

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: CARDIOLOGIA E  
CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**Dissertação**

**Identificação de candidatos a biomarcadores de rejeição em  
transplante cardíaco a partir de transcriptomas: revisão sistemática e  
meta-análise.**

**Sheyla Velasques Paladini**

**Identificação de candidatos a biomarcadores de rejeição em transplante cardíaco  
a partir de transcriptomas: revisão sistemática e meta-análise.**

Autor: Sheyla Velasques Paladini

Orientador: Profa. Dra. Mariana Recamonde-Mendoza

Dissertação de mestrado  
submetida como requisito para obtenção  
do título de Mestre ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde, Área  
de Concentração: Cardiologia e Ciências  
Cardiovasculares, da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.

**Porto Alegre**

**2019**

## **Dedicatória**

A Ramiro & Coelho, com quem amo partilhar a vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Mariana Recamonde-Mendoza, que, até quando tive dúvidas, acreditou em mim e neste projeto.

Agradecimentos especiais a Graziela Hünning Pinto - uma grande amiga - a qual incentivou meu ingresso na pesquisa e participou de várias etapas deste caminho. O Rodrigo Haas Bueno, por sua inteligência e prestatividade. Raquel Calloni que participou e apoiou essa pesquisa. Da mesma forma, a todos os colegas do Cardiolab, que compartilharam seus conhecimentos e experiências. A UFRGS que me proporcionou uma formação de qualidade.

À professora Cristianne Famer Rocha, pela oportunidade, por sua bondade, disponibilidade e dedicação à educação em saúde.

Aos amigos e colegas do PROADI-SUS, pelo companheirismo. A meus amigos pela compreensão em momentos de ausência e apoio incondicional durante este período de mestrado. A minha família - minha mãe, meu pai e meu irmão – que com seus exemplos me ensinam o valor do conhecimento e a importância de contribuir para o bem comum.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS .....	8
APRESENTAÇÃO .....	9
Parte I .....	10
Resumo .....	10
INTRODUÇÃO.....	11
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1.1 TRANSPLANTE CARDÍACO E REJEIÇÃO.....	15
1.2 BIOMARCADORES E TRANSCRIPTOMA.....	16
1.3 MICROARRANJO DE DNA .....	21
1.4 METANÁLISE .....	23
2. JUSTIFICATIVA .....	27
3. HIPÓTESE .....	28
4. OBJETIVO PRINCIPAL .....	28
4.1 Objetivo Específico.....	28
Subprojeto 1:.....	28
Subprojeto 2:.....	29
5. REFERÊNCIAS .....	30
Parte II .....	35

Artigo 1: Identification of candidate biomarkers for transplant rejection from transcriptome data: A systematic review. ....	35
Parte III.....	82
Artigo 2 – Pesquisa em andamento: Metanálise de dados de transcriptoma para identificação de biomarcadores de rejeição ao transplante cardíaco. ....	82
Parte IV.....	100
Conclusões e Perspectivas .....	100

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciências “ômicas”

Figura 2: Esquema de análise por microarranjos de DNA.

Figura 3: Processamento de dados de expressão gênica por microarranjo.

Figura 4: Esquematização dos etapas de pré- processamento para metanálise de dados de microarranjo de DNA.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**SLR:** *systematic literature review* (Revisão sistemática da Literatura)

**miRNA:** microRNA

**mRNA:** RNA mensageiro

**ncRNAs:** RNAs não codificantes

**DE:** Diferencialmente Expressos

**FDR:** A taxa de descoberta falsas (*The false discovery rate*)

**FC:** *fold change*

**LogFC:** *fold change* em base logarítmica (em geral, base 2)

**GEO:** *Gene Expression Omnibus*

**KEGG:** *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

**PR:** *Product of ranks*



## **APRESENTAÇÃO**

A presente dissertação de mestrado será apresentada na seguinte disposição:

Parte I: Resumo, Introdução, Justificativa, Hipótese, Objetivos, Referências

Parte II: Artigo 1

Parte III: Artigo 2 - Resultados preliminares

Parte IV: Conclusões

## Parte I

### Resumo

Os métodos tradicionais de controle de rejeição em pacientes transplantados são considerados invasivos, arriscados e propensos a erros de amostragem; por isso, cabe investigar alternativas que possam contribuir para aumentar a sobrevida e o bem-estar dos pacientes, a exemplo de avanços recentes em tecnologias ômicas - os quais fornecem uma oportunidade para a seleção de novos biomarcadores moleculares. Esta dissertação tem dois artigos; no primeiro, publicado no *Molecular Diagnosis & Therapy* em maio de 2019, realizamos uma revisão sistemática da literatura, seguindo a metodologia PRISMA e o guia BiSLR, sobre a utilização de biomarcadores moleculares como uma alternativa às biópsias para monitorar rejeição em transplantes, a partir do PubMed, ScienceDirect e EMBASE. O segundo artigo trata de resultados preliminares de uma metanálise de múltiplos estudos de dados de transcriptoma para identificação de biomarcadores de rejeição ao transplante cardíaco, usando, além da literatura do artigo anterior, as bases de dados públicas Gene Expression Omnibus (GEO) e ArrayExpress Archive of Functional Genomics Data (ArrayExpress). Apesar do papel relevante das tecnologias transcriptômicas para a descoberta de biomarcadores, concluímos pela necessidade de pesquisa adicionais para preencher as atuais lacunas de conhecimento e suprir questões como heterogeneidade experimental.

## INTRODUÇÃO

À primeira vista, receber um órgão transplantado - em especial, um coração - poderia ser visto como o fim de uma jornada bem sucedida, um final feliz: após aguardar ansiosamente numa lista de espera, o paciente teria a chance de superar uma patologia grave, recebendo um órgão saudável. Contudo, do ponto de vista da prática clínica, o transplante é melhor visto como uma nova etapa no tratamento, e implica uma escolha incerta com um alto custo de oportunidade, já que órgãos são recursos escassos: o transplante para um paciente frequentemente implica que outro deixará de receber o órgão aguardado. Outrossim, mesmo que um paciente não tenha qualquer contraindicação relevante, viva o suficiente para receber um órgão compatível, passe pelo complexo e arriscado procedimento cirúrgico, e ainda se recupere do trauma sem contrair infecções, ele ainda precisa submeter-se a um longo pós-operatório que inclui biópsias frequentes.

A situação já foi muito pior. O primeiro transplante cardíaco entre humanos foi realizado pelo médico sul-africano Christiaan Barnard, em 3 de dezembro de 1967; embora o transplante haja sido bem-sucedido, o paciente Louis Washkansky morreu de pneumonia 18 dias depois. No ano seguinte, mais de cem transplantes cardíacos foram realizados no mundo todo; porém, a sobrevida de mais de dois terços dos pacientes foi inferior a noventa dias (HASSOULAS, 2012). Além das complicações usuais decorrentes de cirurgias dessa ordem, como infecções, um dos principais obstáculos era (e ainda é) a resposta imunológica que chamamos de rejeição.

Esse problema já havia sido identificado por Alexis Carrel, Prêmio Nobel de Medicina em 1912; permaneceu insuperável por décadas, de tal forma que se considera que o primeiro transplante de órgão sólido bem-sucedido, no longo prazo, teria ocorrido apenas em 1954, com uma doação de rim entre irmãos gêmeos. Apenas a partir da década de 1980, com o uso amplo

de imunossuppressores como a ciclosporina (descoberta em 1970), a sobrevida se estendeu a níveis aceitáveis - em 1984, dois terços dos pacientes viveriam mais de cinco anos após transplantes de órgãos (BARKER; MARKMANN, 2013).

Para prevenir e monitorar a rejeição, o transplantado se submete a exames laboratoriais e a frequentes biopsias - um exame caro, invasivo, que oferece riscos e pode apresentar erros de amostragem. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos de monitoramento, que permitam diminuir a frequência de biópsias ou ao menos aumentar a precisão diagnóstica, tem potencial para melhorar o bem-estar e a sobrevida do paciente.

Na última década, vários estudos foram realizados em busca de biomarcadores clínicos para prever a rejeição pós-transplante, analisando, por exemplo: níveis de proteínas, metabólitos e genes, como a quimiocina CXCL10, troponina, ácido úrico ou o status genético, como o genótipo TNF-alfa. Até o momento, porém, nenhum desses marcadores progrediu para a prática clínica – com exceção das tipagens de PRA e HLA, usadas para triagem de doadores (HOLLANDER et al, 2013).

Nosso trabalho visa a contribuir com essa aspiração: uma metanálise e uma revisão da literatura de estudos que busquem, por meio da abordagem de ciências ômicas, encontrar biomarcadores para rejeição de transplantes.

Na década de 1970 o termo “bioinformática” começou a ser utilizado para estudos com processos informatizados de sistemas biológicos. Após o sequenciamento completo do genoma humano e outros avanços da biologia molecular e genética, a compreensão dos processos biológicos tornou-se mais acessível, com o uso em larga escala de análises de padrões lineares e não lineares, mineração de dados e algoritmos de aprendizado de máquina. Nosso foco, neste trabalho, são estudos de transcriptoma, que hoje geram grandes quantidades de dados, disponibilizados em bancos de dados públicos e abertos à pesquisa. O transcriptoma compreende o sequenciamento do conteúdo de transcritos, dentre os quais RNA mensageiro

(mRNA) e RNAs não codificantes (ncRNAs), produzidos em uma determinada célula. Uma vez que o transcriptoma reflete a adaptação da célula a uma determinada condição, como uma patologia ou uma resposta imunológica, pode ser usado para identificar genes que ficam ativos nessa condição, assim funcionando como seu biomarcador.

A regulação gênica compreende uma cadeia de eventos complexos pelos quais um sinal leva a um aumento ou diminuição da atividade de um conjunto de proteínas. Podem-se usar dados de expressão para inferir a regulação gênica, comparando dados de *microarranjos* para formar hipóteses sobre os genes envolvidos em cada estado.

O microarranjo (*microarray*) de DNA tem sido a principal tecnologia para estudos de expressão gênica em larga escala, a partir do seu surgimento na década de 1990, pois é capaz de simultaneamente quantificar o nível de transcrito de milhares de genes por marcação com fluorescência. Uma análise estatística de dados de microarranjos resulta, em geral, em listas de genes cuja atividade está significativamente associada a determinadas condições fisiológicas ou patológicas, i.e., genes com uma expressão diferencial associada a uma condição. Isso possibilita identificar padrões específicos de expressão gênica a fim de prever e caracterizar rejeição aguda e crônica, em amostras de biópsia de tecido, sangue periférico e biofluidos (ZARKHIN; SARWAL, 2008).

Uma revisão sistemática da literatura usa métodos para coleta de dados secundários, visando a sintetizar os resultados e fornecer avaliação crítica de pesquisas anteriores. Ela pode ser realizada em conjunto com ou de forma complementar a uma metanálise - a qual combina estudos distintos, provendo médias ponderadas de seus resultados por meio de uma abordagem estatística, a fim de obter melhor poder estatístico e melhores estimativas do tamanho de efeito, ou mesmo de compará-los em caso de desacordo. A ideia é análoga ao princípio de que agregar diferentes medições de um mesmo fenômeno, cada uma com uma expectativa de erro própria,

tende a fornecer um resultado mais confiável que uma única observação. Ainda, metanálises permitem generalizar resultados para uma população mais ampla que a dos estudos originais, e até investigar a ocorrência de viés de publicação - i.e., o risco de que o conjunto de estudos seja influenciado pela maior tendência de que periódicos publiquem resultados estatisticamente significativos.

Neste trabalho, apresentamos dois artigos; o primeiro, já publicado no periódico *Molecular Diagnosis & Therapy*<sup>1</sup> em maio deste ano, é uma revisão sistemática de pesquisas existentes sobre o perfil de expressão em larga escala em relação ao RNAm e miRNA diferencialmente expressos na rejeição de enxertos, com destaque para potenciais biomarcadores moleculares em transplantes. O segundo apresenta resultados preliminares de uma metanálise de múltiplos estudos de dados de transcriptoma para identificação de biomarcadores de rejeição ao transplante cardíaco, utilizando ferramentas de bioinformática. Além da literatura utilizada na revisão sistemática anterior, utilizamos dados de transcriptoma buscados nas bases públicas *Gene Expression Omnibus* (GEO) e *ArrayExpress Archive of Functional Genomics Data* (ArrayExpress).

---

<sup>1</sup> <https://doi.org/10.1007/s40291-019-00397-y>

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 TRANSPLANTE CARDÍACO E REJEIÇÃO

Desde 1982 até junho de 2017, já foram realizados 141.268 transplantes de coração em 407 centros especializados no mundo, segundo a Sociedade Internacional de Transplante de Coração e Pulmão (*International Society for Heart and Lung Transplantation – ISHLT*)(KHUSH et al., 2018). Só nos Estados Unidos, de 1988 até maio de 2019, foram realizados 67.017 transplantes cardíacos (TRANSPLANTS BY ORGAN TYPE - UNOS, 2017) - que é o tratamento de escolha para a insuficiência cardíaca refratária. Diversos avanços da última década – como a incorporação de novas técnicas cirúrgicas, novos imunossupressores, novos métodos diagnósticos – tornaram possível o prolongamento da vida do paciente transplantado. O Brasil está em destaque neste campo na América Latina, principalmente como país referência no transplante cardíaco no caso da doença de Chagas, instituindo condutas adotadas no mundo todo (II DIRETRIZ BRASILEIRA DE TRANSPLANTE CARDÍACO, 2010).

Segundo o relatório de Dimensionamento dos Transplantes publicado em 2018, da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, o país é o segundo em número absoluto de transplantes renais, entre 35 países, ficando atrás apenas dos EUA. No ano de 2018, ocorreram 353 transplantes cardíacos no Brasil, dos quais 22 no Rio Grande do Sul; no entanto, a necessidade estimada era de 1.661 operações. Além disso, a lista de novos pacientes ativos em espera no país no ano de 2018 é de 282 pacientes (RBT, 2018).

Nos transplantes realizados em pacientes adultos e pediátricos no Brasil entre 2008 e 2018, a sobrevivência em um ano foi de 74% e em cinco anos de 64%, com sobrevida média de 9 anos (RBT, 2018). Após o transplante cardíaco, a prevenção à rejeição é realizada com imunossupressores; porém tais medicamentos apresentam diversos efeitos colaterais (PHAM et al., 2010). A biópsia endomiocárdica é o principal método de monitoramento da rejeição; contudo, é caro, invasivo, pode apresentar erros de amostragem (como coleta de material representativo de fibrina, infiltração gordurosa ou fibrose) e ser associado a complicações graves (CALÉ et al., 2012). Apesar disso, precisa ser realizada repetidamente: no primeiro mês após a operação, a frequência da biópsia é semanal; do segundo ao terceiro mês, quinzenalmente; do terceiro ao sexto mês, trimestralmente; do sexto ao décimo segundo mês, a biópsia é semestral; enfim, após o primeiro ano, a biópsia é anual, ou conforme a necessidade específica do paciente (II DIRETRIZ BRASILEIRA DE TRANSPLANTE CARDÍACO, 2010). Essa frequência não depende do risco de rejeição do paciente.

Embora o transplante cardíaco seja um procedimento importante, trata-se de um processo complexo, caro, restrito (pois depende de um recurso escasso – um órgão saudável apto ao transplante); e o monitoramento de seu principal efeito colateral (rejeição) requer a realização repetida de um exame invasivo, com riscos ao paciente.

