






Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**TESIS DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**ESTUDIO DEL DAÑO RENAL INDUCIDO POR LA
ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO DURANTE
EL FENÓMENO DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN**

Carlos E. Arias Cabrales

Directores

Eva Rodríguez García

Marta Riera Oliva

Julio Pascual Santos

Tutor

Juan Pedro Botet Montoya

Barcelona, 2021

ABREVIATURAS

BR: Biopsia renal.

CR1: Receptor de complemento 1.

DAMPS: Danger Associated Molecular Patterns (patrones moleculares asociados a daño).

DAF: Factor acelerador del decaimiento.

ERC: Enfermedad renal crónica.

FBS: Fetal bovinum serum.

FH: Factor H.

FRI: Función retrasada del injerto.

HR: Hazard ratio.

I/R: Isquemia reperusión.

IRA: Insuficiencia renal agudo.

KDPI: Kidney Donor Profile Index.

MAC: Complejo de ataque de membrana.

MCP: Proteína cofactor de membrana.

MASP-1: Mannan-binding lectin Serine Protease 1.

MASP-2: Mannan-binding lectin Serine Protease 2.

MBL: Mannose-binding lectin.

NHS: Normal human serum.

PDGF: Platelet derived growth factor.

TGF-B: Transforming growth factor-beta.

TABLAS

pag.

Tabla 1. Reguladores del sistema del complemento.....	16
---	----

FIGURAS

Figura 1. Funcionamiento del sistema del complemento.....	15
---	----

Figura 2. Papel del complemento en la patogénesis del daño por isquemia-reperfusión.....	18
---	----

Figura 3. Activación y regulación por factor H de la vía alternativa del complemento en el plasma y en superficies celulares.....	21
--	----

ÍNDICE

RESUMEN DE TESIS	6
THESIS SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Función retrasada del Injerto: Definición, fisiopatología e impacto en la supervivencia del injerto renal.....	11
1.2. Sistema de complemento.....	13
1.2.2 Reguladores del sistema del complemento.	16
1.3.1 Complejo de Ataque de Membrana (MAC) y daño por isquemia-reperfusión.	21
1.3.2 Factor H como regulador en el daño por I/R.....	24
1.3.3 Participación de los receptores de C5a (C5aR1 y C5L2) en el daño por isquemia-reperfusión.	26
2. HIPÓTESIS.....	30
4. MATERIAL Y MÉTODOS	34
4.1 Relevance of KDPI value and acute rejection on kidney transplant outcomes in recipients with delayed graft function.....	34
4.2 Activation of final complement components after kidney transplantation as a marker of delayed graft function severity.....	41
4.3 Role of C5aR1 and C5L2 receptors in ischemia reperfusion injury.....	49
5. RESULTADOS GLOBALES	62
6. DISCUSIÓN	67
7. CONCLUSIONES	78
8. PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	81
9. BIBLIOGRAFÍA	83
10.ANEXO 1.....	95

RESUMEN DE TESIS

Los avances realizados en los últimos años en las técnicas de extracción y preservación de los órganos trasplantados, así como en la medicación inmunosupresora y la evaluación del riesgo inmunológico, han permitido mejorar la supervivencia del injerto renal y del receptor a corto plazo. Esta mejoría no se ve tan claramente reflejada a medio y largo plazo. Probablemente, una de las causas de esto último es la función retrasada del injerto, una forma de daño renal agudo, que se presenta en un 20-50% de los receptores de donante fallecido y que empeora el pronóstico de los riñones trasplantados que la sufren.

En esta línea, la principal causa de función retrasada del injerto es el daño inducido por la isquemia-reperfusión, proceso en parte inherente a la técnica del trasplante renal, que puede verse agravado por múltiples factores como pueden ser la situación del donante previo a la extracción del órgano, la propia intervención quirúrgica o por características del receptor. La activación del sistema del complemento es uno de los principales mecanismos involucrados en la fisiopatología de este fenómeno.

El objetivo de la presente tesis es profundizar en el conocimiento del daño inducido por la activación del sistema del complemento en el fenómeno de isquemia-reperfusión, en el ámbito del trasplante renal.

Para ello, hemos diseñado tres estudios que abarcan diferentes aspectos clínicos y etiopatogénicos del daño por el complemento en la isquemia-reperfusión. Inicialmente, analizamos el impacto de la función retrasada del injerto, en una amplia cohorte de pacientes trasplantados renales. Detectamos peor supervivencia del injerto y peor función renal al año del trasplante, en aquellos pacientes que presentaron función retrasada del

injerto. Por otro lado, analizamos, la dinámica de las concentraciones solubles del complejo de ataque de membrana, producto de la activación de la vía final del sistema del complemento; también, examinamos el patrón histológico de los depósitos del complejo de ataque de membrana, C3d y el factor H. Este análisis fue realizado en pacientes trasplantados renales, con y sin función retrasada del injerto, seguidos de forma prospectiva. Encontramos un aumento relevante tanto de los niveles plasmáticos, como de los depósitos histológicos del complejo de ataque de membrana, C3d y factor H, en aquellos casos con función retrasada del injerto. Además, detectamos que una mayor concentración de niveles plasmáticos de complejo de ataque de membrana se relaciona con peor función renal a 1 y 2 años después del trasplante.

También desarrollamos un modelo de hipoxia-reoxigenación, utilizando células tubulares proximales humanas (HK-2). Este modelo reveló activación local de diferentes componentes del sistema del complemento, incluido el complejo de ataque de membrana, y los receptores de C5a (C5aR1 y C5L2), otro producto final del sistema del complemento, poco estudiado en este ámbito. Finalmente, evaluamos la expresión histológica de C5aR1 y C5L2, en biopsias de pacientes trasplantados renales con función retrasada del injerto y un grupo control. Este análisis nos mostró, mayor expresión de C5aR1 en la membrana de las células tubulares y de C5L2 en endotelio de capilar peritubular en las biopsias de pacientes con función retrasada del injerto, comparado con los controles.

THESIS SUMMARY

The advances made during the last years in the extraction and preservation of the organs for transplantation, immunosuppressive medication, and the evaluation of immunological risk have improved patient and renal allograft survival. However, these improvements have had a limited effect on long-term survival. One of the reasons that negatively influence this long-term survival is the appearance of delayed graft function, a form of acute kidney damage, which occurs in 20-50% of deceased donor recipients and worsens the graft outcomes.

The leading cause of delayed graft function is the damage induced by ischemia-reperfusion, a process inherent to the kidney transplantation process. The ischemia-reperfusion injury could be aggravating by different variables such as the donor's situation before organ retrieval or recipient characteristics. In the pathophysiology of this phenomenon, the activation of the complement system is highly relevant.

This thesis's objective has been to expand our understanding of the damage induced by the activation of the complement system during ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation.

To this end, we designed three studies that evaluated different clinical and etiopathogenic aspects of the ischemia-reperfusion phenomenon. We initially assessed the impact of delayed graft function in a large cohort of kidney transplant patients. The development of delayed graft function was associated with worse graft survival and worse kidney function in the first year after transplantation. On the other hand, we analyze the dynamics of plasma levels of the membrane attack complex's soluble form, the final product from complement system activation in kidney transplant patients with and without delayed graft function. Additionally, we examined the

histological pattern of the deposits of the membrane attack complex, C3d, and factor H in kidney biopsies from patients who were experiencing delayed graft function and controls with normal biopsies. We detected a relevant increase in plasma levels and histological deposits of the membrane attack complex, C3d, and factor H, in those patients with delayed graft function. A high concentration of membrane attack complex levels was related to worse kidney function at one and two years after transplantation.

Finally, we developed a model of hypoxia-reoxygenation with human proximal tubular cells (HK-2). We demonstrated local activation of the complement system's different components, including the membrane attack complex, and the C5a receptors (C5aR1 and C5L2), another product of the complement system, scarcely studied in this area. Besides, we observed a higher expression of C5aR1 in the tubular cell membrane and C5L2 in the peritubular capillary endothelium, in biopsies of patients with delayed graft function, compared to controls.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Función retrasada del Injerto: Definición, fisiopatología e impacto en la supervivencia del injerto renal.

La función retrasada del injerto (FRI) es una complicación frecuente tras el trasplante renal. Diversas series describen una frecuencia entre un 20-50% de los trasplantes provenientes de donante fallecido (1). No existe un consenso claro sobre los factores de riesgo más relevantes para el desarrollo de FRI, sin embargo, algunas variables como el tiempo de preservación entre la extracción e implante del órgano (isquemia fría) y variables relacionadas con las características del donante (edad, causa de la muerte o comorbilidades) suelen relacionarse con la aparición de FRI (1,2).

Existen diversas características clínicas que permiten definir la FRI. La más ampliamente utilizada y que parece tener mayor relevancia pronóstica, es la necesidad de diálisis durante la primera semana del trasplante (2).

Fisiopatológicamente, la FRI consiste en un daño renal agudo, ocasionado por diferentes mecanismos desencadenados por el daño secundario a isquemia-reperfusión (I/R). La isquemia inicial ocasiona necrosis en el tejido que, a su vez, libera sustancias endógenas capaces de activar el sistema inmune innato. Tras la restauración de la perfusión de estos tejidos, algunos ligandos endógenos procedentes de células necróticas y apoptóticas, denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), activan el sistema inmune e inducen liberación de citoquinas que perpetúan la respuesta inflamatoria en el tejido dañado. A nivel renal este proceso afecta particularmente al epitelio tubular proximal renal (3,4).

Respecto al impacto de la FRI en la supervivencia del injerto renal, varias publicaciones describen mayor riesgo de pérdida del injerto en pacientes con FRI (5). Algunos autores sostienen que el efecto deletéreo en la supervivencia del injerto tras presentar FRI, es más debido a mayor frecuencia de rechazo agudo en estos pacientes, que al daño por I/R (6). Los estudios diseñados para valorar la interacción entre la presencia de rechazo agudo y FRI han arrojado resultados contradictorios. Algunos autores reportaron supervivencia del injerto más corta en aquellos pacientes con FRI, independientemente de la presencia o no de rechazo agudo (7–9), mientras que otros solo encontraron impacto negativo de la FRI cuando se asociaba a rechazo agudo (10,11). La heterogeneidad de esos estudios en términos de la época en la que se realizaron, las pautas de inmunosupresión utilizadas, algunas actualmente obsoletas, y las diferencias en las características de donantes y receptores, respecto a nuestra práctica clínica habitual, hace difícil sacar conclusiones al respecto. Por lo que son necesarios estudios que evalúen dicha interacción en cohortes modernas de trasplante renal.

En relación a lo anterior, debido al aumento en la demanda de órganos y al envejecimiento de los pacientes con enfermedad renal crónica que requieren trasplante, se han ampliado los criterios de selección y aceptación de donantes y receptores. Como consecuencia, cada vez es mayor el número de trasplantes procedentes de donantes añosos y con criterios expandidos (12), una población poco representada en la mayoría de estudios publicados sobre FRI.

Esta ampliación de criterios ha hecho más compleja la evaluación del binomio donante/receptor en el momento del trasplante. Por este motivo es

fundamental contar con herramientas que permitirán una mejor caracterización del donante, una evaluación del beneficio que el trasplante aportaría al receptor y una mejor categorización de perfiles más susceptibles a complicaciones, como la FRI. Una de estas herramientas es el KDPI (Kidney Donor Profile Index), desarrollado por el programa de distribución de órganos de Estados Unidos. El KDPI, se basa en 10 variables del donante (edad, raza, antecedente de diabetes mellitus, hipertensión, valor de creatinina sérica al momento de la extracción, peso, seropositividad para virus de la hepatitis C y causa de muerte), y busca cuantificar el riesgo de pérdida del injerto evaluado, al compararlo con todos los injertos trasplantados durante el año anterior en Estados Unidos. Un valor del 80%, significa que el injerto que se está evaluando, tiene más riesgo de pérdida que el 80% de los riñones trasplantados durante el año anterior. Por lo tanto, valores más bajos, se relacionan con mayor supervivencia del injerto. Este score ha demostrado una capacidad predictiva aceptable en términos de pérdida del injerto en nuestro entorno (13), sin embargo, la interacción entre KDPI y FRI no ha sido evaluada con población no americana. Dicha interacción permitiría identificar grupos de riesgo en los cuales aplicar estrategias dirigidas a disminuir la tasa de FRI.

1.2. Sistema de complemento.

El sistema de complemento es uno de los principales componentes del sistema inmune innato. Constituye una de las principales barreras de defensa contra patógenos externos. Está conformado por más de 30 proteínas, principalmente de producción hepática, que se encuentran solubles en la sangre y otros fluidos corporales. Muchas de estas proteínas

están normalmente inactivas, pero en respuesta al reconocimiento de componentes moleculares en los microorganismos o tejidos autólogos dañados, pueden activarse secuencialmente a través de una cascada enzimática. El complemento puede ser activado a través de tres vías (14):

- **La vía clásica** involucra los componentes C1, C2 y C4. Se inicia por complejos antígeno-anticuerpo unidos a C1, que, a su vez, cuenta con tres subcomponentes, C1q, C1r y C1s. La vía activa la convertasa C3, llamada C4b2a, que permite la fragmentación de C3 en dos fragmentos: C3b, que puede unirse covalentemente a la superficie de patógenos microbianos y opsonizarlos, y C3a, que activa mastocitos, lo que causa la liberación de mediadores vasoactivos (14).
- **La vía alternativa** involucra a los factores B, D, H e I, que interactúan entre sí, y C3b, permitiendo la generación de la convertasa C3, llamada C3bBb, que puede activar más C3; ésta es la razón por la que muchas veces se la conoce como “bucle de amplificación”. La activación del bucle tiene lugar principalmente en presencia de paredes bacterianas y fúngicas, pero se inhibe por ciertas moléculas presentes en la superficie de células normales de mamíferos (14)
- **Vía de la lectina de unión a manosa.** Esta ruta es activada por la unión de lectinas a residuos de manosa en las superficies de patógenos (MBL, por sus siglas en inglés). Como consecuencia se activan las serín-proteasas asociadas a MBL, MASP-1 y MASP-2, que activan C4 y C2 para formar convertasa C3, C4b2a (14).

- Finalmente, estas tres vías, confluyen en la generación de C3 convertasas que van a activar la vía final del complemento, conocida como **vía lítica**. Esta ruta se inicia tras la escisión de C5, y la unión de C5b a su diana. C6, C7, C8 y C9 se unen a C5b formando el complejo de ataque a la membrana (MAC, por sus siglas en inglés) que, cuando se inserta en la membrana externa de algunas bacterias, facilita su muerte por lisis (Figura 1).

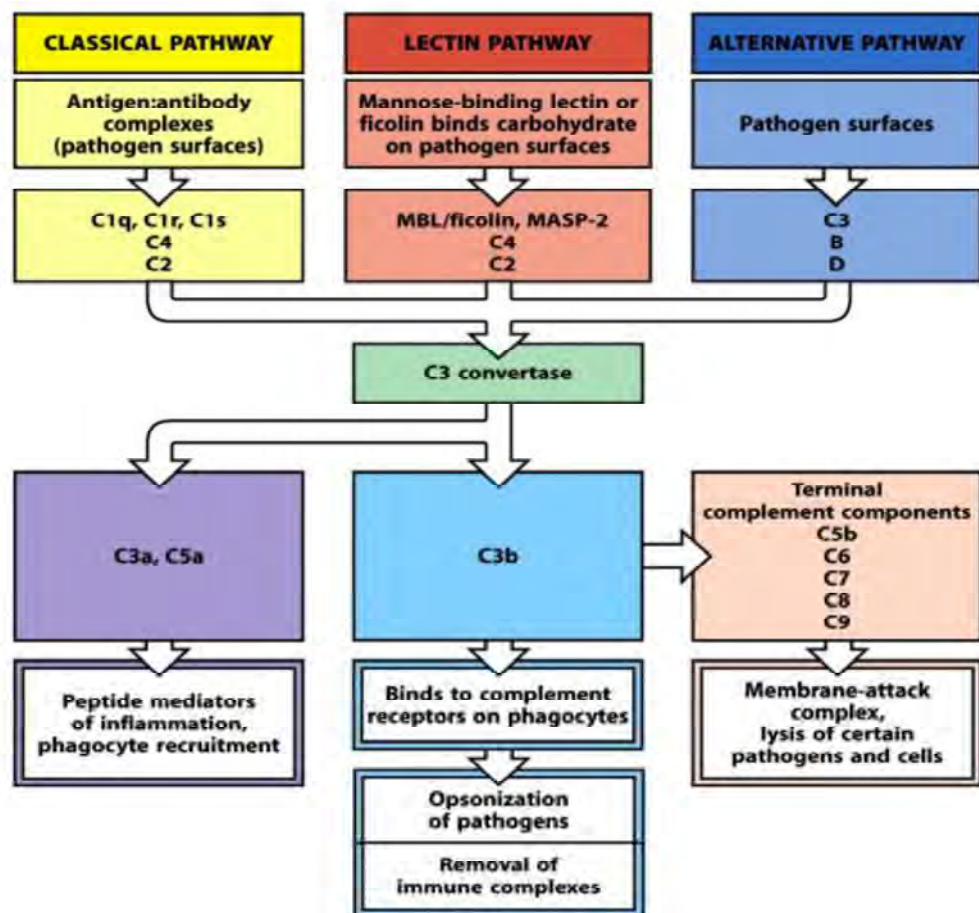


Figura 1. Funcionamiento del sistema del complemento. (Reproducido de Murphy K et al. (2012) *Janeway's Immunobiology (8th Ed.)* Garland Science, Nueva York.).

1.2.2 Reguladores del sistema del complemento.

El correcto funcionamiento del sistema del complemento requiere un equilibrio entre la activación frente a patógenos externos y el reconocimiento de células propias, para evitar el daño autólogo. Para este fin, existen un conjunto de proteínas solubles y de membrana que actúan como reguladores en diferentes niveles de la vía de activación. Entre las proteínas solubles encontramos el factor H, el factor I, la proteína de unión a C4(4-BP), el inhibidor de C1, la vitronectina (proteína-S) y la clusterina SP-40. En membranas celulares, las principales proteínas reguladoras presentes son: la proteína cofactor de membrana (MCP/CD46), el factor de aceleración de descomposición (DAF/CD55), el receptor de complemento 1 (CR1/CD35), la trombomodulina y el CD59 (Tabla 1).

Tabla 1. Reguladores del sistema del complemento.

Regulador	Función	Localización
Factor H	Se une a C3b; acelera la descomposición de las C3 y C5 convertasas de la vía alternativa. Actúa como cofactor del factor I. Reconoce marcadores específicos de células propias y se une a depósitos iniciales de C3b, evitando que se depositen más.	Plasma
Factor I	Degrada C3b y C4b junto con cofactores.	Plasma
Inhibidor de C1	Inactiva C1r, C1rs, MASP-1 y MASP-2.	Plasma
Proteína de unión a C4b(4-BP)	Se une a C4b, acelera su descomposición, actuando como cofactor del Factor I.	Plasma
Vitronectina (Proteína-S)	Se une a C5b-7 e inhibe la polimerización de C9.	Plasma
Clusterina (SP-40)	Se une a C5b-7 e inhibe la formación de C5b-9.	Plasma
MCP	Cofactor del factor I para el clivaje de C3b y C4b.	Membrana
DAF	Desestabiliza las C3 y C5 convertasas de la vía clásica y alternativa.	Membrana
CD-59	Bloquea la unión de C9 y C5b-8 y la formación de C5b-9.	Membrana
CR1	Acelera la degradación de C3 convertasa y actúa como cofactor del Factor I para el clivaje de C3b y C4b.	Membrana
Trombomodulina	Incrementa la actividad de cofactor del factor H. Desactivación de C3a y C5a a través del inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina).	Membrana

1.3 Activación del complemento durante la isquemia-reperfusión.

La función retrasada del injerto, es la consecuencia del daño producido por los eventos que se desencadenan por la isquemia a la que es sometida el órgano durante la muerte del donante, la extracción y conservación del mismo y posteriormente tras la reperfusión. Ésta induce un proceso que es necesario para la correcta recuperación de los tejidos, pero que puede ser nocivo (15).

La isquemia induce un estado anaeróbico secundario a la privación del oxígeno en los tejidos, lo que puede activar el sistema del complemento por diversos mecanismos.

Por una parte, el descenso del pH como resultado del metabolismo anaeróbico, puede alterar la regulación de la vía alternativa, al alterar la unión de FH y C3b (16).

Otro posible mecanismo, es a través de la generación de amoníaco (NH_3) durante el metabolismo anaeróbico. Éste es capaz de romper el enlace tioéster de C3, formando $\text{C3}(\text{NH}_3)$ Bb convertasas, que podrían iniciar la vía alternativa.

Por otro lado, la isquemia induce la expresión de heparinasa y metaloproteinasas en las células endoteliales de la pared vascular, lo que resulta en clivaje y ruptura del glicocálix (17), lo que impediría la unión de varios reguladores del complemento, como el inhibidor de C1, la proteína de unión a C4b y el FH.

Además, durante la isquemia las células tubulares, endoteliales y perivasculares, dañadas por la hipoxia, exponen de manera extracelular ciertas moléculas citoplasmáticas y nucleares. En conjunto estas moléculas se han denominado patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) o

señales de peligro. Estas DAMPs, son reconocidas por C1q, la manosa unida a lectina (MBL), las colectinas, ficolinas y el C3b, lo que llevaría a la activación de las 3 vías del complemento.

