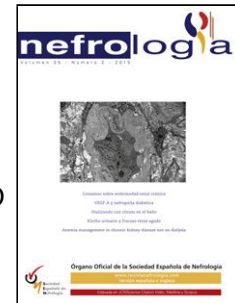


Journal Pre-proof



IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INTERNA (“IN-HOUSE”) DE DETERMINACIÓN DEL DNA LIBRE DEL DONANTE EN LA ACTIVIDAD CLÍNICA DIARIA: EXPERIENCIA DEL HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA

Elena Cuadrado-Payán Eva González-Roca Diana Rodríguez-Espinosa Alicia Molina-Andújar Enrique Montagud-Marrahi Carol Arana Angela González-Rojas Nuria Esforzado Vicens Torregrosa Pedro Ventura-Aguilar María Argudo Daniel Serrano-Jorcano María José Ramírez Bajo Elisenda Bañón-Maneus Silvia Casas Jose Jesús Broseta Joan Anton Puig-Butille Ignacio Revuelta Fritz Diekmann David Cucchiari

PII: S0211-6995(24)00118-8

DOI: <https://doi.org/doi:10.1016/j.nefro.2024.12.002>

Reference: NEFRO 1306

To appear in: *NEFROLOGÍA*

Received Date: 9 September 2024

Accepted Date: 7 December 2024

Please cite this article as: Cuadrado-Payán E, González-Roca E, Rodríguez-Espinosa D, Molina-Andújar A, Montagud-Marrahi E, Arana C, González-Rojas A, Esforzado N, Torregrosa V, Ventura-Aguilar P, Argudo M, Serrano-Jorcano D, Bajo MJR, Bañón-Maneus E, Casas S, Broseta JJ, Puig-Butille JA, Revuelta I, Diekmann F, Cucchiari D, IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INTERNA (“IN-HOUSE”) DE DETERMINACIÓN DEL DNA LIBRE DEL DONANTE EN LA ACTIVIDAD CLÍNICA DIARIA: EXPERIENCIA DEL HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA (2024), doi: <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2024.12.002>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2024 Sociedad Española de Nefrología. Publicado por Elsevier España, S.L.U.

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INTERNA (“IN-HOUSE”) DE
DETERMINACIÓN DEL DNA LIBRE DEL DONANTE EN LA ACTIVIDAD
CLÍNICA DIARIA: EXPERIENCIA DEL HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA

Elena Cuadrado-Payán^{1,2}, Eva González-Roca³, Diana Rodríguez-Espinosa¹, Alicia Molina-Andújar¹, Enrique Montagud-Marrahi^{1,2}, Carolit Arana^{1,2}, Angela González-Rojas¹, Nuria Esforzado¹, Vicens Torregrosa¹, Pedro Ventura-Aguiar^{1,2}, María Argudo¹, Daniel Serrano-Jorcano², Maria José Ramírez Bajo^{2,3}, Elisenda Bañón-Maneus^{2,3}, Silvia Casas⁵, Jose Jesús Broseta^{1,2}, Joan Anton Puig-Butille³, Ignacio Revuelta^{1,2,4}, Fritz Diekmann^{1,2,4}, David Cucchiari^{1,2}.

1. Servicio de Nefrología y Trasplante Renal, Hospital Clínic, Barcelona, España.
2. Laboratori Experimental de Nefrologia i Trasplantament (LENIT), Fundació de Recerca Clínic Barcelona-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (FRCB-IDIBAPS), Barcelona, España.
3. Laboratorio CORE de Biología Molecular, Centro de Diagnóstico Biomédico (CDB), Hospital Clínic, Barcelona, España.
4. Red de Investigación Renal (REDINREN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.
5. CareDx, San Francisco, CA, U.S.

AUTOR DE CORRESPONDENCIA: David Cucchiari, Unidad de Trasplante Renal (UTR), Instituto Clínico de Nefrología y Trasplante (ICNU), Hospital Clínic de Barcelona, Carrer Villarroel, 170 - 08036 Barcelona, España, Tel. +34 93 227 5444 david.cucchiari@gmail.com

RESUMEN

Antecedentes y objetivo: El único método actual definitivo para el diagnóstico de rechazo en el paciente trasplantado renal es mediante la biopsia del injerto. La introducción del ADN libre derivado del donante (ddcfDNA) ha emergido como un biomarcador no invasivo más preciso para cuantificar esta lesión y diagnosticar el rechazo, en comparación con biomarcadores clásicos. Aquí evaluamos nuestra experiencia tras su implementación en nuestro centro.

Materiales y métodos: Estudio transversal unicéntrico con extracción de cell-free DNA en sangre y cuantificación mediante ensayo AlloSeqcfDNA (CareDx) del ddcfDNA en el momento de realización de biopsias “por protocolo” o “por indicación” entre diciembre 2020 y diciembre 2023.