## 1.2 BIOMARCADORES E TRANSCRIPTOMA

Embora as taxas de sobrevida de transplantados em curto prazo tenham aumentado ao longo dos anos, as de longo prazo mantêm-se com pouca melhora (KHATRI et al., 2013). Além disso, há uma demanda por novas drogas imunossupressoras contra a rejeição de enxertos, visto que as existentes provocam diversas implicações negativas no tratamento (CHEN et al., 2010). Esses desafios demandam novos paradigmas em relação à prática clínica de pacientes

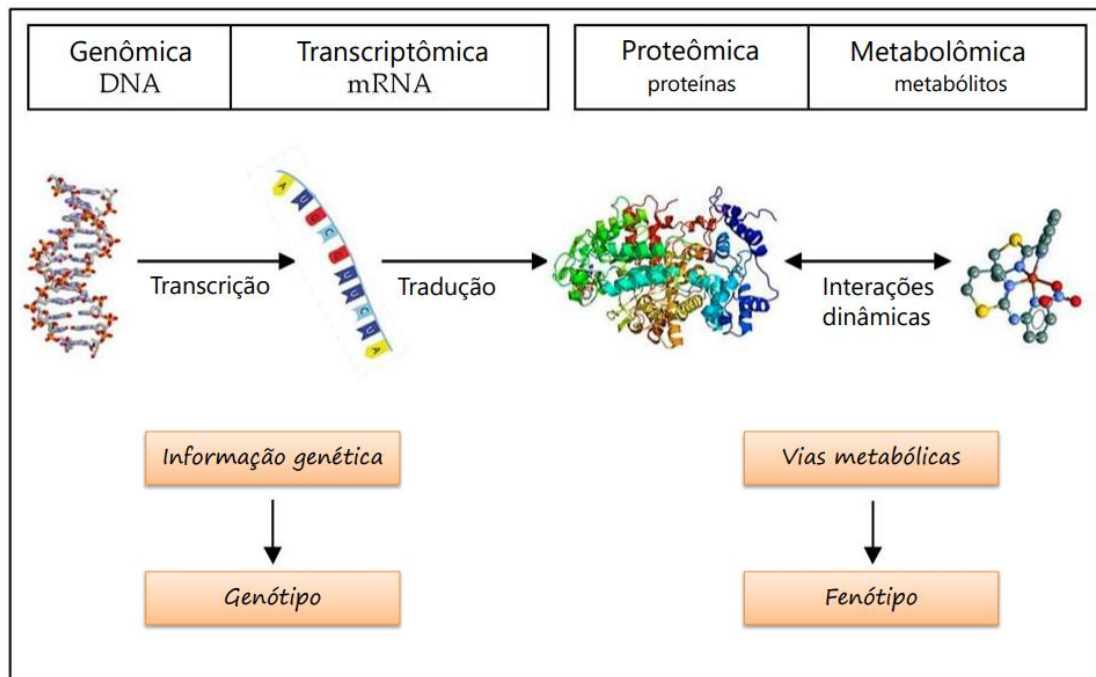


transplantados. O modelo de pesquisa tradicional é baseado em hipóteses derivadas de modelos experimentais complexos que por vezes não traduzem adequadamente a patologia humana. Pode-se considerar, porém, sua substituição ou complementação pela análise de dados em larga escala gerados através de tecnologias “ômicas” - genômica, transcriptômica e proteômica - para obter novos *insights* visando à descoberta de biomarcadores específicos (WANG; SARWAL, 2015) (Figura 1).

“Biomarcador” é um termo amplo, que se refere a uma molécula ou assinatura biológica para um determinado estado fisiológico ou patológico, que podem ser qualificados como indicadores da predisposição, desenvolvimento ou prognóstico de doenças, e resposta à atividade farmacológica. Um dos objetivos mais interessantes no desenvolvimento de sistemas de biomarcadores é monitorar e prever o resultado de fenótipo em transplantes; por exemplo, os biomarcadores analisados em biópsias realizadas em curto prazo (até três meses após o transplante) podem estar associados ao fenótipo de lesão crônica constatadas em biópsias de longo prazo (um ano após o transplante) (EINECKE et al., 2010). Ainda assim, eles podem ser utilizados para obter uma previsão precisa do risco imune e ser uma ferramenta de diagnóstico que minimiza riscos (WANG; SARWAL, 2015).

Assim, são diversas as estratégias utilizadas para a descoberta de biomarcadores, dentre as quais a análise de dados “ômicos” tem se tornado cada vez mais frequente (RIFAI; GILLETTE; CARR, 2006). A abordagem das ciências “ômicas” envolve técnicas analíticas, estatística multivariada e ferramentas de bioinformática que auxiliam na descoberta de novos biomarcadores não invasivos a partir de análise de dados pós-genômicos gerados em larga escala, com grande potencial para contribuir para um tratamento mais personalizado ao extrair informações biologicamente válidas e clinicamente úteis. Assim, através desta metodologia é

possível desenvolver sistemas biomarcadores de transplante confiáveis (WANG; SARWAL, 2015).



**Figura 1: Ciências “ômicas”.** Às ciências ômicas são: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica que possuem o objetivo de isolar e caracterizar o RNA, as proteínas e os metabólitos. Fonte: Adaptado de Prosdocimi, 2007 (PROSDOCIMI, 2007).

Às ciências ômicas são: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, com o objetivo de isolar e caracterizar o RNA, as proteínas e os metabólitos. Transcriptômica refere-se ao estudo das moléculas de RNA formadas a partir do processo de transcrição (DNA para RNA) e que determinam as proteínas a serem formadas pela célula. Metabolômica: estuda alterações na expressão de pequenas moléculas orgânicas denominadas metabólitos; Proteômica: tem como objeto de estudo, o produto da expressão gênica, as proteínas e tem como objetivo o conjunto completo de proteínas resultante da expressão gênica de uma célula, de um tecido ou de um organismo - fenótipo.

Por sua vez, o diagnóstico através da biópsia permanece limitado (devido a erros amostrais, variabilidade da avaliação, morbidade processual, custo, etc). Segundo o estudo de

Thierry e colaboradores (2011), aproximadamente 10% dos pacientes que possuem função renal clinicamente normais apresentam evidências de rejeição aguda na biópsia do protocolo de controle (THIERRY et al., 2011). Por exemplo, o monitoramento da Creatinina faz parte do protocolo de controle da rejeição em pacientes transplantados renais indicando a disfunção do enxerto, embora não seja um marcador sensível à etiologia da rejeição. Diversos estudos pesquisaram e validaram biomarcadores derivados da urina que classificam as células imunes associadas à tolerância ao aloenxerto renal, podendo oferecer uma maneira não invasiva de monitorar o status de aloenxerto renal (NISSAISORAKARN et al., 2018).

Hollander e colaboradores (2010) exploram a rejeição a transplantes cardíacos em amostras de biópsias e de sangue total e propõem a utilização de biomarcadores sanguíneos capazes de diagnosticar a rejeição aguda de aloenxerto cardíaco nos primeiros 6 meses após o transplante, quando a maioria dos episódios de rejeição aguda ocorre (HOLLANDER et al., 2010). Ainda, Hollander e colaboradores (2013) identificaram como um painel biomarcador genes a partir do sangue total do receptor e tecido miocárdio do doador. Já o sangue periférico é uma fonte amostral acessível que prevê respostas imunes a pacientes receptores de diversos tipos de transplantes; pode ser usado tanto a curto como a longo prazo após o transplante para monitorar o estado imunológico e metabólico dos receptores. No entanto, grande parte dos estudos analisam pacientes em condições definidas (como rejeição aguda ou crônica), assim desprezando outras causas imunológicas, como infecções; porém, para que um biomarcador seja clinicamente útil, deve ser capaz de realizar diferenciação de estado patológico (HEIDT et al., 2011).

Outrossim, em transplantes pulmonares, amostras de lavagem bronco-alveolar são muito estudadas como potenciais biomarcadores para monitoramento de rejeição pós-transplante, porque permitem a detecção de infecções e disfunções, mas o método de coleta da

lavagem broncoalveolar não é padronizado, o que representa uma fonte importante de variação (LEVY et al., 2018).

Assim, a busca por biomarcadores não invasivos que preencham todas as lacunas de conhecimento existentes e as heterogeneidades do processo (como a falta de um “padrão ouro” para dados de entrada confiáveis, variações de compatibilidade e características dos doadores, e a variação de amostras e coletas) tem se mostrado uma tarefa difícil, tornando a validação dos resultados para ser utilizado clinicamente o principal desafio na utilização de tecnologia de alto rendimento para análises de expressão diferencial.

A abordagem transcriptômica é o foco do nosso estudo. Enquanto o genoma é um sequenciamento da molécula de DNA de uma determinada célula, o transcriptoma consiste no sequenciamento do conteúdo de transcritos, dentre os quais RNA mensageiro (mRNA) e RNAs não codificantes (ncRNAs), produzido em uma determinada célula sujeita a determinada condição (PROSDOCIMI, 2007). Assim, uma célula apresenta apenas um genoma, mas pode apresentar diferentes conteúdos de transcriptoma, pois a expressão de genes depende de vários fatores. Portanto, o transcriptoma pode refletir a adaptação da célula a uma determinada condição, como uma patologia, e com isso é possível estudar os genes que ficam ativos nessa condição, os quais representam potenciais biomarcadores, e detectar tendências coordenadas amplas que não podem ser discernidas por pesquisas mais direcionadas (LOWE et al., 2017).

Nos últimos anos, inúmeros estudos demonstram a aplicabilidade destas tecnologias a diversas patologias, detectando padrões específicos de expressão gênica que caracterizam diferentes tipos de neoplasias, doenças neurológicas, cardiovasculares, insuficiência cardíaca e processos de rejeição a enxertos (GUINDALINI; TUFIK, 2007; PHAM et al., 2010). Como o estudo de Khatri e colaboradores (2013), o qual afirma que a análise do perfil transcricional de biópsias de transplantes fornece informações úteis sobre o mecanismo da lesão de aloenxertos,

como na rejeição aguda e crônica, fato que levou a hipótese de que existe um mecanismo de rejeição em comum em todos os órgãos sólidos transplantados (KHATRI et al., 2013).

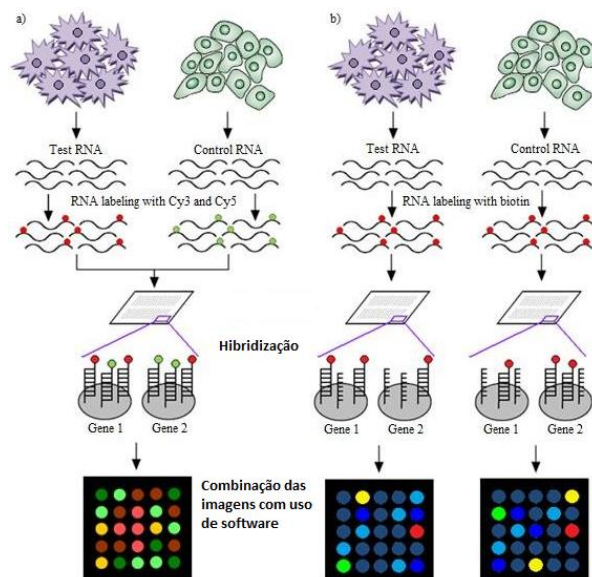
Atualmente, grandes quantidades de dados são gerados por estudos transcriptômicos e depositados em bancos de dados públicos acessíveis a toda a comunidade acadêmica, como o *Gene Expression Omnibus* (GEO). Estes bancos de dados representam uma rica e completa matéria-prima para novos estudos científicos, contendo, por exemplo, diversos experimentos cadastrados de aloenxertos de coração, rim, fígado e pulmão que são derivados de amostras de biópsias de tecido ou sangue (KHATRI et al., 2013). A bioinformática tem viabilizado um novo modelo de ciência, denominada ciência *in silico*, que através da exploração e análise integrativa destes dados ômicos, visa auxiliar na investigação de importantes questões relacionadas à pesquisa básica e aplicada nas áreas das Ciências Biológicas e da Saúde.

### 1.3 MICROARRANJO DE DNA

Para produzir conjuntos de dados de transcritos de RNA pode-se utilizar, principalmente, sequenciamento de transcritos individuais (RNA-Seq), ou hibridação de transcritos para uma matriz ordenada de sondas nucleotídicas (microarranjo). O microarranjo (*microarray*) de DNA tem sido a principal tecnologia para estudos de expressão gênica em larga escala, a partir do seu surgimento na década de 1990, pois é capaz de simultaneamente quantificar o nível de transcrito de milhares de genes por marcação com fluorescência. Isso permitiu avanços na identificação de genes diferentemente expressos entre tecidos doentes e saudáveis, identificando detalhes da biologia de um organismo (LOWE et al., 2017).

A tecnologia de microarranjo auxilia o diagnóstico de rejeição de enxertos, pois permite identificar padrões específicos de expressão gênica que podem prever e caracterizar rejeição aguda e crônica, em amostras de biópsia de tecido, sangue periférico e biofluidos (ZARKHIN;

SARWAL, 2008). Esses microarranjos, também conhecidos como *chips* de DNA, consistem em coleções de segmentos de DNA que estão ordenadamente distribuídas sobre uma superfície sólida. Cada componente da coleção possui uma localização própria que é chamada de *spot* (ponto), e possui uma quantidade restrita de DNA imobilizado, denominada *probe* (sonda) que hibridizam com moléculas-alvo marcadas com fluoróforos. A intensidade da fluorescência de cada sonda é medida por um scanner (Figura 2), quantificada, e assume-se que o valor resultante é proporcional ao nível de atividade do gene correspondente. Diversas empresas - (como, *Affymetrix, Agilent, Illumina*) produzem diferentes tipos de plataformas e *arrays* (arranjos) de sondas para análises animais e vegetais (JALURIA et al., 2007).

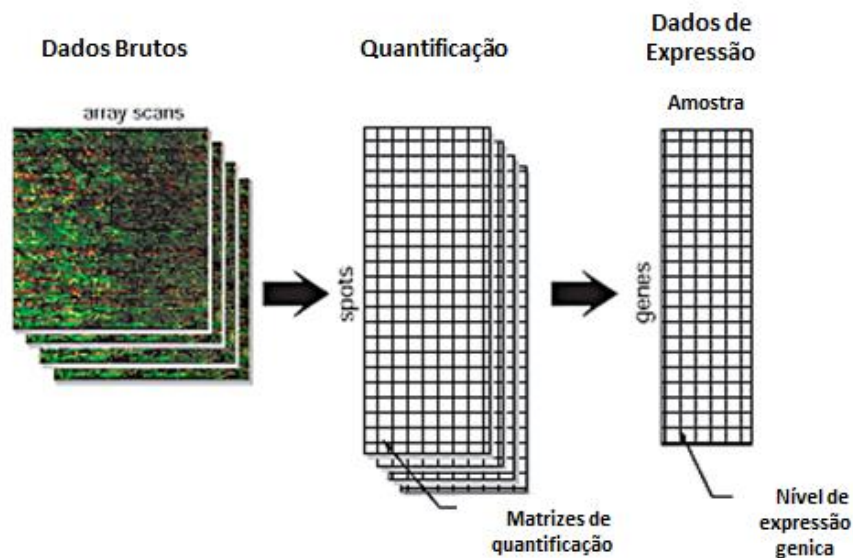


**Figura 2: Esquema de análise por microarranjos de DNA.** As principais etapas de um experimento de microarray de DNA. As tecnologias de *microarrays* podem ser divididos em dois: (a) com dois fluoróforos (*two Channel*) e (b) com um fluoróforo (*single channel*). Duas amostras de RNA, uma é considerada o “teste” e a outra o “controle”. As amostras são hibridizadas em uma lâmina de microarranjo, que é digitalizada em comprimentos de onda diferentes, correspondendo à cor representativa de uma certa quantidade de ligação. Fonte: Adaptado de Dawany *et al.*, 2010 (DAWANY *et al.*, 2010)

A partir de imagens de alta resolução com recursos de detecção e análise, os dados de microarranjo são registrados; os artefatos de imagem devem, adicionalmente, ser identificados e removidos da análise. A expressão gênica diferencial é medida por normalização, modelagem

e análise estatística dos dados, uma vez que a quantificação da transcrição é disponível (PETROV; SHAMS, 2004) (Figura 3).

O resultado dessa análise são listas de genes com testes pareados associados à expressão diferencial e as estimativas de probabilidade dessas diferenças. Esses conjuntos de dados brutos ou processados devem ser, preferencialmente, acessíveis em banco de dados públicos, a fim de que sejam úteis para toda a comunidade científica (LOWE et al., 2017).