Finalmente, la rápida oxigenación que se produce al restablecer el riego sanguíneo, durante la reperfusión, produce daño por diversos mecanismos, incluido la liberación de radicales libres de oxígeno (18). Además, la suma de la desprotección de las superficies celulares, la hipoxia y el medio ácido, previamente creado por la isquemia, activan y amplifican la actividad destructiva del complemento (19) (Figura 2).

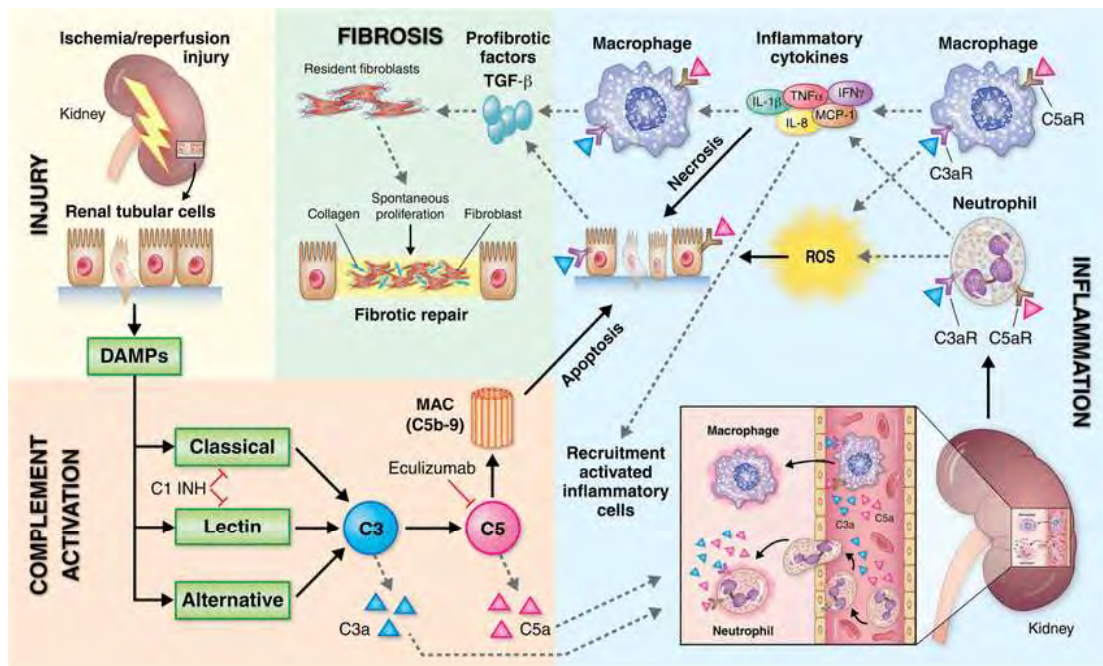


Figura 2. Papel del complemento en la patogénesis del daño por isquemia-reperfusión, (Reproducido de (20)).

La lesión de I/R activa el sistema del complemento mediante la liberación de ligandos endógenos (DAMP) del tejido con lesión aguda. Esta activación produce daño renal directo a través de MAC, así como reclutamiento de células inflamatorias y liberación de citoquinas por mediación de las anafilatoxinas C3a y C5a. Por otra parte, el endotelio activado, los monocitos y el epitelio tubular lesionado secretan factores pro-fibrogénicos y activación de fibroblastos locales en respuesta a la ligadura de C3aR y C5aR por C3a y C5a, respectivamente. Todos estos procesos llevan a una reparación anómala y aparición de fibrosis en el tejido afectado.

Diferentes estudios, en su mayoría utilizando modelos animales, sugieren que el complemento tiene un papel relevante en el daño por I/R.

En modelos porcinos, el bloqueo de la vía de las lectinas o de la vía clásica utilizando inhibidores de C1 antes de la reperfusión, protege a los riñones

del daño por I/R (21,22). Por otra parte, modelos murinos, utilizando inhibidores de C3b(23) con ratones knock-out para MBL, MASP2 e IgM, también han mostrado protección contra el daño por I/R, mientras que la inhibición de C4, componente de la vía clásica, no mostró esta protección (24). Estos resultados podrían indicar un papel relevante de las vías alternativa y de la lectina en este proceso. Sin embargo, estudios realizados con células tubulares humanas, han descrito activación predominantemente por vía clásica, lo que podría indicar diferencias en los mecanismos de activación del complemento en respuesta a la isquemia-reperfusión entre modelos murinos y humanos (25).

Independientemente de la vía que lo desencadene, existe clara evidencia sobre activación del complemento tras la isquemia y reperfusión en el trasplante renal. Diversos estudios describen hallazgos que indicarían activación del complemento inicialmente en el donante previo a la extracción del órgano y que se verían potenciados tras la reperfusión del órgano (19,26–29).

1.3.1 Complejo de Ataque de Membrana (MAC) y daño por isquemia-reperfusión.

El resultado final de la vía de activación del sistema del complemento es la formación del complejo de ataque de membrana (MAC). El MAC es un complejo macromolecular que se ubica en la membrana de fosfolípidos de patógenos y células formando un canal transmembrana, el cual permite la entrada de iones y pequeñas moléculas al interior de la célula, ocasionando lisis celular. Además del daño celular directo, el MAC también tiene la capacidad de inducir respuestas celulares pro-inflamatorias. Esta acción se

conoce como actividad sublítica, la cual desencadena diferentes mecanismos celulares, como apoptosis, proliferación, producción de matriz celular y liberación de citoquinas inflamatorias y sustancias profibróticas como el factor de crecimiento transformador β (TGF- β), que podrían favorecer la aparición de daño crónico tras la lesión aguda inicial (30–32).

La formación del MAC está controlada por dos vías. Una es a través de proteínas que unen al complejo C5b-7, impidiendo su inserción en las membranas celulares, entre las que se encuentran la proteína S (Vitronectina) y la SP-40 (clusterina) (33). La otra vía involucra proteínas que inhiben la incorporación y polimerización de C9 dentro del MAC. Entre éstas, la más potente es CD59 (34).

A pesar de que es uno de los principales mecanismos de defensa contra microorganismos, el MAC también tiene un papel importante en múltiples enfermedades autoinmunes e inflamatorias (35). En algunos casos, estas patologías pueden estar relacionadas con su efecto citotóxico, como suele pasar en algunas patologías hematológicas. Sin embargo, en otros casos, la participación del MAC, está más relacionada con la habilidad de inducir activación celular, cuando está presente en concentraciones sublíticas (30,36). A nivel renal, el MAC se ha implicado en la fisiopatología de diversas enfermedades, como la glomerulonefritis post-estreptocócica (37), nefropatía membranosa (38), glomerulonefritis membranoproliferativa tipo III (39), nefritis lúpica (40), rechazo renal (41) y el daño por isquemia-reperusión (15,19,27,42).

Estudios previos han descrito la relación entre la producción de MAC y daño por I/R en patologías humanas. Blogowski et al. (28) estudiaron los niveles de MAC en sueros de receptores de donantes en muerte encefálica, extraídos 1, 3 y 5 minutos tras la reperusión. Los investigadores reportaron

un aumento de MAC 2-3 veces mayor en aquellos pacientes que posteriormente presentaron FRI, respecto a aquellos con función temprana del injerto. Posteriormente investigadores de la universidad de Leiden, cuantificaron los niveles de MAC en 24 receptores de trasplante renal (8 de donante vivo, 9 en muerte encefálica y 7 en muerte de causa cardíaca), al momento de la reperfusión, 3, 10 y 30 minutos tras la misma. Este estudio mostró un aumento significativo de los niveles de MAC en los receptores de donante en muerte encefálica y muerte cardíaca, pero no en los receptores de donante vivo, lo que indicaría, que este aumento no se produce tras tiempos de isquemia cortos. En este mismo estudio, se evaluaron depósitos de MAC en biopsias realizadas previo a la conservación en frío y 45 minutos tras la reperfusión, sin detectar tinción en ninguna de las muestras. Este resultado fue atribuido a toma de muestras muy precoz, ya que en modelos murinos se ha descrito aparición de MAC tras 12-24 horas de la reperfusión (19). Finalmente, estudios realizados por nuestro grupo, que evaluaron los niveles de MAC en suero y los depósitos tubulares en biopsias de pacientes con insuficiencia renal aguda (IRA) de diferentes etiologías, incluido una muestra de trasplantados renales con FRI, demostraron una relación entre la gravedad de la IRA y niveles más elevados de MAC en suero, así como con la presencia de depósitos más extensos en biopsias (27).

Como se mencionó previamente, los efectos del MAC pueden ser líticos o sublíticos. Sin embargo, en las células nucleadas, el efecto del MAC es primordialmente por acción sublítica, debido a que éstas cuentan con diferentes mecanismos de defensa. Éstos incluyen la presencia de bombas de iones que contrarrestan el efecto de poro del MAC, la capacidad de removerlo de la membrana celular y la presencia de inhibidores homólogos como el CD59 (43).

Diversos estudios han demostrado una potente capacidad profibrótica e inflamatoria del MAC en diferentes células renales. La incubación de células epiteliales glomerulares humanas con niveles sublépticos de MAC, se relacionó con una gran producción de TGF- β e IL-6 (31,44). Por otra parte, esa exposición de concentraciones sublépticas de MAC en células endoteliales humanas, se ha relacionado con liberación de sustancias profibróticas como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (45). Similares resultados se han obtenido de modelos con células tubulares murinas y humanas, en las que se ha descrito mayor expresión de vías moléculas profibróticas como el colágeno tipo IV(46), fibronectina (47) y TGF- β (48).

1.3.2 Factor H como regulador en el daño por I/R.

El factor H es una glicoproteína que circula en concentraciones elevadas en el plasma, se expresa constitutivamente en el hígado, pero que también puede ser expresado localmente por diferentes células, incluidas las células tubulares renales (49). Su actividad es esencial para el control de la vía alternativa del complemento. Para su correcto funcionamiento es necesario el reconocimiento de marcadores específicos de células autólogas y el reconocimiento de fragmentos de C3b/C3d (49) (Figura 3).

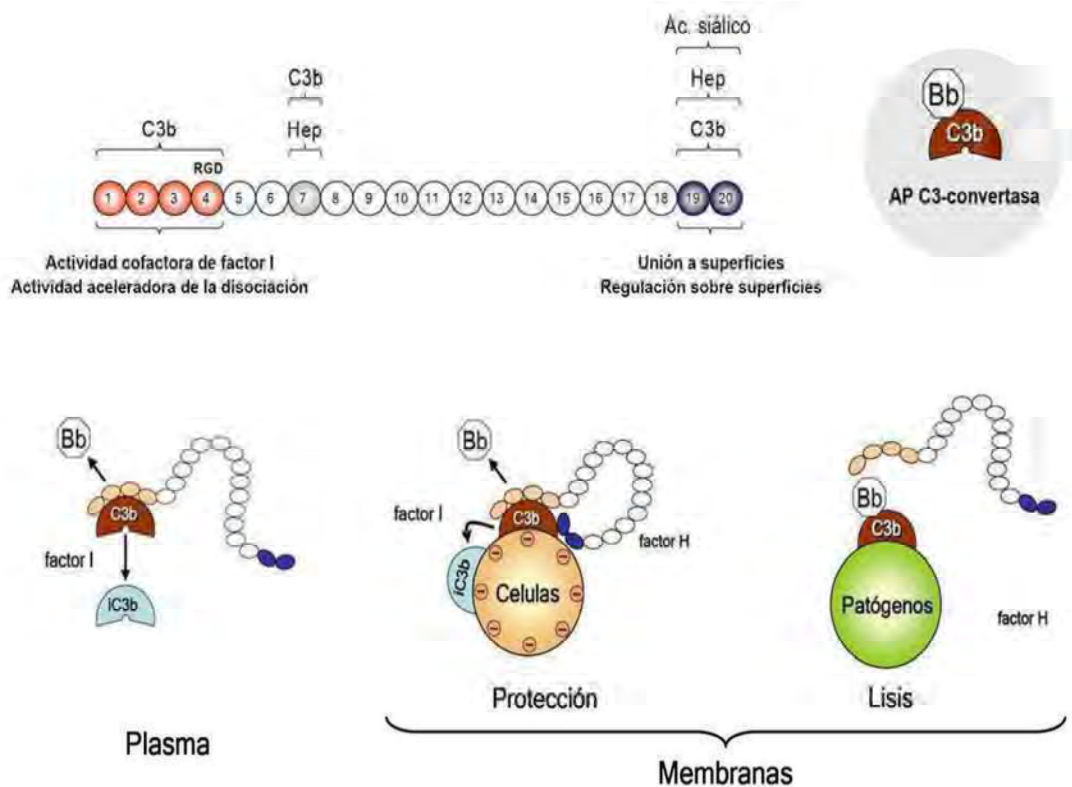


Figura 3. Activación y regulación por factor H de la vía alternativa del complemento en el plasma y en superficies celulares. (Reproducido de (50)).

Las mutaciones que producen alteraciones funcionales del FH están relacionadas con diversas patologías renales como el síndrome hemolítico urémico atípico (51) y la enfermedad por depósitos densos (52). Sin embargo, diversos estudios han descrito un aumento patológico de la actividad de la vía alternativa en el daño isquémico renal, incluso con un funcionamiento completamente normal del FH (23,53). Esto probablemente se deba por una parte a que a pesar de encontrarse en altas concentraciones, el FH no sería capaz de compensar la hiperactividad de la vía alternativa, producida por la pérdida de expresión de otros reguladores en la superficie

de las células dañadas (54). Por otro lado, podría haber una disminución en la capacidad de identificar células propias, debido a que las células afectadas por el daño isquémico podrían expresar en su superficie sustancias capaces de alterar la interacción del factor H con los marcadores específicos de las células normales (55).

Estudios murinos han descrito mayor daño por I/R en ausencia de FH, con una protección parcial tras su reposición (56,57). Su papel en el daño por isquemia reperusión está poco descrito en humanos. Estudios previos realizados por nuestro grupo, evaluaron los depósitos histológicos de factor H en biopsias de pacientes con función renal normal, IRA y un subgrupo de pacientes trasplantados con FRI. Se detectó la presencia de tinción extensa en el epitelio de tubular cortical tanto en controles como en biopsias con IRA y FRI. Sin embargo, se objetivó una clara relación entre una mayor intensidad de la tinción y la gravedad del daño renal (27).

1.3.3 Participación de los receptores de C5a (C5aR1 y C5L2) en el daño por isquemia-reperusión.

Como ya explicamos previamente la activación de las diferentes vías del sistema del complemento confluyen en la escisión de C5, de la que surgen C5b y C5a, una potente anafilotoxina, que también está involucrada en los mecanismos de daño por I/R mediado por el complemento (58–60). C5a y su producto de degradación C5adesArg, interactúan con dos receptores transmembrana de 7 dominios, el receptor de C5aR/C5aR1 y C5a-like receptor 2 (C5L2) (61,62). Ambos receptores se expresan en una gran variedad de células, particularmente en la superficie de células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos y linfocitos T (63).

Aunque los dos receptores comparten características similares, existen importantes diferencias entre ellos. Por una parte, aunque la afinidad por C5a es similar entre ambos, solo C5L2 es capaz de fijar C5adesArg con gran afinidad (64,65). Por otra parte, C5aR1 forma parte de la familia de receptores ligados a proteína G, lo que le otorga capacidad de internalización y activación de vías intracelulares, mientras que C5L2 parece carecer de la capacidad de acoplarse a proteína G (66,67). Debido a esto, muchos autores defienden la hipótesis de que C5L2 es un receptor señuelo para C5a, cuya función consistiría en actuar como modulador de la actividad biológica de C5a (64,65,68,69). Sin embargo, se le han atribuido tanto efectos inflamatorios como antiinflamatorios en diversas enfermedades, esto parece depender del tipo de enfermedad, modelo o células en los que se estudie.

El eje C5a-C5aR1 podría tener un papel crucial en daño por I/R. En estos modelos, en su mayoría murinos, la inhibición de C5a o C5aR1 resultó en menor daño isquémico (60,70–72). Respecto a C5L2, algunos autores han observado menor daño tras I/R en ratones knock-out, tanto para C5aR1 como para C5L2, aparentemente con una mayor protección y menor grado de fibrosis en aquellos ratones que no expresaban C5L2. Los investigadores atribuyeron estos resultados a una mayor producción de sustancias antiinflamatorias (interleucina-10) y antifibróticas (serina/treonina proteína quinasa) (73,74). Sin embargo, existen pocos datos sobre la expresión de C5aR1 y C5L2 en humanos. Algunos autores describen la presencia de C5aR solo en células tubulares proximales de biopsias renales normales (75). En otro estudio, éste realizado en biopsias de trasplantados renales, mostró expresión de C5aR1 en la porción ascendente del asa de Henle y en la primera parte del túbulo contorneado distal, mientras que C5L2 solo se detectó en túbulos distales. Hasta la fecha, este es el único estudio que

había valorado la expresión de estos receptores en trasplantados con FRI. Los investigadores no encontraron diferencias en la intensidad de tinción para ninguno de los dos receptores, entre riñones normales y riñones con necrosis tubular aguda.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

La activación o desregulación del sistema del complemento tiene un papel clave en el desarrollo de la función retrasada del injerto, a través tanto del daño lítico directo como el daño indirecto por la liberación de sustancias inflamatorias y profibróticas, de los componentes de la vía lítica o terminal del complemento sobre las células tubulares renales. Por ello, el estudio de algunos de los componentes de esta vía y su relación con la evolución del injerto renal podría ayudar a conocer mejor este proceso y evaluar la utilidad pronóstica obtenida de cuantificar la expresión de estos durante el fenómeno de isquemia-reperfusión.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

Estudiar la implicación etiológica entre la activación del sistema del complemento y el desarrollo de la función retrasada del injerto renal y su implicación clínica sobre la función renal.

Objetivos secundarios

1. Analizar el impacto de la función retrasada del injerto renal en la supervivencia y la función renal de los órganos trasplantados.
2. Estudiar la dinámica del complejo de ataque de membrana, como marcador de activación del complemento en trasplantados renales con función retrasada del injerto.
3. Estudiar la expresión de diferentes componentes del sistema de complemento y la activación de vías inflamatorias y profibróticas relacionadas con el mismo en un modelo in vitro de hipoxia-reoxigenación con células tubulares humanas.
4. Estudiar la expresión de los receptores de la fracción C5a del complemento en el daño por isquemia-reperfusión.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Relevance of KDPI value and acute rejection on kidney transplant outcomes in recipients with delayed graft function.

Carlos E Arias-Cabrales, María José Pérez-Sáez, Dolores Redondo-Pachón, Anna Buxeda, Carla Burballa, Xavier Duran, Marisa Mir, Marta Crespo, Julio Pascual.

Transpl Int. 2020 Sep;33(9):1071-1077.

doi: 10.1111/tri.13654. Epub 2020 Jun 15

doi: 10.1111/tri.13654. Epub 2020 Jun 15.

doi: 10.1111/tri.13654. Epub 2020 Jun 15.

doi: 10.1111/tri.13654. Epub 2020 Jun 15.

doi: 10.1111/tri.13654. Epub 2020 Jun 15.

doi: 10.1111/tri.13654. Epub 2020 Jun 15.

doi: 10.1111/tri.13654. Epub 2020 Jun 15.

4.2 Activation of final complement components after kidney transplantation as a marker of delayed graft function severity.

Carlos E Arias-Cabrales, Marta Riera, María José Pérez-Sáez, Javier Gimeno, David Benito, Dolores Redondo, Carla Burballa, Marta Crespo, Julio Pascual, Eva Rodríguez García.

Clinical Kidney Journal, 2020; sfaa147.

doi.org/10.1093/ckj/sfaa147



ORIGINAL ARTICLE

Activation of final complement components after kidney transplantation as a marker of delayed graft function severity

Carlos E. Arias-Cabrales,¹ Marta Riera,^{1,2} María José Pérez-Sáez,¹ Javier Gimeno,³ David Benito,^{1,2} Dolores Redondo,¹ Carla Burballa,¹ Marta Crespo,¹ Julio Pascual¹ and Eva Rodríguez¹

¹Department of Nephrology, Hospital del Mar, Barcelona, Catalunya, Spain, ²Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, IMIM, Barcelona, Catalunya, Spain and ³Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Catalunya, Spain

Correspondence to: Eva Rodríguez; E-mail: erodriguezg@psmar.cat

ABSTRACT

Background. Ischaemia-reperfusion (I/R) damage is a relevant cause of delayed graft function (DGF). Complement activation is involved in experimental I/R injury, but few data are available from kidney transplant (KT) patients. We studied the dynamics of membrane attack complex (C5b-9) as a soluble fraction (SC5b-9) and the histological deposit pattern of C3b, complement Factor H (FH) and C5b-9 in DGF patients.

Methods. We evaluated SC5b-9 levels in 59 recipients: 38 with immediate graft function and 21 with DGF. The SC5b-9 was measured at admission for KT and 7 days after KT. DGF-kidney biopsies ($n = 12$) and a control group of 1-year protocol biopsies without tissue damage ($n = 4$) were stained for C5b-9, C3b and FH.

