA identificati nei tessuti

Lo screening dei miRNA è stato inizialmente eseguito su campioni bioptici. La normalizzazione delle conte del numero di *reads* prodotte tramite sequenziamento dei miRNA ha evidenziato una distribuzione omogenea dei campioni all'interno dei due gruppi SCR/CONT. L'analisi ha evidenziato l'espressione di 1095 miRNA diversi nelle biopsie di pazienti CONT e SCR. Di questo *pool* di microRNA una piccola frazione è risultata differentemente espressa nei due sottogruppi analizzati.

L'analisi statistica ha infatti dimostrato una sovraespressione di 5 miRNA in biopsie di pazienti SCR rispetto a quelle di pazienti con quadro istologico di Banff 1 ($p\text{-value} < 0.05\%$ _Tabella 4).

miRNA	<i>p-value</i>
hsa-miR-101-3p	0.0429
hsa-miR-185-5p	0.0428
hsa-miR-106b-3p	0.0315
hsa-miR-142-3p	0.0125
hsa-miR-142-5p	0.0059

Tabella 4: Sono indicati i valori di p-value in corrispondenza del miRNA di riferimento.

In figura 25 viene riportata la *HeatMap* dei miRNA differenzialmente espressi. In particolare si osserva che i dati clusterizzano in due macro gruppi, parzialmente sovrapponibili con la suddivisione dello studio (SCR/CONT).

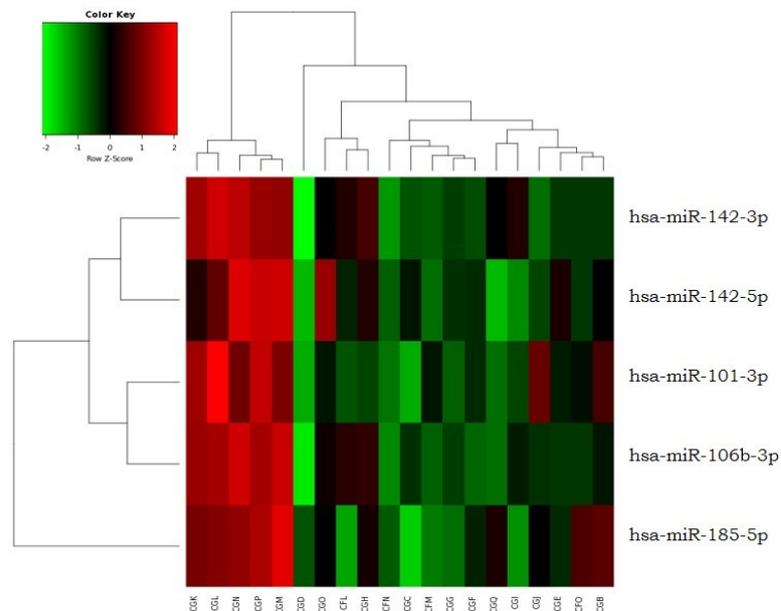
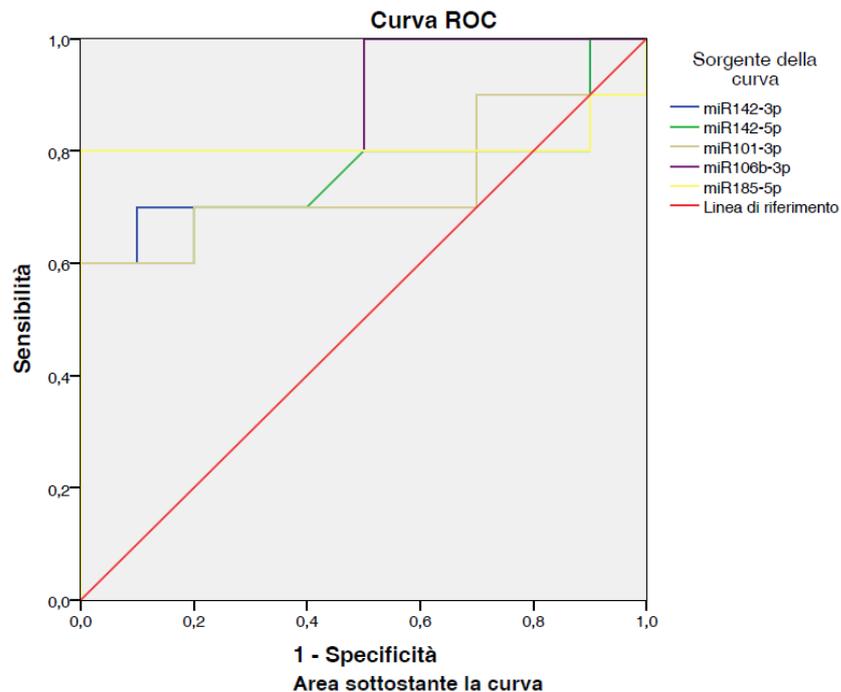


Figura 25: La HeatMap permette la visualizzazione dei dati d'espressione in riferimento al risultato statistico ottenuto. Sono colorati in rosso i miRNA in sovraespressione, in verde quelli sotto espressi, nero quelli che non sono

differentemente espressi nelle 20 biopsie renali. Si può osservare una clusterizzazione della sovraespressione dei 5 miRNA (rosso) in 5 campioni di pazienti in fase di rigetto ad un anno dal trapianto (CGK, CGL, CGN, CGP, CGM).

È stata condotta l'analisi di sensibilità per verificare quanto i miRNA sovraespressi siano in grado di identificare i pazienti SCR rispetto ai CONT. I dati sono stati stratificati mediante curva di ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Tutti i miRNA mostrano un'elevata sensibilità e specificità nel distinguere i pazienti in fase di rigetto. In particolare sembra che miR-106b-3p e miR-185-5p i migliori discriminanti (AUC *area under curve* = 0.900 e 0.810 rispettivamente_Figura 26).



Variabili del risultato del test	Area	Errore std ^a	Sig. asintotica ^b	Intervallo di confidenza al 95% asintotico	
				Limite inferiore	Limite superiore
miR1423p	,740	,126	,070	,493	,987
miR1425p	,755	,120	,054	,520	,990
miR1013p	,740	,123	,070	,499	,981
miR106b3p	,900	,073	,002	,756	1,000
miR1855p	,810	,121	,019	,573	1,000

Figura 26: analisi di sensitività dei miRNA sovraespressi: A) Grafico della curva di ROC. B) analisi della curva di ROC.

6.4 **miRNA identificati nel siero**

I campioni di miRNA ottenuti dalle EVs sieriche hanno evidenziato una distribuzione omogenea tra i due gruppi SCR/CONT nel numero di conte delle *reads* prodotte dal sequenziamento. Sono stati ottenuti circa 100 differenti miRNA, sopra o sotto espressi ma, non in modo statisticamente significativo ($p\text{-value} > 0.05$). In particolare sono stati individuati anche 4 dei 5 miRNA che risultavano sovraespressi nelle biopsie dei pazienti trapiantati con diagnosi istologica di rigetto: **miR-142-3p, miR-142-5p, miR-101-3p e miR-185-5p**.

7. DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Il trapianto di rene ad oggi è il trattamento elettivo per quanto riguarda la cura di pazienti in insufficienza renale in fase terminale. Sebbene le terapie immunosoppressive abbiano migliorato la durata media dei trapianti di rene in età pediatrica, la percentuale di sopravvivenza del *graft* a cinque anni dal trapianto è tuttavia del 83%, nel caso di donatore vivente, e del 70%, nel caso di donatore cadavere [80]. Considerando le aspettative di vita di un bambino, questo risultato è inaccettabile. Attualmente il mezzo d'elezione per valutare l'andamento del rene trapiantato è l'ago-biopsia renale. In particolare, la biopsia di protocollo è l'unica procedura in grado di evidenziare il rigetto subclinico, che rimane tuttavia, una pratica invasiva e non predittiva di danno renale. Negli ultimi anni molti studi si sono focalizzati sull'individuazione di nuovi possibili strumenti prognostici, ovvero in grado di prevenire l'insorgenza del rigetto, prima della comparsa del danno istologico. Ciò nonostante, non si è ancora giunti alla definizione di un pannello di biomarcatori utili e applicabili in ambito pediatrico.

Questo è il primo studio ad oggi che si è prefissato di identificare un profilo di miRNA utile per la predizione del rigetto renale subclinico in biopsie di protocollo e in campioni vescicolari sierici, di bambini trapiantati di rene.

È stato condotto uno screening della frazione di miRNA espressa in campioni bioptici di 20 pazienti selezionati da un *pool* di 30 bambini trapiantati di rene. La scelta dei campioni si è basata sulle loro condizioni cliniche, sul referto istologico ad un anno dal trapianto suddividendo pazienti in rigetto subclinico (SCR: biopsia con diagnosi Banff 2, 3 e 4) e in pazienti di controllo non rigettati (CONT: Banff 1). Inoltre si sono considerate le concentrazioni di miRNA ottenute dal frammento bioptico stoccato e processato.

I pazienti arruolati e suddivisi nei due gruppi (SCR/CONT) mostravano caratteristiche simili e funzionalità renale stabile. Come

riportato nella sezione risultati (tabella 2), l'analisi statistica multivariata dei dati clinico anamnestici non ha riportato differenze statisticamente significative tra i due gruppi. La scelta di rendere omogenee le due popolazioni ha permesso di azzerare eventuali variazioni presenti nei due sottogruppi al fine di individuare i miRNA più significativamente associati al danno renale nel rigetto subclinico. I campioni bioptici e sierici analizzati fanno riferimento al periodo di ricovero per follow-up ad un anno post trapianto.

Le concentrazioni e l'integrità dei miRNA estratti da tessuto renale sono risultate sufficienti per il loro sequenziamento NGS. I campioni vescicolari sierici non presentavano un indice di qualità del RNA (RIN) in quanto, come noto in letteratura, all'interno di campioni plasmatici e sierici non è possibile rintracciare le frazioni ribosomiali 18S e 28S [81] essendo questi campioni privi della componente cellulare.

Il sequenziamento dei micro-RNA tissutali ha evidenziato la presenza di 1095 miRNA diversi. L'analisi statistica ha portato all'identificazione di 5 miRNA sovraespressi nel cluster dei pazienti SCR, rispetto ai CONT (*p-value* da 0,04 a 0,005). Le analisi effettuate sui campioni di vescicole extracellulari sieriche, degli stessi pazienti, hanno evidenziato la presenza di soli 100 diversi miRNA, senza però identificare differenze statisticamente apprezzabili tra i 2 gruppi. Ad ogni modo 4 dei 5 miRNA associati al rigetto a livello tissutale, risultano espressi anche nel pool di miRNA identificati nelle vescicole sieriche.

Tra i miRNA differenzialmente espressi nelle biopsie ritroviamo miR-142-3p e 5p, due miRNA derivanti da diverse maturazioni dello stesso pre-micro-RNA, noti in letteratura anche in ambito di trapianto renale come possibili marker di danno istologico. *Soltaninejad E. et al* nel 2015 hanno pubblicato i risultati di una ricerca fatta su 35 pazienti adulti trapiantati di rene e a loro volta suddivisi in due gruppi: pazienti con rigetto acuto cellulare e pazienti senza lesioni istologiche.

Dal confronto dei due gruppi è emerso come miR-142-3p e 5p risultino sovraespressi in campioni biotici mentre miR-142-3p anche in campioni di linfomonociti da sangue periferico [61]. Un altro studio ha sottolineato l'associazione positiva tra la sovraespressione di miR-142-3p in campioni leucocitari e urinari, la condizione istologica di rigetto acuto e la presenza di necrosi tubulare del rene trapiantato in soggetti adulti [82]. In entrambe queste pubblicazioni vi è correlazione nella sovraespressione di questi miRNA a livello tissutale, in campioni leucocitari e in sedimenti urinari. Differentemente da quanto riportato in questi studi, nel nostro caso non è stata riscontrata una correlazione tra i miRNA tissutali e quelli circolanti. È ipotizzabile che questo sia dovuto al tipo di campione di partenza (EVs da siero vs leucociti da sangue periferico) dal quale abbiamo ottenuto minori concentrazioni di miRNA. Inoltre va sottolineato che gli studi riportati si basano su l'identificazione di miRNA presenti in biopsie eseguite su indicazione clinica di rigetto, che potrebbe rappresentare uno stadio più avanzato del rigetto subclinico valutato nel nostro studio.

Nell'adulto, sembra che miRNA-142-3p sia direttamente coinvolto nella differenziazione dei linfociti Treg, che sia specifico per le linee cellulari nel rigetto d'organo trapiantato e necrosi [82] e che una sua sovraespressione possa regolare i processi infiammatori [83]. Quest'ultima ipotesi è avvalorata anche dalla coespressione a livello urinario sia di miR-142-3p, sia di CXCL10 (chemochina 10), nota molecola pro infiammatoria [84].

La sovraespressione di miR-142-3p nei tessuti di pazienti in fase di rigetto subclinico sembra trovare supporto anche in considerazione dei target genici di questo miRNA. Esso infatti regola, ad esempio l'espressione di WASL, gene codificante per la proteina *Wiskott-Aldrich syndrome like form*, coinvolto nei processi tumorogenetici ed espresso anche nel rene. La sovraespressione di miR-142-3p sembrerebbe inibire WASL il quale è essenziale nei processi di

infiltrazione/invasività da parte dei macrofagi [85]. Inoltre recentemente è stato osservato in un cluster di 1066 geni associati a rigetto acuto [86]. Il miR-142-3p sovraespresso in pazienti con rigetto renale, potrebbe agire su WASL riducendo quindi le capacità infiltranti delle cellule macrofaghe nel tessuto.

Anche miR-142-5p si associa positivamente all'insorgenza di rigetto renale. In particolare, è stato individuato in campioni di sangue periferico di pazienti adulti trapiantati di rene e con quadro clinico di rigetto cronico anticorpo mediato [60].

All'analisi bioinformatica, risulta anche per miR-142-5p una predizione di target genici coinvolti a livello renale; in particolare il gene AHR, codificante per la proteina *aryl hydrocarbon receptor* espressa anche nel rene. Studi su modelli murini hanno dimostrato che la stimolazione del recettore proteico AHR ha un ruolo attivo nel meccanismo di protezione del rene mediante il reclutamento di cellule Treg e cellule staminali nell'area danneggiata del rene [87].