**Figura 3: Processamento de dados de expressão gênica por microarranjo.**

Os dados brutos dos experimentos de microarranjo são imagens, que devem ser quantificadas por um software, que identifica os pontos relacionados a cada elemento da matriz e mede a intensidade de fluorescência. Para obter a matriz final de expressão gênica, todas as quantidades relacionadas a cada gene devem ser combinadas e a matriz inteira deve ser normalizada para obter diferentes matrizes comparáveis. Fonte: Adaptado de Brazma et al. 2001 (BRAZMA et al., 2001).

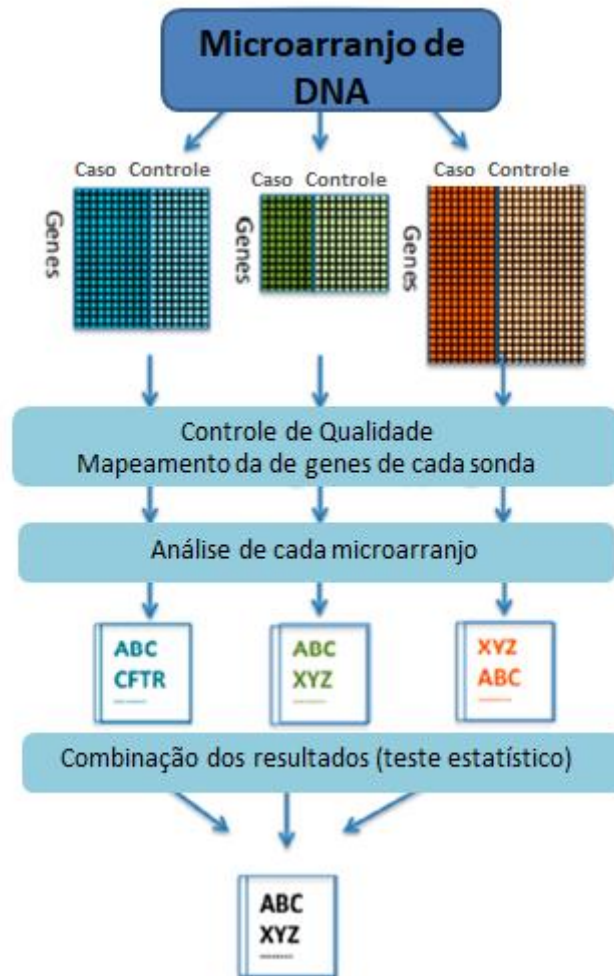
#### 1.4 METANÁLISE

Estudos de associação em larga escala do genoma estão ajudando a descobrir novas variantes genéticas associadas a fenótipos clínicos, graças a bancos de dados públicos amplamente disponíveis; esse aumento no número de associações leva a um crescente interesse por métodos para desenvolver metanálises das mesmas (DEY et al., 2019). Tal metodologia começou a ser utilizada em estudos científicos na década de 1970, com um efeito revolucionário em muitos campos, pois auxiliou a estabelecer práticas baseadas em evidências e solucionou aparentes contradições em resultados de pesquisa (GUREVITCH et al., 2018).

A metanálise é uma técnica estatística que permite integrar resultados de diferentes estudos primários independentes e possibilita a sua reprodutibilidade. Para que os estudos possam ser combinados, é necessário calcular a medida de efeito de cada estudo (DOS SANTOS; CUNHA, 2013; RODRIGUES; ZIEGELMANN, 2010); para esses cálculos realiza-se a meta-análise integrando valores-p e/ou *fold change* para cada gene entre múltiplos experimentos (WALDRON; RIESTER, 2016; ZHOU et al., 2016)

Na metanálise de dados de microarranjo de DNA visando a combinar múltiplos estudos de perfis de expressão de microarranjo de DNA (FIGURA 4), é primeiro necessário realizar uma etapa de pré-processamento de cada estudo com a realização de: (1) correção de *background*, a fim de eliminar sinais de hibridização cruzada; (2) normalização, para minimizar os efeitos ou diferenças observados entre as amostras devido a erros sistemáticos (e não a biologia) e garantir que a distribuição dos valores de expressão das diferentes amostras sejam comparáveis entre si; (3) sumarização de *probe sets*, para obter um valor único de expressão para uma dada sonda (pode haver várias sondas para um mesmo éxon ou gene); (4) sumarização de sondas redundantes, para obter um valor único de expressão para cada gene, dadas as múltiplas sondas associadas a ele. Assim, cada estudo é primeiro analisado separadamente, e depois os resultados são combinados (WALSH et al., 2015).





**Figura 4: Esquematização dos etapas de pré- processamento para metanálise de dados de microarranjo de DNA.** Para o pré-processamento de cada estudo aconselha-se os seguintes passos: (1) correção de background; (2) normalização; (3) sumarização de *probe sets*; (4) sumarização de sondas redundantes. Assim, cada estudo é primeiro analisado separadamente, e depois os resultados são combinados na metanálise. Fonte: Adaptado de Walsh *et al* 2015 (WALSH *et al.*, 2015).

Em estudos de metanálise, as questões e hipóteses de interesse determinam o modelo estatístico e o tamanho do efeito que os autores utilizam – que não são os mesmos em todos os estudos, mas são estimados mediante uma distribuição de probabilidade (CHANG *et al.*, 2013). A metanálise deve enfatizar a importância biológica dos resultados e não somente concentrar-se nos valores-p e na significância estatística (NAKAGAWA *et al.*, 2017).

A escolha do método de metanálise mais adequado depende da hipótese relacionada ao propósito biológico a ser testado. Na detecção de possíveis marcadores em estudos de rejeição a transplantes, é relevante analisar genes diferencialmente expressos consistentes em todos os estudos - o que demanda um modelo conservador, porém apropriado para associação de diversos estudos. No presente estudo, utilizou-se o teste estatístico *Product of Ranks* (PR), que aumenta o poder de detecção e é considerado apropriado para conjuntos de dados heterogêneos (CHANG et al., 2013).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Encontrar uma nova alternativa à biópsia possibilitaria antecipar o diagnóstico de rejeição, conseqüentemente, reduzindo as chances de óbito por esse evento e melhorando a sobrevivência dos pacientes. Além disso, a biópsia é um procedimento complexo, invasivo e arriscado; uma nova alternativa permitiria reduzir os custos e melhorar a própria qualidade de vida do transplantado.

Dados de transcriptoma já têm sido utilizados para detecção de biomarcadores de rejeição de transplante, tanto cardíaco como outros; portanto, é provável que se trate de uma abordagem promissora. Outrossim, a metodologia escolhida – metanálise de dados de transcriptoma - se apresenta adequada, como confirmado por diferentes estudos meta-analíticos de dados de expressão gênica, em diferentes contextos, que têm reportado uma detecção mais robusta de genes diferencialmente expressos, representando biomarcadores com maior potencial translacional.

### **3. HIPÓTESE**

A identificação de candidatos a biomarcadores transcriptômicos pode auxiliar na prevenção e tratamento de rejeição a transplantes (cardíacos).

### **4. OBJETIVO PRINCIPAL**

O objetivo geral deste projeto é identificar potenciais biomarcadores de rejeição a transplante cardíaco através da meta-análise de dados de transcriptoma com modelos de bioinformática relacionados a este contexto, coletados a partir de bancos de dados públicos.

#### **4.1 Objetivo Específico**

##### **Subprojeto 1:**

- Elaborar uma revisão sistemática da literatura com artigos científicos que utilizem dados de expressão gênica para identificação de possíveis biomarcadores de rejeição a transplantes;
- Sumarizar os genes e miRNAs associados à rejeição de transplante, analisando a consistência de seu padrão de expressão diferencial para diferentes enxertos, técnicas utilizadas, e investigando o potencial molecular através de análise de enriquecimento funcional *in silico*.

## **Subprojeto 2:**

- Analisar o perfil de expressão gênica em larga escala oriundos de estudos prévios relacionados à rejeição de transplante cardíaco, utilizando estratégias e métodos de metanálise sobre bancos de dados públicos;
- Investigar o papel funcional de potenciais biomarcadores identificados na metanálise;

## 5. REFERÊNCIAS

BARKER, C. F.; MARKMANN, J. F. **Historical Overview of Transplantation Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a014977>>

BRAZMA, A. et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. **Nature genetics**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 365–371, 2001.

CALÉ, Rita et al. [Complications of endomyocardial biopsy after heart transplantation: a lesser evil]. **Revista portuguesa de cardiologia: orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology: an official journal of the Portuguese Society of Cardiology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 159–162, 2012.

CHANG, Lun-Ching et al. Meta-analysis methods for combining multiple expression profiles: comparisons, statistical characterization and an application guideline. **BMC bioinformatics**, [s. l.], v. 14, p. 368, 2013.

CHEN, Rong et al. Differentially Expressed RNA from Public Microarray Data Identifies Serum Protein Biomarkers for Cross-Organ Transplant Rejection and Other Conditions. **PLoS computational biology**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. e1000940, 2010. . Acesso em: 25 maio. 2019.

DAWANY, Noor et al. Large-scale integration of microarray data reveals genes and pathways common to multiple cancer types. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 128, n. 12, p. 2881 – 2891, 2013. Disponível em: <<doi/full/10.1002/ijc.25854>>

DEY, Rounak et al. Robust meta-analysis of biobank-based genome-wide association studies with unbalanced binary phenotypes. **Genetic epidemiology**, [s. l.], 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/gepi.22197>>

DOS SANTOS, Eduardo José Ferreira; CUNHA, Madalena. **Interpretação crítica dos resultados estatísticos de uma meta-análise: Estratégias metodológicas**. 2013. Disponível em: <<https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/16571>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

EINECKE, Gunilla et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 120, n. 6, p. 1862–1872, 2010.

GUINDALINI, Camila; TUFIK, Sergio. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica: aplicação no estudo de fenótipos complexos. **Brazilian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 370–374, 2007. . Acesso em: 25 maio. 2019.

GUREVITCH, Jessica et al. Meta-analysis and the science of research synthesis. **Nature**, [s. l.], v. 555, n. 7695, p. 175–182, 2018.

HASSOULAS, J. Transplantation of the heart: An overview of 40 years' clinical and research experience at Groote Schuur Hospital and the University of Cape Town: Part I. Surgical experience and clinical studies. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, [s. l.], v. 102, n. 6 Pt 2, p. 350–352, 2012.

HEIDT, Sebastiaan et al. Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. **Transplantation**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 1–9, 2011.

HOLLANDER, Zsuzsanna et al. Predicting acute cardiac rejection from donor heart and pre-transplant recipient blood gene expression. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 259 - 265, 2013.

HOLLANDER, Zsuzsanna et al. Whole blood biomarkers of acute cardiac allograft rejection: double-crossing the biopsy. **Transplantation**, [s. l.], v. 90, n. 12, p. 1388–1393, 2010.

**II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco. Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2010.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0066-782x2010000700001>>

KHATRI, Purvesh et al. A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 210, n. 11, p. 2205–2221, 2013.

KHUSH, {kiran K. et al. **The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fifth Adult Heart Transplantation Report—2018; Focus Theme: Multiorgan Transplantation**[https://www.jhltonline.org/article/S1053-2498\(18\)31584-5/abstract](https://www.jhltonline.org/article/S1053-2498(18)31584-5/abstract), 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.07.022>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

LEVY, Liran et al. Sequential broncho-alveolar lavages reflect distinct pulmonary compartments: clinical and research implications in lung transplantation. **Respiratory research**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 102, 2018. . Acesso em: 25 maio. 2019.

LOWE, Rohan et al. Transcriptomics technologies. **PLoS computational biology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. e1005457, 2017.

NAKAGAWA, Shinichi et al. Meta-evaluation of meta-analysis: ten appraisal questions for biologists. **BMC biology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 18, 2017.

NISSAISORAKARN, Voravech et al. Urine biomarkers informative of human kidney allograft rejection and tolerance. **Human immunology**, [s. l.], v. 79, n. 5, p. 343–355, 2018.

PETROV, Anton; SHAMS, Soheil. Microarray Image Processing and Quality Control. **Journal of VLSI signal processing systems for signal, image, and video technology**, [s. l.], v. 38, n.



3, p. 211–226, 2004.

PHAM, Michael X. et al. Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 362, n. 20, p. 1890–1900, 2010.

PROSDOCIMI, Francisco. **INTRODUÇÃO À BIOINFORMÁTICA**. 2007. Disponível em: <[http://www.iq.usp.br/setubal/bmc/2015/FProsdocimi07\\_CursoBioinfo.pdf](http://www.iq.usp.br/setubal/bmc/2015/FProsdocimi07_CursoBioinfo.pdf)>. Acesso em: 25 maio. 2019.

**RBT, 2018**. Disponível em: [http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2018/Lv\\_RBT-2018.pdf](http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2018/Lv_RBT-2018.pdf). Acesso em: 25 maio. 2019.

RIFAI, Nader; GILLETTE, Michael A.; CARR, Steven A. **Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility** *Nature Biotechnology*, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt1235>>

RODRIGUES, Caroline Legramanti; ZIEGELMANN, Patrícia Klarmann. **Metanálise: Um Guia Prático**. 2010. Disponível em: <<https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/16571>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

THIERRY, A. et al. Long-term impact of subclinical inflammation diagnosed by protocol biopsy one year after renal transplantation. **American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 2153–2161, 2011.

**Transplants by organ type - UNOS**. 2017. Disponível em: <<https://unos.org/data/transplant-trends/transplants-by-organ-type/>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

WALDRON, Levi; RIESTER, Markus. **Meta-Analysis in Gene Expression Studies Methods**

**in Molecular Biology**, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_8)>

WALSH, Christopher J. et al. Microarray Meta-Analysis and Cross-Platform Normalization: Integrative Genomics for Robust Biomarker Discovery. **Microarrays (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 389–406, 2015.

WANG, Anyou; SARWAL, Minnie M. Computational Models for Transplant Biomarker Discovery. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 6, p. 458, 2015.

ZARKHIN, Valeriya; SARWAL, Minnie M. Microarrays: monitoring for transplant tolerance and mechanistic insights. **Clinics in laboratory medicine**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 385–410, vi, 2008.