Results. SC5b-9 increased significantly in DGF patients (Day 0: 6621 ± 2202 mAU/L versus Day 7: 9626 ± 4142 mAU/L; $P = 0.006$), while it remained stable in non-DGF patients. Days 0–7 increase $>5\%$ was the better cut-off associated with DGF versus non-DGF patient discrimination (sensitivity = 81%). In addition, SC5b-9 increase was related to DGF duration and worse graft function, and independently associated with DGF occurrence. SC5b-9, C3b and FH stains were observed in tubular epithelial cells basal membrane. DGF-kidney biopsies showed a more frequently high-intensity stain, a higher number of tubules with positive stain and larger perimeter of tubules with positive stains for SC5b-9, C3b and FH than control patients.

Conclusions. Both SC5b-9 levels and SC5b-9, C3b and FH deposits in tubular epithelial cells basal membrane are highly expressed in patients experiencing DGF. SC5b-9 levels increase could be useful as a marker of DGF severity.

Keywords: biomarkers, complement, delayed graft function, kidney biopsy, kidney transplantation

Received: 7.3.2020; Editorial decision: 19.5.2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of ERA-EDTA.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

INTRODUCTION

Ischaemia–reperfusion (I/R) damage is one of the most important causes of delayed graft function (DGF) after kidney transplantation (KT) [1], a form of acute kidney injury (AKI) with a negative impact in graft outcomes [2–4].

Complement activation is implicated in the pathophysiology of I/R injury. It may occur through three different pathways (classic, alternative or lectin), due to the interaction with antibodies, pro-inflammatory proteins or mannose-binding lectin fragments [5–7]. Data extracted mostly from experimental studies have described a principal role of the complement classical pathway route activation in I/R injury in hearts, livers and intestines. However, in experimental models of I/R injury in kidneys, the alternative and lectin pathways are showed to be more relevant [5, 8], with some contradictory findings between animal models and clinical data [9].

Regardless of the mechanism, the three complement pathways converge in the assembly of C3 convertases that have the same function: cleavage of C3 into C3a and C3b fragments, with the latter union of C3b fragment to C3 convertase, producing C5 convertase. Finally, C5 convertases promote the complement cascade by cleaving C5 into C5a and C5b fragments. C5a initiates the building of the membrane attack complex (C5b-9) consisting of C5b, C6, C7, C8 and multiple C9 molecules [10]. C5b-9 has a critical role for defence against pathogens and has been implicated in the mechanisms of tissue injury during inflammation [5]. C3 and C5 components and the generation of anaphylatoxins (C3a and C5a) amplify the inflammatory response and provoke the release of opsonins such as C3b, which are important mediators in the process of antigen presentation and complement cascade amplification [11, 12].

Given the multiple effects that complement can exert, there are mechanisms to limit complement activation, where and when it occurs. One of the most relevant complement regulator is Factor H (FH), which accelerates the decay of the alternative pathway C3 convertase and is a co-factor of factor I-mediated cleavage and inactivation of C3b [13].

There is little information about the dynamics of complement components during I/R injury in KT recipients [14–16]. Some studies focused on soluble C5b-9 (sC5b-9) levels during the first minutes after unclamping with contradictory results [14, 15]. Regarding FH, most available data come from animal models and describe the ability to ameliorate partially I/R injury [17]. Moreover, most of these studies are focused on FH alteration during the liquid phase, and there are few data about the deposition of FH on cell surface in this setting. A previous study from our group reported higher intensity stain in kidney biopsies from patients with ischaemic AKI [16]. The C3d, a cleavage product from C3b, is considered a surrogate marker for complement activation, and has been described in kidney biopsies with the diagnosis of acute tubular necrosis [18], but there is less information regarding C3d stain in DGF patients.

Our principal aim was to evaluate the potential association between sC5b-9 levels and DGF in KT recipients. Additionally, we evaluated the histological pattern of three different complement components: C3d, FH and C5b-9.

MATERIALS AND METHODS

Study design and data collection

The study was undertaken in 115 KT recipients with available plasma samples. Their KT had been performed in our hospital

between April 2016 and December 2017. We excluded KT from living donors ($n=25$), KT from uncontrolled donation after cardio-circulatory death ($n=7$), patients with acute rejection ($n=18$) and patients with primary non-function ($n=6$). Finally, we assessed sC5b-9 levels in 59 patients.

Clinical data were collected from our local transplant data base, which includes: baseline demographic characteristics from donors and recipients, transplant characteristics and clinical follow-up variables periodically registered, complications and patient/graft survival.

All participants gave written informed consent. This study adhered to the Principles of Helsinki Declaration and the Ethics Committee of the Hospital del Mar approved the protocol (CEIC 2010/3777/1).

Definitions

DGF was defined as the requirement for dialysis within the first week after transplantation.

Preemptive KT is defined as transplantation performed before initiation of maintenance dialysis.

Plasma samples and sC5b-9 measurements

Blood samples were prospectively collected at admission for KT day (Day 0) and at Day 7 after KT. They were collected in EDTA tubes to prevent further complement activation and stored in aliquots at -80°C until use. Sandwich ELISAs were used to measure sC5b-9 levels (#HK328, Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands). Briefly, samples and standards were incubated in microtiter wells coated with antibodies recognizing human C5b-9 (Clone 6G3) diluted samples to 1:45 concentration. Streptavidin–peroxidase conjugate was used to bind the biotinylated tracer antibody (dilution 1:12), and the enzyme reaction was stopped by the addition of oxalic acid. The absorbance was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm (Tecan Infinite 200, TECAN Instruments, Männedorf, Zürich, Switzerland). A standard curve by plotting the absorbance versus the corresponding sC5b-9 concentrations was obtained. sC5b-9 were determined from the standard curve.

Immunohistochemistry in kidney tissue samples

C5b-9, F H and C3d deposition were assessed in kidney biopsies from 12 KT patients with DGF. Four patients with 1-year protocol graft biopsies with completely stable creatinine serum values since transplantation without proteinuria, anti-HLA antibodies or histological signs of renal dysfunction or rejection served as controls. The mean time between KT and kidney biopsy was 15 days [interquartile range (IQR) 10.7–29]. Biopsies from controls were performed at 12 months (IQR 12–16) after KT.

Frozen blocks on OCT resin were cut into $6\text{-}\mu\text{m}$ sections using the cryostat. Tissue sections onto Superfrost® glass slides were dried at room temperature. Samples were fixed in 10% buffered formalin and blocked for endogenous peroxidase activity by H_2O_2 3% in methanol. Goat serum 3% in TBS was used to block nonspecific sites. Primary antibodies against C5b-9 (#HM2167, anti-human terminal complex complement; Hycult Biotech, The Netherlands, Clone 6G3) [monoclonal antibody (mAb) 1:2000], FH (courtesy of Dr S. de Córdoba, CSIC, Clone 214) (mAb 1:1000) and C3d (courtesy of Dr S. de Córdoba, CSIC, Clone 12.3.3) (mAb 1:400) were incubated at 4°C overnight. Antigen–antibody reaction was detected by a goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (#P0447, Dako). Sections were visualized with

DAB Chromogen System (#K3467, Dako) and counterstained with haematoxylin.

Samples were evaluated by two independent observers (C.E.A.-C. and J.G.) in a blinded manner using a semi-quantitative method, based on the percentage of stained tubules and the percentage of stained perimeter of the average stained tubule. The intensity of staining was graded as 0 (no staining), +1 (stain visible at 40× magnification), +2 (at 20×), +3 (at 10×) and +4 (at 2–4×). We considered 'high-intensity' as stain visible at or <10× magnification (+3 and +4), 'diffuse stain' as positive stain in >50% of all tubules from slide and 'perimetral stain' as 50% positive staining in >50% of tubular perimeter.

Statistical analysis

Quantitative variables with a normal distribution are expressed as mean [standard deviation (SD)] and the remaining as median and IQR. Means were compared with *t*-test for normally distributed variables and Mann-Whitney-Wilcoxon test or abnormally distributed ones. Comparisons of SC5b-9 levels between Days 0 and 7 within DGF and non-DGF patients were performed with Mann-Whitney-Wilcoxon test due to abnormal distribution. Categorical data were analysed by χ^2 test. Risk factors for DGF were analysed by logistical regression analysis with a stepwise selection method. The factors included in the univariate analysis were: donor age, time on dialysis prior to transplant (months), recipient gender, previous transplants, diabetes mellitus (DM), peak of panel reactive antibody, cold ischaemia time (CIT), donor after cardiac death (DCD), donor terminal creatinine, donor weight, number of HLA mismatches and induction immunosuppression therapy, as well as Days 0–7 SC5b-9% increase. These were included in the analysis in basis of literature review [19] and clinical experience.

In the multivariate analysis, only those variables with a $P < 0.05$ were included.

Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed for assessing the discriminative ability of SC5b-9 levels increase Days 0–7 for estimating DGF, and the area under curve (AUC) was calculated. The value of marker defined as cut-off was determined by the maximum of Youden index ($J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$).

A $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS version 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the STATA package version 15 (STATA Corp., College Station, TX, USA).

RESULTS

SC5b-9 levels

We analysed SC5b-9 levels at Days 0 and 7 post in 59 patients, 21 of them (35.6%) with DGF and 38 (64.4%) without DGF. Their clinical characteristics are summarized in Table 1. Patients in the DGF group were older, more frequently diabetics and received kidneys from older donors and more frequently controlled cardio-circulatory death type. All patients with DGF performed conventional haemodialysis, none required continuous techniques. Patients with DGF showed renal similar kidney function at 3 and 6 months, but worse renal function 1 year after KT (serum creatinine 1.78 ± 0.61 versus 1.35 ± 0.30 mg/dL in non-DGF patients) (Table 2).

No significant differences were found in Day 0 SC5b-9 levels between DGF and non-DGF patients (Table 1). These levels were

similar between patients undergoing renal replacement therapy and preemptive KT patients (6273 ± 3048 mAU/L versus 6102 ± 2681 mAU/L; $P = 0.835$).

DGF patients presented similar levels at Day 0 and 7 (5902 ± 3049 mAU/L versus 6178 ± 2882 mAU/L; $P = 0.686$). While those patients with DGF showed a significant increase of SC5b-9 levels between Days 0 and 7 (6621 ± 2202 mAU/L versus 9625 ± 4142 mAU/L; $P = 0.006$, Figure 1). The post KT SC5b-9 levels were independent of creatinine serum value at Day 7 post-KT in non-DGF patients (data not show).

Multivariate analysis showed an independent association between SC5b-9 levels increase between basal and Day 7 after KT and DGF (Table 2). Percentage SC5b-9 levels increase ($\Delta 0$ –7 SC5b-9%) discriminative assessment analysed by ROC curve showed a good discriminative value for DGF with an AUC of 0.78, $P < 0.001$ (sensitivity 81%, specificity 66%), by cut-off point of 5%. This cut-off point was related with longer DGF duration (83% of patients with DGF longer than 10 days had $\Delta 0$ –7 SC5b-9 >5%) and worse renal function 1 and 2 years after KT (Table 3).

Immunohistochemistry in kidney tissue samples

Twelve kidney biopsies from patients with DGF were assessed. The median age of these patients was 61.0 ± 10.5 years, predominantly male (75% versus 16.7%), none of these patients had glomerulopathy related to complement alterations.

The mean (IQR) time between KT and kidney biopsy was 15 days (10.7–29). Biopsies from controls were performed at 12 months (12–16) after KT.

C5b-9-, C3b- and FH-positive staining were observed in tubular epithelial cells basal membrane. There was no staining in cytoplasmic, apical and/or lateral membrane in tubular cells. C5b-9 and C3b were diffusely positive in arterial endothelial cells and in endothelial glomerular cells in all cases, with variable intensity staining. FH was positive in some cases in arterial endothelial cells and in the mesangial areas of glomeruli, although intensity was not evaluated in this study.

Regarding C5b-9 staining, biopsies from patients experiencing DGF showed more frequently high-intensity stain (67% versus 25%; $P = 0.043$) and diffuse stain (85% versus 50%; $P = 0.052$) compared with the control group. Perimetral stain was found only in biopsies from DGF patients (Figure 2).

C3d stain showed similar intensity in both DGF biopsies and controls (80% versus 70%, $P = 0.143$); however, diffuse staining was more usually observed in biopsies from DGF patients (91% versus 50% controls; $P = 0.049$) and also perimetral (75% DGF versus 50% controls; $P = 0.054$) (Figure 2).

FH stain showed similar results. Biopsies from DGF patients presented more frequently higher intensity staining than controls (73% versus 25%; $P = 0.036$), more diffuse staining (60% versus 25% controls; $P = 0.054$) and only biopsies from DGF patients presented perimetral stain (Figure 2).

Among the 12 patients with DGF, three (25%) never recovered renal function, presenting all of them with $\Delta 0$ -SC5b-9 >5% and intense, diffuse and positive staining in >50% of tubular perimeter for C5b-9, FH and C3b. Five DGF patients had 1-year protocol biopsy, and three of them showed more extensive interstitial fibrosis and tubular atrophy compared with biopsy performed during DGF period: all of them presented high-intensity and perimetral stain for C5b-9 and C3b staining. There were heterogeneous findings regarding FH staining.

Table 1. Comparison between DGF and non-DGF patients

Variables	DGF (n = 21)	Non-DGF (n = 38)	P-value
Recipient age, mean ± SD, years	63 ± 11	56 ± 12	0.030
Donor age, mean ± SD, years	66 ± 14	57 ± 36	0.029
Recipient sex (male, %)	16 (76.2)	20 (52.6)	0.076
Recipients with hypertension, %	19 (90.4)	34 (89.4)	0.968
Recipients with DM, %	10 (47.6)	7 (18.4)	0.033
Pre-KT SC5b-9 levels, mean ± SD, mAU/mL	6621 ± 2201	5901 ± 3049	0.303
Donor sex (male, %)	14 (66.6)	22 (61.1)	0.508
KDPI, mean ± SD	84.8 ± 21.7	74.5 ± 27.4	0.153
DCD, %	13 (61.9)	11 (28.9)	0.014
Time on dialysis prior to KT, median (IQR), months	19 (14–37)	20 (11–28)	0.454
CIT, median (IQR), h	11 (7–17)	12 (7–17)	0.951
Creatinine drop, median (IQR), days	11 (10–15)	2 (1–3)	<0.001
Previous KT, %	2 (9.5)	5 (13.1)	0.109
Immunosuppression induction, %			
Thymoglobulin	0	1 (2.7)	0.954
Others ^a	21 (100)	37 (97.3)	
Renal replacement therapy, %			
Haemodialysis	17 (80.9)	23 (60.5)	0.148
Peritoneal dialysis	4 (19.1)	12 (31.6)	0.370
Preemptive KT	0	3 (7.9)	0.545
12-month creatinine, mean ± SD	1.78 ± 0.61	1.35 ± 0.30	0.001
Follow-up, median (IQR), months	11 (4.5–12.1)	12.1 (8.9–12.2)	0.064

KDPI, Kidney Donor Profile Index.

^aBasiliximabTable 2. Comparative in renal function among DGF patients with Δ C5b-9 >5% compared with DGF and Δ C5b-9 <5%

	Δ 0–7 C5b-9 <5% (n = 5)	Δ 0–7 C5b-9 >5% (n = 16)	P-value
3-month creatinine	2.13 ± 1.07	2.34 ± 0.58	0.215
6-month creatinine	1.91 ± 0.96	2.33 ± 0.58	0.081
12-month creatinine	2.11 ± 1.85	2.37 ± 0.74	0.045
24-month creatinine	1.50 ± 0.58	3.20 ± 1.96	0.020

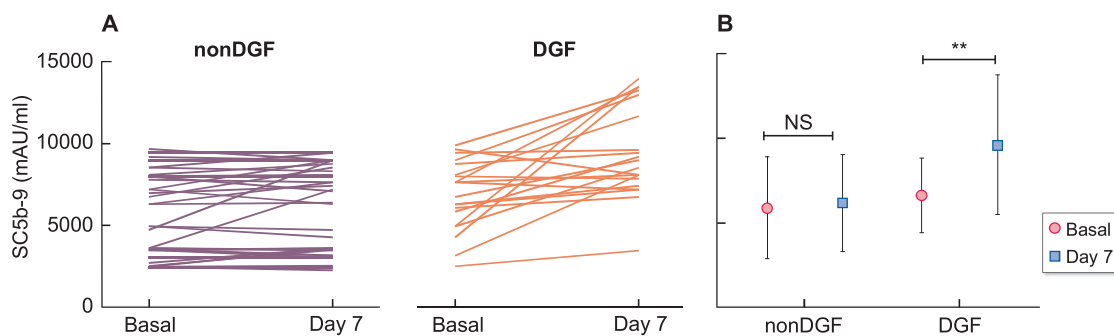


FIGURE 1: Individual plasmatic SC5b-9 levels at Days 0 and 7 after KT among DGF and non-DGF patients (A), and plasmatic SC5b-9 levels expressed as mean ± SD (B). Data from 38 patients in the non-DGF group, 21 patients in the DGF group. NS, not significant. **P = 0.006.

DISCUSSION

This study shows that I/R injury activates complement system as reflected both by the increase of SC5b-9 levels and the local deposition of complement system fractions C5b-9, C3b and regulator FH in tubular epithelial cells basal membrane. We excluded patients who suffered from acute rejection since our aim was to evaluate the association between I/R injury and DGF caused mainly by complement system proteins fractions. To

our knowledge, this is the first study that evaluates jointly the SC5b-9 levels increase and C5b-9, C3d and FH stain in KT patients.

Some studies have established complement's critical role in post-transplant I/R injury [8, 20, 21]. Previous studies from our group reported a relationship between higher SC5b-9 levels and histologic C5b-9 deposits with the severity of AKI, including a small group of KT recipients with DGF [16, 22]. However, the independent impact of SC5b-9 with levels by multivariate analysis

and pre-KT SC5b-9 levels were lacking in this study. Błogowski *et al.* [14] showed an increase in C5b-9 since the first minute after reperfusion in those patients that lately developed DGF, but they did not evaluate C5b-9 levels after the first 5 min. de Vries *et al.* [15] reported a transient increase in C5b-9 levels only the first seconds after reperfusion in brain-deceased and cardiac-death donor KT recipients, but not in living donor KT. The relationship between C5b-9 levels increase and DGF was not evaluated in this study.

Our data show that the complement cascade activation in the form of the increase of lytic C5b-9 fraction levels during the first week after KT was clearly increased in patients with DGF. Additionally, we found that those patients with DGF that experienced higher SC5b-9 increase presented more frequently worse graft function at 1 and 2 years and longer DGF duration. Similar to our results, in the study abovementioned from Błogowski *et al.* [14], authors also reported worse graft function

Table 3. Multivariate lineal regression analysis to evaluate the association between SC5b-9 level increase and DGF

	OR (95% CI)	P-value
ΔC5b-9 %	1.030 (1.054–1.007)	0.009
KDPI	1.014 (0.987–1.041)	0.312
Donor age (years)	1.013 (0.965–1.064)	0.336
DM (recipient)	1.504 (0.364–6.222)	0.573
DCD	4.285 (1.066–17.23)	0.040

Data from two independent models for evaluating the impact of increase C5b-9 increase (ΔC5b-9%) in DGF. One model was adjusted for KDPI score and the other one for donor age. Other variables included in the model were: recipient age, history of DM and DCD type. KDPI, Kidney Donor Profile Index; OR, odds ratio.

in patients with higher C5b-9 increase after reperfusion, but the relationship between DGF duration and C5b-9 increase was not evaluated in this study.