Nella lista dei miRNA differenzialmente espressi è stato individuato anche miR-101-3p. Tale miRNA sembra essere associato, insieme ad altri 10 possibili miRNA sierici, con il danno da insufficienza renale acuta (AKI). In questo caso i pazienti, non trapiantati di rene, ed in particolare la popolazione di studio, erano ricoverati in terapia intensiva e presentavano un quadro clinico di insufficienza multiorgano [88].

miR-101-3p è stato anche associato con miR-142-3p in pazienti trapiantati di cuore, in fase di rigetto acuto [89]. Apparentemente quindi questo microRNA, legandosi ad una condizione di danno renale non correlato al trapianto, potrebbe non essere uno specifico marker di rigetto.

La ricerca su database miRbase per miR-101-3p mette in luce una possibile regolazione del gene STC1. Questo gene codifica per l'omonima proteina, *Staniocalcina-1*, una glicoproteina espressa anche nel rene, la cui produzione è collegata all'inibizione di specie

reattive dell'ossigeno. È noto che tra i fattori non immunologici del rigetto, sia l'ipertensione, che le dislipidemie, e l'iperomocisteinemia contribuiscano all'aumento di stress ossidativo nel rene trapiantato, ed è noto che meccanismi di regolazione genica possano contribuire a proteggere il rene riducendo le specie libere dell'ossigeno [90].

In particolare è dimostrato, sia in vitro sia in modelli animali, che STC1 agisca inibendo l'azione dell'anione superossido (O_2^-), riducendo i danni da ischemia/riperfusionazione [91]. STC1 svolgerebbe azione anti infiammatoria proteggendo il *graft* da possibili danni [92], che si potrebbero instaurare anche durante l'attivazione dei neutrofilo nei processi di infiltrazione renale in fase di rigetto. La sovraespressione di miR-101-3p bloccherebbe l'azione anti infiammatoria di STC1, diminuendo l'effetto protettivo della proteina sul rene.

Un altro miRNA risultato sovraespresso nei campioni tissutali dei CONT è miR-185-5p. Questo miRNA sembra implicato nella regolazione di diversi geni target tra cui SIX2 (*SIX homeobox 2*) e WNT1 (*WNT family member 1*). SIX 2 (associato alla regolazione della nefrogenesi) sembra essere essenziale nel rinnovo della matrice cellulare durante i processi di organogenesi del rene [93], quindi potrebbe avere un ruolo essenziale anche nella riparazione tissutale post danno renale da rigetto. WNT1, gene coinvolto nei processi di sviluppo renale, è strettamente correlato all'attivazione di TGF β (*transforming growth factor beta 1*). In una recente pubblicazione è dimostrato che l'inibizione di WNT1 previene l'attivazione di miofibroblasti ad opera del TGF β (esperimenti in vitro) [94]. La sovra stimolazione dei miofibroblasti porterebbe a deposizione di matrice e comparsa di fibrosi. L'azione di "sequestro" ad opera di miR-185-5p su WNT1, risulterebbe quindi utile nei processi di blocco della fibrosi renale, sia nel rigetto cellulare che nel rigetto umorale renale.

L'ultimo dei 5 miRNA identificati nel presente studio è miR-106b-3p. Il database miRbase riporta che tale miRNA appartiene alla famiglia dei miR-17, noti per essere sovraespressi durante la fase di "*recovery*"

dopo danno da I/R in modelli murini [95]. Nell'uomo invece, miR-106b è stato associato a pazienti con una miglior prognosi post-nefrectomia per carcinoma renale. Gli autori ipotizzano che questo sia dovuto al coinvolgimento della famiglia miR-106b nella via di “*signaling*” del TGF β [96]. Più recentemente *Q. Tang et al*, in uno studio in vitro su cellule HEK, dimostrano un suo incremento correlato all'inibizione del TGF β durante la transizione mesenchimo epiteliale (EMT) [97]. Considerando TGF β un importante fattore di crescita, coinvolto nei processi pro-fibrotici, è possibile ipotizzare che un aumento di miR-106b-3p possa *down*-regolare la sua attività nei processi di fibrosi e EMT nel rigetto di trapianto renale.

Per quanto riguarda l'analisi di screening di miRNA nei sieri, contrariamente a quanto osservato nei tessuti, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative di espressione, sebbene 4 dei 5 miRNA fossero comunque espressi nelle vescicole sieriche. Va considerato che nel nostro studio, il fenomeno di rigetto che si vuole evidenziare è molto precoce rispetto a quello considerato negli altri studi. Infatti i dati di letteratura riportati, si riferiscono a rigetti d'organo con manifestazioni cliniche/funzionali già in atto, mentre nel nostro caso, grazie alle biopsie di protocollo, si vogliono valutare fenomeni di rigetto subclinico presenti in organi con funzionalità normale.

I dati ottenuti suggeriscono che il rigetto subclinico possa essere un fenomeno locale e per questo i miRNA trovati sovraespressi nel tessuto non siano ancora rilevabili in circolo.

Come già argomentato, la scelta di valutare i miRNA nelle vescicole extracellulari sieriche anziché nelle cellule leucocitarie periferiche, ha influenzato notevolmente le quantità di miRNA ottenute. Essendo lo studio retrospettivo, tale scelta è stata dettata dalla possibilità di analizzare solo campioni sierici stoccati per un precedente studio sui metaboliti, nei pazienti trapiantati. Prima di iniziare sono state

confrontate le concentrazioni di miRNA ottenibili dalle vescicole sieriche o da siero *in-toto* (compresi eventuali miRNA circolanti). Non risultando differenze nelle concentrazioni, è stato deciso di proseguire con il protocollo per i miRNA vescicolari, in previsione di continuare lo studio anche nell'ambito delle vescicole extracellulari urinarie (uEVs). La ricerca andrà infatti a completarsi, con la caratterizzazione delle uEVs e valutazione del loro contenuto in miRNA sulle urine dei pazienti trapiantati, permettendo di scoprire dei biomarcatori più accessibili e strettamente correlati ai meccanismi di patogenesi del rigetto renale. Oltre all'identificazione dei miRNA vescicolari, le uEVs stesse potrebbero essere dei possibili biomarcatori. Infatti, essendo esse prodotte dalle cellule nei processi di comunicazione inter cellulare, ci si aspetta che vengano rilasciate in quantità diverse dalle diverse aree del nefrone, in relazione alla condizione fisiopatologica del rene. Questa loro classificazione, potrebbe essere aiutata grazie all'identificazione delle loro dimensioni e delle proteine di membrana che le caratterizzano. Tale argomento è approfondito nell'appendice PROSPETTIVE FUTURE.

In conclusione lo screening dei miRNA su campioni tissutali e vescicolari sierici ha portato all'identificazione di 5 possibili candidati sovraespressi nel tessuto, 4 dei quali rintracciabili anche nei campioni vescicolari sierici. Come riportato in letteratura, alcuni risultano sovraespressi in pazienti adulti nel rigetto, mentre una parte di questi sembra essere regolatore di geni target coinvolti in processi nefrogenetici e/o nella patologia renale.

Il valore aggiunto di questo studio è la conferma del coinvolgimento di questi miRNA anche in ambito pediatrico, ma soprattutto nel rigetto subclinico. Inoltre la loro presenza nelle vescicole sieriche, malgrado le difficoltà riscontrate nell'isolamento, conferma la loro possibile validità come vettori nella comunicazione cellulare nei processi fisiologici che sottendono al rigetto renale.