ZHOU, Guangyan et al. **Comprehensive Transcriptome Meta-analysis to Characterize Host Immune Responses in Helminth Infections** **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004624>>

## Parte II

### **Artigo 1: Identification of candidate biomarkers for transplant rejection from transcriptome data: A systematic review<sup>2</sup>.**

Sheyla Velasque Paladini<sup>1,2</sup>, Graziela Hünning Pinto<sup>1,2</sup>, Rodrigo Haas Bueno<sup>1</sup>, Raquel Calloni<sup>3</sup>, Mariana Recamonde-Mendoza<sup>2,4,5</sup>

<sup>1</sup>Experimental and Molecular Cardiovascular Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio Grandense - Campus Gravataí, Gravataí, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Institute of Informatics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>5</sup>Bioinformatics Core, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

#### **Corresponding author**

Prof. Dr. Mariana Recamonde-Mendoza

Institute of Informatics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Av. Bento Gonçalves, 9500, Setor IV, Building 43424, Office 225

Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 91501-970

+55 51 33086843

[mrmendoza@inf.ufrgs.br](mailto:mrmendoza@inf.ufrgs.br)

---

<sup>2</sup> Artigo publicado no periódico *Molecular Diagnosis & Therapy*. <https://doi.org/10.1007/s40291-019-00397-y>

**Authorship:** SVP and MRM conceived and designed the study; SVP collected data; SVP, GHP, RHB, RC, and MRM analyzed data; SVP and MRM wrote the manuscript; GHP and RC reviewed the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

**Running Title:** Candidate biomarkers for transplant rejection from transcriptome data

## **Abstract**

**Background** Traditional methods for rejection control in transplanted patients are considered invasive, risky, and prone to sampling errors. Using molecular biomarkers as an alternative protocol to biopsies, for monitoring rejection may help to mitigate some of these problems, increasing the survival rates and well-being of patients. Recent advances in omics technologies provide an opportunity for screening new molecular biomarkers to identify those with clinical utility. **Objective** This systematic literature review (SLR) aimed to summarize existing evidence derived from large-scale expression profiling regarding differentially expressed mRNA and miRNA in graft rejection, highlighting potential molecular biomarkers in transplantation. **Methods** The study was conducted following PRISMA methodology and the BiSLR guide for performing SLR in bioinformatics. PubMed, ScienceDirect, and EMBASE were searched for publications from January 2001 to January 2018, and studies (i) aiming at the identification of transplant rejection biomarkers, (ii) including human subjects, and (iii) applying methodologies for differential expression analysis from large-scale expression profiling were considered eligible. Differential expression patterns reported for genes and miRNAs in rejection were summarized from both cross-organ and organ-specific perspectives, and pathways enrichment analysis was performed for candidate biomarkers to interrogate their functional role in transplant rejection. **Results** A total of 821 references were collected,

resulting in 604 studies after removal of duplicates. After application of inclusion and exclusion criteria, 33 studies were included in our analysis. Among the 1517 genes and 174 miRNAs identified, CXCL9, CXCL10, STAT1, hsa-miR-142-3p, and hsa-miR-155 appeared to be particularly promising as biomarkers in transplantation, with an increased expression associated with transplant rejection in multiple organs. In addition, hsa-miR-28-5p was consistently decreased in samples taken from rejected organs. **Conclusion** Despite the need for further research to fill existing knowledge gaps, transcriptomic technologies have a relevant role in the discovery of accurate biomarkers for transplant rejection diagnostics. Studies have reported consistent evidence of differential expression associated with transplant rejection, although issues such as experimental heterogeneity hinder a more systematic characterization of observed molecular changes. Special attention has been giving to large-scale mRNA expression profiling in rejection, whereas there is still room for improvements in the characterization of miRnome in this condition

**PROSPERO registration number** CRD42018083321.

### **Key points**

- This SLR summarizes efforts harnessing transcriptomic technologies in the development of biomarkers to identify patients at high risk of graft loss due to rejection;
- Despite experimental heterogeneity among studies, a good level of consistency in differential expression changes was observed for most markers.
- A set of the most promising genes and miRNAs candidate biomarkers is provided based on cross-organ and organ-specific consistent dysregulation reported in the included studies.

## 1. Introduction

Although the short-term survival rates of transplanted patients have increased over the years, the same trend has not been observed for long-term survival (Khatri et al. 2013; Rana et al. 2019). Five-year graft survival for transplanted organs is about 43% for lung, 78% for kidney (Wang and Sarwal 2015), and 72.5% for heart (Wilhelm 2015). New immunosuppressive drugs against graft rejection are needed since the existing ones have several negative implications on treatment (Ettenger, Albrecht, and Alloway 2018) and only a marginal effect on long-term rejection (Baron et al. 2015). In addition, despite being clinically useful in identifying rejection, protocol biopsies are susceptible to sampling errors, as well as invasive and risky, making them unsuitable for continuous monitoring of possible rejection (Loftheim et al. 2012). These challenges demand new paradigms regarding the clinical management of transplanted patients, including the discovery of informative molecules that may be used as biomarkers to improve monitoring and predict transplantation outcomes (Einecke et al. 2010), and to allow accurate anticipation of the immune risk (Wang and Sarwal 2015).

Molecular biomarker is a broad term, referring to any measurable biological molecule or signature associated with a particular physiological or pathological state, which can be qualified as indicator of predisposition, development or prognosis of diseases, and response to pharmacological activity (Burke 2016). The traditional research model for biomarker discovery is based on hypotheses derived from complex experimental models that sometimes do not translate to human pathology. This is reflected by a stagnation in the number of immunosuppressive drugs approved yearly for transplant recipients (Wang and Sarwal 2015). Several studies have investigated alternatives to find molecular biomarkers to monitor transplantation rejection and improve survival rates. Also rapidly evolving technologies for omics data generation, such as transcriptomics, are providing the opportunity for novel insights into molecular factors and pathways in tissue injury associated to rejection episodes. Previous

efforts have proposed transcriptome-based methods to detect differentially expressed genes and microRNAs (miRNAs) able to predict the clinical status of transplanted patients (Mas et al. 2013). Moreover, omics technologies have the potential to improve the evaluation of graft compatibility and to detect early pathological stages of organ injury in a less costly, more frequent, and less invasive way than standard routine biopsies (Sirota and Sarwal 2017).

Large amounts of omics data are continuously generated and shared through public databases, including a number of registered experiments on heart, kidney, liver, and lung allografts that represent a rich material for further scientific studies (Khatri et al. 2013). This experimental data may be explored in the search for diagnostic, prognostic, or theranostic biomarkers (Naesens and Sarwal 2010), although challenges exist regarding data integration from multiple sources of evidence and identification of true associations (Ritchie et al. 2015). Despite the inherent data complexity and analytical challenges, omics technologies have been increasingly applied to transplant investigation and are promising approaches for discovering useful molecular biomarkers (Wang and Sarwal 2015).

This article presents a systematic review of published studies investigating candidate biomarkers of transplant rejection from transcriptome profiling. We aimed to conduct a descriptive analysis of the related literature, providing a comprehensive summary of the main methodological characteristics of the studies found, including types of organs, samples and rejection analyzed, technologies used, as well as their main findings in terms of potential molecular biomarkers. In particular, our work sought to summarize and organize existing evidence regarding differentially expressed genes and miRNAs in transplant rejection, outlining most promising molecular biomarkers identified, analyzing the consistency in terms of their differential expression pattern reported for different grafts, and investigating the potentially altered molecular mechanisms through *in silico* functional enrichment analysis. In addition, we

outlined and discussed current limitations identified in the literature regarding the use of transcriptome data in the discovery of biomarkers of transplant rejection.

## **2. Materials and Methods**

This systematic literature review (SLR) was performed following the methodology proposed by the BiSLR guideline for SLR in bioinformatics (Mariano et al. 2017)[ and the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) checklist (Moher et al. 2009). The protocol is registered in the PROSPERO database (CRD42018083321).

### ***2.1 Search strategy***

PubMed, ScienceDirect, and EMBASE were searched for studies reporting the analysis of transcriptomes in the identification of biomarkers for transplant rejection. The following keywords were used in the queries, which were defined by consensus among reviewers and individualized for each database (**Table S1**): “gene expression profiling”; “transcriptome”; “allograft rejection”; “graft rejection”; “transplant rejection”; “biomarker”. Reference lists of retrieved articles and *Gene Expression Omnibus* (GEO) and ArrayExpress databases were also manually reviewed for any additional relevant studies. The search was completed in January, 2018.

### ***2.2 Eligibility criteria***

Original articles published from January 2001 to January 2018 were considered for inclusion. Date filtering was applied due to better accuracy of newer gene expression profiling technologies. To be eligible for screening, studies had to fulfill the following criteria: i) present the identification of transplant rejection biomarkers as main objective; ii) include human



subjects; iii) apply methodologies for differential expression analysis from large-scale transcriptome profiling. Studies performed in animal models or with insufficient information regarding experimental design were excluded. Abstracts and review papers were not considered, as well as original studies that did not properly report differentially expressed genes/miRNAs detected, including observed expression pattern (increased or decreased expression and statistical significance).

### ***2.3 Study selection***

Four researchers from different areas (i.e., bioinformatics, pharmacy, biology, and biomedicine) independently reviewed the articles retrieved in order to evaluate whether they were eligible for this review. After removing duplicates with the JabRef reference management software and R software scripts, study selection was performed in four steps: i) titles screening, ii) abstracts screening, iii) diagonal reading (focused on introduction, figures, tables, and conclusion), and iv) full-text reading (Mariano et al. 2017). For steps i) to iii), studies were selected for the next step if more than half of reviewers approved the inclusion. In step iv), each reviewer had to independently evaluate the articles according to a score system and a set of five predefined, specific questions: a) “does the article aim to identify biomarkers of transplant rejection?”; b) “has the article generated or used transcriptome data (large-scale expression profiling)?”; c) “is the methodology of the article based on differential expression analysis or meta-analysis of transcriptome data?”; d) “does the article clearly identify the experimental design, groups, and types or number of samples?”; e) “does the article properly report the list of potential biomarkers and the respective fold-change, p-value, or differential pattern observed (increased expression or decreased expression) in the main text or supplementary material?”. For each question, scores were given according to the following criteria: (0) if the article does not attend requirements of the question; (1) if it attends the question’s requirements only

partially; and (2) if it attends the question's requirements. Papers with an average score equal or higher than six among all reviewers' evaluation were included in this review. This iterative process of evaluation and selection (BiSLR's "spiral model") aims to guarantee, as much as possible, the quality of the selected studies and also to minimize the risk of selection bias (Mariano et al. 2017).

#### ***2.4 Data synthesis and analysis***

Data were independently extracted by all investigators using a standardized form, and disagreements were solved by consensus. A narrative summary of the results was produced according to specific data fields: a) the article's author, year of publication, and country; b) characteristics of the study, such as study design, transplant type, sample type, rejection type, groups definition, assay used for expression profiling, data analysis method, type of validation); and c) differential expression patterns of potential biomarkers (i.e., increased or decreased expression ). Given the clinical complexity in defining the specific type of rejection, this information was extracted and used as described by the *Materials and Methods section* of the corresponding original study. In cases where the type of rejection was not clearly described in the study, we categorized it as "not specified". For each study, reported genes and miRNAs were extracted from tables, figures, text, or supplemental material. Only statistically significant findings reported by authors were considered by our review. For comparison purposes, genes identifiers were converted to the official gene symbol nomenclature approved by the Human Gene Nomenclature Committee (Wain et al. 2002). Data analysis focused on identifying patterns and particularities regarding reported candidate biomarkers for allograft rejection, following both a general and a transplant-specific analysis.

## ***2.5 Pathways enrichment analysis***

Bioinformatics analysis was performed to better understand the functional role of potential biomarkers retrieved through the SLR by pathway enrichment investigation. For this purpose, gene lists identified during data synthesis and analysis were submitted to functional enrichment analysis by the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 (Huang, Sherman, and Lempicki 2009) using pathways annotation from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway database (Kanehisa et al. 2017). P-values were calculated according to a modified Fisher's exact test (DAVID's EASE score) and adjusted for multiple hypotheses testing using Benjamini-Hochberg method. Analyses were conducted using gene count and EASE score thresholds of 2 and 0.1, respectively.

## **2.6 Risk of bias assessment**

The Downs and Black checklist (Downs and Black 1998) was used for a critical appraisal of the quality of the cited papers. Due to the heterogeneity regarding the type of study among studies, we adapted the original checklist to define a standard set of 13 questions based on which the risk of bias was evaluated. All items related to an intervention (items 4, 8, 12–15, 19, 23, 24) and to follow-up (items 9, 17, 26) were excluded. Moreover, since there is not a general agreement on a single best method to perform power size calculation for large-scale gene expression profiling experiments (Flechner et al. 2004), we have also excluded item 27. Therefore, all included papers were independently evaluated as to the risk of bias based on the remaining 13 items by two researchers.

### 3. Results

#### *3.1 Literature search and studies characteristics*

A total of 807 references were collected from PubMed, ScienceDirect, and EMBASE databases. Fourteen additional studies were collected from other sources. Duplicates were removed, resulting in 604 studies. After the screening phase, 553 studies were considered to be out of the scope of this SLR and excluded. Finally, 51 studies were assessed for eligibility, among which 14 were excluded for having an average score lower than six and four were removed due to inappropriate research design or lack of clarity in results or in groups definition. A total of 33 studies were included in this SLR (**Fig. 1**).

The main characteristics of the selected studies are provided in **Table 1** (see **Table S2** for further information). From the 33 studies, 57.6% are from North America (USA and Canada), 30.3% are from Europe, and 12.1% are from Asia (China). The year of publication among the selected studies varies between 2003 and 2017, with 42.4% published in the last five years.

#### *3.2 Types of transplants, samples, and rejection analyzed*

The vast majority (93.4%) of selected studies focused on the analysis of transcriptome from a single type of graft, with only two papers (R. Chen et al. 2010; Khatri et al. 2013) investigating common rejection biomarkers across different types of transplants. Renal transplantation was the most common among papers (45.4%), followed by cardiac transplantation (36.4%) (**Fig. 2A**). Other organs investigated include intestinal, liver, lung, and cornea transplantation.

Regarding the type of samples used (**Fig. 2B**), we observed that most of the studies performed large-scale expression profiling of graft biopsy specimens (66.7%), followed by blood samples (39.4%). Three studies analyzed bronchoalveolar lavage samples in lung

transplant rejection (Gregson et al. 2015; Gimino et al. 2003; Lu et al. 2006). Moreover, seven studies analyzed more than one type of biological sample: five papers (Y. Chen et al. 2013; Lin et al. 2009; Alakulppi et al. 2008; Hollander et al. 2010; Flechner et al. 2004) analyzed tissue biopsy and blood samples, and two studies (R. Chen et al. 2010; Karason et al. 2006) collected graft biopsy and serum samples from transplanted patients. Finally, while most of the studies analyzed adult samples, three studies (Vitalone et al. 2015; Alakulppi et al. 2008; R. Chen et al. 2010) also included samples from pediatric patients who underwent cardiac or renal transplantation.

Due to the large heterogeneity in the definition of the rejection group among included papers, the lack of clarity in some papers as to the specific rejection phenotype investigated, and the clinical complexity in categorizing a rejection sample in antibody-mediated rejection (ABMR) or T-cell mediated rejection (TCMR), we chose to focus this review on the distinction between acute and chronic rejection. Notably, less than half of the studies included in our SLR (i.e., 13 out of 33) (Moher et al. 2009; Wilflingseder et al. 2013) specified the type of rejection according to the ABMR or TCMR phenotypes, supporting our decision to restrict categorization to acute and chronic rejection. Studies categorization into acute or chronic rejection was performed as specified by the corresponding original article, and in cases where this information was not clearly presented in the *Materials and Methods* section, the article was classified as "not specified". Most of the included studies (60.6%) focused on biomarkers related to acute rejection (**Fig. 2C**). In addition, three papers (Lu et al. 2006; Scherer et al. 2003; Rascio et al. 2015) aimed to identify biomarkers in chronic rejection, and ten papers did not specify the type of rejection tested (i.e., acute or chronic rejection) (Alakulppi et al. 2008; Y. Chen et al. 2013; Einecke et al. 2010; Horwitz et al. 2004; Huang, Sherman, and Lempicki 2009; Loupy et al. 2017; Shen and Gong 2015; Venner et al. 2015; Talayero et al. 2017).

### **3.3 Group comparisons**

Although a certain variation was observed in the specific comparisons examined by studies, most of them performed expression profiling comparing transplanted patients undergoing rejection to transplant patients without rejection and with stable graft function (**Table S2**). Type of comparison for these studies was defined as “Transplant patients with rejection vs Transplant patients without rejection” (Rej vs NonRej).

Moreover, one study (W. Chen et al. 2014) investigating renal transplantation rejection used as control group normal tissue samples from renal cortex obtained during resection operation of renal tumors. Whereas (Wilflingseder et al. 2013) compared transplant patients with rejection to a control group consisting of living donors, which according to authors, served as a parameter of optimal allograft function and morphology. In our analysis, these studies were categorized as “Transplant patients with rejection vs Living donors” (Rej vs LivDon).

Finally, we also observed studies that compared biopsy samples collected at different time points for transplant patients. Among these, (Flechner et al. 2004) analyzed the molecular differences between graft samples with acute rejection and samples collected in one year post-transplant biopsies, whereas (Karason et al. 2006) followed transplant patients for six months, comparing expression profiles from samples collected before, during, and after a rejection episode. Thus, we categorized these studies as “During rejection vs After rejection” (DurRej vs AftRej).