To support the finding of complement activation in DGF cases, we also evaluated C5b-9, C3d and FH deposition in kidney biopsies from DGF patients. We found the presence of positive linear C5b-9, C3d and FH staining in tubular epithelial cell basal membrane. C5b-9 and FH stains were clearly more intense, more extensive and with higher perimeter staining in kidney biopsies from DGF patients compared with protocol biopsies from kidneys without signs of renal dysfunction or rejection. C3d stain showed similar intensity in both groups, but similar to C5b-9 and FH staining, biopsies from DGF patients showed more extensive and higher perimeter staining than controls. Previous studies from our group reported comparable findings in AKI biopsies that included a number of KT biopsies with DGF. Rodríguez *et al.* [16] reported a larger number of tubules with C5b-9 deposition and strong intensity for FH staining in AKI patients. This study stained the samples in fixed paraffin sections, and a different FH stain pattern with a tubular cytoplasmic distribution was noted. In our study, detection technique on frozen sections showed FH linear staining in the basal tubular membrane, with a similar pattern to C5b-9 and C3d staining, probably reflecting a more antibody specificity. As mentioned before, FH plays a fundamental role in complement regulation in soluble phase, helping to the decay and inactivation of C3b by Factor I and avoiding the additional deposition of C3b fragments and subsequent C5 convertase formation on cells surfaces [23]. However, this protective role seems insufficient to stop the complement damage in I/R injury [24]. The C3d is a cleavage product from C3b and its deposit reflects local activated complement. The fact that we found almost the same histological

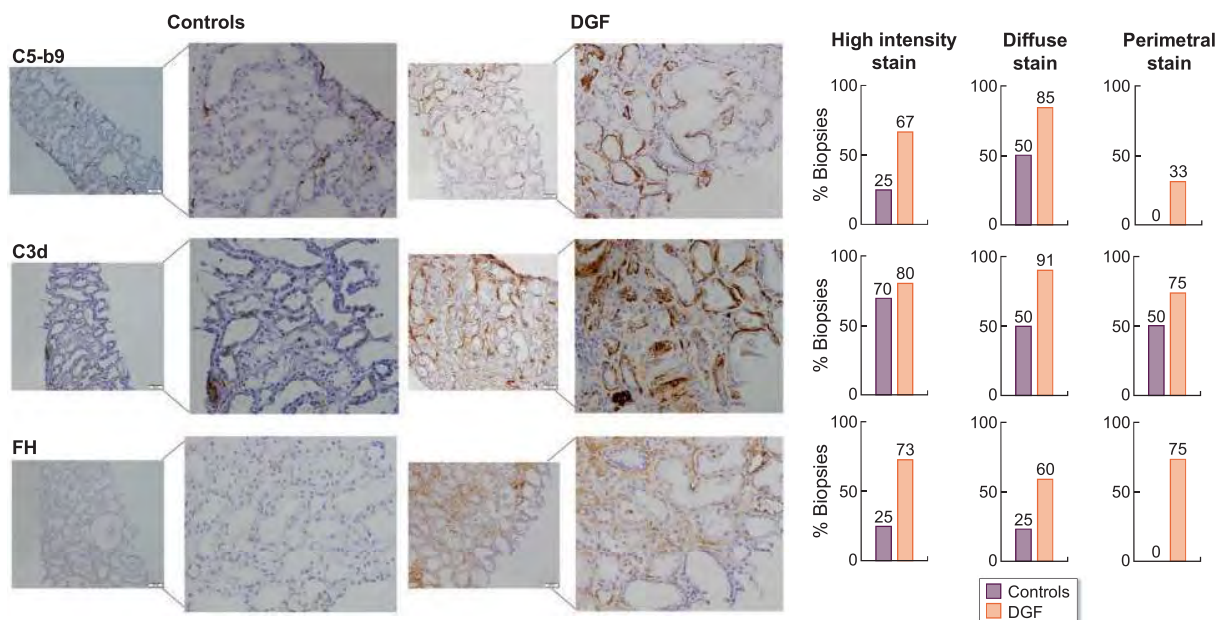


FIGURE 2: C5b-9, C3d and FH markers for complement activation in biopsies from KT patients with DGF and 1-year protocol biopsies without tissue damage as the control group. C5b-9, C3d and FH were evaluated in the tubular compartment using immunohistochemistry and semi-quantitative scoring. DGF biopsies showed more frequently high-intensity staining (stain visible at or less than $\times 10$ magnification) for C5b-9 and FH than controls. C3d high intensity-stain was similar between DGF and controls. DGF biopsies showed more frequently diffuse staining ($>50\%$ of tubules) than controls. DGF biopsies also showed more frequently perimetral staining (positive staining in $>50\%$ of tubular perimeter) for C5b-9, C3d and FH than controls.

pattern of C3d, C5b-9 and FH in biopsies from the DGF group confirms a local complement activation in these patients. Otherwise, DGF patients with worse outcomes, such as never renal function recovery or more fibrosis in 1-year protocol biopsies, had more intense and diffuse staining. However, the small sample in this subgroup limits the interpretation and extrapolation of these results.

To our knowledge, this is the first study that correlates SC5b-9 levels increase during the first week after KT with DGF duration and more interestingly, medium-term renal function. According to this finding, Δ C5b-9 (0–7) may be considered as a promising marker to DGF severity. In addition, possible complement-dependent DGF cases might benefit from treatment with complement inhibitors.

A reasonable concern about our findings could be the influence of haemodialysis or glomerular filtration rate in SC5b-9 levels. Some studies reported that complement proteins (including C5b-9) might increase due to blood–membrane contact in the dialyser [25, 26]; however, this reaction is not described with the modern membranes used in our patients. Furthermore, we did not find differences between baseline levels in patients on haemodialysis before KT, peritoneal dialysis or preemptive KT patients, so it is unlikely that treatment with haemodialysis could have significantly influenced our results. Regarding influence by effective glomerular filtration rate, we did not find differences in SC5b-9 levels between non-DGF patients with different creatinine serum values at Day 7 after KT.

The limitations of our study are derived from its single-centre and small sample size, with a number of cases that needed to be excluded due to missing blood sample for C5b-9 determination. We believe that the exclusion of the patients with missing samples was not associated with any recipient or donor characteristics and thus should not bias our results. Other limitations were the exclusion of KT from living donors and uncontrolled cardio-circulatory death donors; the reason for excluding this patient was the under representation of these groups in the global sample. In addition, the small sample size even could reduce the statistical power of the multivariable linear regression analysis.

In conclusion, complement activation during the peritransplant period could be related to the severity of graft injury and the presence of DGF. Therefore, the determination of C5b-9 levels could be useful to identify patients with possible complement-dependent graft injury that might benefit from complement inhibitor therapies. Additional studies are needed to improve the diagnostic accuracy from this marker.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the study coordinators Anna Faura, Sara Alvarez, Montserrat Folgueiras and María Vera for their continuous technical support. This work was carried out by C.E.A.-C. as part of his thesis project in the Department of Medicine, Universitat Autònoma of Barcelona.

FUNDING

C.E.A.-C. has support from a Rio Hortega contract CM17/00067, ISCIII. This study had funds from FIS-FEDER PI16/0617 and Redinren RD16/0009/0013.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

C.E.A.-C., M.R., E.R. and J.P. designed the study, performed the analysis and validated the data. J.G. contributed to histological analyses. C.E.A.-C. drafted the initial report, while all authors contributed to the final manuscript and approved it.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The results presented in this article have not been published previously in whole or part, except in abstract format. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Zhao H, Alam A, Soo AP et al. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond. *EBioMedicine* 2018; 28: 31–42
- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ et al. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 968–974
- Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN et al. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 24: 1039–1047
- Pascual J, Pérez-Sáez MJ, Mir M et al. Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management. *Transplant Rev* 2012; 26: 280–290
- Diepenhorst GMP, van Gulik TM, Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg* 2009; 249: 889–899
- Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 729–740
- Damman J, Schuur TA, Ploeg RJ et al. Complement and renal transplantation: from donor to recipient. *Transplantation* 2008; 85: 923–927
- Zhou W, Farrar CA, Abe K et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2000; 105: 1363–1371
- van der Pol P, Roos A, Berger SP et al. Natural IgM antibodies are involved in the activation of complement by hypoxic human tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300: F932–F940
- Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 227–235
- Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 821–852
- Zhou W. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology* 2012; 217: 225–234
- Harrison RA, Lachmann PJ. The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol Immunol* 1980; 17: 9–20
- Błogowski W, Dołęgowska B, Sałata D et al. Clinical analysis of perioperative complement activity during ischemia/reperfusion injury following renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 1843–1851
- de Vries DK, van der Pol P, van Anken GE et al. Acute but transient release of terminal complement complex after reperfusion in clinical kidney transplantation. *Transplant J* 2013; 95: 816–820
- Rodríguez E, Gimeno J, Arias-Cabrales C et al. Membrane attack complex and factor H in humans with acute kidney injury. *Kidney Blood Press Res* 2018; 43: 1655–1665

17. Renner B, Ferreira VP, Cortes C *et al.* Binding of factor H to tubular epithelial cells limits interstitial complement activation in ischemic injury. *Kidney Int* 2011; 80: 165–173
18. Thurman JM, Scott Lucia M, Ljubanovic D *et al.* Acute tubular necrosis is characterized by activation of the alternative pathway of complement. *Kidney Int* 2005; 67: 524–530
19. Irish WD, Ilsley JN, Schnitzler MA *et al.* A risk prediction model for delayed graft function in the current era of deceased donor renal transplantation. *Am J Transplant* 2010; 10: 2279–2286
20. Chun NH, Horwitz JK, Heeger PS. Role of complement activation in allograft inflammation. *Curr Transpl Rep* 2019; 6: 52–59
21. Zhang M, Takahashi K, Alicot EM *et al.* Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 2006; 177: 4727–4734
22. Rodríguez E, Riera M, Barrios C *et al.* Value of plasmatic membrane attack complex as a marker of severity in acute kidney injury. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 1–6
23. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortés C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol* 2010; 47: 2187–2197
24. Goetz L, Laskowski J, Renner B *et al.* Complement factor H protects mice from ischemic acute kidney injury but is not critical for controlling complement activation by glomerular IgM. *Eur J Immunol* 2018; 48: 791–802
25. Cheung AK, Parker CJ, Wilcox L *et al.* Activation of the alternative pathway of complement by cellulosic hemodialysis membranes. *Kidney Int* 1989; 36: 257–265
26. Hauser AC, Derfler K, Stockenhuber F *et al.* Generation of the membrane attack complex during haemodialysis: impact of classical and alternative pathway components. *Clin Sci* 1990; 79: 471–476

4.3 Role of C5aR1 and C5L2 receptors in ischemia reperfusion injury

Carlos Arias-Cabrales, Eva Rodríguez-García, Javier Gimeno, David Benito, María José Pérez-Sáez, Dolores Redondo-Pachón, Anna Buxeda, Carla Burballa, Marta Crespo, Marta Riera, Julio Pascual.

J. Clin. Med. 2021, 10, 974.

<https://doi.org/10.3390/jcm10050974>



Article

Role of C5aR1 and C5L2 Receptors in Ischemia-Reperfusion Injury

Carlos Arias-Cabrales ^{1,*}, Eva Rodriguez-Garcia ¹, Javier Gimeno ², David Benito ³, María José Pérez-Sáez ¹, Dolores Redondo-Pachón ¹, Anna Buxeda ¹, Carla Burballa ¹, Marta Crespo ¹, Marta Riera ^{3,*} and Julio Pascual ^{1,*}

¹ Department of Nephrology, Parc de Salut Mar, 08003 Barcelona, Spain; erodriguezg@psmar.cat (E.R.-G.); mperezsaez@psmar.cat (M.J.P.-S.); mredondopachon@psmar.cat (D.R.-P.); abuxeda@psmar.cat (A.B.); cburballa@psmar.cat (C.B.); mcrespo@psma.cat (M.C.)

² Department of Pathology, Parc de Salut Mar, 08003 Barcelona, Spain; jgimenobeltran@psmar.cat

³ Kidney Research Group, Hospital del Mar Medical Research Institute, IMIM, 08003 Barcelona, Spain; dbenito@psmar.cat

* Correspondence: cariascabrales@psmar.cat (C.A.-C.); mriera1@imim.es (M.R.); julpascual@gmail.com (J.P.)

Abstract: The role of C5a receptors (C5aR1 and C5L2) in renal ischemia-reperfusion injury (IRI) is uncertain. We generated an in vitro model of hypoxia/reoxygenation with human proximal tubule epithelial cells to mimic some IRI events. C5aR1, membrane attack complex (MAC) and factor H (FH) deposits were evaluated with immunofluorescence. Quantitative polymerase chain reaction evaluated the expression of *C5aR1*, *C5L2* genes as well as genes related to tubular injury, inflammation, and profibrotic pathways. Additionally, C5aR1 and C5L2 deposits were evaluated in kidney graft biopsies (KB) from transplant patients with delayed graft function (DGF, $n = 12$) and compared with a control group ($n = 8$). We observed higher immunofluorescence expression of C5aR1, MAC and FH as higher expression of genes related to tubular injury, inflammatory and profibrotic pathways and of *C5aR1* in the hypoxic cells; whereas, *C5L2* gene expression was unaffected by the hypoxic stimulus. Regarding KB, C5aR1 was detected in the apical and basal membrane of tubular epithelial cells, whereas C5L2 deposits were observed in endothelial cells of peritubular capillaries (PTC). DGF-KB showed more frequently diffuse C5aR1 staining and C5L2 compared to controls. In conclusion, C5aR1 expression is increased by hypoxia and IRI, both in vitro and in human biopsies with an acute injury. C5L2 expression in PTC could be related to endothelial cell damage during IRI.

Keywords: kidney transplant; ischemia-reperfusion injury; delayed graft function; complement system; C5a receptors



Citation: Arias-Cabrales, C.; Rodriguez-Garcia, E.; Gimeno, J.; Benito, D.; Pérez-Sáez, M.J.; Redondo-Pachón, D.; Buxeda, A.; Burballa, C.; Crespo, M.; Riera, M.; et al. Role of C5aR1 and C5L2 Receptors in Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 974. <https://doi.org/10.3390/jcm10050974>

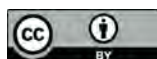
Academic Editor: Giuseppe Regolisti

Received: 29 January 2021

Accepted: 17 February 2021

Published: 2 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Organ injury because of ischemia followed by reperfusion is a major clinical problem. Renal ischemia-reperfusion injury (IRI) is the most common cause of acute kidney injury after renal transplantation [1]. The pathophysiology of IRI is characterized by three different processes: neutrophilic infiltration, reactive oxygen species formation, and innate immune activation [2–5]. Regarding innate immune activation in renal IRI, complement activation plays a critical role [6,7]. It may occur through three different pathways (classic, alternative, or lectin) due to the interaction with antibodies, pro-inflammatory proteins, or mannose-binding lectin fragments [8–10]. Regardless of the mechanism, complement activation leads to the generation of the terminal panel of complement anaphylatoxins C3a, C5a, and C5b-9-membrane attack complex (MAC) that can enhance the recruitment of inflammatory cells and intensify cellular lysis within the site of tissue/organ injury. MAC and FH's role in IRI after kidney transplant (KT) has been described in previous studies [11–15]. However, the role of C5a receptors during IRI in human tissues is less known. C5a is one of the most potent inflammatory mediators, which induces leukocyte chemotaxis, activates

leukocytes and endothelial cells, and drives the production of inflammatory mediators. C5a binds to two receptors, named C5aR1 and C5aR2 (also known as C5L2) [16]. Several studies reported the critical role of the C5a/C5aR1 interaction-mediated inflammation in the pathogenesis of renal injury [17–19].

Nevertheless, the function of C5a/C5L2 interactions in the inflammatory process and its involvement in pathophysiology is controversial. Although opposite anti-inflammatory and pro-inflammatory effects have been reported, this seems to rely on different methodologies, such as disease models and cell types [20]. *C5aR1*- and *C5L2*-knockout mice have shown a protective effect from IRI, with less fibrosis and better tubular regeneration [21,22]. Up to date, only a previous study has addressed the evaluation of C5aR1 and C5L2 expression in KT patients without conclusive results. In a small number of patients, Van Werkhoven et al. were unable to find differences between C5aR1 or C5L2 expression in kidney biopsies obtained pre-donation from kidney living donors and post-transplant kidney biopsies showing acute tubular necrosis [23].

In recent years, C5a-receptor inhibitor drugs have been developed and are being used in other kidney pathologies in which complement also participates [24]. Expanding the knowledge about the role of C5a receptors in IRI in kidney transplants is essential to consider the usefulness of these drugs in this setting.

Our study aimed to evaluate the role of C5aR1 and C5L2 during IRI in an in vitro human cell model of hypoxia/reoxygenation and post-transplant kidney biopsies with ischemic injury.

2. Methods

2.1. Cell Culture

HK-2, an immortalized proximal tubular epithelial cell (PTEC) line derived from normal kidneys, was employed for in vitro studies. The HK-2 cell line was obtained from Dr. López-Novoa. Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% P/S, 1% glutamine and 1% ITS (insulin–transferrin–selenium) under normal conditions (air O₂ and 5% CO₂ at 37 °C). Products were purchased from Biowest (Nuaille, France) and Life Technologies (Waltham, MA, USA). Subconfluent cells were cultured for 48 h in normal conditions and, after changing cell media, for 48 h more either under normal conditions or under hypoxic conditions (1% O₂ and 5% CO₂ at 37 °C), based on the previous model [25]. After this time, the cell medium was replaced and incubated for 30 min under normal conditions. Throughout the reoxygenation period, the cell medium contained 10% heat-inactivated FBS or 10% human serum (NHS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), according to the study group. As a result, the experimental conditions were as follows: (i) normoxia + 10% FBS (N+FBS), (ii) normoxia + 10% NHS (N+NHS), (iii) hypoxia + 10% FBS (H+FBS) and (iv) hypoxia + 10% NHS (H+NHS).

For immunofluorescent protein detection, the same experiments were performed on sterilized glass coverslips on 6-well plates. After incubations, cells were washed with PBS, fixed in 2% PFA for 15 min and permeabilized at –20 °C in methanol for 5 min more. Primary antibodies against C5b-9 (#HM2167, clone 6G3, Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) (mAb 1:2000), factor H (clone 214, courtesy of Dr S Rodríguez de Córdoba, CSIC) (mAb 1:2000), C5aR (#HM2094, clone S5/1, Hycult Biotech) (mAb 1:50) and β -actin (#A1978, Sigma-Aldrich) (mAb 1:6000) were diluted in 1.5% BSA and incubated at room temperature for 1 h. Secondary antibodies coupled to AlexaFluor[®] 489 or 549 (Life Technologies, Waltham, MA, USA) (1:2000) were used to localize proteins. Coverslips were mounted on glass slides using Mowiol/DABCO+DAPI solution (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Cell staining was evaluated with an upright Nikon Ni-e microscope (Amsterdam, Netherlands). The intensity of the staining was measured with Image J software v1.51j8 (Bethesda, MD, USA), and results were expressed as arbitrary units of fluorescence (AUF) per cell after counting the number of nuclei per area, as previously published [26,27].

For gene expression, cells grown in monolayer after the reoxygenation period were collected with cell scrapers and washed in PBS at 300 g for 5 min. Pellets were kept frozen at -80°C in TriPure isolation reagent (Roche, Mannheim, Germany) until total RNA extraction. RNA quantity and purity were analyzed with NanoDrop (ND-1000 V3.3, Waltham, MA, USA). First-strand cDNA was synthesized from 0.5 μg of RNA using the high-capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) incubated 10 min at 25°C , 120 min at 37°C and 5 min at 85°C . Real-time PCR was performed in the LightCycler[®] 480 System (Roche, Mannheim, Germany) using SYBR Green I Master mix and the $\Delta\Delta\text{Cp}$ method for relative quantification was used with *PPIA* gene normalization. The sequences of primers were the following:

C5aR1: 5'-CACCAAGACACTCAAGGTGGT-3'; 5'-ATTATCCCCGTCACCTGGTAG-3'
C5L2: 5'-ATGGAGGTGTAGGCTGGAGAG-3'; 5'-CTATGCCTGAAGCCAGTCTTG-3'
Col1A1: 5'-AGTACTGGATTGACCCCAACC-3'; 5'-GTACACGCAGGTCTCACCAGT-3'
Vimentin: 5'-TCAATGTAAAGATGGCCCTTG-3'; 5'-GCAGAGAAATCCTGCTCTCCT-3'
CD59: 5'-GCCTTCATCCCTAAGTCAACAC-3'; 5'-TTAGAATGTGGCAGCAAGAGAA-3'
Kim1: 5'-GCTTTGCAAATGCAGTTGA-3'; 5'-GGGTCTTAGTCCGTGGCATA-3'
PPIA: 5'-GACCCAACACAAATGGTTCC-3'; 5'-TTTCACTTTGCCAAACACCA-3'

2.2. Kidney Biopsies

We evaluated the C5aR1 and C5L2 deposits in kidney biopsies from KT patients with delayed graft function (DGF), defined as dialysis needed during the first week after KT, and evidence of acute tubular damage in the biopsy ($n = 12$). Eight patients with one-year protocol graft biopsies with stable creatinine serum values since transplantation, without proteinuria, anti-HLA antibodies, or histological signs of renal dysfunction or rejection served as controls.

The mean time between KT and kidney biopsy for DGF was 15 days (IQR 10.7–29). Biopsies from controls were performed 12 months (IQR 12–16) after KT.

Immunohistochemistry

Frozen samples in OCT (Optimal Cutting Temperature compound) stored at -80°C were available for the study. 6 μm cryostatic sections were mounted onto Superfrost[®] glass slides (Waltham, MA, USA). After drying at room temperature, we fixed the samples in 10% buffered formalin for 10 min. After PBS washing, 3% goat serum in PBS was used to block nonspecific binding sites for 1 h. Primary antibodies against C5aR1 (#HM2094, Hycult Biotech) (mAb 1:10) and C5aL (#HP9036, Hycult Biotech) (pAb 1:25) were then incubated for one hour more. Blocking solution was employed as diluent. Secondary antibodies conjugated with HRP-labeled polymer (Dako, Glostrup, Denmark) were incubated for 1 h. After this, we visualized the proteins with The EnVision[®] System-HRP (Dako, Glostrup, Denmark). Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in graded alcohols, and mounted with DPX (Dibutylphthalate Polystyrene Xylene) mounting media. Samples were histologically evaluated by two independent observers (CA-C and JG) in a blinded manner using a semiquantitative method based on the percentage of stained tubules or capillaries. This method was used and validated in previous studies from our group [13]. Regarding C5aR1 staining, we considered “minimally or focal positive staining” as positive staining in less than 50% of all tubules from the slide and “diffuse staining” as positive staining in more than 50% of tubules.

Regarding C5L2 staining, we applied the same method for C4d staining according to the Banff group criteria [28]. This means “minimally positive” when positive staining in less than 10% of all peritubular capillaries, “focally positive staining” when positive staining in 10–50% of all PTC, and finally “diffusely positive” for positive staining in more than 50% of all PTC.