Resultados: En total se incluyeron 172 biopsias de injerto (59 por protocolo y 113 por indicación) en 112 receptores de trasplante renal. Entre las biopsias, se identificaron 19 rechazos borderline, 11 rechazos mediados por células T y 30 rechazos mediados por anticuerpos. La mediana de ddcfDNA en cada grupo diagnóstico fue: 0,40% (0,23%-0,82%) en el borderline, 0,60% (0,23%-1,91%) en el celular y 1,48% (0,77%-3,4%) en el mediado por anticuerpos ($p < 0,001$). En las 112 biopsias sin datos de rechazo, la mediana de ddcfDNA fue de 0,33% (0,17%-0,54%) ($p < 0,001$). Los casos con DSAs positivos y rechazo presentaron niveles de ddcfDNA más elevados en comparación con los DSAs positivos sin rechazo ($p = 0,010$) y los niveles de ddcfDNA mostraron una asociación significativa con la inflamación microvascular y la positividad de C4d. El área bajo las curvas ROC del ddcfDNA para discriminar cualquier tipo de rechazo de la ausencia de rechazo fue de 0,74 (0,65-0,82) y excluyendo el rechazo borderline del análisis, de 0.80 (0.72-0.89), superando a otros marcadores de función renal.

Conclusiones: La implementación del análisis ddcfDNA en nuestro centro como herramienta asistencial ha demostrado ser valiosa para distinguir el rechazo agudo comprobado por biopsia, especialmente el mediado por anticuerpos, superando a otros marcadores clásicos de función renal. Su implementación hospitalaria favorece un diagnóstico oportuno y preciso, mejorando la gestión y pronóstico del trasplante.

IMPLEMENTATION OF THE IN-HOUSE TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION
OF DONOR-DERIVED CELL-FREE DNA IN DAILY CLINICAL PRACTICE:
EXPERIENCE FROM THE HOSPITAL CLINIC OF BARCELONA

ABSTRACT

Background and objective: The introduction of donor-derived free DNA (ddcfDNA) has emerged as an accurate non-invasive biomarker to diagnose rejection, compared to classical ones. Here we evaluate our experience after its implementation in our center as an in-house technique.

Materials and methods: Single-center cross-sectional study with extraction of cell-free DNA in blood and quantification of the ddcfDNA using the AlloSeqcfDNA assay (CareDx) at the time of performing biopsies “per protocol” or “per indication” between December 2020 and December 2023.

Results: 172 graft biopsies were included (59 for protocol and 113 for cause) in 112 kidney transplant recipients. Among the biopsies, 19 borderline rejections, 11 T-cell mediated rejections, and 30 antibody-mediated rejections were identified. The median ddcfDNA in each diagnostic group was: 0.40% (0.23%-0.82%) in borderline, 0.60% (0.23%-1.91%) in cellular, and 1.48% (0.77%-3.4%) in antibody-mediated rejection ($p < 0.001$). In the 112 biopsies with no signs of rejection, the median ddcfDNA was 0.33% (0.17%-0.54%) ($p < 0.001$). Cases with positive DSAs and rejection showed higher levels of ddcfDNA than positive DSAs without rejection ($p = 0.010$), and ddcfDNA levels were significantly associated with microvascular inflammation and C4d positivity. The area under the ROC curves of ddcfDNA to discriminate any type of rejection from the absence of rejection was 0.74 (0.65-0.82) and, excluding borderline rejection from the analysis, 0.80 (0.72-0.89), outperforming other markers of renal function.

Conclusions: Implementing ddcfDNA analysis at our center as a clinical tool has proven valuable for distinguishing biopsy-confirmed acute rejection, particularly antibody-mediated rejection, outperforming classic renal function markers. Its hospital-based implementation supports timely and accurate diagnosis, improving transplant management and prognosis

Palabras clave: rechazo mediado por anticuerpos, DNA libre del donante, diagnóstico, rechazo

Keywords: antibody-mediated, ddcfDNA, donor-derived cell-free DNA, diagnosis, rejection

INTRODUCCIÓN

El rechazo mediado por anticuerpos (ABMR, de sus siglas en inglés: *antibody mediated rejection*) sigue siendo el desafío más relevante para garantizar la supervivencia a largo plazo del injerto renal. El diagnóstico precoz es esencial, ya que los tratamientos son ineficaces cuando el rechazo agudo progresa a una forma crónica¹. Lamentablemente, los biomarcadores utilizados, como la creatinina o la proteinuria, se elevan tardíamente, una vez establecido el rechazo y los anticuerpos específicos contra el donante (DSA, por su acrónimo en inglés: donor-specific antibodies) no son altamente sensibles, ya que casi la mitad de los casos de ABMR ocurren sin DSA detectables².

Un biomarcador recientemente introducido que podría transformar la práctica clínica es el ADN libre derivado del donante (ddcfDNA, por su acrónimo en inglés: donor-derived cell-free DNA). El ddcfDNA se libera de las células del donante por apoptosis o necrosis y constituye un porcentaje del DNA libre circulante del receptor. Cuando ocurre un daño en el injerto, el porcentaje de ddcfDNA en sangre aumenta significativamente, siendo útil como marcador sensible de daño³. Sin embargo, no es un biomarcador específico de rechazo, sino de daño celular del injerto, pues niveles elevados se observan en otras circunstancias como la necrosis tubular aguda (NTA)⁴ o la infección por el virus BK⁵.

La capacidad diagnóstica del ddcfDNA ha sido destacada en varios estudios^{1,6-9}. La prueba es realizada por diferentes proveedores de servicio de análisis clínicos, quienes lo ofrecen mediante el envío de muestras a un laboratorio centralizado o implementando su realización en el mismo centro hospitalario (*in-house*) usando técnicas de secuenciación masiva (NGS). En el Hospital Clínic de Barcelona, se implementó la detección *in-house* de ddcfDNA a finales de 2020.