Si prevede di continuare il presente studio su una popolazione più ampia di bambini trapiantati di rene confermando la presenza dei miRNA selezionati mediante Digital-PCR sulle biopsie di protocollo, isolando e caratterizzando vescicole extracellulari dalle urine.

8. PROSPETTIVE FUTURE

I risultati ottenuti finora hanno incoraggiato la prosecuzione di questo studio valutando le potenzialità delle vescicole extracellulari come biomarcatori e fonte di informazioni delle cellule da cui sono prodotte. È stata avviata una fase prospettica, attraverso la messa a punto dei sistemi di isolamento e caratterizzazione delle vescicole extracellulari urinarie (uEVs). Quest'ultime risulterebbero infatti, una fonte diretta d'informazioni dello stato di salute del nefrone e quindi ottime candidate nella ricerca di nuovi biomarcatori predittivi di danno renale nel rigetto d'organo subclinico.

8.1 MATERIALI E METODI

Il primo obiettivo posto è stata la messa a punto di un metodo di isolamento e caratterizzazione dei miRNA da vescicole extracellulari urinarie valutando kit e metodologie già presente in commercio e applicando opportune modifiche ai protocolli. In questa fase sono stati utilizzati campioni di urine di volontari sani.

Di seguito viene riportato lo schema operativo:

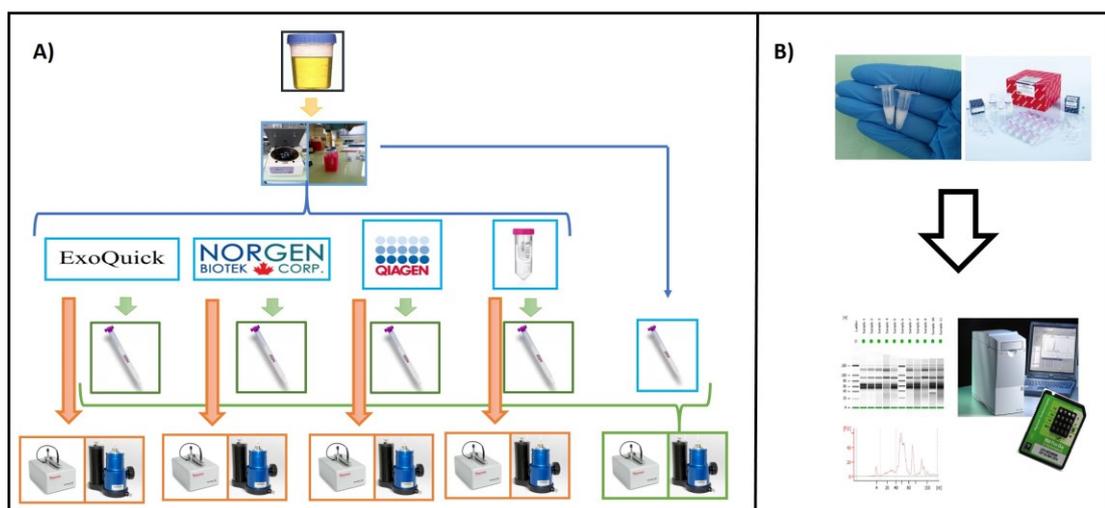


Figura 27: A) Piano di isolamento, purificazione e quantificazione della frazione proteica dei campioni di vescicole extracellulari. B) Estrazione e valutazione della concentrazione dei miRNA vescicolari

8.1.1 Preparazione dei campioni urinari

I campioni di urine sono stati prelevati da 3 volontari sani; in particolare sono stati processati campioni di urina del mattino. I campioni di urine sono stati centrifugati per 5 min x 4000 g, il surnatante è stato prelevato e filtrato con filtri da 0,22 µm. Queste due fasi iniziali sono essenziali per eliminare la frazione cellulare residua e tutti i detriti presenti nei campioni di urine che potrebbero inficiare il risultato della caratterizzazione vescicolare.

8.1.2 Isolamento delle vescicole extracellulari urinarie (uEVs)

I campioni di urine centrifugati e filtrati sono stati processati al fine di estrarre la frazione vescicolare. L'isolamento ha previsto il confronto fra più metodiche, quali: *Norgen Urine Exosome RNA Isolation Kit (modificato)*, *ExoQuick-TC™ Exosome Precipitation Solution*, *Qiagen exoEasy Maxi Kit*, *Ultracentrifugazione con filtri Amicon® filter column* e *Izon qEVsingle Size Exclusion Column*.

8.1.2.1 Norgen Urine Exosome RNA Isolation Kit (modificato)

Al campione di urine vengono aggiunti 300 µl di *slurry solution*, in dotazione al kit. Questa soluzione si lega a diverse componenti urinarie ma non alle vescicole extracellulari. La miscela viene poi mescolata e centrifugata due volte a 2500 rpm x 2 min, sciacquando il pellet con PBS 1X. Alla fine della seconda centrifuga viene prelevato il surnatante contenente le uEVs.

8.1.2.2 ExoQuick-TC™ Exosome Precipitation Solution

Il campione di urine viene unito a soluzione di precipitazione contenente glicole polietilene in rapporto 1:1/2. La miscela viene lasciata riposare a 4°C overnight prima di subire due passaggi in centrifuga a 1500 g (la prima di 30 minuti e la seconda di 5 minuti) nei quali viene eliminato il surnatante e vi è comparsa di un *pellet*

semitrasparente. Questo *pellet* contiene la frazione vescicolare depositata che viene successivamente risospesa in PBS.

8.1.2.3 Qiagen exoEasy Maxi Kit

Il campione viene mescolato in rapporto 1:1 con Buffer XBP e successivamente centrifugato su colonna filtrante a 500 g x 1 minuto. Segue un lavaggio con buffer XWP tramite centrifugazione a 3000 g x 5 minuti. Il filtro della colonna utilizzata trattiene la frazione vescicolare mentre il resto viene eliminato. L'ultimo passaggio prevede due lavaggi del filtro con buffer XE (incubato la prima volta per 1 minuto a t° ambiente) al fine di raccogliere l'eluato contenente la frazione di uEVs. I lavaggi sono fatti tramite centrifugazione: la prima 500 g x 5 min mentre la seconda (raccogliendo la soluzione filtrata) a 3000 g x 5 minuti.

8.1.2.4 Ultracentrifugazione con filtri Amicon® filter

L'ultracentrifugazione è una metodica di concentrazione della frazione vescicolare con eliminazione del restante materiale. Il campione di urine viene centrifugato a 4000 rpm x 30 minuti. Il filtro Amicon trattiene la frazione vescicolare. Dopo aver eliminato il filtrato si effettua un lavaggio della colonna filtrante con PBS (in rapporto 1:1 con il volume iniziale del campione) mediante centrifuga a 4000 rpm x 30 minuti. Al termine della seconda centrifuga viene raccolta la frazione vescicolare presente sul fondo della colonna filtrante.

8.1.2.5 Izon qEVsingle Size Exclusion Column

Questa colonna è prodotta per purificare i campioni di vescicole extracellulari dalla frazione proteica contaminante. In questo studio è stata utilizzata come metodo diretto di isolamento e purificazione di uEVs. Il processo prevede l'aggiunta del campione all'interno della colonna. Tramite aggiunta di PBS le particelle presenti nella colonna scorrono a velocità diverse in base alle dimensioni e al peso delle

stesse. Vengono raccolte frazioni di 200 μ l e in particolare, secondo protocollo, le frazioni dalla 6 alla 9, contenenti le vescicole extracellulari urinarie.