The intensity of staining was graded as 0 (no staining), +1 (staining visible at $40\times$ magnification), +2 (at $20\times$), +3 (at $10\times$), and finally +4 (at $2-4\times$). We considered “high-intensity” as staining visible at or below $10\times$ magnification (+3 or +4).

2.3. Statistical Analysis

We reported continuous variables with a normal distribution as mean and standard deviation; if variable distribution deviated significantly from normality, we reported median and interquartile range (IQR).

We used the Mann–Whitney U test to compare the means of continuous variables and the chi-squared test to analyze categorical data. A p -value (two-tail) < 0.05 was considered statistically significant.

All analyses were performed using SPSS V 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Expression of MAC and FH-Related Proteins in HK-2 Cells

To establish an in vitro model for hypoxia/reoxygenation injury on PTEC, we cultured HK-2 cells under normoxic or hypoxic conditions. Data from five different experiments with the same conditions were analyzed.

The highest mean intensity value for MAC expression was observed in H+NHS cells, followed by H+FBS cells. We did not find significant differences between these two groups ($p = 0.588$). H+NHS cells showed higher MAC intensity values when compared with N+FBS cells ($p = 0.005$) and with N+NHS cells ($p = 0.030$). We did not find statistical differences between H+FBS cells and N+NHS cells. H+FBS cells showed higher values than N+FBS cells ($p = 0.021$). Finally, we detected a significantly higher MAC expression in N+NHS cells compared with N+ FBS cells ($p = 0.002$; Figure 1).

Regarding FH, similarly to MAC, the highest mean intensity values were observed in H+NHS cells, followed by H+FBS cells. However, H+NHS cells showed higher values when compared with H+FBS cells ($p < 0.023$). The FH mean intensity values in H+NHS cells and H+FBS cells were higher than all the other experimental conditions. In normoxic cells, FH mean intensity values were higher in the N+NHS cells compared with N+FBS cells ($p = 0.037$; Figure 1).

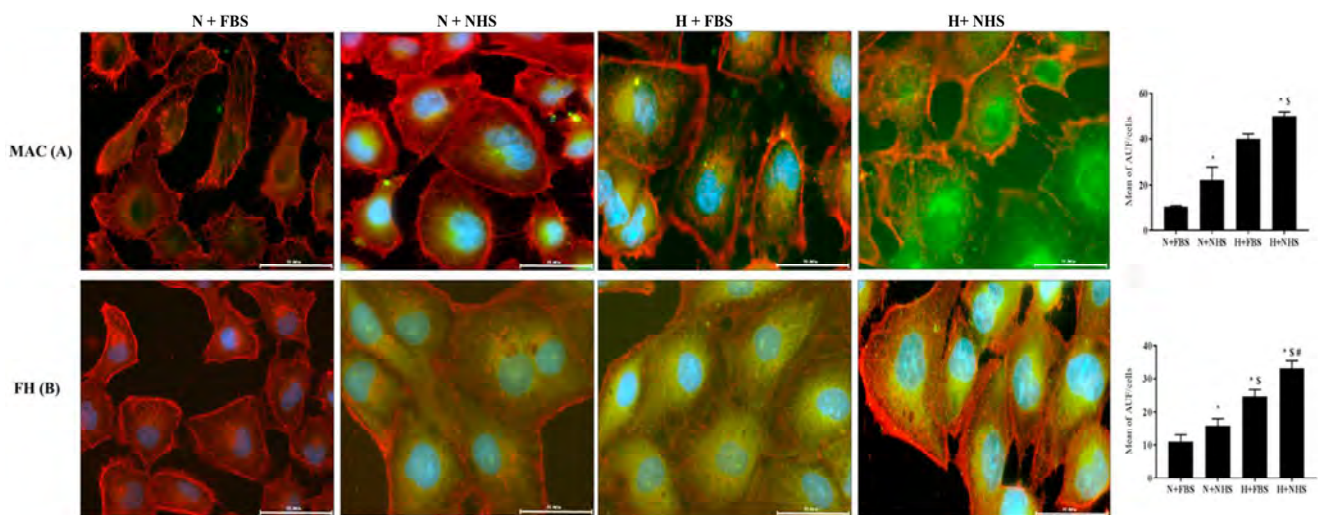


Figure 1. Cellular distribution of membrane attack complex (MAC) and factor H (FH). HK-2 under normoxic or hypoxic conditions for 48 h and later reoxygenated for 30 min with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) or 10% normal human serum (NHS). Two-color immunostaining was performed with MAC (green) and β -actin (red) and with FH (green) and β -actin (red), respectively. Nuclei were visualized by DAPI (blue) (scale bar: 50 μ m). The intensity of the staining was expressed as arbitrary units of fluorescence (AUF) per cell. All analyses were performed in a blinded fashion. Data come from 5 different experiments. Data were shown as mean \pm SEM and analyzed by the Mann–Whitney test. The experimental conditions were: normoxia + 10% FBS (N+FBS), normoxia + 10% NHS (N+NHS), hypoxia + 10% FBS (H+FBS) and hypoxia + 10% NHS (H+NHS). * $p < 0.05$ vs. normoxia + 10% FBS condition. \$ $p < 0.05$ vs. N+NHS, # $p < 0.05$ vs. H+FBS. N: normoxia, H: hypoxia.

3.2. Gene Expression in HK-2 Cells

The *C5aR1* gene expression was higher in hypoxic cells than in normoxic ($p = 0.001$ vs. N+FBS; $p = 0.005$ vs. N+NHS cells). Cells exposed to hypoxia+NHS showed the highest gene expression values. However, they were similar to the values found for H+FBS cells ($p = 0.155$), indicating a strong influence of the oxygen deprivation period. Regarding *C5L2*, only cells exposed to 10% NHS increased the expression of this gene, independently to normoxic or hypoxic conditions (Figure 2).

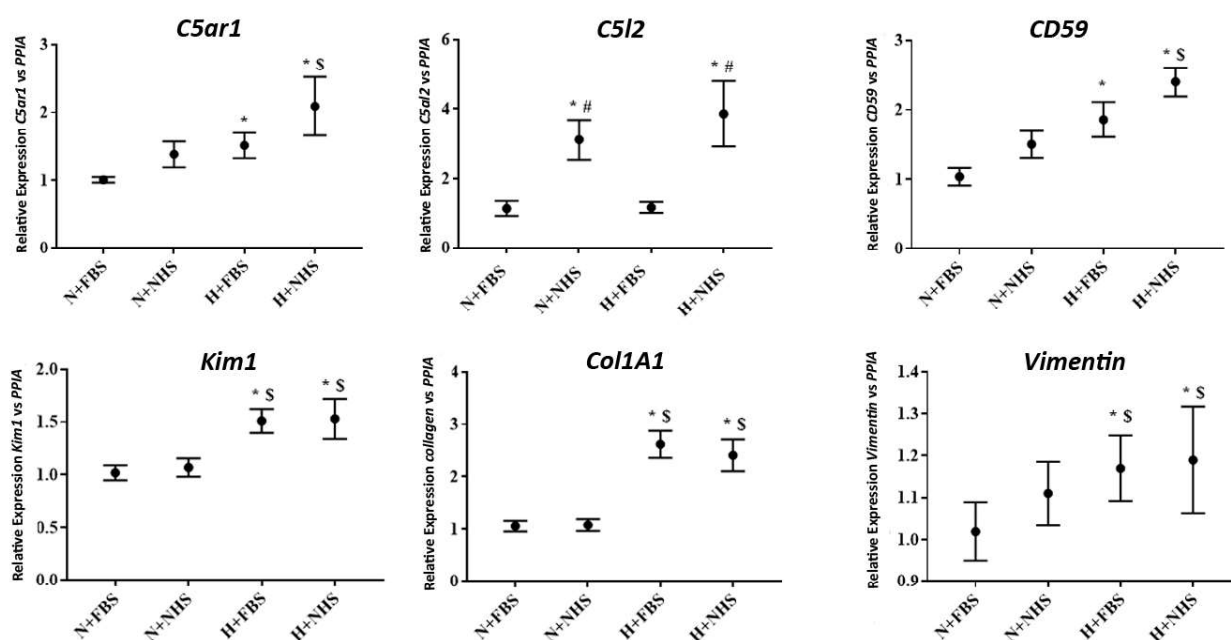


Figure 2. Gene expression of *C5aR1*, *C5L2*, complement regulators, an inflammatory and profibrotic gene from in vitro ischemia-reperfusion injury (IRI) model. Quantitative real-time RT-PCR for analyzing *C5aR1*, *C5L2*, *CD59*, *KIM-1*, *Collagen1A1*, and *Vimentin* was performed in HK-2 cells collected after a reoxygenation step from the IRI model. Gene expression was expressed as relative gene expression vs. *PPIA*. Data were shown as mean \pm SEM and analyzed by the Mann–Whitney test. * $p < 0.05$ vs. normoxia + 10% FBS condition. \$ $p < 0.05$ vs. N+NHS, # $p < 0.05$ vs. H+FBS.

Gene expression for complement regulator *CD59* was higher in hypoxic cells when compared with normoxic cells, independently to 10% NHS addition (Figure 2).

Kidney injury molecular 1 (*KIM-1*) gene expression was also higher in hypoxic cells when compared with N+FBS cells ($p = 0.016$ to H+NHS and $p = 0.006$ to H+FBS) (Figure 2).

Pro-fibrotic, Collagen A-1 and vimentin gene expression were increased in both H+NHS and H+FBS cells when compared with N+FBS. No differences were found between normoxic nor hypoxic cells, independently of the addition to NHS (Figure 2).

3.3. Expression of *C5aR1* Protein in HK-2 Cells

We assayed *C5aR1* protein localization by immunofluorescence stain in our hypoxia/reoxygenation model. We analyzed the data from three different experiments in the same condition described above. We detected a significant increase of *C5aR1* expression in the H+NHS cells compared with N+FBS cells ($p = 0.049$). The N+NHS and H+FBS cells also tended to express more *C5aR1* protein than the N+FBS cells. However, these differences were not statistically significant (Figure 3).

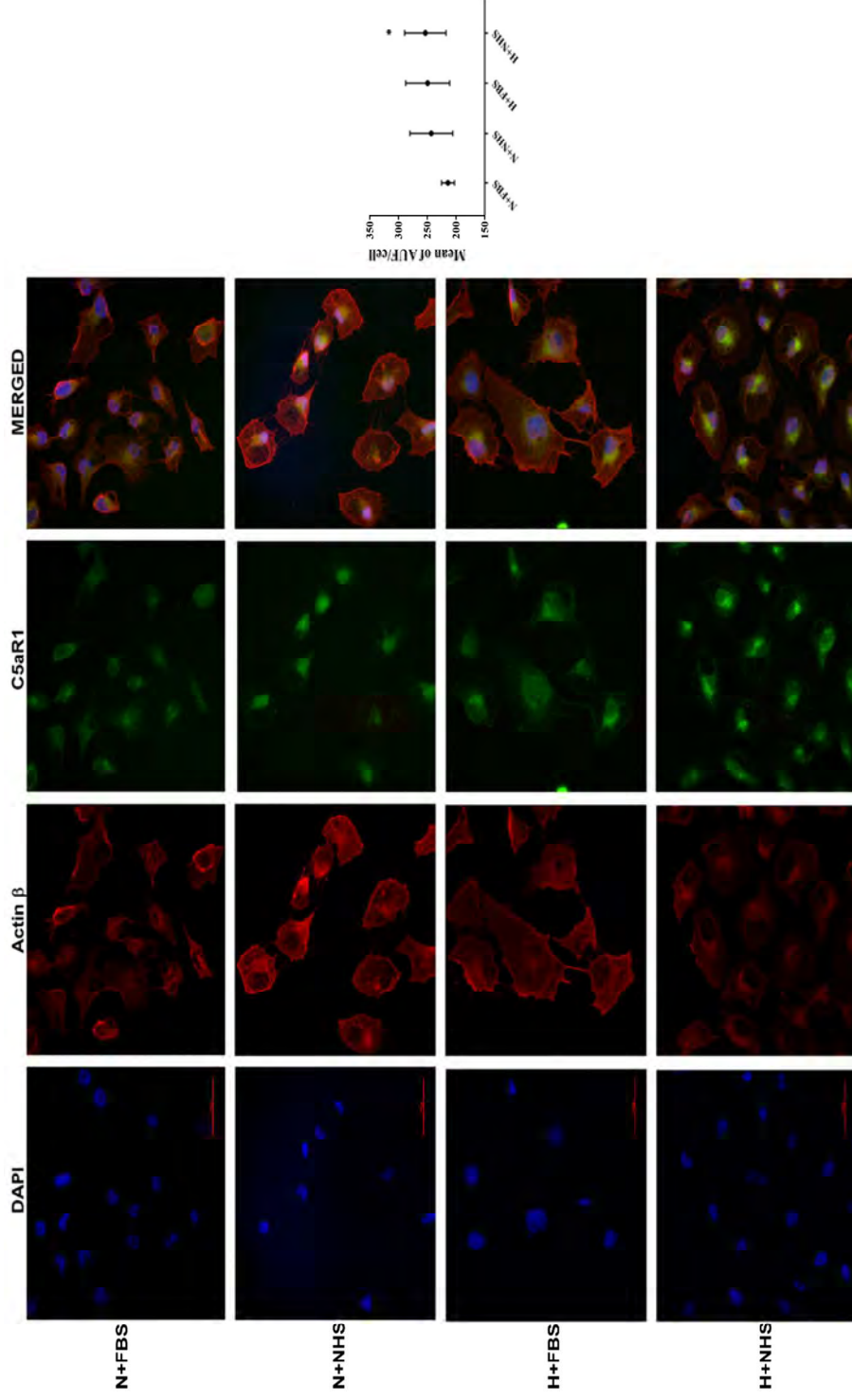


Figure 3. Cellular distribution of C5aR1. HK-2 under normoxic or hypoxic conditions for 48 h and later reoxygenated for 30 min with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) or 10% normal human serum (NHS). Double immunostaining was performed with C5aR1 (green) and β -actin (red). Nuclei were visualized by DAPI (blue) (scale bar: 50 μ m). The intensity of the staining was expressed as arbitrary units of fluorescence (AUF) per cell. Data from 3 different experiments are shown as mean \pm SEM and analyzed by the Mann–Whitney test. The experimental conditions were: normoxia + 10% FBS (N+FBS), normoxia + 10% NHS (N+NHS), hypoxia + 10% FBS (H+FBS) and hypoxia + 10% NHS (H+NHS). * $p < 0.05$ vs. normoxia + 10% FBS condition.

3.4. Immunohistochemistry for C5aR1 and C5L2 in Kidney Tissue Samples

We studied twelve kidney biopsies from patients with DGF and acute tubular damage and eight kidney biopsies from controls. The global sample's median age was 61.0 ± 10.5 years; they were predominantly males (75% vs. 16.7%). Basal characteristics were similar between DGF and the control group (Table 1). We found a higher serum creatinine value at 12 months after transplantation in the group with DGF compared with controls (2.16 mg/dL vs. 1.14 mg/dL; $p = 0.004$). None of these patients had a prior history of eventual glomerulopathies related to complement alterations.

Table 1. Baseline characteristics of DGF and controls patients.

	Controls (n = 8)	DGF (n = 12)	p-Value
Age at transplantation (y, mean \pm SD)	55.1 \pm 9.97	60.9 \pm 10.23	0.219
Donor age	56.0 \pm 9.81	64.3 \pm 11.55	0.185
Recipient sex male (n, %)	4 (50)	11 (92)	0.088
History of DM (n, %)	2 (25)	6 (50)	0.160
History of hypertension (n, %)	7 (87.5)	12 (100)	0.191
Pretransplant hemodialysis (n, %)	4 (50)	10 (83)	0.116
Donor Type (n, %)			0.260
DBD	6 (75)	6 (50)	
DCD	2 (25)	6 (50)	
12-month creatinine mg/dL (mean \pm SD)	1.14 \pm 0.27	2.16 \pm 1.11	0.004
Cold ischemic time (hours, mean \pm SD)	10.6 \pm 6.86	15.3 \pm 6.81	0.076

DGF, delayed graft function; SD, standard deviation; DM, diabetes mellitus; DBD, donor after brain death; DCD, donor after cardiac death.

We detected C5aR1 deposits in either the apical or the basal regions of the tubular epithelial cell membrane. No lateral membranous nor cytoplasmic staining was detected in tubular cells. We did not observe positive staining of other renal structures such as glomeruli or vessels.

Renal biopsies from patients experiencing DGF showed more frequently diffuse-positive staining (44% vs. 13%; $p = 0.048$) of both proximal and distal tubules, whereas C5aR1 staining in sample controls was minimally or focally positive and was located predominantly in distal tubules (Figure 4).

We observed C5L2 staining in the endothelium of peritubular capillaries. Diffusely positive staining was only observed in samples from patients experiencing DGF (67% vs. 0%; <0.001 ; Figure 4).

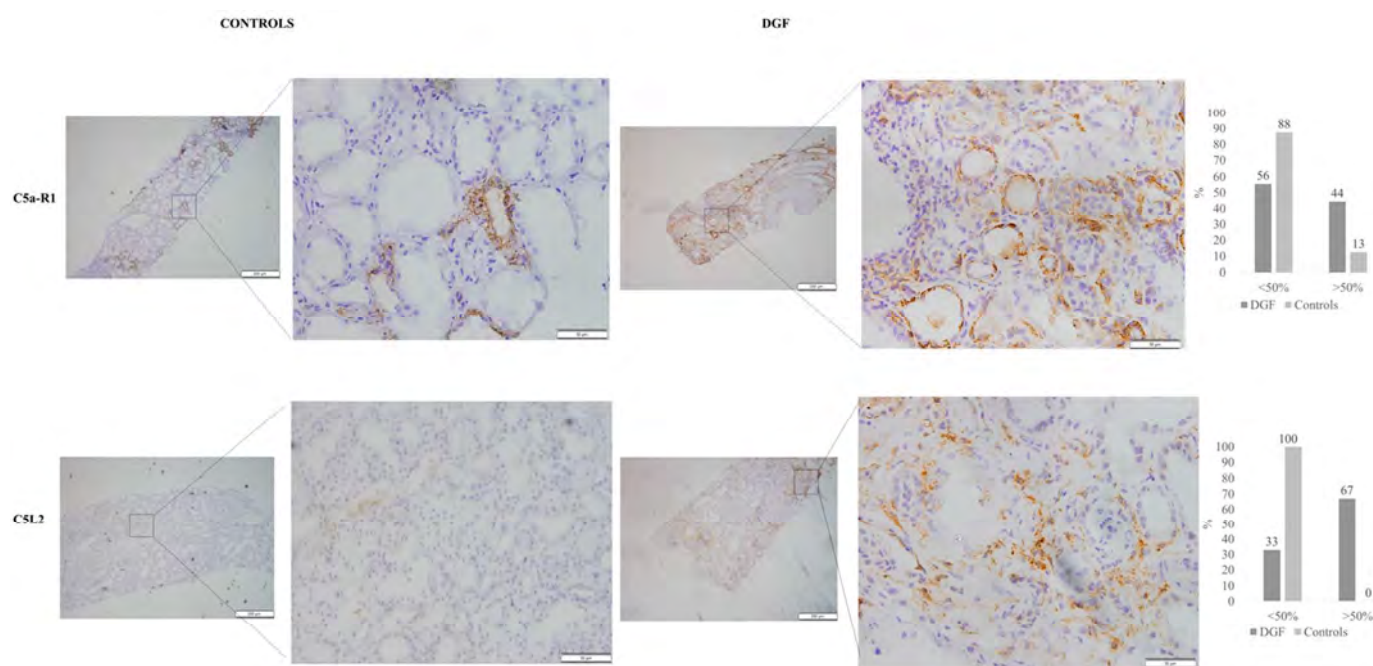


Figure 4. C5aR1 and C5L2 stain in biopsies from kidney transplantation (KT) patients with DGF and one-year protocol biopsies without tissue damage as a control group. C5aR1 and C5L2 were evaluated in the tubular compartment using immunohistochemistry and semi-quantitative scoring. C5aR1 stain was observed in the apical and basal side of the membrane from tubular epithelial cells, while C5L2 deposit was observed in the endothelium from peritubular capillaries. DGF biopsies showed more frequently diffuse staining (>50% of tubules or PTC) for both C5aR1 and C5aL2 than controls.

4. Discussion

In the present study, renal proximal tubular epithelial cells (PTEC) in culture show that hypoxia/reoxygenation activates the complement system, as reflected by protein expression of the final complement pathway's effector MAC and the relevant complement regulator FH. Moreover, we find an increased gene and protein expression of *C5aR1* in hypoxic cells and diffuse and intense deposits of C5aR1 in tubular epithelial cells from KT biopsies of patients with DGF. Our results show that C5L2 expression appeared not to be related to hypoxia and only observed in the endothelium of peritubular capillaries but not in tubular epithelial cells. To our knowledge, this is the first study evaluating jointly the gene expression of *C5aR1* and *C5L2* in PTEC undergoing hypoxia/reperfusion and their protein expression in KT biopsies with acute tubular damage.