El objetivo de este estudio es analizar la experiencia del centro en la implementación de esta técnica, así como los resultados clínicos obtenidos desde ese momento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño y población del estudio

Este es un estudio transversal unicéntrico desarrollado en el Hospital Clínic de Barcelona, donde se analizaron muestras sanguíneas e histológicas de pacientes trasplantados renales a los que se les realizó una biopsia del injerto entre diciembre de 2020 y diciembre de 2023, determinándose paralelamente el porcentaje de ddcfDNA en sangre. Se incluyeron biopsias realizadas tanto por indicación clínica, debido a deterioro analítico (alteraciones en creatinina, disminución en la tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe) mediante ecuación CKD-EPI o empeoramiento de la proteinuria), acompañado o no del desarrollo de DSAs *de novo*, como biopsias realizadas por protocolo. En nuestro centro, estas se realizan rutinariamente a los 3 y 12 meses postrasplante, independientemente de la función del injerto. Se han recopilado y analizado datos demográficos, clínicos, analíticos e inmunológicos de los pacientes incluidos. Todas las biopsias fueron evaluadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona, siguiendo la clasificación de Banff 2019. Para asegurar la validez interna de los resultados, se excluyeron aquellos pacientes que habían recibido trasplantes de múltiples órganos, evitando posibles interferencias derivadas de otros injertos.

Cuantificación del DNA libre derivado del donante (ddcfDNA) por secuenciación masiva

En cada paciente, se llevó a cabo la extracción en 2 tubos Streck de 10 ml (Streck, La Visa, NE, EE. UU.), que se mantuvieron a temperatura ambiente y se centrifugaron dentro de los 7 días posteriores a la recolección de la muestra. El plasma obtenido de la centrifugación (la primera a 1600 g durante 20 minutos, y la segunda a 16000 g durante 10 min) se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. Se extrajo ADN libre de células desde 5 ml de plasma utilizando el kit QiAmp circulating nucleic acid kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) siguiendo las

instrucciones del fabricante. La cantidad relativa de ADN libre de células procedente del donante en el receptor de trasplante de riñón se evaluó mediante la secuenciación masiva de 202 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por su acrónimo en inglés: *single nucleotide polymorphism*). Las bibliotecas se prepararon utilizando el ensayo AlloSeq cfDNA Assay (CareDx, San Francisco, CA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante y la secuenciación se realizó en un instrumento MiSeq utilizando los kits de 300 ciclos MiSeq Micro v2 o 150 ciclos MiSeq v3 (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) según cantidad de muestras a procesar. El análisis de datos se realizó con el software AlloSeq cfDNA v2.2.1 (CareDx) usando el análisis blind el cual no requiere de la genotipación de ninguna muestra genómica, y el ddcfDNA se midió como el porcentaje de todo el cfDNA disponible en la muestra.

Análisis estadístico

La normalidad de las variables continuas se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos de variables cuantitativas con distribución normal se presentan como media y desviación estándar (DE), mientras que para las de distribución no normal se usa la mediana y el rango intercuartílico (RIC), calculado con el método de Tukey. Las variables cualitativas se describen con frecuencias absolutas y relativas.

Según la naturaleza de los datos, se utilizó la prueba t de Student para comparar variables con distribución normal, mientras que para variables con distribución no normal se aplicaron las pruebas de U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. En el análisis de datos categóricos, se aplicaron pruebas de Chi-cuadrado o de Fisher, según correspondiera. Para el análisis multivariante, se realizó una regresión logística binaria.

El área bajo las curvas ROC (AUC) se empleó para evaluar el rendimiento del ddcfDNA, los DSAs, el TFGe y el cociente proteína/creatinina en orina (UPCR, de sus siglas en inglés: *Urine Protein Creatinine Ratio*) en el diagnóstico de rechazo. Los resultados de la AUC incluyen su intervalo de confianza al 95%.

El análisis estadístico se realizó con el software IBM SPSS Statistics versión 21.0 (SPSS, Inc; Chicago, Illinois) para Windows, y las representaciones gráficas se diseñaron con GraphPad versión 9.5.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

Se aplicaron pruebas de significación estadística de dos colas y se estableció un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Este estudio incluyó un total de 172 biopsias renales, realizadas a 112 receptores de trasplante renal, de las cuales 59 (34,3%) fueron biopsias de protocolo y 113 (65,7%) biopsias por indicación clínica realizadas a las 24 (4-68) semanas postrasplante.

Entre los 112 receptores, 26 (23,4%) recibieron un injerto de donante vivo, 40 (36%) de donante en muerte encefálica, 38 (33,3%) de donante en asistolia tipo III y 8 (7,2%) en asistolia tipo II. La media de edad fue de $58,78 \pm 13,45$ años y el 59,8% de los pacientes fueron varones. En cuanto a los trasplantes previos, 87 pacientes (77,7%) recibían su primer trasplante, 13 (11,6%) el segundo, 6 (5,4%) recibían el tercero, 4 (3,6%) el cuarto y 2 pacientes (1,8%) recibían su quinto trasplante. Las principales características basales de los pacientes se resumen en la Tabla 1.