8.1.3 Purificazione delle uEVs

Tutti i campioni di vescicole isolate con i diversi metodi (ad eccezione di quelli ottenuti con colonne SEC, già purificate), sono stati anche processate con colonne IZON qEVsingle SEC al fine di eliminare la frazione proteica e verificare le possibili differenze nella quantificazione delle vescicole. La procedura di purificazione segue il principio spiegato sopra per le *Izon qEVsingle Size Exclusion Column*.

8.1.4 Quantificazione della frazione proteica vescicolare

La componente proteica dei campioni di uEVs pre e post purificazione è stata quantificata con saggio dell'acido bicincoico (*BCA assay*) usando due strumentazioni diverse; uno spettrofotometro classico e il Thermofisher Nanodrop 2000.

8.1.5 Caratterizzazione delle uEVs: quantità e dimensioni

La caratterizzazione delle vescicole, ossia la concertazione ottenuta e le dimensioni medie (quest'ultimo dato utile per la loro classificazione), sono state eseguite tramite strumento Izon qNano (Figura 28). Tale strumento misura la resistenza elettrica di un nano poro messo a contatto con un fluido conduttivo (nel nostro caso PBS) e con il campione contenente le vescicole extracellulari. Attorno a tale poro è applicata una corrente elettrica necessaria per misurare la resistenza del poro stesso. Quando le vescicole attraversano il poro si osserva una diminuzione rapida della corrente che viene rilevata e quantificata come particella. Le dimensioni rilevabili dallo strumento sono direttamente correlate alla dimensione del nano-poro usato per

l'analisi. Nel nostro caso comunque andremo ad osservare particelle inferiori a 220 nm di diametro, essendo i campioni di urine pre trattati con filtri di tale calibro.

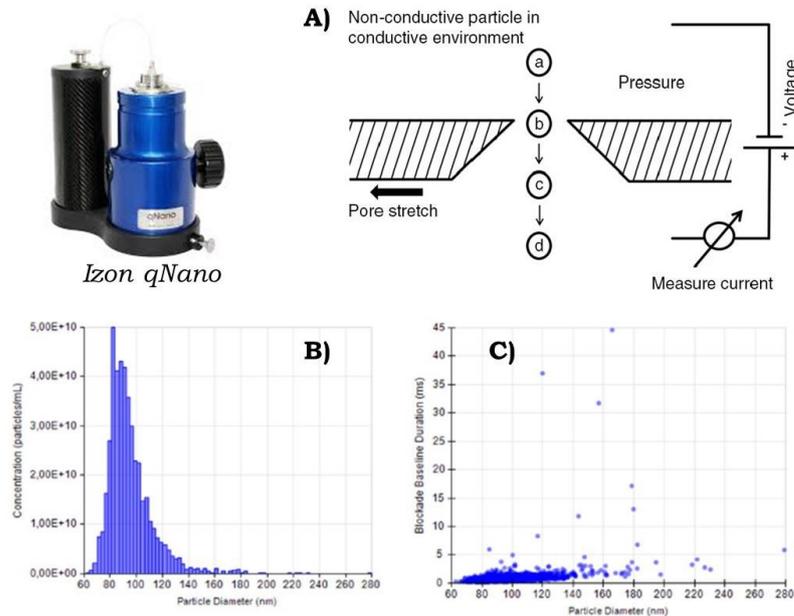


Figura 28: A) Meccanismo di rilevazione del numero e delle dimensioni delle vescicole con strumento Izon qNano [98]. B) Esempio di distribuzione delle concentrazioni e dimensioni medie delle vescicole rilevate C) Distribuzione delle particelle rilevate.

8.2 RISULTATI

8.2.1 Messa a punto di un sistema efficace di estrazione delle vescicole extracellulari da urine

Nella prospettiva di proseguire questo studio, ampliando la ricerca di marcatori di danno renale anche in campioni urinari, è iniziata la fase di messa a punto di un metodo efficace di isolamento e caratterizzazione nel contenuto di miRNA delle vescicole extracellulari urinarie (uEVs) (Tabella 5).

	Qiagen	Norgen	ExoQuick	Amicon	Izon
Concentrazione uEVs	Non	1,27 x 10 ⁸	7,51 x 10 ⁸	4,38 x 10 ⁹	-
Dimensioni Ø (nm) (pre purificazione)	valutabile	131	143	147	-
Concentrazione uEVs	1,53 x 10 ⁷	1,93 x 10 ⁷	2,16 x 10 ⁸	5,96 x 10 ⁸	6,47 x 10 ⁸
Dimensioni Ø (nm) (post purificazione)	156	146	161	145	123

Tabella 5: Concentrazioni e dimensioni medie di uEVs estratte con diversi kit/metodi

I campioni di vescicole isolate con diversi kit/metodi sono stati valutati prima e dopo la purificazione dalla frazione proteica. I risultati dei dosaggi proteici effettuati con test dell'acido bicincoico (*BCA assay*) hanno evidenziato un netto calo della frazione proteica media da 8 mg/ml a 0.03 mg/ml (Tabella 6).

	Qiagen	Norgen	ExoQuick	Amicon	Izon
Concentrazione proteica Pre-purificazione[mg/ml]	1,2	8,17	0,42	4,35	-
Concentrazione proteica Post-purificazione[mg/ml]	0,04	0,03	0,06	0,03	0,01

Tabella 6: concentrazioni medie delle proteine determinate con *BCA assay* pre e post purificazione.

Per questi nuovi campioni di vescicole si è deciso di valutare anche le concentrazioni e dimensioni con strumento Izon qNano. Le vescicole isolate e purificate sono state valutate per quantità e dimensioni riportando un *range* di concentrazione compreso tra 10⁸ – 10⁹ particelle/ml con dimensioni medie delle EVs compresa tra 130 – 300 nm di diametro. Basandosi sulle concentrazioni ottenute è stato possibile identificare un kit migliore per l'isolamento delle uEVs (Figura 29).

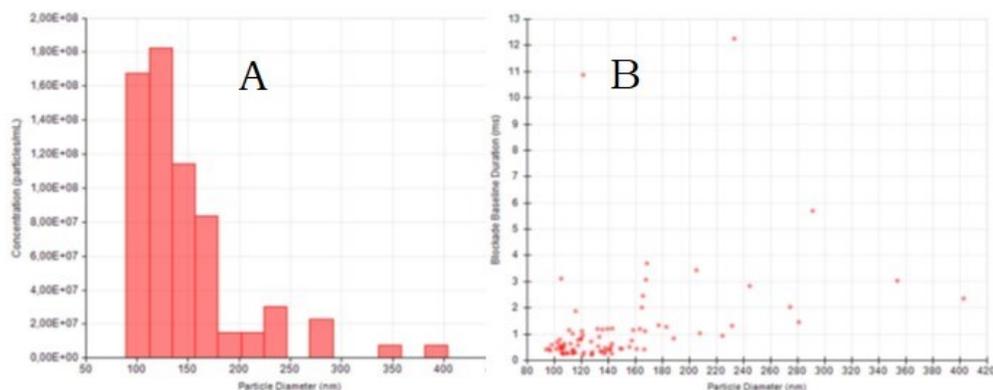


Figura 29: Risultato quantificazione campione uEVs isolato con colonna cromatografica SEC (valori da strumento Izon qNano). A) Si possono osservare concentrazioni di particelle pari a 10^8 e dimensioni medie di 130 nm. B) Si osserva una distribuzione omogenea del campione.