### ***3.4 Transcriptomic technologies used***

Twenty-five papers adopted microarray technology for transcriptomic profiling, with Affymetrix array platforms being the most common among these (**Table S2**). In addition, five studies employed low-density arrays and four studies used RNA-Seq. Most of the studies (90.90%) profiled a single type of RNA in their experiments, either mRNA (69.7%) or miRNA (21.2%). Two papers (Rascio et al. 2015; Vitalone et al. 2015) performed expression profiling

for both mRNAs and miRNAs. Although transcriptomic technologies are exploratory tools and require further experimental validation to confirm differential expression results, we observed that fourteen studies (Gregson et al. 2015; Loupy et al. 2017; Günther et al. 2009; Gimino et al. 2003; Sotolongo et al. 2010; Shen and Gong 2015; Bodez et al. 2016; Lu et al. 2006; Hollander et al. 2010; Venner et al. 2015; Shannon et al. 2012; Khatri et al. 2013; Einecke et al. 2010) did not perform any experimental validation of findings.

### ***3.5 Candidate gene and miRNA biomarkers for graft rejection***

Finally, we aimed at outlining the most promising genes and miRNAs biomarkers for allograft rejection based on results reported in the selected studies. For this purpose, all reported data regarding differential expression patterns observed from large-scale expression profiling were included in our analyses, independent of subsequent experiments via more narrowly focused assays for experimental validation. Since a quantitative approach to summarize results was not feasible due to the large diversity among data provided by authors, we classified each differentially expressed gene/miRNA as increased or decreased in rejection according to the fold-change value reported in the corresponding study, restricting our analysis to statistically significant findings reported by authors. We note that the large heterogeneity among the selected studies in terms of clinical setting, experimental design, large-scale expression profiling platform, and analytical methods used by authors to identify candidate biomarkers added extra complexity to this analysis. Therefore, we performed a qualitative description of results, focusing on summarizing existing evidence for candidate biomarkers in a cross-organ and transplant-specific analysis.

Data extracted from selected studies resulted in a list of 1517 unique (protein-coding) genes and 174 unique miRNAs presenting potential association with transplant rejection (**Table S3**). **Figure 3** summarizes the main statistics in terms of distribution of studies characteristics

for these biomarkers, reflecting the large heterogeneity mentioned above. The vast majority of genes (89.6%) and miRNAs (83.5%) reported as differentially expressed in graft rejection samples have support from a single study or experimental comparison (**Fig. 3A and 3B**). Only 0.9% of genes and 1% of miRNAs were reported as differentially expressed in four or more selected papers, with the maximum number of evidences per gene and miRNA equal to eight and four, respectively. Acute rejection was the main type of rejection addressed for differentially expressed genes and miRNAs considering papers that provided a clear description of samples phenotype (Fig. 3C and 3D). For both types of markers, the “*Rej vs NonRej*” group comparison was the most recurrent (**Fig. 3E and 3F**). In addition, whereas for genes a large variety of transplanted organs have been investigated (**Fig. 3G**), including studies that compared samples from multiple organs, the candidate miRNA biomarkers extracted from selected studies are related solely to renal and intestinal graft rejection (**Fig. 3H**). Finally, the type of sample used also presented large variety in studies investigating candidate gene biomarkers as compared to studies that evaluated miRNAs (**Fig. 3I and 3J**).

### 3.5.1 Cross-organ evidence of differential expression

In a cross-organ analysis (i.e., without restricting for type of transplant), we observed that 1105 genes (72.84%) presented increased expression in rejection group in relation to controls (**Fig. 4A**). Furthermore, only 28 of 1517 genes (1.84%) have experimental evidence for both increased expression and decreased expression in rejection, suggesting good consistency among findings from distinct studies and supporting the hypothesis of common molecular changes underlying rejection episodes across multiple organs (Khatri et al. 2013). Regarding miRNAs, 76 and 78 miRNAs presented increased expression and decreased expression, respectively, in graft rejection samples (**Fig. 4B**), with 11.49% of miRNAs having experimental evidence for both types of expression change. **Figures 4C and 4D** show the



observations for the 28 genes and 20 miRNAs with evidences supporting both types of expression changes. The majority of markers with opposite differential expression refer to biomarkers that responded differently in distinct type of organs. Only a few markers have opposite differential expression patterns (i.e., increased or decreased expression) observed for the same type of transplant.

Thirteen genes (**Fig. 5A, Table 2**) were consistently found as increased in rejection samples across distinct organ transplants by four or more experimental comparisons (as some papers perform multiple group comparisons, this does not necessarily reflect the number of supporting papers). Interestingly, all genes in this list were associated with rejection for at least two types of organ transplants. Regarding the type of rejection, genes *C4A*, *CD8A*, *GZMA*, *HLA-F*, *RARRES3*, and *PTPRC* were exclusively characterized in acute rejection samples, whereas *STAT1*, *C3*, and *AIF1* were detected in acute and chronic rejection. Moreover, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, and *GBP1* were described as differentially expressed in acute rejection, as well as by studies that did not clearly specified the type of rejection addressed (i.e., acute or chronic) within their Materials and Methods section. We note that *CXCL9*, *CXCL10*, and *STAT1* had the greatest evidence for increased expression in rejection according to revised papers.

From the seven miRNAs with three or more supporting experimental evidences, six were described as differentially expressed in a consistent manner (**Fig. 5B, Table 2**). Among these, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-155, hsa-miR-146a, and hsa-miR-223 were consistently increased in both intestinal and renal transplant rejection samples, whereas hsa-miR-28-5p was consistently decreased in the same grafts. Furthermore, hsa-miR-21 has increased expression in renal allograft rejection in all studies that reported this miRNA as candidate biomarker. Regarding the type of rejection, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a, and hsa-miR-223 were described solely for acute rejection, while the others have been characterized in more than one

type of rejection. Of note, hsa-miR-195 had rejection-related increased expression in renal graft samples according to three distinct studies (Rascio et al. 2015; Anglicheau et al. 2009; Matz et al. 2016) and was found to be decreased in intestinal allograft rejection by one study (Asaoka et al. 2012). Thus, although this miRNA was not considered to be consistently differentially expressed in this cross-organ analysis, it may represent a promising biomarker for renal transplant rejection.

### 3.5.2 Organ-specific evidence of differential expression

Next, we investigated genes and miRNAs with consistent expression changes observed by two or more experimental evidences in an organ-specific fashion. As our goal is to investigate rejection biomarkers potentially specific for a particular organ type, we have removed from this analysis the genes and microRNAs associated with more than one type of transplant according to the previous analysis, since they are not candidates for organ-specific markers. However, we emphasize that this definition is based on evidence collected from the literature, which may not be exhaustive and whose results may be influenced by characteristics of the reviewed studies, such as sample size and clinical characteristics of the samples.

A total of 20 and 22 genes were uniquely observed in cardiac and renal allograft rejection, respectively (**Table 3**). Among these, *CFLAR* had decreased expression in blood samples of cardiac transplant patients undergoing acute rejection in relation to controls (Shen and Gong 2015; Shannon et al. 2012; Horwitz et al. 2004), and *LTF* expression was observed to be increased in both biopsy and blood samples from patients with acute and chronic rejection after renal transplantation (Einecke et al. 2010; Flechner et al. 2004; Rascio et al. 2015).

In relation to organ-specific miRNAs, 14 and 5 miRNAs were consistently altered in renal and intestinal transplant rejection, respectively (**Table 3**). In particular, hsa-miR-195 was observed to have decreased expression in blood and biopsy samples of kidney transplant

recipients with acute and chronic rejection by three studies (Rascio et al. 2015; Matz et al. 2016; Günther et al. 2009). Although we highlight these genes and miRNAs as candidate organ-specific biomarkers of graft rejection according to evidence collected from the revised papers, we note that further biomarkers validation with standard experimental techniques such as qPCR are needed to confirm their clinical value for rejection monitoring.

### ***3.6 Enriched pathways for consistently dysregulated genes***

To obtain insight into the biological significance of the consistently differentially expressed genes in allograft rejection, we conducted a functional enrichment analysis using DAVID v6.8. The gene lists of cross-organ and transplant-specific (i.e., cardiac and renal allograft rejection) candidate biomarkers identified in our SLR were individually submitted for pathways annotation. Results were summarized in Table 4.

Ten out of the 13 genes identified as consistently dysregulated across distinct allografts were recognized by DAVID tool. Using the default analytical parameters, 10 pathways were associated with this gene list, of which five achieved statistical significance (p-value < 0.05). The most significantly enriched KEGG term was toll-like signaling pathway (hsa04620), whereas the highest fold enrichment was observed for primary immunodeficiency (hsa05340). Additionally, cell adhesion molecules (CAMs) (hsa04514) and chemokine signaling pathway (hsa04062) were among the pathways strongly associated to genes dysregulated in multiple graft types, while antigen processing and presentation (hsa04612) and complement and coagulation cascades (hsa04610) presented a non statistically significant association with genes *CD8A* and *HLA-F*, and *C4A* and *C3*, respectively. We note that the lack of statistical significance after p-values adjustment using the Benjamini and Hochberg method may be, to some extent, related to the small size of gene lists, which affects the statistical power of the test.

Regarding the gene lists derived from the organ-specific analysis, functional enrichment analysis returned nine and five KEGG terms with potential association with the candidate cardiac and renal allograft rejection-specific biomarkers highlighted in our SLR. Among these, we stress the involvement of genes consistently dysregulated in cardiac allograft rejection in the pathways of *antigen processing and presentation* (hsa04612) and allograft rejection (hsa05330), and the participation of genes consistently altered in renal allograft rejection in the biological processes of *complement and coagulation cascades* (hsa04610) and PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151).

### 3.7 Quality assessment

The methodological quality scores of the included studies according to the adapted Downs and Black checklist are provided in Table S4. The average score was 67.13% and 11 out of the 33 studies achieved a score higher than 70% (higher scores indicate higher quality). Two studies scored less than 50% on their evaluation due to poor information or methodological deficiencies regarding external and internal validity (Liu et al. 2015; Sotolongo et al. 2010). In general, the studies were very clear in relation to their objectives, hypotheses and main findings. Most of the studies properly described the main confounders and performed adequate adjustment for these factors, as well as presented reliable and valid outcome measures. Nonetheless, few studies have clearly detailed how patients were selected for inclusion in the study in order to allow assessment of representativeness in relation to the source population.

## 4. Discussion

In this paper, we systematically reviewed 33 studies that performed transcriptome profiling for biomarkers discovery in transplant rejection to summarize their characteristics and

main findings regarding candidate gene and miRNA biomarkers of rejection. Several types of grafts were already investigated through this approach, with cardiac and renal transplantation being the most recurrent ones. Most studies focused on the analysis of a single type of transplant, although initial efforts were also observed in the investigation of a common rejection module across distinct tissues. In addition, acute rejection was the prominent type of rejection among the selected papers. Nonetheless, we emphasize that most papers (i.e., 60.6%) were unclear about the specific type of rejection (i.e., ABMR/TCMR and acute/chronic phenotypes) presented by their samples, hindering a proper and detailed categorization for this analysis.

While large-scale mRNA expression has been investigated for all types of graft rejection reported in this review, miRNA expression profiling has only been performed for intestinal and renal transplantation, thus presenting an opportunity for future research. Overall, we observed a good consistency among findings from distinct studies for both mRNAs and miRNAs, with very few candidate biomarkers presenting opposite differential expression patterns detected for the same graft. This reinforces the potential of transcriptomic technologies in generating precise hypotheses for biomarkers discovery. Nonetheless, we noted a lack of standards regarding protocols for material collection and data analysis, which coupled with the large studies' heterogeneity in terms of clinical setting and experimental design, hinders the systematic characterization of promising biomarkers based on integration of findings from previous research. Furthermore, although transcriptomic techniques are exploratory tools, about half of the studies did not perform consolidated experimental validation tests (e.g., RT-qPCR, ELISA, immunohistochemistry), limiting the reliability and clinical application of their findings and demanding new experimental research in this direction.

Our analyses have originated a collection of candidate biomarkers for distinct types of graft rejection, which may be useful for guiding future experimental studies. Noteworthy, the genes *CXCL9*, *CXCL10*, *GZMA*, *RARRES3*, *PTPRC*, *CD8A*, and *C3* were highlighted as

promising biomarkers both in our SLR and in a previous review (Halloran, Famulski, and Reeve 2016), increasing the confidence regarding their relevance in the clinical course of transplanted subjects. However, the previous study (Halloran, Famulski, and Reeve 2016) concerns mainly biopsy samples of kidney transplants, even though the authors emphasize their results might be extrapolated to heart, lung, and liver transplants.

*CXCL9* and *STAT1* were among the most recurrent genes reported by selected studies, presenting increased expression in rejection samples. Positive regulation of these genes was confirmed in a previous study related to cardiac allograft acute cellular rejection. *CXCL9* acts in the state of growth, movement or activation of cells joining in immune and inflammatory responses (Wu et al. 2016). Several studies in the literature point this gene as a biomarker of multiple organs rejection, with positive regulation observed in cardiac (Karason et al. 2006), renal (Lo et al. 2011), and liver biopsies during acute rejection (Kumar et al. 2018). *STAT1* mediates the expression of several genes through signal transduction and transcription activation, including genes involved in the cellular response to interferons (IFNs), cytokines and other growth factors, which are important for cellular viability in response to different cellular and pathogenic stimuli (Chmielewski et al. 2016). Interestingly, *STAT1* is on the central axis of the regulation of 11 genes identified as a common rejection module in acute multiple organ rejection in a previous meta-analysis (Khatri et al. 2013).

The biological interpretation of the candidate gene biomarkers derived from our organ-specific analysis using pathways enrichment tools suggested an association of consistently dysregulated genes in cardiac transplant rejection with antigen processing and presentation, allograft rejection, and graft-versus-host disease pathways. The first pathway obtained the highest number of gene associations and is related to the T cells of the immune system, which are activated in the graft rejection process. According to Alegre et al. (2016) (Alegre, Lakkis,

and Morelli 2016), the activation of the graft-reactive T cells is based on the presentation of antigens derived from transplantation by mature dendritic cells.

Moreover, the toll-like receptor signaling pathway was significantly enriched for the 13 genes with consistent expression changes in multiple organs. Toll-like receptors play a role in the adaptive immune system, mainly in the initial response to tissue injury, recognizing molecular patterns associated with pathogens; they are expressed in immune cells, such as dendritic cells (Kawasaki and Kawai 2014). Therefore, it may be directly related to the antigen processing and presentation pathway observed in genes associated with cardiac transplant rejection. By comparing the pathways enriched among the differentially expressed genes in an organ-specific analysis with those found for the 13 consistently dysregulated genes obtained from the cross-organ analysis, we observed the association of complement and coagulation cascades with candidate biomarkers from renal transplant rejection and for multiple-organs rejection. This is consistent with the fact that coagulation factors play an important role in the process of inflammatory response and acute rejection (Freue et al. 2010).

Several studies also emphasize microRNAs as useful biomarkers in different pathological conditions due to the accurate and effective detection of these molecules in biofluids. Thus, there is an increasing interest in the discovery of microRNAs and other non-coding RNA biomarkers (Sukma Dewi et al. 2017). An increased expression of hsa-miR-155 in transplant rejection samples was detected by four selected studies. This miRNA is associated with the regulation of cytokine production in T and B cells, among other functions related to the humoral and cellular rejection process in solid organ transplantation (Seddiki et al. 2014). Among the studies consolidating its potential as a biomarker for rejection (Duong Van Huyen et al. 2014), evaluated their differential expression at both tissue and serological levels in the rejection of transplanted patients.

Moreover, hsa-miR-142-3p, which is also increased in acute rejection after renal and intestinal transplantation, is a T-cell regulator that promotes tolerance in solid organs transplantation (Danger et al. 2012). Since it originates from immune cells, not from graft tissue, it allows predicting rejection before organ damage (Sukma Dewi et al. 2017). Peripheral blood and urine samples from renal transplants demonstrate a distinct pattern of expression in the context of acute tubular necrosis following renal transplantation; so this miRNA has the potential to be used as a non-invasive biomarker in renal graft dysfunction (Domenico et al. 2017).