En cuanto a los hallazgos histopatológicos, se identificó la presencia de rechazo en 60 (34,9%) de las 172 biopsias, siendo la mayoría por indicación clínica (52, 86,7%) frente a las biopsias de protocolo (8, 13,3%), $p < 0,001$. Entre las 112 biopsias sin rechazo, 61 (54,5%) fueron solicitadas por indicación clínica y 51 (45,5%) por protocolo.

De los 60 casos con rechazo, se identificaron 19 (31,67%) casos de rechazo borderline, 11 (18,33%) casos de rechazo mediado por células T (TCMR, de sus siglas en inglés: *T cell mediated rejection*) y 30 (50%) casos de ABMR. En cuanto a la clasificación de los TCMR, se identificaron 4 casos de rechazo de tipo IA, 2 de tipo IB, 2 de tipo IIA y 3 casos de rechazo crónico-activo. En el caso del ABMR, 21 eran rechazos agudos y 9 rechazos crónicos-activos. La presencia DSA se detectó en 19 de los 30 casos de ABMR (63,3%).

Entre las biopsias sin rechazo, los diagnósticos más comunes fueron cambios inespecíficos (36 casos, 20,9%), fibrosis intersticial y atrofia tubular leve a moderada

(30 casos, 17,4%), NTA (17 casos, 9,9%) y alteraciones vasculares (16 casos, 14,3%). Otros diagnósticos incluyeron microangiopatía trombótica (5 casos, 2,9%), glomerulonefritis (4 casos, 2,3%), complicaciones relacionadas con diabetes tipo 2 (2 casos, 1,2%), causa urológica (1 caso, 0,6%) e infección por virus BK (1 caso, 0,6%). La Tabla 2 muestra la mediana de ddcDNA en cada diagnóstico.

En cuanto a los niveles de ddcfDNA, se observó una diferencia significativa entre los pacientes con y sin rechazo, con una mediana de 0,88% (0,34-2,08%) en los casos de rechazo y 0,33% (0,17-0,54%) en ausencia de rechazo ($p < 0,001$). Específicamente, la mediana de ddcfDNA fue de 0,40% (0,23-0,82%) en los casos borderline, 0,60% (0,23-1,91%) en los TCMR y 1,48% (0,77-3,4%) en los ABMR, evidenciando valores significativamente superiores en los pacientes con ABMR en comparación con los pacientes sin rechazo ($p < 0,001$) y los pacientes con rechazo borderline ($p = 0,0010$) (Figura 1). Dentro de los TCMR, no hubo diferencias significativas en los niveles de ddcfDNA entre los rechazos IA y \geq IB ($p = 0,788$). Tampoco hubo diferencias significativas entre ABMR agudos y crónicos-activos (1,59% frente a 0,97%, $p = 0,108$).

Los casos con DSAs positivos y datos de rechazo en la biopsia (19 ABMR y 2 TCMR) mostraron niveles significativamente mayores de ddcfDNA en comparación con los casos con DSAs positivos pero sin rechazo ($n = 8$), con una mediana de 2,13% (1,2%-4,8%) frente a 0,69% (0,28%-1,23%) ($p = 0,010$). Además, los 19 casos con DSAs positivos y ABMR en la biopsia también presentaron una mediana de ddcfDNA significativamente superior (2,34%; 1,28-5,47%) en comparación con los 11 casos de ABMR sin DSAs (0,97%; 0,52-1,24%), con un valor p de 0,010.

Respecto al TFGe y UPCR, no se observaron diferencias significativas entre los pacientes con y sin rechazo ($30,31 \pm 16,98$ mL/min/1,73m² vs. $36,18 \pm 19,64$ mL/min/1,73m², $p = 0,135$; 522 mg/g vs. 359 mg/g, $p = 0,171$, respectivamente).

En el análisis univariante, las variables significativamente asociadas con el rechazo fueron la biopsia de indicación ($p < 0,001$), la presencia de DSA ($p < 0,001$), el trasplante previo ($p = 0,023$) y los niveles de ddcfDNA ($p < 0,001$). En el análisis multivariante, la biopsia de indicación ($p = 0,010$), los DSA al momento de la biopsia

($p=0,005$) y los niveles de ddcfDNA ($p=0,021$) mantuvieron su asociación, mientras que el trasplante previo ($p=0,9$) la perdió (Tabla 3).

En el análisis de asociación del ddcfDNA con los scores individuales de la clasificación de Banff, se observó una correlación significativa con la inflamación microvascular y la presencia de C4d positivo, pero no con la inflamación tubulointersticial (Figura 2).

Para evaluar el rendimiento diagnóstico del ddcfDNA en la discriminación entre presencia y ausencia de rechazo, se calculó el AUC. Su resultado para discriminar cualquier tipo de rechazo (incluido el borderline) de la ausencia de rechazo fue de 0,74 (0,65- 0,82). Excluyendo el rechazo borderline del análisis, el AUC fue de 0.80 (0.72-0.89) (Figura 3). Para la discriminación de ABMR o TCMR exclusivamente frente a la ausencia de rechazo, el ddcfDNA exhibió un AUC de 0,84 (0,77–0,92) y 0,59 (0,40–0,77), respectivamente. Si solo se compara el rechazo borderline versus la ausencia de rechazo, se observó un AUC todavía más bajo de 0,49 (0,36–0,62).