Dai campioni di EVs isolate è stato estratto l'RNA totale, la cui qualità è risultata adeguata (misurazioni al Nanodrop) e di seguito si è valutata la frazione di miRNA con Agilent Bioanalyzer 2100. Come è stato osservato per i campioni vescicolari sierici, anche per i campioni urinari sono state rilevate concentrazioni di miRNA basse, con un *range* compreso tra 0.1 a 0.2 ng/ μ l. Il metodo migliore per ottenere una maggior concentrazione di miRNA vescicolari urinari è un kit basato sulla ritenzione delle particelle su colonna filtrante. Le quantità ottenute con tale kit sono pari a 231 pg/ μ l (Tabella 7).

	Qiagen	Norgen	ExoQuick	Amicon	Izon
miRNA concentration [pg/ μ l]	231	103	91	67	37

Tabella 7: concentrazioni miRNA uEVs.

8.2.2 Conclusioni

I dati ottenuti suggeriscono che il miglior metodo per la ottenere elevate quantità di miRNA da uEVs è il sistema di isolamento *Qiagen exoEasy Maxi Kit*. Per quanto riguarda invece, un ipotetico studio basato sullo studio e caratterizzazione delle uEVs come possibili biomarcatori predittivi di rigetto, il metodo migliore risulta essere la

purificazione diretta con colonna *Izon qEVsingle Size Exclusion Column*, sia per quantità di vescicole che per purezza del campione. Risulta chiaro quindi, che la scelta del metodo/kit dipende strettamente dalla tipologia di analisi da effettuarsi sulle vescicole extracellulari urinarie e dallo scopo dello studio.

8. BIBLIOGRAFIA

1. McDonald SP, Craig JC. Long-term survival of children with end-stage renal disease. *N Engl J Med.* 2004 Jun;350(26):2654–62
2. A.G. John, M. Rao, C.K. Jacob, Preemptive live-related renal transplantation., *Transplantation.* 66 (1998) 204–209.
3. Malho A, Malheiro J, Fonseca I, et al. Advantages of kidney transplant pre-cocity in graft long-term survival.*Transplant Proc .* 2012;44:2344 – 2347.
4. J.J. Friedewald, P.P. Reese, The kidney-first initiative: what is the current status of preemptive transplantation?, *Adv. Chronic Kidney Dis.* 19 (2012) 252–256. doi:10.1053/j.ackd.2012.05.001.
5. M.E. Grams, B.P.-H. Chen, J. Coresh, D.L. Segev, Preemptive deceased donor kidney transplantation: considerations of equity and utility., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 8 (2013) 575–582. doi:10.2215/CJN.05310512.
6. C.L. Jay, K. Washburn, P.G. Dean, R.A. Helmick, J.A. Pugh, M.D. Stegall, Survival Benefit in Older Patients Associated With Earlier Transplant With High KDPI Kidneys., *Transplantation.* 101 (2017) 867–872. doi:10.1097/TP.0000000000001405.
7. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation.* 2010 Jul;90(1):68–74.
8. G. Eknoyan, Emergence of the concept of acute renal failure., *Am. J. Nephrol.* 22 (2002) 225–230. doi:10.1159/000063766.
9. Smith, Homer William. *The kidney: structure and function in health and disease.* Oxford University Press, USA, 1951.
10. M.A. Ferguson, S.S. Waikar, Established and emerging markers of kidney function., *Clin. Chem.* 58 (2012) 680–689. doi:10.1373/clinchem.2011.167494.

11. S.S. Waikar, R.A. Betensky, J. V Bonventre, Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies?, *Nephrol. Dial. Transplant.* 24 (2009) 3263–3265. doi:10.1093/ndt/gfp428.
12. K. Solez, History of the Banff classification of allograft pathology as it approaches its 20th year., *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15 (2010) 49–51. doi:10.1097/MOT.0b013e328334fedb.
13. A. Loupy, M. Haas, K. Solez, L. Racusen, D. Glotz, D. Seron, B.J. Nankivell, R.B. Colvin, M. Afrouzian, E. Akalin, N. Alachkar, S. Bagnasco, J.U. Becker, L. Cornell, C. Drachenberg, D. Dragun, H. de Kort, I.W. Gibson, E.S. Kraus, C. Lefaucheur, C. Legendre, H. Liapis, T. Muthukumar, V. Nickeleit, B. Orandi, W. Park, M. Rabant, P. Randhawa, E.F. Reed, C. Roufosse, S. V Seshan, B. Sis, H.K. Singh, C. Schinstock, A. Tambur, A. Zeevi, M. Mengel, The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology., *Am. J. Transplant.* 17 (2017) 28–41. doi:10.1111/ajt.14107.
14. S. Hara, Cell mediated rejection revisited: Past, current, and future directions., *Nephrology (Carlton)*. 23 Suppl 2 (2018) 45–51. doi:10.1111/nep.13283.
15. K. Sakai, H. Oguchi, M. Muramatsu, S. Shishido, Protocol graft biopsy in kidney transplantation., *Nephrology (Carlton)*. 23 Suppl 2 (2018) 38–44. doi:10.1111/nep.13282.
16. D.N. Rush, S.F. Henry, J.R. Jeffery, T.J. Schroeder, J. Gough, Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients., *Transplantation*. 57 (1994) 208–211.
17. M. Ibernon, F. Moreso, D. Seron, Subclinical rejection in renal transplants is associated with low serum mannose-binding lectin levels., *Kidney Int. Suppl.* 1 (2011) 36–39. doi:10.1038/kisup.2011.10.

18. D. Rush, P. Nickerson, J. Gough, R. McKenna, P. Grimm, M. Cheang, K. Trpkov, K. Solez, J. Jeffery, Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study., *J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (1998) 2129–2134.
19. B.J. Nankivell, R.J. Borrows, C.L.-S. Fung, P.J. O’Connell, R.D.M. Allen, J.R. Chapman, The natural history of chronic allograft nephropathy., *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 2326–2333. doi:10.1056/NEJMoa020009.
20. A. Loupy, C. Suberbielle-Boissel, G.S. Hill, C. Lefaucheur, D. Anglicheau, J. Zuber, F. Martinez, E. Thervet, A. Mejean, D. Charron, J.P. Duong van Huyen, P. Bruneval, C. Legendre, D. Nochy, Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies., *Am. J. Transplant.* 9 (2009) 2561–2570. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02813.x.
21. M. Haas, R.A. Montgomery, D.L. Segev, M.H. Rahman, L.C. Racusen, S.M. Bagnasco, C.E. Simpkins, D.S. Warren, D. Lepley, A.A. Zachary, E.S. Kraus, Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts., *Am. J. Transplant.* 7 (2007) 576–585. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01657.x.
22. J.C. Papadimitriou, C.B. Drachenberg, E. Ramos, D. Kukuruga, D.K. Klassen, R. Ugarte, J. Nogueira, C. Cangro, M.R. Weir, A. Haririan, Antibody-mediated allograft rejection: morphologic spectrum and serologic correlations in surveillance and for cause biopsies., *Transplantation.* 95 (2013) 128–136. doi:10.1097/TP.0b013e3182777f28.
23. Giulia Fregonese, Germana Longo, Elisa Benetti, Davide Meneghesso, Mattia Parolin, Enrico Vidal, Andrea Carraro, Susanna Negrisolò, Luisa Murer; Efficacy and safety of protocol biopsies for surveillance of pediatric renal transplant recipients, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 33,

24. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation*. 2010 Jul;90(1):68–74.
25. G. Einecke, B. Sis, J. Reeve, M. Mengel, P.M. Campbell, L.G. Hidalgo, B. Kaplan, P.F. Halloran, Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure., *Am. J. Transplant*. 9 (2009) 2520–2531. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02799.x.
26. Marfo K, Ajaimy M, Colovai A, Kayler L, Greenstein S, Lubetzky M, et al. Pretransplant immunologic risk assessment of kidney transplant recipients with donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies. *Transplantation*. 2014 Nov;98(10):1082–8.
27. S.G.E. Marsh, E.D. Albert, W.F. Bodmer, R.E. Bontrop, B. Dupont, H.A. Erlich, M. Fernandez-Vina, D.E. Geraghty, R. Holdsworth, C.K. Hurley, M. Lau, K.W. Lee, B. Mach, M. Maiers, W.R. Mayr, C.R. Muller, P. Parham, E.W. Petersdorf, T. Sasazuki, J.L. Strominger, A. Svejgaard, P.I. Terasaki, J.M. Tiercy, J. Trowsdale, Nomenclature for factors of the HLA system, 2010., *Tissue Antigens*. 75 (2010) 291–455. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x.
28. J. McCluskey, C. Kanaan, M. Diviney, Nomenclature and Serology of HLA Class I and Class II Alleles., *Curr. Protoc. Immunol*. 118 (2017) A.1S.1-A.1S.6. doi:10.1002/cpim.32.
29. P.I. TERASAKI, J.D. MCCLELLAND, MICRODROPLET ASSAY OF HUMAN SERUM CYTOTOXINS., *Nature*. 204 (1964) 998–1000.
30. K. Jayant, I. Reccia, B.M. Julie, A. Sharma, A. Halawa, Role of crossmatch testing when Luminex-SAB is negative in renal

- transplantation., Pol. Przegl. Chir. 90 (2018) 41–46.
doi:10.5604/01.3001.0011.5959.
31. N. Lachmann, K. Todorova, H. Schulze, C. Schonemann, Luminex® and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion., *Transfus. Med. Hemother.* 40 (2013) 182–189.
doi:10.1159/000351459.
 32. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Sep;16(9):2804–12.
 33. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant.* 2009 Nov;9(11):2532–41.
 34. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, Tanriover B, Crew RJ, Dube G, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol.* 2012 Dec;23(12):2061–71.
 35. Filippone EJ, Farber JL. Humoral Immune Response and Allograft Function in Kidney Transplantation. *Am J Kidney Dis.* 2015 Aug;66(2):337–47.
 36. Dijke EI, Platt JL, Blair P, Clatworthy MR, Patel JK, Kfoury AG, et al. B cells in transplantation. Vol. 35, *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* United States; 2016. p. 704–10.
 37. Sawitzki B, Schlickeiser S, Reinke P, Volk H-D. Monitoring tolerance and rejection in organ transplant recipients.

Biomarkers Biochem Indic Expo response, susceptibility to Chem. 2011 Jul;16 Suppl 1:S42-50.

38. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 2013 Sep;369(13):1215–26.
39. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, Couzi L, McGregor B, Badet L, et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Feb;26(2):457–67.
40. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012 May;12(5):1157–67.
41. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, Santos-Nunez E, Steggar C, Galliford J, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 2012 Jul;94(2):172–7.
42. Cai J, Qing X, Tan J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: some hot topics. *Br Med Bull*. 2013;105:139–55.
43. Cesca E, Ghirardo G, Kiblawi R, Murer L, Gamba P, Zanon GF. Delayed graft function in pediatric deceased donor kidney transplantation: donor-related risk factors and impact on two-yr graft function and survival: a single-center analysis. *Pediatr Transplant*. 2014 Jun;18(4):357–62.
44. K. Safa, C.N. Magee, J. Azzi, A critical review of biomarkers in kidney transplantation., *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 26 (2017) 509–515. doi:10.1097/MNH.0000000000000361.

45. M. Salvadori, A. Tsalouchos, Biomarkers in renal transplantation: An updated review., *World J. Transplant.* 7 (2017) 161–178. doi:10.5500/wjt.v7.i3.161.
46. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Aug;15(8):509–24.
47. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(Database issue):D152-7.
48. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):219–30.
49. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 2006 Mar;20(5):515–24.
50. Gantier MP, Sadler AJ, Williams BRG. Fine-tuning of the innate immune response by microRNAs. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(6):458–62.
51. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen C-Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol.* 2008 Feb;8(2):120–30.
52. Pipkin ME, Monticelli S. Genomics and the immune system. *Immunology.* 2008 May;124(1):23–32.
53. Tili E, Michaille J-J, Calin GA. Expression and function of micro-RNAs in immune cells during normal or disease state. *Int J Med Sci.* 2008 Apr;5(2):73–9.
54. P. Brodersen, O. Voinnet, Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 141–148. doi:10.1038/nrm2619.
55. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009 Mar;11(3):228–34.

56. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. 2005 Mar;11(3):241–7.
57. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007 Jun;129(7):1401–14.
58. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar;106(13):5330–5.
59. Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol*. 2008 Apr;19(1):81–5.
60. Danger R, Paul C, Giral M, Lavault A, Foucher Y, Degauque N, et al. Expression of miR-142-5p in peripheral blood mononuclear cells from renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection. *PLoS One*. 2013;8(4):e60702.
61. Soltaninejad E, Nicknam MH, Nafar M, Ahmadpoor P, Pourrezagholi F, Sharbafi MH, et al. Differential expression of microRNAs in renal transplant patients with acute T-cell mediated rejection. *Transpl Immunol*. 2015 Sep;33(1):1–6.
62. Ichii O, Otsuka S, Sasaki N, Namiki Y, Hashimoto Y, Kon Y. Altered expression of microRNA miR-146a correlates with the development of chronic renal inflammation. *Kidney Int*. 2012 Feb;81(3):280–92.
63. Lorenzen JM, Volkmann I, Fiedler J, Schmidt M, Scheffner I, Haller H, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2221–7.
64. V.R. Dharnidharka, P. Fiorina, W.E. Harmon, Kidney transplantation in children., *N. Engl. J. Med.* 371 (2014) 549–558. doi:10.1056/NEJMra1314376.

65. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967 May;13(3):269–88.
66. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012;10(12):e1001450.
67. Kim D-K, Kang B, Kim OY, Choi D-S, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell vesicles.* 2013;2.
68. Kim D-K, Lee J, Kim SR, Choi D-S, Yoon YJ, Kim JH, et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics.* 2015 Mar;31(6):933–9.
69. Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan;40(Database issue):D1241-4.
70. Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell vesicles.* 2012;1.
71. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. Vol. 2, *Nature reviews. Immunology.* England; 2002. p. 569–79.
72. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009 Feb;19(2):43–51.
73. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, Klein JB. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Dec;13(12):731–49.
74. Keller S, Ridinger J, Rupp A-K, Janssen JWG, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med.* 2011 Jun;9:86.
75. Lasser C, Alikhani VS, Ekstrom K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk

- exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med.* 2011 Jan;9:9.
76. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006 Sep;20(9):1487–95.
77. Street JM, Birkhoff W, Menzies RI, Webb DJ, Bailey MA, Dear JW. Exosomal transmission of functional aquaporin 2 in kidney cortical collecting duct cells. *J Physiol.* 2011 Dec;589(Pt 24):6119–27.
78. Salih M, Zietse R, Hoorn EJ. Urinary extracellular vesicles and the kidney: biomarkers and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Jun;306(11):F1251-9.
79. Turco AE, Lam W, Rule AD, Denic A, Lieske JC, Miller VM, et al. Specific renal parenchymal-derived urinary extracellular vesicles identify age-associated structural changes in living donor kidneys. *J Extracell vesicles.* 2016;5:29642.
80. NAPRTCS, NAPRTCS Collaborative Studies. "Annual transplant report." (2014)
81. X. Huang, T. Yuan, M. Tschannen, Z. Sun, H. Jacob, M. Du, M. Liang, R.L. Dittmar, Y. Liu, M. Liang, M. Kohli, S.N. Thibodeau, L. Boardman, L. Wang, Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing., *BMC Genomics.* 14 (2013) 319. doi:10.1186/1471-2164-14-319.
82. T.D. Domenico, G. Joelsons, R.M. Montenegro, R.C. Manfro, Upregulation of microRNA 142-3p in the peripheral blood and urinary cells of kidney transplant recipients with post-transplant graft dysfunction., *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 50 (2017) e5533. doi:10.1590/1414-431X20175533.
83. R. Danger, A. Pallier, M. Giral, M. Martinez-Llordella, J.J. Lozano, N. Degauque, A. Sanchez-Fueyo, J.-P. Souillou, S.

- Brouard, Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant., *J. Am. Soc. Nephrol.* 23 (2012) 597–606. doi:10.1681/ASN.2011060543.
84. O. Millan, K. Budde, C. Sommerer, I. Aliart, O. Rissling, B. Bardaji, M. Matz, M. Zeier, I. Silva, L. Guirado, M. Brunet, Urinary miR-155-5p and CXCL10 as prognostic and predictive biomarkers of rejection, graft outcome and treatment response in kidney transplantation., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83 (2017) 2636–2650. doi:10.1111/bcp.13399.
85. A. Schwickert, E. Weghake, K. Bruggemann, A. Engbers, B.F. Brinkmann, B. Kemper, J. Seggewiss, C. Stock, K. Ebnet, L. Kiesel, C. Riethmuller, M. Gotte, microRNA miR-142-3p Inhibits Breast Cancer Cell Invasiveness by Synchronous Targeting of WASL, Integrin Alpha V, and Additional Cytoskeletal Elements., *PLoS One.* 10 (2015) e0143993. doi:10.1371/journal.pone.0143993.
86. C.P. Shannon, R. Balshaw, R.T. Ng, J.E. Wilson-McManus, P. Keown, R. McMaster, B.M. McManus, D. Landsberg, N.M. Isabel, G. Knoll, S.J. Tebbutt, Two-stage, in silico deconvolution of the lymphocyte compartment of the peripheral whole blood transcriptome in the context of acute kidney allograft rejection., *PLoS One.* 9 (2014) e95224. doi:10.1371/journal.pone.0095224.
87. B. Baban, J.Y. Liu, M.S. Mozaffari, Aryl hydrocarbon receptor agonist, leflunomide, protects the ischemic-reperfused kidney: role of Tregs and stem cells., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303 (2012) R1136-46. doi:10.1152/ajpregu.00315.2012.
88. E. Aguado-Fraile, E. Ramos, E. Conde, M. Rodriguez, L. Martin-Gomez, A. Lietor, A. Candela, B. Ponte, F. Liano, M.L. Garcia-Bermejo, A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs

As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury.,
PLoS One. 10 (2015) e0127175.
doi:10.1371/journal.pone.0127175.

89. Sukma Dewi I, Hollander Z, Lam KK, et al. Association of Serum MiR-142-3p and MiR-101-3p Levels with Acute Cellular Rejection after Heart Transplantation. Mari B, ed. PLoS ONE. 2017;12(1):e0170842. doi:10.1371/journal.pone.0170842.
90. L. Artifoni, E. Benetti, S. Centi, S. Negrisolò, G.M. Ghiggeri, F. Ginevri, L. Ghio, A. Edefonti, C. Brambilla, N. Cagni, L. Murer, The impact of eNOS, MTR and MTHFR polymorphisms on renal graft survival in children and young adults., *Nephrol. Dial. Transplant.* 24 (2009) 2931–2937. doi:10.1093/ndt/gfp161.
91. Pan JS-C, Huang L, Belousova T, et al. Stanniocalcin-1 Inhibits Renal Ischemia/Reperfusion Injury via an AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Pathway. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* 2015;26(2):364-378. doi:10.1681/ASN.2013070703.
92. Huang L, Garcia G, Lou Y, et al. Anti-Inflammatory and Renal Protective Actions of Stanniocalcin-1 in a Model of Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis. *The American Journal of Pathology.* 2009;174(4):1368-1378. doi:10.2353/ajpath.2009.080476.
93. A. Kobayashi, M.T. Valerius, J.W. Mugford, T.J. Carroll, M. Self, G. Oliver, A.P. McMahon, Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development., *Cell Stem Cell.* 3 (2008) 169–181. doi:10.1016/j.stem.2008.05.020.
94. O.H. Maarouf, A. Aravamudhan, D. Rangarajan, T. Kusaba, V. Zhang, J. Welborn, D. Gauvin, X. Hou, R. Kramann, B.D. Humphreys, Paracrine Wnt1 Drives Interstitial Fibrosis without Inflammation by Tubulointerstitial Cross-

- Talk., *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (2016) 781–790. doi:10.1681/ASN.2014121188.
95. T. Kaucsar, C. Revesz, M. Godo, T. Krenacs, M. Albert, C.I. Szalay, L. Rosivall, Z. Benyo, S. Batkai, T. Thum, G. Szenasi, P. Hamar, Activation of the miR-17 family and miR-21 during murine kidney ischemia-reperfusion injury., *Nucleic Acid Ther.* 23 (2013) 344–354. doi:10.1089/nat.2013.0438.
96. O. Slaby, J. Jancovicova, R. Lakomy, M. Svoboda, A. Poprach, P. Fabian, L. Kren, J. Michalek, R. Vyzula, Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy., *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29 (2010) 90. doi:10.1186/1756-9966-29-90.
97. Q. Tang, H. Zhong, F. Xie, J. Xie, H. Chen, G. Yao, Expression of miR-106b-25 induced by salvianolic acid B inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in HK-2 cells., *Eur. J. Pharmacol.* 741 (2014) 97–103. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.051.
98. F.A.W. Coumans, E. van der Pol, A.N. Boing, N. Hajji, G. Sturk, T.G. van Leeuwen, R. Nieuwland, Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing., *J. Extracell. Vesicles.* 3 (2014) 25922.