It has been previously discussed that avoiding or reducing the use of routine biopsies would improve patients' life quality and long-term survival (Anglicheau et al. 2016). Thus, extensive research has been conducted to implement non-invasive biomarkers into clinical routine. For instance, , peripheral blood is considered a source of accessible samples to predict immune response for transplanted patients, being useful for monitoring the immunological and metabolic status of graft recipients both in short and long-periods after transplantation (Heidt et al. 2011). Plasma and serum samples are good sources of information since individual blood protein levels represent a sum of multiple events that occur in all organ systems (Paczesny 2018), allowing frequent evaluation of a patient and favoring the follow-up of the pathological evolution.

It must also be noted that patients prefer non-invasive procedures, as demonstrated by (Khush and Zarafshar 2017), in which transplant patients who were monitored through blood gene expression profile and underwent fewer biopsies reported higher satisfaction.

In line with this observation, several studies included in this SLR performed transcriptome profiling for blood samples. The high consistency among reported findings, despite studies heterogeneity, suggest that transcriptomic technologies may play an important role in the search for non-invasive biomarkers. Nonetheless, only a few studies simultaneously



analyzed blood and biopsy samples to identify peripheral transcriptomic biomarkers that correlate with graft damage and that might be measurable in early stages of rejection episodes. In addition, confirming the clinical usefulness of non-invasive biomarkers requires adequate control for inherent blood heterogeneity and experimental confounders, since cellular components of peripheral blood quickly respond to exogenous stimuli that may induce gene expression changes. These points demand further investigation to advance in the search for non-invasive biomarkers of transplant rejection.

## **5. Study Limitations**

Despite following a definite and careful protocol for the elaboration of this SLR, there are limitations intrinsic to this type of study that are aggravated by challenges specific to the current state of development of the omics technologies. In particular, the lack of standardization of experimental methodology and data analysis methods among included papers, their varied sample sizes, and the low incidence of experimental validation of omics-derived molecular signatures, are important issues that inevitably influence our results. Establishing a minimal sample size for studies selection could result in more robust conclusions, nonetheless, it is hard to define the ideal sample size. Moreover, adding this novel criterion would further reduce the number of selected articles, which in turn could hinder our qualitative summary of the related literature.

The large heterogeneity in terms of experimental design observed for selected papers (e.g., group comparisons carried out, adopted criteria for rejection, selection of control samples) also posed difficulties in the process of data extraction and analysis. Given the clinical complexity in defining the specific rejection phenotype, we decided to categorize the rejection samples reported by each paper as described in the *Materials and Methods* section of the corresponding

original study. Nonetheless, differences observed in terms of case mix for both rejection and non-rejection groups, as well as the lack of clarity of original studies regarding this methodological detail, limited a less general categorization of rejection type, such that in our descriptive analysis the type of rejection was classified as acute or chronic. About 61% of papers did not classify their samples according to ABMR and/or TCMR phenotypes, and very few papers actually addressed both types of rejection, justifying our decision. Due to scarcity of data, and considering that selectivity for ABMR and TCMT requires having large numbers of samples of the opposite rejection phenotype in the control group (Nissaisorakarn et al. 2018).

## **6. Conclusions**

Analysis of the global spectrum of molecular changes in distinct types of transplants or rejections provides useful insights into the pathophysiology of rejection, including the identification of shared mechanisms across distinct organ transplants that may allow higher specificity and sensitivity in diagnostic. Transcriptome profiling is being increasingly applied for this purpose and is a promising technique to advance the search for transplant rejection biomarkers. This systematic review aimed to contribute with further progress in the field by performing a comprehensive descriptive analysis of the related literature to help the identification of consolidated knowledge and future research directions. We also provided a summary of existing evidence regarding differentially expressed genes and miRNAs published by previous works as means to highlight most promising candidates of transplant rejection. Although transcriptomes are tools of an exploratory nature, a high consistency was observed among studies regarding organ-specific and cross-organ candidate biomarkers. CXCL9, CXCL10, STAT1, miR-142-3p, and hsa-miR-155 had the largest and consistent body of evidence for increased expression in rejection, whereas hsa-miR-28-5p was consistently

decreased in this condition. Moreover, our results showed that is still room for characterization of miRNomes in transplant rejection, since studies in this direction were limited, especially in terms of types of organ investigated. Despite our study limitations, the collection of promising genes and miRNAs biomarkers provided by our SLR, with their corresponding differential expression patterns, is a valuable resource to derive new hypotheses on rejection diagnostic tools to be tested by further confirmatory experiments. Whereas the search to fill existing knowledge gaps has proved to be a difficult task, aggravated by studies' procedural heterogeneity and open challenges in validating transcriptomic-based results, we conclude that transcriptomics analysis can be a robust tool and have a remarkable applicability in the development of biomarkers that may accurately identify patients at high risk of graft loss due to rejection.

**Acknowledgments:** SVP and RHB acknowledge scholarships from CNPq.

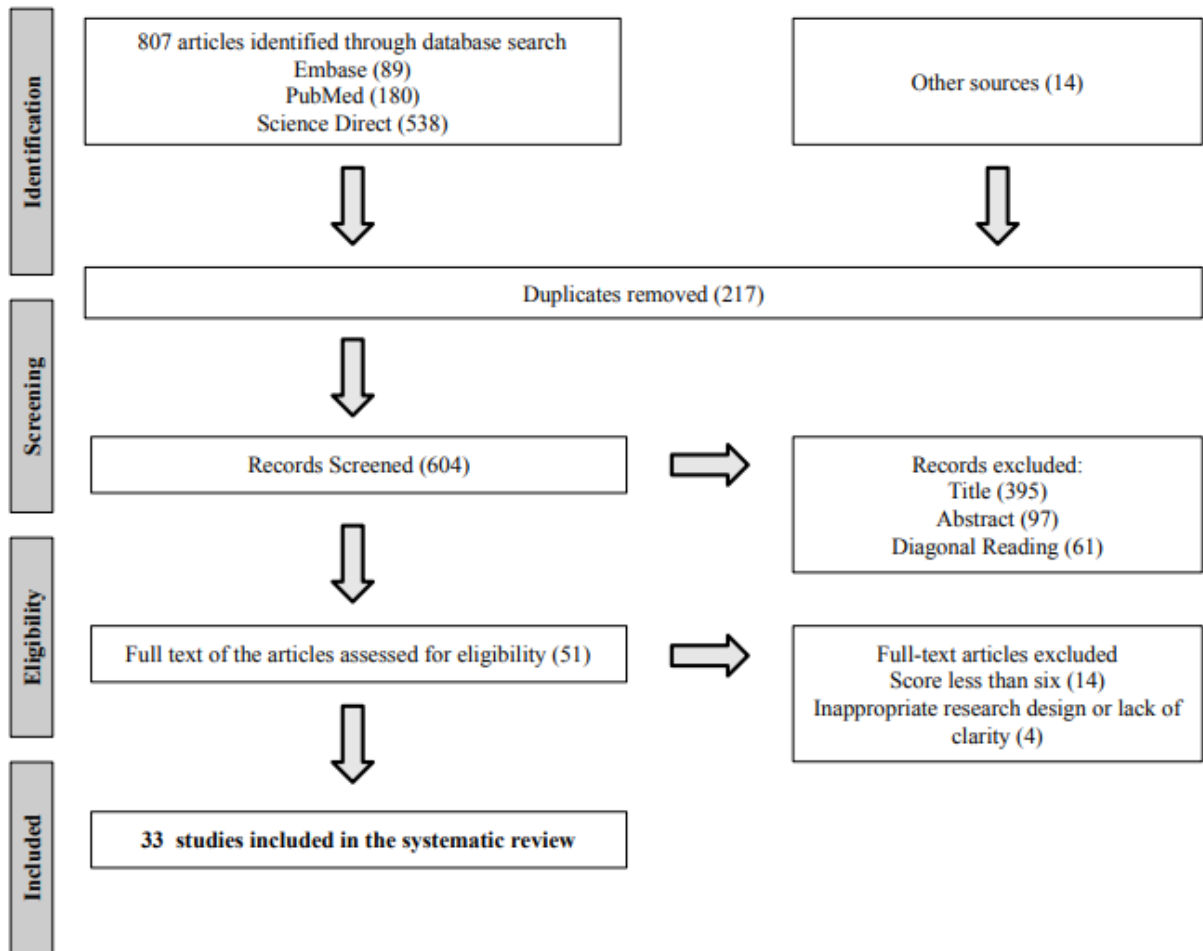
#### **Compliance with Ethical Standards**

**Funding:** No sources of funding were received for this systematic review.

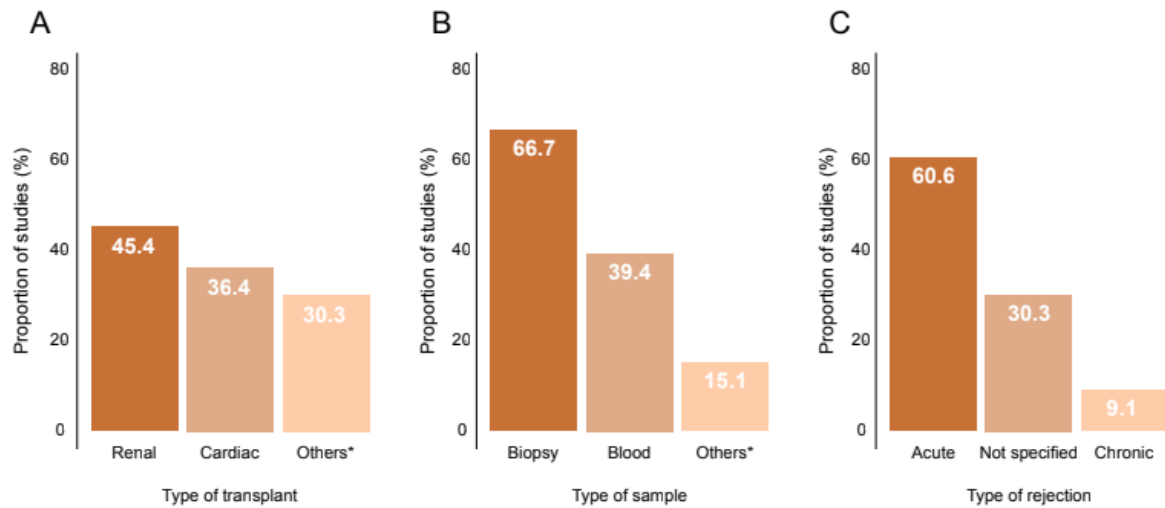
**Conflict of interest:** SVP, GHP, RHB, RC, and MRM declare that they have no conflict of interest.

#### **Figure**

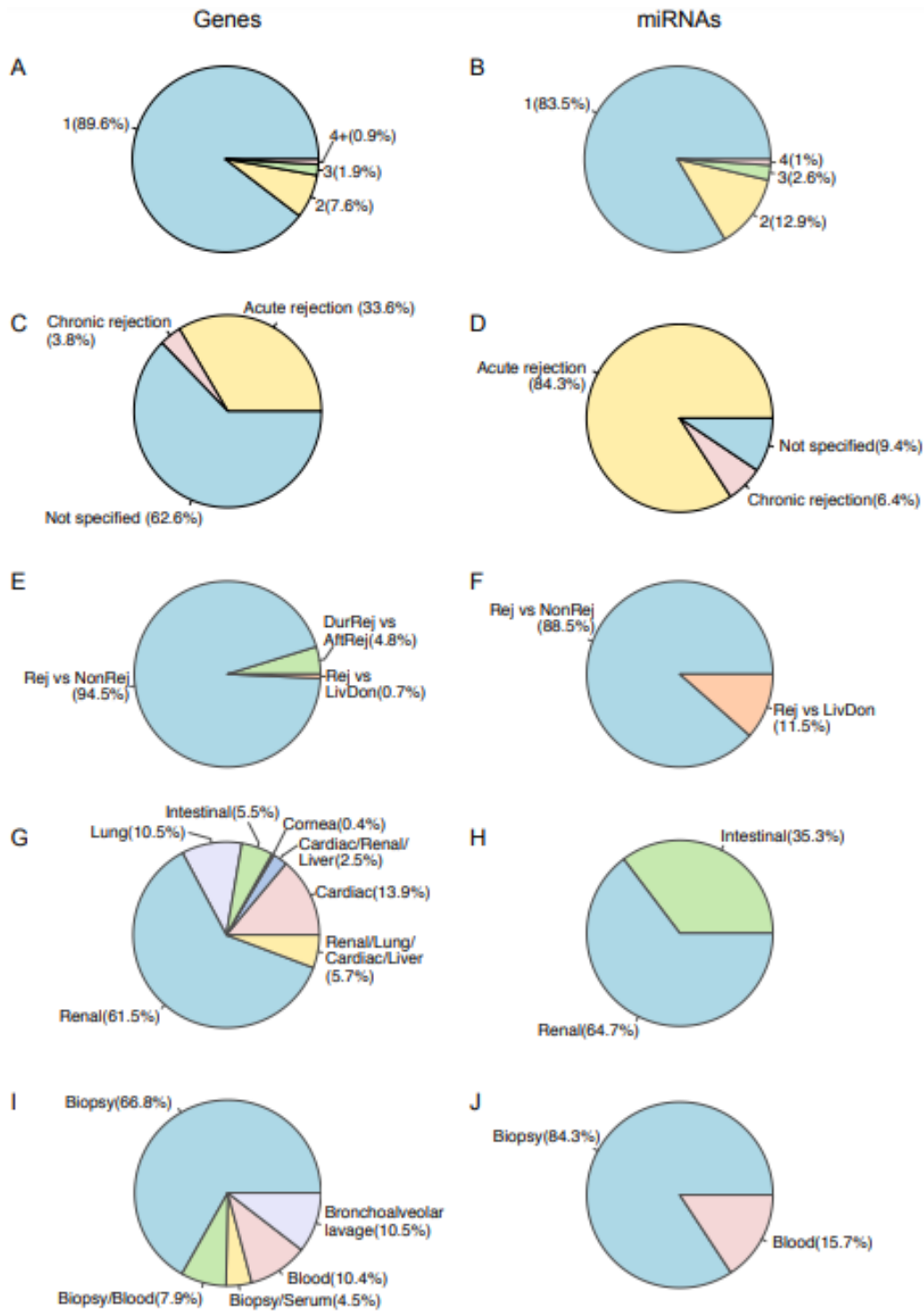
**Figure 1.** PRISMA flow diagram summarizing the steps of studies selection.