La presencia de DSA mostró un AUC de 0,71 (0,60-0,82), mientras que el TFGe y el cociente proteína/creatinina en orina tuvieron AUC de 0,43 (0.34–0.52) y 0,56 (0.47–0.66), respectivamente. (Figura 3).

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio respaldan la implementación del ddcfDNA como herramienta diagnóstica en la monitorización postrasplante renal. Nuestros datos muestran una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de ddcfDNA entre pacientes con y sin rechazo, siendo considerablemente mayores en aquellos con rechazo, especialmente en los casos mediados por anticuerpos. Estos hallazgos sugieren que este biomarcador podría ser más sensible en la detección de ABMR en comparación con TCMR o el rechazo borderline, y son consistentes con estudios previos⁸⁻¹⁰, subrayando el potencial del ddcfDNA para identificar el rechazo de manera no invasiva.

En contraste con otros estudios que han reportado niveles de ddcfDNA más elevados en rechazos TCMR severos (\geq IB)^{11,12}, nuestra cohorte no mostró diferencias significativas entre los diferentes subtipos de TCMR ($p=0,788$). Esto podría atribuirse a la heterogeneidad en la presentación y severidad del rechazo, a que el ddcfDNA no refleje el daño tisular o a que los mecanismos fisiopatológicos no generen cantidades detectables de ADN en circulación, además del tamaño muestral reducido de pacientes con TCMR ($n=11$).

Este estudio también respalda observaciones previas sobre el comportamiento del ddcfDNA en el ABMR¹³⁻¹⁵, evidenciando niveles significativamente más altos en pacientes con ABMR que en aquellos con DSA positivo pero sin daño en la biopsia. Específicamente, los pacientes con ABMR y DSA positivo presentaron una mediana de ddcfDNA de 2,34%, notablemente mayor que la de los pacientes con ABMR sin DSA (0,97%; $p=0,010$). La integración de estos dos tipos de información (ddcfDNA y presencia o ausencia de DSA) nos permitiría discernir si el fenómeno inmunológico esté causando o no un daño en el injerto.

En cuanto a su capacidad diagnóstica, el ddcfDNA mostró un AUC de 0,74 para discriminar entre cualquier tipo de rechazo (incluido el rechazo borderline) y la ausencia de rechazo. Y en concreto, su rendimiento fue más robusto al diferenciar ABMR de la ausencia de rechazo, con un AUC de 0,84. Estos datos reflejan que el ddcfDNA podría tener limitaciones en la detección de rechazo borderline (AUC de 0,49)^{9,16,17}, aunque en estos casos podría ayudar a identificar pacientes con peor pronóstico en términos de función renal y progresión del rechazo¹¹.

Comparativamente, el rendimiento diagnóstico del ddcfDNA fue superior al de otros marcadores de función renal como la TFGe y el UPCR, que presentaron AUCs de 0,43 y 0,56, respectivamente. Esto reafirma el valor del ddcfDNA como un marcador más sensible y específico para el rechazo agudo en receptores de trasplante renal. Y en cuanto al análisis del ddcfDNA en relación con los scores individuales de la clasificación de Banff, respalda su utilidad para evaluar el ABMR, ya que se observó una asociación significativa con la inflamación microvascular y la positividad de CD4, mientras que no se observó una asociación con la inflamación tubulointersticial^{18,20}.

A pesar de estos resultados positivos, nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Primero, la falta de seguimiento longitudinal de los niveles de ddcfDNA tras la biopsia y el tratamiento del rechazo impide evaluar su utilidad como biomarcador dinámico, pronóstico o de respuesta al tratamiento. Estudios previos sugieren que los cambios en los niveles postratamiento podrían indicar la respuesta terapéutica y la recuperación del injerto, lo cual no se evaluó en este estudio^{8,16,18}. Además, la heterogeneidad del rechazo en nuestra muestra pudo influir en la interpretación de los resultados. Por último, con el método actual para medir ddcfDNA no podemos diferenciar la proporción correspondiente a injertos previos no funcionantes. Sin embargo, en nuestra cohorte, solo un paciente presentó niveles de ddcfDNA superiores al 1% sin datos de rechazo (presentó NTA) y era portador de un injerto previo²⁰.

Este conocimiento generado nos permite discernir el área de uso del biomarcador en los diferentes escenarios clínicos^{11,16,18,21} y que presentamos en la Tabla 4.

Finalmente, la implementación de la prueba en el propio hospital ofrece flexibilidad en la obtención de resultados, adaptándose a las necesidades clínicas específicas al permitir procesar un número variable de muestras en cada análisis. Además, el contacto directo entre el nefrólogo y el especialista de laboratorio facilita la discusión y resolución de dudas en pacientes complejos, lo que favorece una comprensión más profunda del uso del biomarcador. Esto, a su vez, contribuye a evitar biopsias innecesarias, lo cual no solo reduce los costes, sino que también optimiza la eficiencia en el manejo clínico.

En conclusión, este estudio evidencia el valor del ddcfDNA en la detección de rechazo agudo en trasplante renal. La diferencia significativa en sus niveles en ABMR destaca su potencial como herramienta diagnóstica y su ventaja sobre otros marcadores de función renal. La implementación hospitalaria de la prueba facilita su integración clínica, promoviendo un diagnóstico oportuno y preciso del rechazo para optimizar la gestión y el pronóstico de los pacientes trasplantados.