IRI is one of the most important causes of DGF after kidney transplantation (KT) [29], a form of acute tubular injury that negatively impacts graft outcomes [29–32]. Renal proximal tubular epithelial cells located at the corticomedullary zone are relatively susceptible to IRI and identified as one of the main targets of complement activation [25]. The main pathway responsible for complement activation during IRI in humans remains unclear [8]. For this reason, we focused the study on final complement fractions, MAC, and C5a to delineate the process of their activation in the context of renal ischemia/reperfusion injury.

We detected increased MAC and FH protein deposits by immunofluorescence in PTEC after hypoxic stress, independently of human serum addition. These results suggest a local production of MAC and FH from HK-2 cells during hypoxia/reoxygenation in our model. This finding is in concordance with previous studies using this cell line, reporting the production of different complement components, including MAC and FH. We are the first to report the expression of C5a receptors in an experimental model using HK-2 cells. Although previous works described the role of MAC and FH in IRI, they mostly were on animal models [15,17,33,34]. Our group formerly reported a relationship between increased plasmatic MAC levels and histological MAC and FH deposits and the severity of acute kidney injury in either native and transplanted kidney [13]. However, the

relationship with C5a receptors at that time was not studied. In the present study, we detect the increased expression of the C5aR1 in tubular cells under hypoxia/reoxygenation conditions. These experimental data are confirmed when we detect C5aR1 deposits in tubular epithelial cells from kidney biopsies. C5aR1 deposits are observed both in controls and in biopsies of patients who underwent DGF; however, these deposits are expressed more diffusely, affecting both proximal and distal renal tubules in those samples with evidence of acute renal damage, which could reflect a greater activation of the complement in these patients. Contrary to *C5aR1*, the gene expression of *C5L2* in tubular epithelial cells appears to be only regulated by the presence of human serum. We could not find any influence of hypoxic stimuli, neither with the expression of pro-inflammatory nor with the expression of profibrotic genes in our in vitro model. Other investigators evaluated renal C5aR1 under diverse inflammatory conditions, and they reported its expression in both proximal and distal tubule [35,36]. In immune cells, C5L2 is expressed alongside C5aR1, and it is thought to serve as a decoy receptor for C5a, thereby counterbalancing C5aR1-initiated responses [37,38]. Both C5aR1 and C5L2 expression have been found in non-immune tissues as well, such as tubular cells [39]. Thus, several studies based on murine models reported protection against IRI, with less inflammatory infiltration and fibrosis when the expression of C5aR1 or C5L2 [21,22] was knockdown. As we mentioned above, the role of C5a receptors in IRI is described in several animal models. However, there is evidence indicating relevant differences between the complement system's functioning between mice and humans. On one hand, murine models reflect that activation of the complement system during IRI occurs almost exclusively through the alternative pathway with the lectin pathway's possible participation. These results are not clearly in studies carried out in humans, in which even the participation of the classical pathway is described [25]. Furthermore, human studies with complement inhibitors, based on murine models, have not shown good results in terms of protection against IRI damage [8]. For these reasons, extrapolating the results from murine models to humans should be done with great caution. These discrepancies and the growing number of complement inhibitor drugs currently developing [40] make it essential to know the complement components involved in ischemia-reperfusion damage in humans.

Prior to our work, only one previous study evaluated the role of C5a receptors in kidney transplant biopsies. Van Werkhoven et al. [23] assessed the expression of renal C5aR1 and C5L2 in biopsies from living donors and patients suffering from acute tubular necrosis (ATN), acute cellular and vascular rejection and interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA). The authors reported C5aR1 and C5L2 expression predominantly in the distal tubule at the epithelial cell basal membrane but in different regions. C5aR1 was mainly expressed in the thick ascending limb of Henle's loop, and C5L2 expression was predominantly in the distal convoluted tubule. Double staining of C5aR and C5L2 revealed the expression of these two receptors to be almost mutually exclusive. In this work, the intensity of renal C5aR1 expression was comparable between normal biopsies obtained from living donors and post-transplant biopsies (ATN, acute rejection, and IF/TA). However, in Van Werkhoven's study, the extension of the staining was not evaluated. We do not detect apparent methodological differences that may explain the different histological patterns reported in their study compared with our results. These differences could be related to different clinical profiles between the two cohorts. Unfortunately, the lack of sufficient clinical information does not allow us to make this comparison.

Nevertheless, ischemia does not exclusively lead to alterations of epithelial cells, also causing interstitial inflammation and interstitial microvasculopathy [41]. Even though renal hypoperfusion mainly induces functional and structural alterations of the tubular epithelium, some studies pointed towards the role of postischemic endothelial cell dysfunction (ED) in peritubular capillaries as a crucial perpetuating factor of prolonged kidney malfunction [42,43]. This microvasculopathy is characterized by cell swelling, increased paracellular and transcellular endothelial permeability, and increased endothelial expression of different cell adhesion molecules. Among those molecules are P-selectin,

E-selectin, and ICAM-1, which mediate leukocyte-endothelial interactions, a prerequisite for transvascular leukocyte migration. In this line, an experimental study performed by Thorenz et al. [22] reported immune cells expressing both receptors C5aR1 and C5L2 in the perivascular space of large vessels, and receptor-positive immune cells surrounded the vessels and tubules after IRI. Furthermore, the peritubular capillary network's integrity was significantly better in *C5aR2* knockout mice after IRI, indicating a role of C5a receptors in the vasculopathy induced after ischemic injury

For these reasons, we believe that C5L2 deposits in peritubular capillaries could be a marker of interstitial microvasculopathy due to DGF. To our knowledge, this is the first study that describes the presence of C5L2 deposits in peritubular capillaries of kidney biopsies from patients experiencing DGF.

Our work has some limitations. First, the lack of specific functional studies does not allow us to establish a direct cause–effect mechanism between complement activation and stimulation of inflammatory or profibrotic pathways. However, we firmly believe that the design of our hypoxia-reoxygenation model covering different experimental situations shows an evident relationship. On the other hand, the limited number of kidney biopsies makes it challenging to explore the relationship between different histological patterns and other predictive variables like cold ischemic time, graft function, or transplant survival.

In conclusion, our hypoxia/reoxygenation injury model proves to be reliable to evaluate the role of the complement system during this process. We report relevant data regarding the role of C5aR1 and C5L2 during IRI in humans, information underrepresented in the literature available to date, which is based mainly on murine models. We found a clear relationship between IRI and a higher expression of both MAC and C5aR1. The higher expression of MAC and C5aR1 was related to complement regulators' activation, pro-inflammatory and profibrotic markers. These findings are in concordance with the presence of extensive deposits of C5aR1 in the tubular cell membrane of biopsies with acute tubular injury, which is nothing else than the clinical manifestation of IRI. We do not detect a direct implication of C5L2 in tubular damage during IRI; however, it could reflect endothelial activation in patients with DGF. Despite this exciting finding, additional studies, including hypoxic endothelial models, are necessary to confirm this hypothesis.

Author Contributions: Conceptualization: C.A.-C., M.R., E.R.-G. and J.P.; methodology C.A.-C., M.R., E.R.-G., D.B. and J.G.; software: C.A.-C., M.R.; validation: C.A.-C., M.R., E.R.-G. and J.P. formal analysis, C.A.-C., M.R.; investigation, C.A.-C., M.R.; data curation, C.A.-C.; writing—original draft preparation, C.A.-C., M.R., E.R.-G. and J.P.; writing—review and editing; M.J.P.-S., D.R.-P., A.B., C.B., M.C.; visualization, C.A.-C., M.R.; supervision, J.P., M.C.; project administration C.A.-C.; funding acquisition, J.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: CAC has support from a Río Hortega contract CM17/00067, ISCIII. This study had funds from FIS-FEDER PI16/0617 and Redinren RD16/0009/0013.

Institutional Review Board Statement: The study adhered to the Principles of Helsinki Declaration and was approved by the Ethical Committee at the study center, Parc de Salut Mar, Barcelona (CEIC 2010/3777/1).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: This work was made by Carlos Arias as part of his thesis project in the Department of Medicine, Universitat Autònoma of Barcelona.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Thadhani, R.; Pascual, M.; Bonventre, J.V. Acute Renal Failure. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1448–1460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Yago, T.; Petrich, B.G.; Zhang, N.; Liu, Z.; Shao, B.; Ginsberg, M.H.; McEver, R.P. Blocking Neutrophil Integrin Activation Prevents Ischemia–Reperfusion Injury. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 1267–1281. [[CrossRef](#)]
3. Brooks, C.; Wei, Q.; Cho, S.-G.; Dong, Z. Regulation of Mitochondrial Dynamics in Acute Kidney Injury in Cell Culture and Rodent Models. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 1275–1285. [[CrossRef](#)]

4. Damman, J.; Daha, M.R.; van Son, W.J.; Leuvenink, H.G.; Ploeg, R.J.; Seelen, M.A. Crosstalk between Complement and Toll-like Receptor Activation in Relation to Donor Brain Death and Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Complement and TLRs in Kidney Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2011**, *11*, 660–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Le Dorze, M.; Legrand, M.; Payen, D.; Ince, C. The Role of the Microcirculation in Acute Kidney Injury. *Curr. Opin. Crit. Care* **2009**, *15*, 503–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Farrar, C.A.; Asgari, E.; Schwaeble, W.J.; Sacks, S.H. Which Pathways Trigger the Role of Complement in Ischaemia/Reperfusion Injury? *Front. Immun.* **2012**, *3*, 341. [[CrossRef](#)]
7. Yamada, K.; Miwa, T.; Liu, J.; Nangaku, M.; Song, W.-C. Critical Protection from Renal Ischemia Reperfusion Injury by CD55 and CD59. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 3869–3875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Diepenhorst, G.M.P.; van Gulik, T.M.; Hack, C.E. Complement-Mediated Ischemia-Reperfusion Injury: Lessons Learned From Animal and Clinical Studies. *Ann. Surg.* **2009**, *249*, 889–899. [[CrossRef](#)]
9. Zipfel, P.F.; Skerka, C. Complement Regulators and Inhibitory Proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 729–740. [[CrossRef](#)]
10. Damman, J.; Schuur, T.A.; Ploeg, R.J.; Seelen, M.A. Complement and Renal Transplantation: From Donor to Recipient. *Transplantation* **2008**, *85*, 923–927. [[CrossRef](#)]
11. Blogowski, W.; Dolegowska, B.; Salata, D.; Budkowska, M.; Domanski, L.; Starzynska, T. Clinical Analysis of Perioperative Complement Activity during Ischemia/Reperfusion Injury Following Renal Transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2012**, *7*, 1843–1851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. de Vries, D.K.; van der Pol, P.; van Anken, G.E.; van Gijlswijk, D.J.; Damman, J.; Lindeman, J.H.; Reinders, M.E.J.; Schaapherder, A.F.; van Kooten, C. Acute but Transient Release of Terminal Complement Complex After Reperfusion in Clinical Kidney Transplantation. *Transplant. J.* **2013**, *95*, 816–820. [[CrossRef](#)]
13. Rodriguez, E.; Gimeno, J.; Arias-Cabrales, C.; Barrios, C.; Redondo-Pachón, D.; Soler, M.J.; Crespo, M.; Sierra-Ochoa, A.; Riera, M.; Pascual, J. Membrane Attack Complex and Factor H in Humans with Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press. Res.* **2018**, *43*, 1655–1665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Goetz, L.; Laskowski, J.; Renner, B.; Pickering, M.C.; Kulik, L.; Klawitter, J.; Stites, E.; Christians, U.; van der Vlag, J.; Ravichandran, K.; et al. Complement Factor H Protects Mice from Ischemic Acute Kidney Injury but Is Not Critical for Controlling Complement Activation by Glomerular IgM. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 791–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Renner, B.; Ferreira, V.P.; Cortes, C.; Goldberg, R.; Ljubanovic, D.; Pangburn, M.K.; Pickering, M.C.; Tomlinson, S.; Holland-Neidermyer, A.; Strassheim, D.; et al. Binding of Factor H to Tubular Epithelial Cells Limits Interstitial Complement Activation in Ischemic Injury. *Kidney Int.* **2011**, *80*, 165–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Guo, R.-F.; Ward, P.A. Role of C5a in Inflammatory Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, *23*, 821–852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. de Vries, B.; Matthijsen, R.A.; Wolfs, T.G.A.M.; van Bijnen, A.A.J.H.M.; Heeringa, P.; Buurman, W.A. Inhibition of Complement Factor C5 Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Inhibition of Late Apoptosis and Inflammation. *Transplantation* **2003**, *75*, 375–382. [[CrossRef](#)]
18. de Vries, B.; Kohl, J.; Leclercq, W.K.G.; Wolfs, T.G.A.M.; van Bijnen, A.A.J.H.M.; Heeringa, P.; Buurman, W.A. Complement Factor C5a Mediates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Independent from Neutrophils. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3883–3889. [[CrossRef](#)]
19. Zheng, X.; Zhang, X.; Feng, B.; Sun, H.; Suzuki, M.; Ichim, T.; Kubo, N.; Wong, A.; Min, L.R.; Budohn, M.E.; et al. Gene Silencing of Complement C5a Receptor Using siRNA for Preventing Ischemia/Reperfusion Injury. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173*, 973–980. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, T.; Garstka, M.A.; Li, K. The Controversial C5a Receptor C5aR2: Its Role in Health and Disease. *J. Immunol. Res.* **2017**, *2017*, 1–16. [[CrossRef](#)]
21. Poppelaars, F.; van Werkhoven, M.B.; Kotimaa, J.; Veldhuis, Z.J.; Ausema, A.; Broeren, S.G.M.; Damman, J.; Hempel, J.C.; Leuvenink, H.G.D.; Daha, M.R.; et al. Critical Role for Complement Receptor C5aR2 in the Pathogenesis of Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *FASEB J.* **2017**, *31*, 3193–3204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Thorenz, A.; Derlin, K.; Schröder, C.; Dressler, L.; Vijayan, V.; Pradhan, P.; Immenschuh, S.; Jörns, A.; Echtermeyer, F.; Herzog, C.; et al. Enhanced Activation of Interleukin-10, Heme Oxygenase-1, and AKT in C5aR2-Deficient Mice Is Associated with Protection from Ischemia Reperfusion Injury-Induced Inflammation and Fibrosis. *Kidney Int.* **2018**, *94*, 741–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. van Werkhoven, M.B.; Damman, J.; Daha, M.R.; Krikke, C.; van Goor, H.; van Son, W.J.; Hillebrands, J.-L.; van Dijk, M.C.R.F.; Seelen, M.A.J. Novel Insights in Localization and Expression Levels of C5aR and C5L2 under Native and Post-Transplant Conditions in the Kidney. *Mol. Immunol.* **2013**, *53*, 237–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Jayne, D.R.W.; Bruchfeld, A.N.; Harper, L.; Schaefer, M.; Venning, M.C.; Hamilton, P.; Burst, V.; Grundmann, F.; Jadoul, M.; Szombati, I.; et al. Randomized Trial of C5a Receptor Inhibitor Avacopan in ANCA-Associated Vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 2756–2767. [[CrossRef](#)]
25. van der Pol, P.; Roos, A.; Berger, S.P.; Daha, M.R.; van Kooten, C. Natural IgM Antibodies Are Involved in the Activation of Complement by Hypoxic Human Tubular Cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2011**, *300*, F932–F940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Márquez, E.; Riera, M.; Pascual, J.; Soler, M.J. Albumin inhibits the insulin-mediated ACE2 increase in cultured podocytes. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2014**, *306*, F1327–F1334. [[CrossRef](#)]
27. Guirado, R.; Carceller, H.; Castillo-Gómez, E.; Castrén, E.; Nacher, J. Automated analysis of images for molecular quantification in immunohistochemistry. *Heliyon* **2018**, *4*, e00669. [[CrossRef](#)]

28. Solez, K.; Colvin, R.B.; Racusen, L.C.; Haas, M.; Sis, B.; Mengel, M.; Halloran, P.F.; Baldwin, W.; Banfi, G.; Collins, A.B.; et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. *Am. J. Transplant.* **2008**, *8*, 753–760. [[CrossRef](#)]
29. Zhao, H.; Alam, A.; Soo, A.P.; George, A.J.T.; Ma, D. Ischemia-Reperfusion Injury Reduces Long Term Renal Graft Survival: Mechanism and Beyond. *EBioMedicine* **2018**, *28*, 31–42. [[CrossRef](#)]
30. Yarlagadda, S.G.; Coca, S.G.; Formica, R.N.; Poggio, E.D.; Parikh, C.R. Association between Delayed Graft Function and Allograft and Patient Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2008**, *24*, 1039–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Pascual, J.; Pérez-Sáez, M.J.; Mir, M.; Crespo, M. Chronic Renal Allograft Injury: Early Detection, Accurate Diagnosis and Management. *Transplant. Rev.* **2012**, *26*, 280–290. [[CrossRef](#)]
32. Arias-Cabrales, C.E.; Pérez-Sáez, M.J.; Redondo-Pachón, D.; Buxeda, A.; Burballa, C.; Duran, X.; Mir, M.; Crespo, M.; Pascual, J. Relevance of KDPI Value and Acute Rejection on Kidney Transplant Outcomes in Recipients with Delayed Graft Function—A Retrospective Study. *Transpl. Int.* **2020**, *33*, 1071–1077. [[CrossRef](#)]
33. Peake, P.W.; O’Grady, S.; Pussell, B.A.; Charlesworth, J.A. C3a Is Made by Proximal Tubular HK-2 Cells and Activates Them via the C3a Receptor. *Kidney Int.* **1999**, *56*, 1729–1736. [[CrossRef](#)]
34. Zhou, W.; Farrar, C.A.; Abe, K.; Pratt, J.R.; Marsh, J.E.; Wang, Y.; Stahl, G.L.; Sacks, S.H. Predominant Role for C5b-9 in Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *J. Clin. Investig.* **2000**, *105*, 1363–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Abe, K.; Miyazaki, M.; Koji, T.; Furusu, A.; Nakamura-Kurashige, T.; Nishino, T.; Ozono, Y.; Harada, T.; Sakai, H.; Kohno, S. Enhanced Expression of Complement C5a Receptor mRNA in Human Diseased Kidney Assessed by in Situ Hybridization. *Kidney Int.* **2001**, *60*, 137–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gueler, F.; Rong, S.; Gwinner, W.; Mengel, M.; Bröcker, V.; Schön, S.; Greten, T.F.; Hawlisch, H.; Polakowski, T.; Schnatbaum, K.; et al. Complement 5a Receptor Inhibition Improves Renal Allograft Survival. *JASN* **2008**, *19*, 2302–2312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bamberg, C.E.; Mackay, C.R.; Lee, H.; Zahra, D.; Jackson, J.; Lim, Y.S.; Whitfield, P.L.; Craig, S.; Corsini, E.; Lu, B.; et al. The C5a Receptor (C5aR) C5L2 Is a Modulator of C5aR-Mediated Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7633–7644. [[CrossRef](#)]
38. Lee, H.; Whitfield, P.L.; Mackay, C.R. Receptors for Complement C5a. The Importance of C5aR and the Enigmatic Role of C5L2. *Immunol. Cell Biol.* **2008**, *86*, 153–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ohno, M.; Hirata, T.; Enomoto, M.; Araki, T.; Ishimaru, H.; Takahashi, T.A. A Putative Chemoattractant Receptor, C5L2, Is Expressed in Granulocyte and Immature Dendritic Cells, but Not in Mature Dendritic Cells. *Mol. Immunol.* **2000**, *37*, 407–412. [[CrossRef](#)]
40. Mastellos, D.C.; Ricklin, D.; Lambris, J.D. Clinical promise of next-generation complement therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 707–729. [[CrossRef](#)]
41. Patschan, D.; Patschan, S.; Müller, G.A. Inflammation and Microvasculopathy in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *J. Transplant* **2012**, *2012*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Brodsky, S.V.; Yamamoto, T.; Tada, T.; Kim, B.; Chen, J.; Kajiya, F.; Goligorsky, M.S. Endothelial Dysfunction in Ischemic Acute Renal Failure: Rescue by Transplanted Endothelial Cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2002**, *282*, F1140–F1149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yamamoto, T.; Tada, T.; Brodsky, S.V.; Tanaka, H.; Noiri, E.; Kajiya, F.; Goligorsky, M.S. Intravital Videomicroscopy of Peritubular Capillaries in Renal Ischemia. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2002**, *282*, F1150–F1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

RESULTADOS GLOBALES

5. RESULTADOS GLOBALES

Para evaluar el impacto de la FRI en la supervivencia del injerto renal, analizamos 601 trasplantes renales en 570 pacientes, de los cuales 226 (37%) presentaron FRI. La presencia de FRI se asoció de forma independiente con mayor riesgo de pérdida global del injerto (HR 1.75, $p=0.010$) y mayor riesgo de pérdida del injerto censurada por muerte del paciente (HR 1.96, $p=0.023$). Esta tendencia se mantuvo tras incluir o excluir los pacientes que presentaron rechazo agudo. Además, valoramos la interacción entre la FRI y las características del donante, recogidas en el score KDPI (Kidney Donor Profile Index). Aunque no observamos diferencias en el valor de KDPI entre los casos con FRI y no FRI, el análisis de supervivencia utilizando la curva de Kaplan-Meier mostró una peor supervivencia en los pacientes con FRI y KDPI $>85\%$.