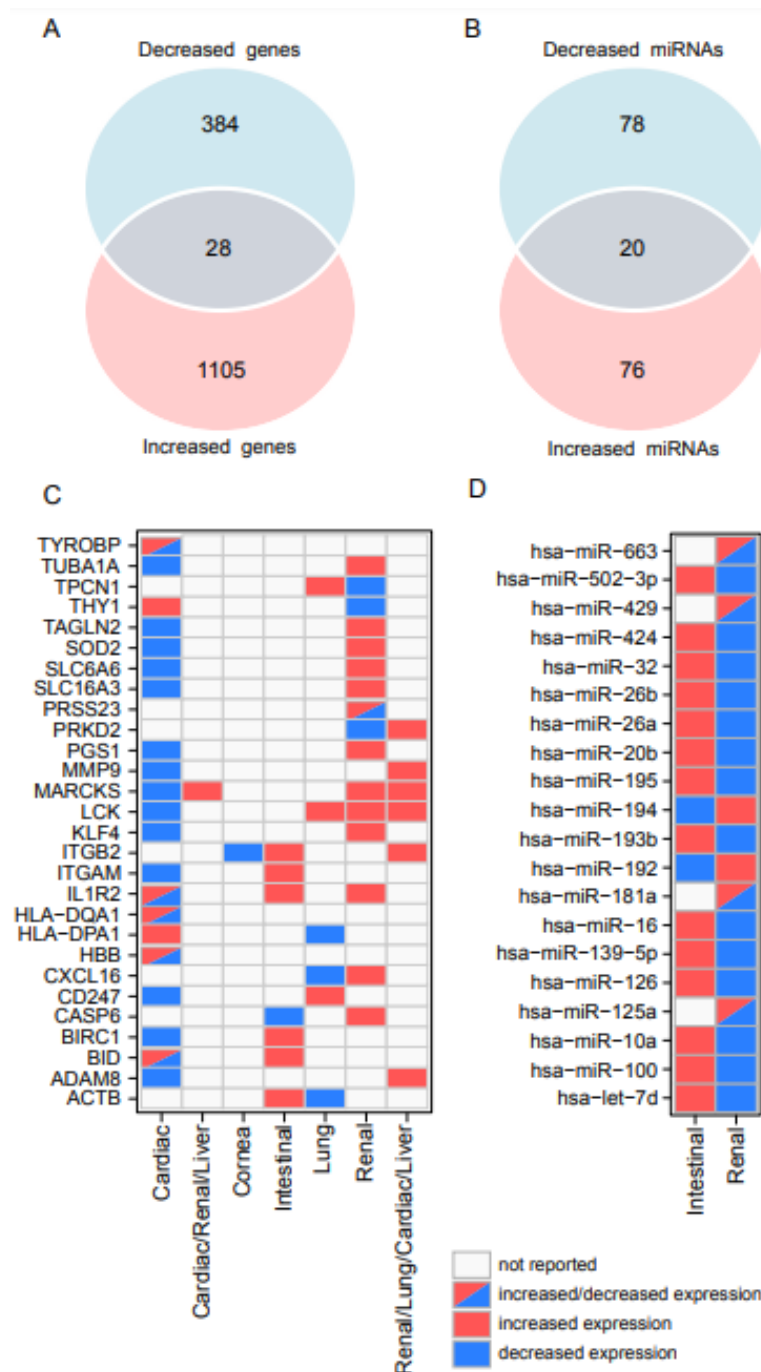
**Figure 2.** Main characteristics of the selected studies related to A) type of transplant, B) type of sample, and C) type of rejection analyzed.



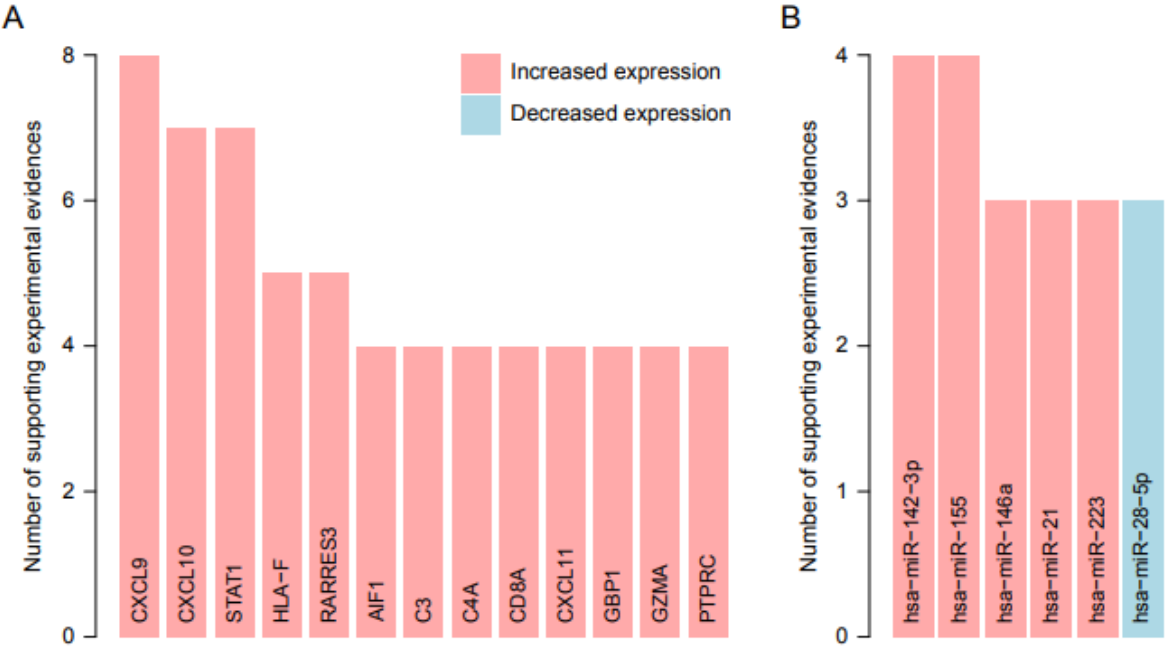
**Figure 3.** Summary of the main characteristics of the candidate biomarkers collected in this SLR regarding their original study design. Genes are reported in the left column, whereas miRNAs are in the right column. A) and B) number of supporting experimental evidences; C) and D) type of rejection; E) and F) type of group comparison; G) and H) transplanted organ; I) and J) type of sample analyzed.



**Figure 4.** Comparison of differential expression patterns observed for A) genes and B) miRNAs among all selected studies in a cross-organ analysis. List of C) Genes and D) miRNAs that had evidences supporting both types of expression changes. Increased expression is represented by red shade, while decreased expression is denoted by blue shade.



**Figure 5.** List of A) genes and B) miRNAs described as differentially expressed in a consistent manner across all selected studies, along with the number of supporting evidences. Red denotes increased expression in rejection, whereas blue denotes decreased expression in rejection.



**Tables**



**Table 1.** Main characteristics of the selected studies.**Table 1**

Reference	Country	Type of transplant	Type of sample	Target analyzed
Alakulppi et al. (2008)	Finland	Renal	Biopsy/Blood	Gene
Anglicheau et al. (2009)	USA	Renal	Biopsy	miRNA
Asaoka et al. (2011)	USA	Intestinal	Biopsy	Gene
Asaoka et al. (2012)	USA	Intestinal	Biopsy	miRNA
Bodez et al. (2016)	France	Cardiac	Biopsy	Gene
Chen et al. (2010)	USA	Cardiac/Renal/Liver	Biopsy/Serum	Gene
Chen et al. (2013)	China	Cardiac	Biopsy/Blood	Gene
Chen et al. (2014)	China	Renal	Biopsy	Gene
Deng et al. (2006)	USA	Cardiac	Blood	Gene
Einecke et al. (2010)	Canada	Renal	Biopsy	Gene
Flechner et al. (2004)	USA	Renal	Biopsy/Blood	Gene
Gimino et al. (2003)	USA	Lung	Bronchoalveolar lavage	Gene
Gregson et al. (2015)	USA	Lung	Bronchoalveolar lavage	Gene
Gunther et al. (2009)	Canada	Renal	Blood	Gene
Hollander et al. (2010)	Canada	Cardiac	Biopsy/Blood	Gene
Horwitz et al. (2004)	USA	Cardiac	Blood	Gene
Huang, Tullo, and Hillarby (2009)	UK	Cornea	Blood	Gene
Karason et al. (2006)	Sweden	Cardiac	Biopsy/Serum	Gene
Khatri et al. (2013)	USA	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy	Gene
Lin et al. (2009)	Canada	Cardiac	Biopsy/Blood	Gene
Liu et al. (2015)	China	Renal	Biopsy	miRNA
Loupy et al. (2017)	France	Cardiac	Biopsy	Gene
Lu et al. (2006)	USA	Lung	Bronchoalveolar lavage	Gene
Matz et al. (2016)	Germany	Renal	Blood	miRNA
Rascio et al. (2015)	Italy	Renal	Blood	Gene/miRNA
Scherer et al. (2003)	Switzerland	Renal	Biopsy	Gene
Shannon et al. (2012)	Canada	Cardiac	Blood	Gene
Shen and Gong (2015)	China	Cardiac	Blood	Gene
Sotolongo et al. (2010)	USA	Intestinal	Biopsy	miRNA
Talayero et al. (2017)	Spain	Intestinal	Biopsy	Gene
Venner et al. (2015)	Canada	Renal	Biopsy	Gene
Vitalone et al. (2015)	USA	Renal	Biopsy	miRNA
Wilflingseder et al. (2013)	Austria	Renal	Biopsy	miRNA

**Table 2.** Studies characteristics for genes and miRNAs consistently found with increased expression or decreased expression among selected studies in a cross-organ analysis.

**Table 2**

Gene/miRNA	Expression	References	Transplant	Sample
CXCL9	Increased	Rascio et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Blood
		Chen et al. (2010) <sup>1</sup>	Cardiac/Renal/Liver	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>2</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		LoIncreasedy et al. (2017) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
		Bodez et al. (2016) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
		Khatri et al. (2013) <sup>1</sup>	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy
		Deng et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Blood
STAT1	Increased	Rascio et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Blood
		Chen et al. (2010) <sup>1</sup>	Cardiac/Renal/Liver	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>2</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Loupy et al. (2017) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
		Bodez et al. (2016) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
		Khatri et al. (2013) <sup>1</sup>	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy
		Einecke et al. (2010) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
CXCL10	Increased	Karason et al. (2006) <sup>2</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Loupy et al. (2017) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
		Khatri et al. (2013) <sup>1</sup>	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy
		Deng et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Blood
		Asaoka et al. (2011) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
		Venner et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
HLA-F	Increased	Chen et al. (2010) <sup>1</sup>	Cardiac/Renal/Liver	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>2</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Khatri et al. (2013) <sup>1</sup>	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy
		Flechner et al. (2004) <sup>2</sup>	Renal	Biopsy/Blood
RARRES3	Increased	Chen et al. (2010) <sup>1</sup>	Cardiac/Renal/Liver	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>2</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Gimino et al. (2003) <sup>1</sup>	Lung	Biopsy/Blood

Gene/miRNA	Expression	References	Transplant	Sample
		Bodez et al. (2016) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
AIF1	Increased	Loupy et al. (2017) <sup>2</sup>	Cardiac	Biopsy
		Bodez et al. (2016) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
		Khatri et al. (2013) <sup>1</sup>	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy
		Flechner et al. (2004) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy/Blood
C3	Increased	Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>2</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Einecke et al. (2010) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Asaoka et al. (2011) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
C4A	Increased	Gregson et al. (2015) <sup>1</sup>	Lung	Bronchoalveolar lavage
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Gimino et al. (2003) <sup>2</sup>	Lung	Bronchoalveolar lavage
CD8A	Increased	Bodez et al. (2016) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
		Khatri et al. (2013) <sup>2</sup>	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy
		Deng et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Blood
		Flechner et al. (2004) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy/Blood
GBP1	Increased	Rascio et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Blood
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Karason et al. (2006) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy/Serum
		Alakulppi et al. (2008) <sup>2</sup>	Renal	Biopsy/Blood
GZMA	Increased	Gimino et al. (2003) <sup>1</sup>	Lung	Bronchoalveolar lavage
		Bodez et al. (2016) <sup>1</sup>	Cardiac	Biopsy
		Khatri et al. (2013) <sup>1</sup>	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy
		Flechner et al. (2004) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy/Blood
PTPRC	Increased	Chen et al. (2010) <sup>1</sup>	Cardiac/Renal/Liver	Biopsy/Serum
		Khatri et al. (2013) <sup>1</sup>	Renal/Lung/Cardiac/Liver	Biopsy
		Alakulppi et al. (2008) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy/Blood
		Asaoka et al. (2011) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
hsa-miR-155	Increased	Sotolongo et al. (2010) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
		Anglicheau et al. (2009) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Liu et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Wilflingseder et al. (2013) <sup>3</sup>	Renal	Biopsy
hsa-miR-142-3p	Increased	Anglicheau et al. (2009) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Sotolongo et al. (2010) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
		Asaoka et al. (2012) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
		Vitalone et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy

hsa-miR-146a	Increased	Anglicheau et al. (2009) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Asaoka et al. (2012) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
		Liu et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
<b>Gene/miRNA</b>	<b>Expression</b>	<b>References</b>	<b>Transplant</b>	<b>Sample</b>
hsa-miR-21	Increased	Anglicheau et al. (2009) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Liu et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Wilflingseder et al. (2013) <sup>3</sup>	Renal	Biopsy
hsa-miR-223	Increased	Anglicheau et al. (2009) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Asaoka et al. (2012) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
		Liu et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
hsa-miR-195	Decreased	Anglicheau et al. (2009) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Rascio et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Blood
		Matz et al. (2016) <sup>1</sup>	Renal	Blood
hsa-miR-28-5p	Decreased	Sotolongo et al. (2010) <sup>1</sup>	Intestinal	Biopsy
		Vitalone et al. (2015) <sup>1</sup>	Renal	Biopsy
		Matz et al. (2016) <sup>1</sup>	Renal	Blood

1- *Rej vs NonRej*; 2- *DurRej vs AftRej*; 3- *Rej vs LivDon*



**Table 3.** Studies characteristics for genes and miRNAs with consistent expression changes observed by two or more experimental evidences in an organ-specific analysis.

**Table 3**

Gene/miRNA	Transplant	Regulation	Sample	Rejection	References
ADM	Cardiac	Decreased	Blood	Not specified	Shen and Gong (2015)
ATP6V1G1		Decreased	Biopsy/Serum	Acute rejection	Karason et al. (2006)
B4GALT5		Decreased	Blood	Acute rejection	Shen and Gong (2015)
BTF3		Increased	Blood	Not specified	Horwitz et al. (2004);Shen and Gong (2015)
CD74		Increased	Biopsy;Biopsy/Blood	Acute rejection; Not specified	Bodez et al. (2016);Chen et al. (2013)
CD97		Decreased	Blood	Not specified	Shen and Gong (2015)
CFLAR		Decreased	Blood	Not specified; Not specified; Acute rejection	Horwitz et al. (2004);Shen and Gong (2015);Shannon et al. (2012)
CSF3R		Decreased	Blood	Not specified	Shen and Gong (2015)
FPR1		Decreased	Blood	Not specified	Shen and Gong (2015)
HBA1		Decreased	Biopsy/Serum	Acute rejection	Karason et al. (2006)
HLA-C		Increased	Biopsy/Serum	Acute rejection	Karason et al. (2006)
HLA-DRB1		Increased	Biopsy;Biopsy/Blood	Not specified	Loupy et al. (2017);Chen et al. (2013)
HLA-J		Increased	Biopsy/Serum	Acute rejection	Karason et al. (2006)
IGFBP4		Increased	Biopsy/Serum	Acute rejection	Karason et al. (2006)
ITM2B		Decreased	Biopsy/Serum	Acute rejection	Karason et al. (2006)
NPPA		Increased	Biopsy/Serum	Acute rejection	Karason et al. (2006)
PSME2		Increased	Biopsy/Serum	Acute rejection	Karason et al. (2006)
SLC16A3		Decreased	Blood	Not specified; Acute rejection	Horwitz et al. (2004);Shannon et al. (2012)
TMEM164		Decreased	Blood	Not specified	Shen and Gong (2015)
UQCRB		Increased	Blood	Not specified	Horwitz et al. (2004);Shen and Gong (2015)