FINANCIACIÓN: el presente trabajo no ha recibido ningún tipo de financiación. Elena Cuadrado ha recibido una beca de investigación "Emili Letang - Josep Font" por parte del Hospital Clinic of Barcelona.

CONFLICTO DE INTERÉS: DC y FD han recibido honorarios por parte de CareDx en calidad de relatores a Simposios nacionales e internacionales.

REFERENCIAS

1. Bu L, Gupta G, Pai A et al. Clinical outcomes from the Assessing Donor-derived cell-free DNA Monitoring Insights of kidney Allografts with Longitudinal surveillance (ADMIRAL) study. *Kidney Int.* 2022;101(4):793-803
2. Senev A, Coemans M, Lerut E, et al. Histological picture of antibody-mediated rejection without donor-specific anti-HLA antibodies: Clinical presentation and implications for outcome. *Am J Transplant.* 2019;19:763–780.
3. Filippone EG, Farber JL. The Monitoring of Donor-derived Cell-free DNA in Kidney Transplantation. *Transplantation.* 2021 Mar 1;105(3):509-516
4. Cucchiari D, Cuadrado-Payan E, Gonzalez-Roca E et al. Early kinetics of donor-derived cell-free DNA after transplantation predicts renal graft recovery and long-term function. *Nephrol Dial Transplant.* 2023 Dec 20;39(1):114-121.
5. Mayer KA, Omic H, Weseslindtner L et al. Levels of donor-derived cell-free DNA and chemokines in BK polyomavirus-associated nephropathy. *Clin Transplant.* 2022 Nov;36(11):e14785.
6. Halloran PF, Reeve J, Madill-Thomsen KS et al; Trifecta Investigators. Antibody-mediated Rejection Without Detectable Donor-specific Antibody Releases Donor-derived Cell-free DNA: Results From the Trifecta Study. *Transplantation.* 2022 Oct 3. doi: 10.1097/TP.0000000000004324
7. Ventura-Aguiar P, Ramirez-Bajo MJ, Rovira J et al. Donor-derived Cell-free DNA Shows High Sensitivity for the Diagnosis of Pancreas Graft Rejection in Simultaneous Pancreas-kidney Transplantation. *Transplantation.* 2022 Aug 1;106(8):1690-1697.
8. Benning L, Morath C, Fink A, et al. Donor-Derived Cell-Free DNA (dd-cfDNA) in Kidney Transplant Recipients With Indication Biopsy-Results of a Prospective Single-Center Trial. *Transpl Int.* 2023 Nov 3;36:11899

9. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):2221-2232.
10. Huang E, Sethi S, Peng A, et al. Early clinical experience using donor-derived cell-free DNA to detect rejection in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2019;19(6):1663-1670
11. Stites E, Kumar D, Olaitan O, et al. High levels of dd-cfDNA identify patients with TCMR 1A and borderline allograft rejection at elevated risk of graft injury. *Am J Transplant.* 2020;20(9):2491-2498.
12. Aubert O, Ursule-Dufait C, Brousse R, et al. Cell-free DNA for the detection of kidney allograft rejection. *Nat Med.* 2024 Aug;30(8):2320-2327
13. Jordan SC, Bunnapradist S, Bromberg JS, et al. Donor-derived Cell-free DNA Identifies Antibody-mediated Rejection in Donor Specific Antibody Positive Kidney Transplant Recipients. *Transplant Direct.* 2018;4(9):e379. Published 2018 Aug 20.
14. Butiu M, Obrisca B, Sibulesky L, et al. Donor-derived Cell-free DNA Complements De Novo Class II DSA in Detecting Late Alloimmune Injury Post Kidney Transplantation. *Transplant Direct.* 2022;8(2):e1285
15. Obrișcă B, Butiu M, Sibulesky L, et al. Combining donor-derived cell-free DNA and donor specific antibody testing as non-invasive biomarkers for rejection in kidney transplantation. *Sci Rep.* 2022;12(1):15061
16. Wolf-Doty TK, Mannon RB, Poggio ED, et al. Dynamic Response of Donor-Derived Cell-Free DNA Following Treatment of Acute Rejection in Kidney Allografts. *Kidney360.* 2021 Feb 3;2(4):729-736.
17. Mayer KA, Doberer K, Tillgren A, et al. Diagnostic value of donor-derived cell-free DNA to predict antibody-mediated rejection in donor-specific antibody-positive renal allograft recipients. *Transpl Int.* 2021 Sep;34(9):1689-1702.
18. Oellerich M, Budde K, Osmanodja B, et al. Donor-derived cell-free DNA as a diagnostic tool in transplantation. *Front Genet.* 2022 Oct 21;13:1031894. doi: 10.3389/fgene.2022.1031894
19. Naesens M, Roufosse C, Haas M, et al. The Banff 2022 Kidney Meeting Report: Reappraisal of microvascular inflammation and the role of biopsy-based transcript diagnostics. *Am J Transplant.* 2024;24(3):338-349.

20. Pettersson L, Frischknecht L, Westerling S, et al. Detection of donor-derived cell-free DNA in the setting of multiple kidney transplantations. *Front Immunol.* 2024;15:1282521.
21. Park S, Sellares J, Tinel C, et al. European Society of Organ Transplantation Consensus Statement on Testing for Non-Invasive Diagnosis of Kidney Allograft Rejection. *Transpl Int.* 2024;36:12115.