Posteriormente evaluamos la acción del sistema del complemento a través de la determinación de los niveles de la fracción soluble del complejo de ataque de membrana (MACs) en un subgrupo de pacientes con FRI. Incluimos 59 pacientes en el análisis de los cuales 21 pacientes (35.6%) presentaron FRI y 38 (64.4%) función renal inmediata. No se observaron diferencias significativas en los niveles basales entre los pacientes con y sin FRI (6621 ± 2201 mAU/ml vs 5901 ± 3049 mAU/ml, $p=0.30$). Los pacientes con FRI presentaron un aumento significativo de los niveles de MACs el día 7 post trasplante respecto a los valores basales (6621 ± 2202 mAU/L vs 9625 ± 4142 mAU/L; $p=0.006$), mientras que los valores de MACs permanecieron estables en los pacientes sin FRI (5902 ± 3049 mAU/L vs 6178 ± 2882 mAU/L; $p=0.686$). El porcentaje de aumento entre el nivel basal y el nivel al día 7, mostró una buena capacidad para discriminar entre pacientes con y sin FRI, con un área bajo la curva de 0.78 ($p<0.001$),

sensibilidad 81% y especificidad 66%, para un punto de corte de 5%. Este valor, además, se asoció con una FRI más prolongada (>10 días) y peor función renal a los 12 y 24 meses después del trasplante.

A continuación, evaluamos si este aumento de MAC en plasma se traducía a nivel histológico, para ello realizamos un estudio de inmunohistoquímica enzimática en tejido renal mediante tinción con MAC, C3b y FH en 12 biopsias de pacientes con FRI y 4 controles. Las biopsias de pacientes con FRI mostraron tinción intensa en un mayor número de túbulos que en los controles, tanto para MAC (67% vs 25%; $p=0.043$) como para FH (73% vs 25%; $p=0.036$). Además, observamos que la tinción afectaba a un mayor porcentaje del perímetro tubular (tinción positiva en >50% del perímetro tubular) de MAC, C3b y FH. No observamos diferencias en intensidad de la tinción para C3b entre las biopsias con FRI y los controles.

En la población con FRI, 3 pacientes (25%) nunca recuperaron función renal, todos ellos presentaron un aumento de MACs >5% y tinción intensa y difusa para MAC, FH y C3b. Además, 3/5 pacientes con FRI que tenían biopsia de control un año tras el trasplante, mostraron mayor grado de fibrosis y atrofia tubular respecto a la biopsia inicial, todos tenían tinción difusa para MAC y C3b.

Finalmente, desarrollamos un modelo *in vitro* de isquemia-reperfusión con células tubulares proximales humanas inmortalizadas (HK-2), las cuales fueron sometidas a 48 horas de hipoxia y 30 minutos de reoxigenación e incubadas con 10% de suero humano normal (NHS, Sigma) o 10% de suero bovino fetal (FBS, Biowest) según la condición experimental. Las condiciones experimentales incluidas en el estudio fueron: Normoxia + 10% FBS (N+FBS), Normoxia + 10% NHS (N+NHS), Hipoxia + 10% FBS (H+FBS) e Hipoxia + 10% NHS (H+NHS).

En este modelo, analizamos la intensidad de inmunofluorescencia de MAC y FH en 5 experimentos diferentes. Se objetivó expresión de MAC y FH, tanto en las células sometidas a hipoxia como en células normóxicas, sin embargo, en estas últimas la expresión fue mínima. Las células sometidas a hipoxia y re oxigenadas con NHS (H+NHS) fueron las que presentaron valores más altos de intensidad de fluorescencia tanto para MAC como FH, seguida de las sometidas a hipoxia+FBS. Posteriormente evaluamos la expresión génica de C5aR1 y C5L1, detectando que la expresión génica de C5aR1 fue mayor en las células sometidas a hipoxia respecto a las células normóxicas ($p=0.001$ vs N+FBS; $p=0.005$ vs N+NHS), independientemente de la adición de NHS o FBS durante el reoxigenación. La activación a nivel génico de C5aR1 en las células sometidas a hipoxia, se confirmó al analizar la expresión proteica de C5aR1 mediante inmunofluorescencia, la cual también fue mayor en las células sometidas a hipoxia, respecto a los controles. Respecto a C5L2, encontramos un aumento de la expresión génica en aquellas células expuestas a NHS, independientemente de si se habían sometido a hipoxia o normoxia previamente. La expresión génica del regulador CD59, así como las de KIM-1 (marcador de daño renal), colágeno tipo A-1 y vimentina (marcadores de fibrosis) fueron mayores en las células sometidas a hipoxia respecto a las que no estuvieron. Esta expresión fue independiente de la adición de NHS durante la reoxigenación.

Finalmente, evaluamos los patrones histológicos de C5aR1 y C5L2 en biopsias. Analizamos 12 biopsias de pacientes trasplantados renales con diagnóstico de función retrasada del injerto y las comparamos con biopsias de 8 controles. Detectamos depósitos de C5aR1 en el lado basal y apical de la membrana de las células epiteliales tubulares, tanto de biopsias con FRI como en controles, siendo esta tinción difusa en las biopsias de pacientes

con FRI (33% vs 12.5%). La tinción se observó tanto en túbulos proximales como distales, mientras que, en los casos de tinción mínima-focal, se observó principalmente en los túbulos distales. La intensidad de la tinción C5aR1 fue similar entre los casos con FRI y los controles. Respecto a la tinción C5L2, los depósitos se localizaron en el endotelio de los capilares peritubulares, sin observarse tinción en células tubulares. De forma similar a la tinción para C5aR1, los depósitos se observaron tanto en biopsias de pacientes con FRI como en controles, pero solo las biopsias de pacientes con FRI presentaron tinción difusa. De los 12 pacientes con biopsia y FRI, 4 de ellos nunca recuperaron la función renal, todos ellos presentaban tinción difusa para C5aR1 y el 70% para C5L2.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los artículos incluidos en esta tesis se enmarcan dentro de un proyecto que tiene como objetivo ampliar el conocimiento del papel del sistema del complemento en el desarrollo de función retrasada del injerto renal, una forma de daño renal agudo, atribuido a la isquemia-reperfusión, y que afecta el pronóstico del trasplante.

El primer artículo analiza el impacto de la función retrasada del injerto en los resultados del trasplante renal, y busca aclarar si este impacto es dependiente del daño isquémico. Además, evalúa el impacto de la FRI según las características del donante recogidas en el KDPI. El segundo artículo se centra en evaluar el grado de activación del complemento en pacientes con FRI, tanto a nivel plasmático como histológico, y su posible implicación pronóstica. Finalmente, el tercer artículo profundiza en los mecanismos celulares de la activación del complemento y el daño por isquemia-reperfusión, haciendo énfasis en el papel de los receptores de C5a, poco estudiados en este contexto.

Los avances alcanzados en los diferentes ámbitos del trasplante renal se han traducido en un aumento de la supervivencia tanto del injerto como del paciente a corto plazo, sin embargo, estos mejores resultados no son tan relevantes a largo plazo (76). Una de las posibles explicaciones es la aparición de complicaciones como la FRI, que continúa afectando a un porcentaje importante de los injertos procedentes de donantes fallecidos (5). La frecuencia con la que se presenta la FRI, probablemente, esté influenciada por los cambios que se han experimentado durante los últimos años en el perfil de los órganos trasplantados en nuestro entorno, los cuales provienen de donantes más añosos y con más comorbilidades. Este perfil

de morbilidad puede hacer más susceptibles a los riñones trasplantados al efecto deletéreo de la FRI.

En nuestro trabajo, analizamos el impacto de presentar FRI, en una cohorte de 600 trasplantados renales, seguidos durante una media de 3 años. Registramos una incidencia de FRI del 37%. Los pacientes con FRI presentaron peores resultados, en términos de mayor riesgo de pérdida del injerto de forma global. Estos peores resultados se verificaron tras censurar la pérdida del injerto por la muerte del receptor, y después de ajustar por variables relacionadas con el propio proceso del trasplante renal, características del receptor y del donante. Y no se vieron modificados tras la inclusión o exclusión de aquellos pacientes que presentaron algún episodio de rechazo agudo, lo que indicaría un efecto independiente de la FRI. Estos datos están sustentados en otros estudios recientes que describen un mayor riesgo de pérdida del injerto en aquellos pacientes que desarrollan FRI (5,77). En nuestro trabajo, registramos un aumento de riesgo de pérdida del injerto algo mayor que el descrito en estudios previos (5), lo que probablemente se debe a la diferencia entre las cohortes anteriormente analizadas y la nuestra, que incluye donantes de mayor edad y con más comorbilidades. Por este motivo, incluimos en nuestro análisis la evaluación de combinación entre presentar FRI y el valor de KDPI, lo que nos permitió valorar el impacto de la FRI según diferentes perfiles de donantes. Nuestros resultados muestran que el impacto negativo de la FRI en la supervivencia fue más marcado en los injertos procedentes de donantes con valores de KDPI elevados (>85%), mientras que aquellos injertos con KDPI más bajos, presentaron prácticamente la misma supervivencia que aquellos pacientes que no presentaron FRI. Solo un estudio previo al nuestro, realizado en población americana, estudió la interacción entre KDPI y FRI. Los autores describieron un aumento en la

frecuencia de FRI y un descenso de la supervivencia a medida que aumentaba el valor del KDPI (78). Nuestro estudio es el primero que evalúa la interacción KDPI/FRI en población europea.

Los resultados de nuestro trabajo mostraron, además, un impacto negativo en la función renal alcanzada al año del trasplante en los pacientes con FRI. Esto se vio reflejado tanto en los valores medios de creatinina plasmática más elevados al año de trasplante en el grupo con FRI comparado con aquellos pacientes sin FRI, como tras realizar un test de regresión lineal multivariable, en el que la FRI fue un factor de riesgo independiente de presentar peor función renal a los 12 meses del trasplante. Estos resultados van en concordancia con los descritos por otros grupos (79,80).

Nuestro estudio tiene varias limitaciones que deben ser consideradas. Por una parte, la naturaleza retrospectiva de los datos llevó a la exclusión de un número relevante de pacientes, al no tener toda la información necesaria para calcular el KDPI. Por otra parte, la gran mayoría de nuestra cohorte era de raza caucásica, lo que dificulta la extrapolación de nuestros resultados a otros grupos raciales. Finalmente, el bajo número de eventos podría afectar el poder estadístico de los modelos multivariantes, esto ha sido corregido con un riguroso ajuste de dichos modelos, que refuerza la validez de nuestros resultados.

Por otra parte, este trabajo tiene fortalezas, como un tamaño muestral adecuado para confirmar la hipótesis del estudio, una cohorte con características clínicas y demográficas representativas de población de pacientes trasplantados renales de nuestro entorno con seguimiento a largo plazo. Estas características difieren considerablemente de la mayoría de cohortes incluidas en estudios previos, en su gran mayoría realizados en

población americana, con políticas de asignación de órganos mucho más restrictivas y por lo tanto con resultados diferentes.

En nuestro segundo artículo, nos planteamos evaluar el grado de activación del sistema del complemento en un grupo de pacientes trasplantados con FRI, comparándolos con un grupo que presentó función renal temprana. Desarrollamos un estudio prospectivo en el que incluimos cerca de 60 pacientes trasplantados renales de donante fallecido, en los que cuantificamos los niveles de la fracción soluble del complejo de ataque de membrana, de forma basal y al séptimo día tras la intervención. Analizamos también el patrón histológico de MAC, C3b y FH en un subgrupo de pacientes con FRI, en los que se había realizado una biopsia renal por ese motivo. Descartamos pacientes con evidencia de cualquier evento inmunológico relacionado con activación del complemento, como el rechazo agudo o antecedentes de enfermedades relacionadas con alteraciones del complemento. Al comparar los valores basales y en el 7º día de MACs, encontramos una dinámica diferente entre los dos grupos. Mientras que en el grupo sin FRI, los niveles de MACs prácticamente no se modificaron antes y después del trasplante, en el grupo con FRI se objetivó un aumento significativo de los mismos. Este aumento fue un factor de riesgo independiente para la aparición de FRI tras ajustar por otras variables. Detectamos, además, una relación entre mayor aumento de MACs y una duración más prolongada de la FRI, así como una peor función renal tras el trasplante, entre aquellos pacientes que presentaron FRI y aumento >5% de los niveles de MACs, respecto a aquellos en los que el aumento fue menor. Estos hallazgos indicarían una relación entre concentraciones más elevadas de MACs y las formas más graves de FRI. Por otra parte, también observamos una tinción más intensa y extensa para MAC, C3b y FH en las biopsias de pacientes con FRI, respecto a los

controles, lo que confirmaría la activación local del complemento durante este proceso. Estudios previos realizados por nuestro grupo, también detectaron niveles más altos de MAC en los pacientes con FRI y describieron una relación entre niveles más altos de MAC al 7º día postrasplante y una peor función renal en el momento del alta hospitalaria (27). Sin embargo, en el estudio antes mencionado, no se analizó la dinámica de los niveles de MAC respecto a los valores basales ni se correlacionó con resultados a más largo plazo. Otros estudios disponibles en la literatura se centran en la medición de MAC los primeros minutos tras la reperfusión del órgano. En uno de ellos se reportó un mayor aumento de MAC entre los pacientes que posteriormente desarrollaron FRI (28). Otro estudio solo detectó un aumento transitorio de MAC tras la reperfusión en trasplante procedente de donante en muerte encefálica o tardía, pero no en aquellos de donante vivo (19). El estudio de los depósitos histológicos de MAC, C3d y FH, nos ha permitido confirmar que la activación local del sistema del complemento está aumentada en los pacientes con FRI. Estos hallazgos van en concordancia con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo en el trabajo (27). En dicho trabajo (27), se reportó un aumento de la expresión de MAC y FH en muestras incluidas en parafina de pacientes con daño renal agudo de diversas etiologías (incluido la FRI). A diferencia del estudio anterior, en este las tinciones se realizaron en tejido fresco congelado, aunque el patrón de localización del MAC fue prácticamente el mismo, encontramos una diferente localización del FH, mientras que en el estudio previo se objetivó tinción a nivel citoplasmático, en nuestro estudio actual se detectó a nivel de la membrana basal tubular, y mostró una distribución similar a las tinciones de MAC y C3d. Esta diferencia podría indicar una mayor especificidad del anticuerpo en las muestras de tejido fresco. Por otra parte, en un pequeño grupo de pacientes

con FRI que presentaban biopsia de control al año del trasplante, observamos que aquellos que tenían más signos de daño crónico como fibrosis intersticial y/o atrofia tubular, habían presentado tinción más intensa y extensa para MAC, FH y C3d, en la biopsia realizada por FRI. En la literatura actual no hemos encontrado otros estudios que valoren conjuntamente la relación entre los niveles plasmáticos de MAC, los depósitos de MAC, C3d y FH en pacientes con FRI.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones a considerar. Por una parte, el pequeño tamaño muestral no permite un análisis pormenorizado de los resultados y limita la validez externa de los mismos. Por otra parte, no se incluyeron trasplantes procedentes de donantes tras muerte cardiaca no controlada, por lo que los resultados no se podrían aplicar en este subgrupo de trasplantes. Sin embargo, nuestro trabajo tiene fortalezas, como la inclusión prospectiva de los pacientes que ha permitido la obtención y mantenimiento de las muestras de forma idónea para realizar los estudios posteriores, además, de tener información clínica y analítica detallada que da fiabilidad a nuestros resultados. Por último, consideramos que este trabajo aporta información relevante en un campo de creciente interés en la comunidad trasplantadora durante los últimos años, como es el papel del complemento en el daño del injerto renal.

En el último estudio incluido en esta tesis, quisimos profundizar en los mecanismos involucrados en la activación del sistema del complemento y el posterior daño ocasionado durante el fenómeno de isquemia-reperfusión, centrándonos en el estudio de los receptores de C5a, poco evaluados en este ámbito. Además, estudiamos la activación de vías inflamatorias y profibróticas durante este proceso. Desarrollamos un modelo de isquemia-reperfusión, utilizando células tubulares humanas proximales

inmortalizadas (HK-2), las cuales fueron sometidas a hipoxia durante 48 horas y posteriormente reoxigenación durante 30 minutos con suero rico en complemento (NHS) o suero bovino con complemento inactivado por calor (FBS). Este modelo nos permitió evaluar, por una parte, la capacidad de estas células de generar localmente fracciones del complemento, y por otra de ver el efecto de la sinergia entre isquemia y niveles más altos de complemento durante el fenómeno de isquemia-reperfusión. Además, realizamos tinción inmunohistoquímica para C5aR1 y C5L2 en biopsias de pacientes trasplantados con diagnóstico de FRI y un grupo control de biopsias realizados al año del trasplante, en pacientes con función renal estable, sin proteinuria ni evidencia de daño histológico.

Evalúamos la expresión de MAC y FH utilizando tinción específica por inmunofluorescencia. Las células sometidas a hipoxia mostraron claramente valores más altos de intensidad media de fluorescencia, con respecto a las células normóxicas, independiente de la adición de suero con complemento, lo que nos permitió confirmar la activación local del complemento en las células HK-2 en nuestro modelo.

De forma similar a la expresión de MAC y FH, observamos mayor expresión génica de CD59, KIM-1, Colageno A1 y Vimentina en las células sometidas a hipoxia, independientemente de la adición de NHS.

Estos hallazgos muestran una relación entre la activación del complemento inducido por la isquemia-reperfusión y una mayor expresión de genes relacionados con daño tubular y vías profibróticas. Estudios previos han descrito cambios inflamatorios y fibróticos relacionados con el aumento de expresión tanto de MAC como de C5a en el daño por I/R. Abe et al (46), describen un aumento de la expresión de colágeno tipo IV tras la estimulación con MAC de células tubulares proximales. Por otra parte,

Peng et al (81), reportaron mayor proliferación de fibroblastos y aumento de la expresión génica de IL-1, IL-6 y TGF- α en las células epiteliales tubulares, tras estimulación con C5a, en un modelo murino de isquemia-reperfusión; en este mismo trabajo, la utilización de un antagonista de C5aR1 redujo el daño renal y la fibrosis túbulo-intersticial. Estos cambios fibróticos, podrían explicar el peor pronóstico a largo plazo de los injertos que sufren función retrasada.

Posteriormente, analizamos la expresión C5aR1 y C5L2 en nuestro modelo y en biopsias de trasplantados renales. Detectamos una mayor expresión génica de C5aR1 en las células sometidas a hipoxia. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en las tinciones de biopsias renales, en las que observamos una tinción más extensa para C5aR1 en las biopsias con daño isquémico (FRI) comparadas con los controles. Diferentes modelos murinos han mostrado una relación clara entre la expresión de C5aR1 y el daño por isquemia-reperfusión (58,60,82). A diferencia de los estudios previos, nuestro trabajo aporta evidencia de expresión de C5aR1 en un modelo con células humanas, información escasa en la literatura actual. Únicamente otro trabajo ha valorado la relación entre los depósitos histológicos de C5aR1, C5L2 y la FRI, sin encontrar diferencias en la intensidad de la tinción de estos pacientes, comparados con los controles (83). Sin embargo, en ese trabajo no se valoró la extensión de la tinción, que sí mostró diferencias en nuestro estudio.

Respecto a la expresión de C5L2, observamos que el aumento en la expresión, solo se relacionó con la adición de NHS, independientemente de la exposición a hipoxia o normoxia. El papel del C5L2 en diversos procesos fisiopatológicos, incluido el daño por isquemia-reperfusión no está claramente definido. Estudios previos basados en modelos con ratones

knock-out para C5L2, han mostrado protección contra el daño por I/R y menor aparición de fibrosis respecto a ratones wild-type. Salvo el estudio ya mencionado previamente, en el que se evaluó la tinción de C5L2 en biopsias de trasplantados renales, no hemos encontrado más datos en la literatura que evalúen C5L2 en muestras humanas. A diferencia del estudio anterior, nosotros no detectamos tinción a nivel tubular, pero sí a nivel del endotelio de capilar peritubular, tanto en biopsias de pacientes con FRI como en los controles. Sin embargo, solo las biopsias de pacientes con FRI mostraron tinción difusa (>50% de los capilares peritubulares). Nuestro trabajo es el primero que describe la presencia de tinción positiva en capilar peritubular de pacientes con FRI.

El daño isquémico renal se ha relacionado con disfunción endotelial y aumento de citoquinas inflamatorias en los capilares peritubulares, proceso denominado micro vasculopatía intersticial, el cual, podría retrasar la recuperación de la función renal tras el daño por isquemia-reperfusión (84,85). Por otra parte, la expresión de C5L2 se ha relacionado con procesos inflamatorios a nivel endotelial (86). En esta línea, Thorenz et al (73), describen la presencia de células inmunológicas que expresaban C5aR1 y C5L2 alrededor de los capilares y túbulos renales tras IRI. Además, encontraron que la integridad de la red capilar peritubular se mantuvo mejor en aquellos los ratones que no expresaban C5aL2.