Journal Pre-proof

Figura 1 – Niveles de ddcfDNA al momento de la biopsia injerto renal (TCMR: rechazo mediado por células T, ABMR: rechazo mediado por anticuerpos)

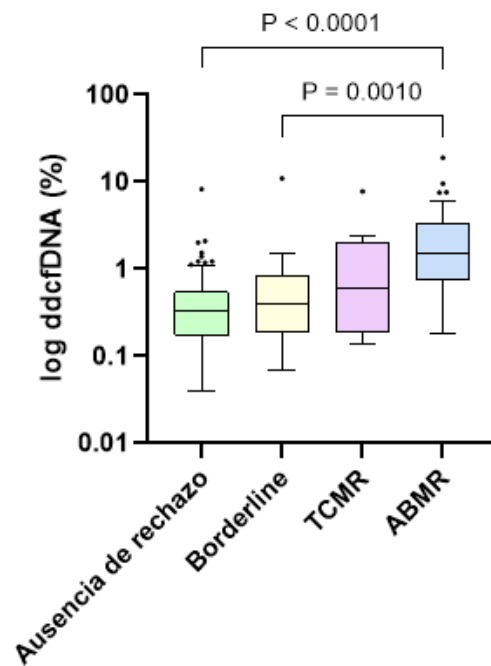


Figura 2. Asociación de los niveles de ddcfDNA con los scores individuales de la clasificación de Banff. El ddcfDNA se correlaciona con la gravedad de las lesiones individuales asociadas con una lesión aloinmune (g: glomerulitis, ptc: capilaritis peritubular, cg: glomerulopatía del trasplante, t:tubulitis, i:inflamación intersticial)

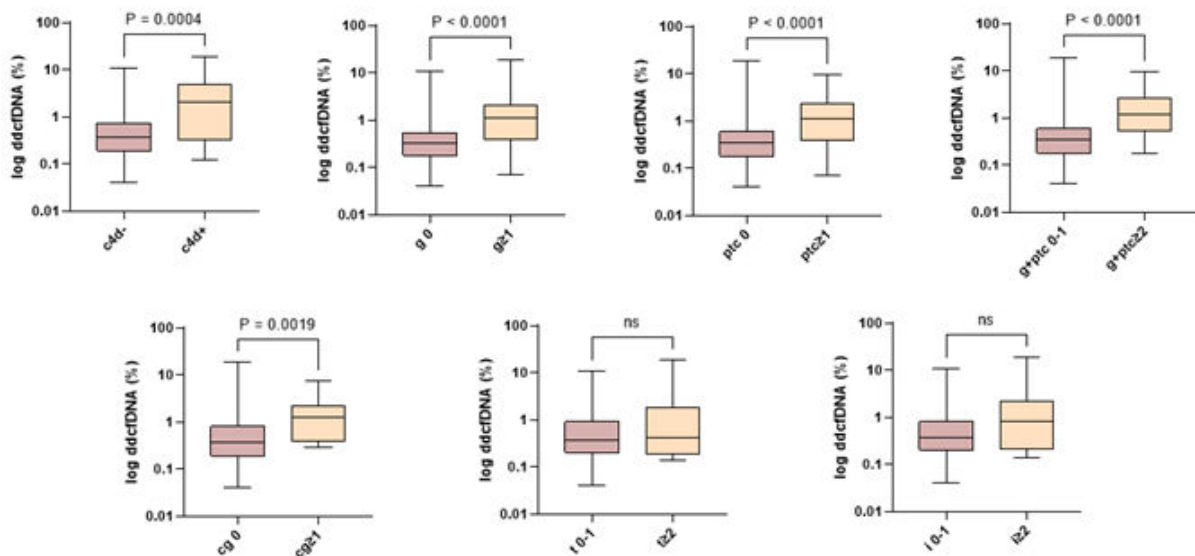
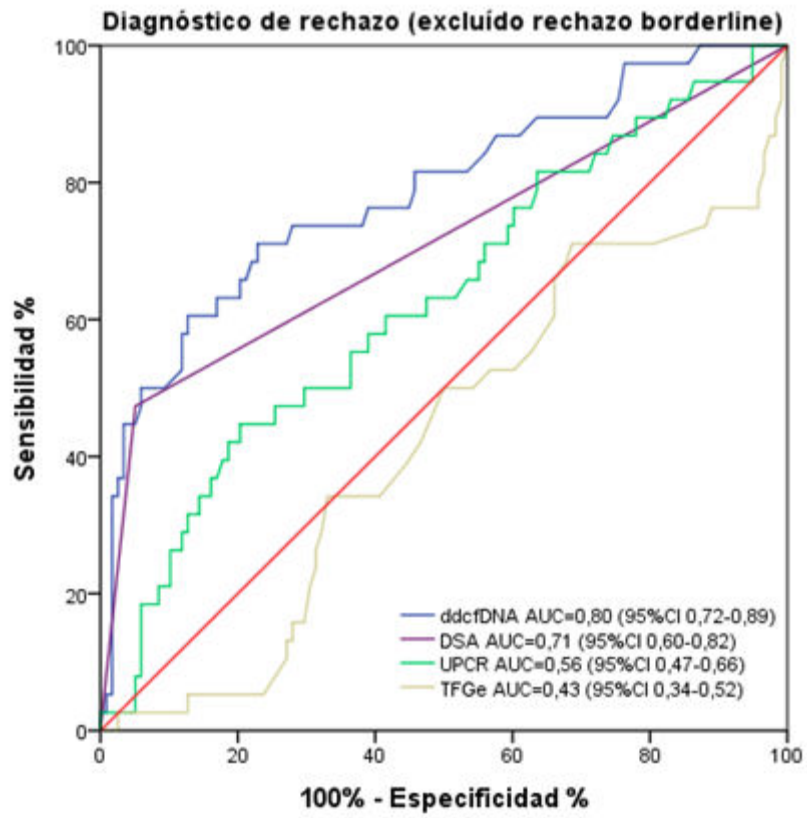


Figura 3 – Curva ROC para el ddcfDNA, la presencia de DSA en el momento de la biopsia, el UPCR y la TFGe. El ddcfDNA discrimina el diagnóstico de rechazo (excluido el rechazo borderline en el análisis) con mejor rendimiento en comparación a otras medidas de la función del injerto renal (ddcfDNA: ADN libre derivado del donante, DSA: anticuerpos específicos contra el donante UPCR: cociente proteína/creatinina en orina; TFGe: tasa de filtrado glomerular estimada).



Journal Pre

Tabla 1. Principales características basales de los pacientes incluidos. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar o número absoluto y porcentaje (MMF; Micofenolato mofetilo, imTOR; inhibidores de mTOR)

	N = 112
Edad receptor al trasplante (años)	55,63 \pm 14,21
Sexo (varón)	67 (59,8)
Hipertensión	86 (76,8)
Diabetes mellitus tipo 2	21 (18,8)
Etiología de la ERC	
Nefroangioesclerosis	11 (9,8)
Nefropatía diabética	12 (10,7)
Enfermedad glomerular	30 (26,8)
Enfermedad Poliquística Autosómica Dominante	12 (10,7)
Nefropatía intersticial	6 (5,4)
Urológica	7 (6,3)
No filiada	23 (20,5)
Nefropatía congénita	3 (2,7)
Otro	8 (7,1)
Trasplante previo	28 (25)
cPRA < 50	76 (67,9)
cPRA \geq 50	36 (32,1)
Edad donante (años)	60 \pm 14,69
Sexo donante (varón)	53 (47,3)
Tipo donante	
Vivo	26 (23,4)
Muerte encefálica	40 (36)
Asistolia tipo II	8 (7,2)
Asistolia tipo III	38 (33,3)
Donante criterios expandidos	57 (50,9)
Tiempo isquemia fría (horas)	11,82 \pm 7,70
Inmunosupresión de inducción	
Timoglobulina	57 (50,9)
Basiliximab	55 (49,1)
Inmunosupresión de mantenimiento	
Prednisona + Tacrolimus + MMF	55 (49,1)
Prednisona + Tacrolimus + imTOR	57 (50,9)
Función retrasada del injerto	32 (28,6)

Tabla 2 – Valores de ddcDNA en los casos de ausencia o presencia de rechazo. Los datos se expresan como mediana (RIC: rango intercuartílico) (FIAT: fibrosis intersticial y atrofia tubular, NTA: necrosis tubular aguda, MAT: microangiopatía trombótica, DM2: diabetes mellitus tipo 2, TCMR: rechazo mediado por células T, ABMR: rechazo mediado por anticuerpos)

Diagnóstico	n	ddcfDNA % (RIC)
Ausencia de rechazo		
Cambios inespecíficos	36	0,30 (0,17-0,46)
FIAT	30	0,33 (0,15-0,53)
NTA	17	0,50 (0,15-0,67)
Alteraciones vasculares	16	0,28 (0,21-0,53)
MAT	5	0,32 (0,24-0,74)
Glomerulonefritis	4	0,30 (0,13-0,75)
Nefropatía DM2	2	0,42 (0,20-0,64)
Causa urológica	1	1,10
Virus BK	1	1,40
Presencia de rechazo		
Borderline	19	0,40% (0,23-0,82%)
TCMR	11	0,60% (0,23-1,91%)
ABMR	30	1,48% (0,77-3,4%)

Tabla 3. Análisis multivariante de las variables asociadas con rechazo. (DSA: anticuerpos específicos contra el donante)

	Exp(B)	IC 95%		<i>P</i>
		Inferior	Superior	
Trasplante previo	0,95	0,41	2,21	0,9
Biopsia por indicación	3,28	1,33	8,06	0,01
DSAs al momento de la biopsia	4,9	1,64	14,67	0,005
ddcfDNA (%)	1,54	1,07	2,23	0,021

Tabla 4. Propuesta sobre el uso del ddcfDNA según el diferente escenario clínico (DSA: los anticuerpos específicos contra el donante, ABMR: rechazo mediado por anticuerpos, TCMR: rechazo mediado por células T)

Escenario Clínico	Uso del biomarcador
DSA preformado al trasplante (histórico o actual) + deterioro de función renal	Diferenciar ABMR de otras alteraciones
DSA preformado al trasplante (histórico o actual) + estabilidad de función renal	Descartar ABMR subclínico
DSA de novo + estabilidad de función renal	Descartar ABMR subclínico
ABMR tratado	Monitorización post-tratamiento para valorar respuesta
TCMR/borderline	Posible valor pronóstico