Por estos motivos, planteamos la posibilidad de que la expresión de C5L2 en los capilares peritubulares podría reflejar la activación y el daño endotelial inducido por IRI en los pacientes con FRI. Sin embargo, consideramos que son necesarios estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

Nuestro trabajo tiene algunas limitaciones. En primer lugar, la falta de estudios funcionales específicos no nos permite establecer un mecanismo directo de causa-efecto entre la activación del complemento y la estimulación de vías inflamatorias o profibróticas. Sin embargo, creemos que el diseño de nuestro modelo de hipoxia-reoxigenación con diferentes situaciones experimentales, permite mostrar que existe una relación evidente. Por otra parte, la muestra reducida de biopsias renales dificulta la exploración de la relación entre diferentes patrones histológicos y la evolución posterior de los injertos. Aun así, nuestro trabajo es el primero que evalúa conjuntamente la expresión de los receptores de C5a en un modelo in vitro con células tubulares humanas y en biopsias renales de pacientes trasplantados. Además, hemos diseñado un modelo de hipoxia-reoxigenación válido para profundizar en los mecanismos del daño por el sistema del complemento durante el proceso de isquemia-reperfusión, lo que nos ayudará a ampliar los conocimientos en este campo.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

El avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el daño del injerto renal es fundamental para desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a mitigar dicho daño y así mejorar el pronóstico a largo plazo del trasplante renal.

1.- El daño por isquemia-reperfusión desempeña un papel primordial en la aparición de la función retrasada del injerto. Este daño parece afectar de forma más marcada a los injertos procedentes de donantes mayores y con más comorbilidad, de manera que el desarrollo de estrategias que ayuden a disminuir la aparición de esta complicación en este grupo de pacientes es fundamental.

2.- El sistema de complemento está implicado en el daño por I/R. La gravedad de la FRI parece estar relacionada con mayor activación del complemento.

3.- La cuantificación de la fracción soluble del complejo de ataque de membrana podría ser un marcador fiable para medir la activación del complemento en este contexto, lo que permitiría detectar pacientes con formas más graves de FRI y que podrían beneficiarse de pautas con fármacos inhibidores del complemento.

4.- La activación del complemento secundaria a la I/R se relaciona con la estimulación de vías inflamatorias y profibróticas, lo que podría explicar el desarrollo de daño crónico y el peor pronóstico en los pacientes con FRI.

5.- La interacción de C5a con su receptor C5aR1 en las células tubulares renales tiene un papel relevante en el daño por I/R. Aunque C5L2 no se

expresa en estas células, su expresión en el endotelio de los capilares tubulares podría estar relacionada con lesión endotelial por I/R a este nivel.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

8. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Nuestras líneas de investigación futuras están encaminadas a profundizar en el estudio de los mecanismos de lesión inducidos por la activación del complemento a nivel renal.

Para ello, y con objetivo de explorar la utilidad como herramienta diagnóstica y pronóstica de la cuantificación de los niveles plasmáticos de MAC, valoraremos de forma retrospectiva, la dinámica de estos en cohortes de pacientes trasplantados renales con diagnóstico de rechazo celular agudo, rechazo humoral agudo y rechazo humoral crónico.

Además, profundizaremos en el estudio de la utilidad pronóstica de las tinciones de C5aR1 y C5L2 en los pacientes con daño renal, tanto de origen isquémico como por otras patologías. Para ello ampliaremos la cohorte de biopsias de pacientes con función retrasada del injerto, evaluaremos la expresión de estos receptores en biopsias de riñones nativos con diagnóstico de necrosis tubular aguda o patología glomerular.

Por último, intentaremos diseñar estudios funcionales en nuestro modelo de hipoxia/re-oxigenación utilizando inhibidores de diferentes fracciones del complemento, con el objetivo de intentar identificar nuevas dianas terapéuticas que ayuden a mitigar el daño por I/R en la célula tubular proximal renal.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Irish WD, Ilesley JN, Schnitzler MA, Feng S, Brennan DC. A risk prediction model for delayed graft function in the current era of deceased donor renal transplantation. *Am J Transplant*. 2010 Oct;10(10):2279–86.
2. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ, et al. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008 Apr 3;23(9):2995–3003.
3. Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Mar;22(3):416–25.
4. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney International*. 2004 Aug;66(2):486–91.
5. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008 Oct 8;24(3):1039–47.
6. Wu WK, Famure O, Li Y, Kim SJ. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation. *Kidney International*. 2015 Oct;88(4):851–8.
7. Moreso F. Donor age and delayed graft function as predictors of renal allograft survival in rejection-free patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1999 Apr 1;14(4):930–5.
8. Feldman HI, Gayner R, Berlin JA, Roth DA, Silibovsky R, Kushner S, et al. Delayed function reduces renal allograft survival independent of acute rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 1996 Jul;11(7):1306–13.
9. Shoskes DA, Cecka JM. DELETERIOUS EFFECTS OF DELAYED GRAFT FUNCTION IN CADAVERIC RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS INDEPENDENT OF ACUTE REJECTION^{1,2,3}: *Transplantation*. 1998 Dec;66(12):1697–701.

10. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RWG, Najarian JS, et al. DELAYED GRAFT FUNCTION, ACUTE REJECTION, AND OUTCOME AFTER CADAVER RENAL TRANSPLANTATION: A Multivariate Analysis. *Transplantation*. 1995 Apr;59(7):962–8.
11. Mikhalski D, Wissing KM, Ghisdal L, Broeders N, Touly M, Hoang A-D, et al. Cold Ischemia is a Major Determinant of Acute Rejection and Renal Graft Survival in the Modern Era of Immunosuppression: *Transplantation*. 2008 Apr;85(Supplement):S3–9.
12. Pérez-Sáez MJ, Arcos E, Comas J, Crespo M, Lloveras J, Pascual J, et al. Survival Benefit From Kidney Transplantation Using Kidneys From Deceased Donors Aged ≥ 75 Years: A Time-Dependent Analysis. *Am J Transplant*. 2016 Sep;16(9):2724–33.
13. Arias-Cabrales C, Pérez-Sáez MJ, Redondo-Pachón D, Buxeda A, Burballa C, Bermejo S, et al. Usefulness of the KDPI in Spain: A comparison with donor age and definition of standard/expanded criteria donor. *Nefrología [Internet]*. 2018 Jun [cited 2018 Aug 1]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0211699518300675>
14. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. The complement system and innate immunity. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease [Internet]*. New York: Garland Science; 2001. (5th edition). Available from: Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>
15. Biglarnia A-R, Huber-Lang M, Mohlin C, Ekdahl KN, Nilsson B. The multifaceted role of complement in kidney transplantation. *Nature Reviews Nephrology [Internet]*. 2018 Oct 26 [cited 2018 Nov 3]; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41581-018-0071-x>
16. Sim E, Sim RB. Enzymic assay of C3b receptor on intact cells and solubilized cells. *Biochemical Journal*. 1983 Feb 15;210(2):567–76.

17. Sieve I, Münster-Kühnel AK, Hilfiker-Kleiner D. Regulation and function of endothelial glycocalyx layer in vascular diseases. *Vascular Pharmacology*. 2018 Jan;100:26–33.
18. Kapitsinou PP, Haase VH. Molecular mechanisms of ischemic preconditioning in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Nov 15;309(10):F821-834.
19. de Vries DK, van der Pol P, van Anken GE, van Gijlswijk DJ, Damman J, Lindeman JH, et al. Acute But Transient Release of Terminal Complement Complex After Reperfusion in Clinical Kidney Transplantation: *Transplantation Journal*. 2013 Mar;95(6):816–20.
20. Danobeitia JS, Djamali A, Fernandez LA. The role of complement in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2014;7(1):16.
21. Castellano G, Intini A, Stasi A, Divella C, Gigante M, Pontrelli P, et al. Complement Modulation of Anti-Aging Factor Klotho in Ischemia/Reperfusion Injury and Delayed Graft Function. *American Journal of Transplantation*. 2016 Jan;16(1):325–33.
22. Delpech P-O, Thuillier R, SaintYves T, Danion J, Le Pape S, van Amersfoort ES, et al. Inhibition of complement improves graft outcome in a pig model of kidney autotransplantation. *J Transl Med*. 2016 Sep 23;14(1):277.
23. Thurman JM, Royer PA, Ljubanovic D, Dursun B, Lenderink AM, Edelstein CL, et al. Treatment with an Inhibitory Monoclonal Antibody to Mouse Factor B Protects Mice from Induction of Apoptosis and Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *JASN*. 2006 Mar;17(3):707–15.
24. Asgari E, Farrar CA, Lynch N, Ali YM, Roscher S, Stover C, et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease 2 is critical for the development of renal ischemia reperfusion injury and mediates tissue injury in the absence of complement C4. *FASEB J*. 2014 Sep;28(9):3996–4003.

25. van der Pol P, Roos A, Berger SP, Daha MR, van Kooten C. Natural IgM antibodies are involved in the activation of complement by hypoxic human tubular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2011 Apr;300(4):F932–40.
26. Damman J, Schuurs TA, Ploeg RJ, Seelen MA. Complement and Renal Transplantation: From Donor to Recipient: Transplantation. 2008 Apr;85(7):923–7.
27. Rodríguez E, Gimeno J, Arias-Cabrales C, Barrios C, Redondo-Pachón D, Soler MJ, et al. Membrane Attack Complex and Factor H in Humans with Acute Kidney Injury. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2018;43(5):1655–65.
28. Blogowski W, Dolegowska B, Salata D, Budkowska M, Domanski L, Starzynska T. Clinical Analysis of Perioperative Complement Activity during Ischemia/Reperfusion Injury following Renal Transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2012 Nov 1;7(11):1843–51.
29. Naesens M, Li L, Ying L, Sansanwal P, Sigdel TK, Hsieh S-C, et al. Expression of complement components differs between kidney allografts from living and deceased donors. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Aug;20(8):1839–51.
30. Cole DS, Morgan BP. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clinical Science*. 2003 May 1;104(5):455–66.
31. Zhang J, Li Y, Shan K, Wang L, Qiu W, Lu Y, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF- β 1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBP β acetylation. *The FASEB Journal*. 2014 Mar;28(3):1511–25.
32. Franzin R, Stasi A, Fiorentino M, Stallone G, Cantaluppi V, Gesualdo L, et al. Inflammaging and Complement System: A Link Between Acute Kidney Injury and Chronic Graft Damage. *Front Immunol*. 2020 May 7;11:734.

33. Choi NH, Nakano Y, Tobe T, Mazda T, Tomita M. Incorporation of SP-40,40 into the soluble membrane attack complex (SMAC, SC5b-9) of complement. *Int Immunol*. 1990;2(5):413–7.
34. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol (Lond)*. 2002 Mar 1;539(Pt 2):537–45.
35. Ballanti E, Perricone C, Greco E, Ballanti M, Di Muzio G, Chimenti MS, et al. Complement and autoimmunity. *Immunol Res*. 2013 Jul;56(2–3):477–91.
36. Morgan BP. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. *Immunobiology*. 2016 Jun;221(6):747–51.
37. Oshima S, Yoshizawa N. [Role of the membrane attack complex (MAC) in acute poststreptococcal glomerulonephritis]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1988 Jul;30(7):811–9.
38. Brglez V, Boyer-Suavet S, Seitz-Polski B. Complement Pathways in Membranous Nephropathy: Complex and Multifactorial. *Kidney International Reports*. 2020 May;5(5):572–4.
39. Martínez-Barricarte R, Heurich M, Valdes-Cañedo F, Vazquez-Martul E, Torreira E, Montes T, et al. Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J Clin Invest*. 2010 Oct;120(10):3702–12.
40. Biesecker G, Katz S, Koffler D. Renal localization of the membrane attack complex in systemic lupus erythematosus nephritis. *J Exp Med*. 1981 Dec 1;154(6):1779–94.
41. Grafals M, Thurman JM. The Role of Complement in Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2019 Oct 4;10:2380.

42. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2000 May 15;105(10):1363–71.
43. Kitzler TM, Papillon J, Guillemette J, Wing SS, Cybulsky AV. Complement modulates the function of the ubiquitin–proteasome system and endoplasmic reticulum-associated degradation in glomerular epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012 May;1823(5):1007–16.
44. Torbohm I, Schönermark M, Wingen A-M, Berger B, Rother K, Hänsch GM. C5b-8 and C5b-9 modulate the collagen release of human glomerular epithelial cells. *Kidney International*. 1990 Apr;37(4):1098–104.
45. Benzaquen LR, Nicholson-Weller A, Halperin JA. Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J Exp Med*. 1994 Mar 1;179(3):985–92.
46. Abe K, Li K, Sacks SH, Sheerin NS. The membrane attack complex, C5b-9, up regulates collagen gene expression in renal tubular epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2004 Apr;136(1):60–6.
47. Bürger A, Wagner C, Hug F, Hänsch GM. Up-regulation of intracellular calcium, cyclic adenosine monophosphate and fibronectin synthesis in tubular epithelial cells by complement. *Eur J Immunol*. 1999;29(4):1188–93.
48. Montinaro V, Lopez A, Bulla R, Pausa M, Cerullo G, Schena FP, et al. Sub-lytic terminal complement complex (TCC) stimulates renal proximal tubular epithelial cells (PTEC) to express adhesion molecules and to secrete proinflammatory and fibrogenic mediators. *Molecular Immunology*. 1998 Apr;35(6–7):385.
49. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortés C. Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate. *Molecular Immunology*. 2010 Aug;47(13):2187–97.

50. Síndrome hemolítico urémico atípico. *Nefrología* [Internet]. 2011 May [cited 2020 Jun 14];(2). Available from: <http://doi.org/10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Mar.10907>
51. Pickering MC, de Jorge EG, Martinez-Barricarte R, Recalde S, Garcia-Layana A, Rose KL, et al. Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1249–56.
52. Smith RJH, Alexander J, Barlow PN, Botto M, Cassavant TL, Cook HT, et al. New approaches to the treatment of dense deposit disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Sep;18(9):2447–56.
53. Thurman JM, Scott Lucia M, Ljubanovic D, Michael Holers V. Acute tubular necrosis is characterized by activation of the alternative pathway of complement. *Kidney International*. 2005 Feb;67(2):524–30.
54. Thurman JM, Ljubanović D, Royer PA, Kraus DM, Molina H, Barry NP, et al. Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *J Clin Invest*. 2006 Feb;116(2):357–68.
55. Renner B, Tong HH, Laskowski J, Jonscher K, Goetz L, Woolaver R, et al. Annexin A2 Enhances Complement Activation by Inhibiting Factor H. *The Journal of Immunology*. 2016 Feb 1;196(3):1355–65.
56. Goetz L, Laskowski J, Renner B, Pickering MC, Kulik L, Klawitter J, et al. Complement factor H protects mice from ischemic acute kidney injury but is not critical for controlling complement activation by glomerular IgM. *European Journal of Immunology* [Internet]. 2018 Feb 22 [cited 2018 Mar 10]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201747240>
57. Renner B, Ferreira VP, Cortes C, Goldberg R, Ljubanovic D, Pangburn MK, et al. Binding of factor H to tubular epithelial cells limits interstitial complement activation in ischemic injury. *Kidney International*. 2011 Jul;80(2):165–73.

58. Peng Q, Li K, Smyth LA, Xing G, Wang N, Meader L, et al. C3a and C5a Promote Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *JASN*. 2012 Sep;23(9):1474–85.
59. de Vries B, Kohl J, Leclercq WKG, Wolfs TGAM, van Bijnen AAJHM, Heeringa P, et al. Complement Factor C5a Mediates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Independent from Neutrophils. *The Journal of Immunology*. 2003 Apr 1;170(7):3883–9.
60. Zheng X, Zhang X, Feng B, Sun H, Suzuki M, Ichim T, et al. Gene Silencing of Complement C5a Receptor Using siRNA for Preventing Ischemia/Reperfusion Injury. *The American Journal of Pathology*. 2008 Oct;173(4):973–80.
61. Gerard NP, Gerard C. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature*. 1991 Feb;349(6310):614–7.
62. Ohno M, Hirata T, Enomoto M, Araki T, Ishimaru H, Takahashi TA. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol*. 2000 Jun;37(8):407–12.
63. Monk PN, Scola A-M, Madala P, Fairlie DP. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *British Journal of Pharmacology*. 2007 Oct;152(4):429–48.
64. Okinaga S, Slattery D, Humbles A, Zsengeller Z, Morteau O, Kinrade MB, et al. C5L2, a Nonsignaling C5A Binding Protein [†]. *Biochemistry*. 2003 Aug;42(31):9406–15.
65. Cain SA, Monk PN. The Orphan Receptor C5L2 Has High Affinity Binding Sites for Complement Fragments C5a and C5a des-Arg ⁷⁴. *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):7165–9.
66. Klos A, Wende E, Wareham KJ, Monk PN. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVII. Complement Peptide C5a, C4a, and C3a Receptors. *Pharmacol Rev*. 2013 Jan;65(1):500–43.

67. Li R, Coulthard LG, Wu MCL, Taylor SM, Woodruff TM. C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a. *FASEB j.* 2013 Mar;27(3):855–64.
68. Bamberg CE, Mackay CR, Lee H, Zahra D, Jackson J, Lim YS, et al. The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2010 Mar 5;285(10):7633–44.
69. Scola A-M, Johswich K-O, Morgan BP, Klos A, Monk PN. The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. *Mol Immunol.* 2009 Mar;46(6):1149–62.
70. Arumugam TV, Shiels IA, Strachan AJ, Abbenante G, Fairlie DP, Taylor SM. A small molecule C5a receptor antagonist protects kidneys from ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int.* 2003 Jan;63(1):134–42.
71. Lewis AG, Köhl G, Ma Q, Devarajan P, Köhl J. Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival. *Clin Exp Immunol.* 2008 Jul;153(1):117–26.
72. de Vries B, Matthijsen RA, Wolfs TGAM, van Bijnen AAJHM, Heeringa P, Buurman WA. Inhibition of complement factor C5 protects against renal ischemia-reperfusion injury: inhibition of late apoptosis and inflammation1: *Transplantation.* 2003 Feb;75(3):375–82.
73. Thorenz A, Derlin K, Schröder C, Dressler L, Vijayan V, Pradhan P, et al. Enhanced activation of interleukin-10, heme oxygenase-1, and AKT in C5aR2-deficient mice is associated with protection from ischemia reperfusion injury-induced inflammation and fibrosis. *Kidney Int.* 2018;94(4):741–55.
74. Poppelaars F, van Werkhoven MB, Kotimaa J, Veldhuis ZJ, Ausema A, Broeren SGM, et al. Critical role for complement receptor C5aR2 in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal.* 2017 Jul;31(7):3193–204.
75. Fayyazi A, Scheel O, Werfel T, Schweyer S, Oppermann M, Götze O, et al. The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but

not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells. *Immunology*. 2000 Jan;99(1):38–45.

76. Riella LV, Djamali A, Pascual J. Chronic allograft injury: Mechanisms and potential treatment targets. *Transplantation Reviews*. 2017 Jan;31(1):1–9.

77. Chaumont M, Racapé J, Broeders N, El Mountahi F, Massart A, Baudoux T, et al. Delayed Graft Function in Kidney Transplants: Time Evolution, Role of Acute Rejection, Risk Factors, and Impact on Patient and Graft Outcome. *J Transplant*. 2015;2015:163757.

78. Zens TJ, Danobeitia JS, Levenson G, Chlebeck PJ, Zitur LJ, Redfield RR, et al. The impact of kidney donor profile index on delayed graft function and transplant outcomes: A single-center analysis. *Clin Transplant*. 2018 Mar;32(3):e13190.

79. Boom H, Mallat MJK, De Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney International*. 2000 Aug;58(2):859–66.

80. Wang CJ, Tuffaha A, Phadnis MA, Mahnken JD, Wetmore JB. Association of Slow Graft Function with Long-Term Outcomes in Kidney Transplant Recipients. *Annals of Transplantation*. 2018 Apr 3;23:224–31.

81. Peng Q, Wu W, Wu K-Y, Cao B, Qiang C, Li K, et al. The C5a/C5aR1 axis promotes progression of renal tubulointerstitial fibrosis in a mouse model of renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney International*. 2019 Jul;96(1):117–28.

82. Zhang T, Wu K, Ma N, Wei L, Garstka M, Zhou W, et al. The C5a/C5aR2 axis promotes renal inflammation and tissue damage. *JCI Insight*. 2020 Apr 9;5(7):e134081.

83. van Werkhoven MB, Damman J, Daha MR, Krikke C, van Goor H, van Son WJ, et al. Novel insights in localization and expression levels of C5aR and C5L2 under native and post-transplant conditions in the kidney. *Molecular Immunology*. 2013 Mar;53(3):237–45.

84. Patschan D, Patschan S, Müller GA. Inflammation and Microvasculopathy in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of Transplantation*. 2012;2012:1–7.
85. Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, Kim B, Chen J, Kajiya F, et al. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002 Jun 1;282(6):F1140–9.
86. Vijayan S, Asare Y, Grommes J, Soehnlein O, Lutgens E, Shagdarsuren G, et al. High Expression of C5L2 Correlates with High Proinflammatory Cytokine Expression in Advanced Human Atherosclerotic Plaques. *The American Journal of Pathology*. 2014 Jul;184(7):2123–33.

10. ANEXO 1. FINANCIACIÓN

Estos estudios han sido financiados con los proyectos de investigación:

- ISCIII Contrato Rio Hortega CM17/00067
- ISCIII FIS-FEDER PI16/0617 → Anticuerpos HLA y no HLA en el rechazo del trasplante renal y mecanismos de lesión. IP Dres. Julio Pascual y Marta Crespo.
- Redinren RD16/0009/0013.