Gene/miRNA	Transplant	Regulation	Sample	Rejection	References
C19orf22	Renal	Increased	Biopsy;Biopsy/Blood	Not specified	Einecke et al. (2010);Alakulppi et al. (2008)
C1QA		Increased	Blood;Biopsy	Chronic rejection; Not specified	Rascio et al. (2015);Einecke et al. (2010)
C1QB		Increased	Blood;Biopsy/Blood	Chronic rejection; Acute rejection	Rascio et al. (2015);Flechner et al. (2004)
CAV1		Increased	Biopsy	Not specified	Einecke et al. (2010);Venner et al. (2015)
CD163		Increased	Biopsy;Biopsy/Blood	Not specified; Acute rejection	Einecke et al. (2010);Flechner et al. (2004)
CDH6		Increased	Biopsy	Not specified; Acute rejection	Einecke et al. (2010);Chen et al. (2014)
DARC		Increased	Biopsy	Not specified	Einecke et al. (2010);Venner et al. (2015)
ENTPD1		Increased	Biopsy;Biopsy/Blood	Not specified; Acute rejection	Einecke et al. (2010);Flechner et al. (2004)
GNG11		Increased	Biopsy	Not specified	Einecke et al. (2010);Venner et al. (2015)
IFITM1		Increased	Biopsy;Biopsy/Blood	Not specified; Acute rejection	Einecke et al. (2010);Flechner et al. (2004)
IFITM2		Increased	Blood;Biopsy	Chronic rejection; Not specified	Rascio et al. (2015);Einecke et al. (2010)
LCN2		Increased	Biopsy;Biopsy/Blood	Not specified; Acute rejection	Einecke et al. (2010);Flechner et al. (2004)
LIMK2		Increased	Blood;Biopsy	Acute rejection; Not specified	Gunther et al. (2009);Einecke et al. (2010)
LTF		Increased	Blood;Biopsy;Biopsy/Blood	Chronic rejection; Not specified; Acute rejection	Rascio et al. (2015);Einecke et al. (2010);Flechner et al. (2004)
PARP9		Increased	Blood;Biopsy	Chronic rejection; Not specified	Rascio et al. (2015);Einecke et al. (2010)
PRLR		Decreased	Biopsy	Chronic rejection; Not specified	Scherer et al. (2003);Einecke et al. (2010)
PRO1073		Increased	Blood;Biopsy/Blood	Acute rejection; Not specified	Gunther et al. (2009);Alakulppi et al. (2008)
RAPGEF5		Increased	Biopsy	Not specified	Einecke et al. (2010);Venner et al. (2015)
SERPING1		Increased	Blood;Biopsy	Chronic rejection; Not specified	Rascio et al. (2015);Einecke et al. (2010)
SLC6A6		Increased	Blood;Biopsy	Acute rejection; Not specified	Gunther et al. (2009);Einecke et al. (2010)
TncRNA	Increased	Blood;Biopsy/Blood	Acute rejection; Not specified	Gunther et al. (2009);Alakulppi et al. (2008)	
VWF	Increased	Biopsy	Not specified	Einecke et al. (2010);Venner et al. (2015)	
hsa-miR-16	Intestinal	Increased	Biopsy	Acute rejection	Sotolongo et al. (2010);Asaoka et al. (2012)
hsa-miR-19a		Increased	Biopsy	Acute rejection	Sotolongo et al. (2010);Asaoka et al. (2012)
hsa-miR-26a		Increased	Biopsy	Acute rejection	Sotolongo et al. (2010);Asaoka et al. (2012)
hsa-miR-26b		Increased	Biopsy	Acute rejection	Sotolongo et al. (2010);Asaoka et al. (2012)
hsa-miR-192		Decreased	Biopsy	Acute rejection	Sotolongo et al. (2010);Asaoka et al. (2012)
<b>Gene/miRNA</b>	<b>Transplant</b>	<b>Regulation</b>	<b>Sample</b>	<b>Rejection</b>	<b>References</b>

hsa-miR-10a	Renal	Decreased	Blood;Biopsy	Chronic rejection; Acute rejection	Rascio et al. (2015);Anglicheau et al. (2009)
hsa-miR-10b		Decreased	Biopsy	Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Liu et al. (2015)
hsa-miR-27b		Decreased	Biopsy	Acute rejection; Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Wilflingseder et al. (2013)
hsa-miR-30a-3p		Decreased	Biopsy	Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Liu et al. (2015)
hsa-miR-30c		Decreased	Biopsy	Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Liu et al. (2015)
hsa-miR-32		Decreased	Biopsy	Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Liu et al. (2015)
hsa-miR-125a		Decreased	Biopsy	Acute rejection; Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Wilflingseder et al. (2013)
hsa-miR-126		Decreased	Biopsy;Blood	Acute rejection; Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Matz et al. (2016)
hsa-miR-130a		Decreased	Biopsy;Blood	Acute rejection; Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Matz et al. (2016)
hsa-miR-148b		Decreased	Blood	Chronic rejection; Acute rejection	Rascio et al. (2015);Matz et al. (2016)
hsa-miR-181c		Decreased	Blood;Biopsy	Chronic rejection; Acute rejection	Rascio et al. (2015);Anglicheau et al. (2009)
hsa-miR-193b		Decreased	Biopsy	Acute rejection; Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Wilflingseder et al. (2013)
hsa-miR-195		Decreased	Blood;Biopsy	Chronic rejection; Acute rejection; Acute rejection	Rascio et al. (2015);Anglicheau et al. (2009);Matz et al. (2016)
hsa-miR-650		Increased	Biopsy	Acute rejection	Anglicheau et al. (2009);Liu et al. (2015)



**Table 4.** Functional enrichment of candidate gene biomarkers identified in the cross-organ and organ-specific analyses.

**Table 4**

Gene List	Term	Count	Genes	% Gene List	P-value	Adjusted P-value	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment
Genes consistently deregulated in allograft rejection according to the cross-organ analysis	hsa04620:Toll-like receptor signaling pathway	3	CXCL9, STAT1, CXCL10	0.2471	0.0078	0.2977	10.0000	106.0000	6910.0000	19.5566
	hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	3	PTPRC, CD8A, HLA-F	0.2471	0.0137	0.2674	10.0000	142.0000	6910.0000	14.5986
	hsa05168:Herpes simplex infection	3	C3, STAT1, HLA-F	0.2471	0.0222	0.2861	10.0000	183.0000	6910.0000	11.3279
	hsa04062:Chemokine signaling pathway	3	CXCL9, STAT1, CXCL10	0.2471	0.0229	0.2295	10.0000	186.0000	6910.0000	11.1452
	hsa05340:Primary immunodeficiency	2	PTPRC, CD8A	0.1647	0.0434	0.3295	10.0000	34.0000	6910.0000	40.6471
	hsa05150:Staphylococcus aureus infection	2	C4A, C3	0.1647	0.0682	0.4113	10.0000	54.0000	6910.0000	25.5926
	hsa04610:Complement and coagulation cascades	2	C4A, C3	0.1647	0.0864	0.4406	10.0000	69.0000	6910.0000	20.0290
	hsa05140:Leishmaniasis	2	C3, STAT1	0.1647	0.0888	0.4074	10.0000	71.0000	6910.0000	19.4648
	hsa05133:Pertussis	2	C4A, C3	0.1647	0.0936	0.3882	10.0000	75.0000	6910.0000	18.4267
	hsa04612:Antigen processing and presentation	2	CD8A, HLA-F	0.1647	0.0948	0.3612	10.0000	76.0000	6910.0000	18.1842

Gene List	Term	Count	Genes	% Gene List	P-value	Adjusted P-value	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment
Genes consistently deregulated in <b>cardiac</b> allograft rejection according to the organ-specific analysis	hsa04612:Antigen processing and presentation	4	HLA-DRB1, PSME2, HLA-C, CD74	0.1744	0.0003	0.0133	13.0000	76.0000	6910.0000	27.9757
	hsa04145:Phagosome	3	HLA-DRB1, HLA-C, ATP6V1G1	0.1308	0.0278	0.5126	13.0000	153.0000	6910.0000	10.4223
	hsa05168:Herpes simplex infection	3	HLA-DRB1, HLA-C, CD74	0.1308	0.0387	0.4885	13.0000	183.0000	6910.0000	8.7137
	hsa05332:Graft-versus-host disease	2	HLA-DRB1, HLA-C	0.0872	0.0559	0.5195	13.0000	33.0000	6910.0000	32.2145
	hsa05330:Allograft rejection	2	HLA-DRB1, HLA-C	0.0872	0.0624	0.4820	13.0000	37.0000	6910.0000	28.7318
	hsa04940:Type I diabetes mellitus	2	HLA-DRB1, HLA-C	0.0872	0.0706	0.4633	13.0000	42.0000	6910.0000	25.3114
	hsa05320:Autoimmune thyroid disease	2	HLA-DRB1, HLA-C	0.0872	0.0867	0.4836	13.0000	52.0000	6910.0000	20.4438
	hsa05150:Staphylococcus aureus infection	2	HLA-DRB1, FPR1	0.0872	0.0899	0.4515	13.0000	54.0000	6910.0000	19.6866
	hsa05416:Viral myocarditis	2	HLA-DRB1, HLA-C	0.0872	0.0947	0.4309	13.0000	57.0000	6910.0000	18.6505
Genes consistently deregulated in <b>renal</b> allograft rejection according to the organ-specific analysis	hsa04610:Complement and coagulation cascades	4	C1QA, C1QB, VWF, SERPING1	22.2222	0.0001	0.0028	10.0000	69.0000	6910.0000	40.0580
	hsa05133:Pertussis	3	C1QA, C1QB, SERPING1	16.6667	0.0040	0.0712	10.0000	75.0000	6910.0000	27.6400
	hsa05020:Prion diseases	2	C1QA, C1QB	11.1111	0.0422	0.4124	10.0000	33.0000	6910.0000	41.8788
	hsa05150:Staphylococcus aureus infection	2	C1QA, C1QB	11.1111	0.0682	0.4798	10.0000	54.0000	6910.0000	25.5926
	hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway	3	VWF, PRLR, GNG11	16.6667	0.0709	0.4198	10.0000	345.0000	6910.0000	6.0087

## Supporting Information

**Table S1.** Search terms used in the queries performed for each database. [DOC]

**Table S2.** Characteristics of the selected studies. [XLSX]

**Table S3.** Summary of candidate genes and miRNAs biomarkers collected from data reported in the selected studies. [XLSX]

**Table S4.** Quality assessment of included papers according to the adapted Downs and Black checklist. [XLSX]

## References

Alakulppi, Noora, Paula Seikku, Taina Jaatinen, Christer Holmberg, and Jarmo Laine. 2008. "Feasibility of Diagnosing Subclinical Renal Allograft Rejection in Children by Whole Blood Gene Expression Analysis." *Transplantation* 86 (9): 1222–28.

Alegre, Maria-Luisa, Fadi G. Lakkis, and Adrian E. Morelli. 2016. "Antigen Presentation in Transplantation." *Trends in Immunology* 37 (12): 831–43.

Anglicheau, Dany, Maarten Naesens, Marie Essig, Wilfried Gwinner, and Pierre Marquet. 2016. "Establishing Biomarkers in Transplant Medicine: A Critical Review of Current Approaches." *Transplantation* 100 (10): 2024–38.

Anglicheau, Dany, Vijay K. Sharma, Ruchuang Ding, Aurélie Hummel, Catherine Snopkowski, Darshana Dadhania, Surya V. Seshan, and Manikkam Suthanthiran. 2009. "MicroRNA Expression Profiles Predictive of Human Renal Allograft Status." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13): 5330–35.

Asaoka, T., B. Sotolongo, E. R. Island, P. Tryphonopoulos, G. Selvaggi, J. Moon, A. Tekin, et al. 2012. "MicroRNA Signature of Intestinal Acute Cellular Rejection in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Mucosal Biopsies." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12 (2): 458–68.

Barker, C. F., and J. F. Markmann. 2013. "Historical Overview of Transplantation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014977>.

Baron, Daniel, Gérard Ramstein, Mélanie Chesneau, Yann Echasseriau, Annaïck Pallier, Chloé Paul, Nicolas Degauque, et al. 2015. "A Common Gene Signature across Multiple Studies Relate Biomarkers and Functional Regulation in Tolerance to Renal Allograft." *Kidney International* 87 (5): 984–95.

Bodez, Diane, Hakim Hocini, Nicolas Tchitchek, Pascaline Tisserand, Nicole Benhaiem, Caroline Barau, Mounira Kharoubi, et al. 2016. "Myocardial Gene Expression Profiling to Predict and Identify Cardiac Allograft Acute Cellular Rejection: The GET-Study." *PLoS One* 11 (11): e0167213.

Burke, Harry B. 2016. "Predicting Clinical Outcomes Using Molecular Biomarkers." *Biomarkers in Cancer* 8 (June): 89–99.

Chen, Rong, Tara K. Sigdel, Li Li, Neeraja Kambham, Joel T. Dudley, Szu-Chuan Hsieh, R. Bryan Klassen, et al. 2010. "Differentially Expressed RNA from Public Microarray Data Identifies Serum Protein Biomarkers for Cross-Organ Transplant Rejection and Other Conditions." *PLoS Computational Biology* 6 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000940>.

Chen, Wenbiao, Wujian Peng, Jianrong Huang, Xiangqi Yu, Kuibi Tan, Yuyu Chen, Xiaocong Lin, Deheng Chen, and Yong Dai. 2014. "Microarray Analysis of Long Non-Coding RNA Expression in Human Acute Rejection Biopsy Samples Following Renal Transplantation." *Molecular Medicine Reports* 10 (4): 2210–16.

Chen, Yan, Haibo Zhang, Xue Xiao, Yixin Jia, Weili Wu, Licheng Liu, Jun Jiang, Baoli Zhu, Xu Meng, and Weijun Chen. 2013. "Peripheral Blood Transcriptome Sequencing Reveals Rejection-Relevant Genes in Long-Term Heart Transplantation." *International Journal of Cardiology* 168 (3): 2726–33.

Chmielewski, Stefan, Anna Piaszyk-Borychowska, Joanna Wesoly, and Hans A. R. Bluysen. 2016. "STAT1 and IRF8 in Vascular Inflammation and Cardiovascular Disease: Diagnostic and Therapeutic Potential." *International Reviews of Immunology* 35 (5): 434–54.

Danger, Richard, Annaïck Pallier, Magali Giral, Marc Martínez-Llordella, Juan José Lozano, Nicolas Degauque, Alberto Sanchez-Fueyo, Jean-Paul Soulillou, and Sophie Brouard. 2012. "Upregulation of miR-142-3p in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Operationally Tolerant Patients with a Renal Transplant." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 23 (4): 597–606.

Domenico, T. D., G. Joelsons, R. M. Montenegro, and R. C. Manfro. 2017. "Upregulation of microRNA 142-3p in the Peripheral Blood and Urinary Cells of Kidney Transplant Recipients with Post-Transplant Graft Dysfunction." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas E Biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et Al.]* 50 (4): e5533.

Downs, S. H., and N. Black. 1998. "The Feasibility of Creating a Checklist for the Assessment

of the Methodological Quality Both of Randomised and Non-Randomised Studies of Health Care Interventions.” *Journal of Epidemiology and Community Health* 52 (6): 377–84.

Duong Van Huyen, Jean-Paul, Marion Tible, Arnaud Gay, Romain Guillemain, Olivier Aubert, Shaïda Varnous, Franck Iserin, et al. 2014. “MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers of Heart Transplant Rejection.” *European Heart Journal* 35 (45): 3194–3202.

Einecke, Gunilla, Jeff Reeve, Banu Sis, Michael Mengel, Luis Hidalgo, Konrad S. Famulski, Arthur Matas, Bert Kasiske, Bruce Kaplan, and Philip F. Halloran. 2010. “A Molecular Classifier for Predicting Future Graft Loss in Late Kidney Transplant Biopsies.” *The Journal of Clinical Investigation* 120 (6): 1862–72.

Ettenger, R., R. Albrecht, and R. Alloway. 2018. “Meeting Report: FDA Public Meeting on Patient-focused Drug Development and Medication Adherence in Solid Organ Transplant Patients.” *American Journal of*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajt.14635>.

Flechner, Stuart M., Sunil M. Kurian, Steven R. Head, Starlette M. Sharp, Thomas C. Whisenant, Jie Zhang, Jeffrey D. Chismar, et al. 2004. “Kidney Transplant Rejection and Tissue Injury by Gene Profiling of Biopsies and Peripheral Blood Lymphocytes.” *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (9): 1475–89.

Freue, Gabriela V. Cohen, Gabriela V. Cohen Freue, Mayu Sasaki, Anna Meredith, Oliver P. Günther, Axel Bergman, Mandeep Takhar, et al. 2010. “Proteomic Signatures in Plasma during Early Acute Renal Allograft Rejection.” *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 9 (9): 1954–67.

Gimino, Vincent J., Jeffrey D. Lande, Todd R. Berryman, Richard A. King, and Marshall I. Hertz. 2003. “Gene Expression Profiling of Bronchoalveolar Lavage Cells in Acute Lung Rejection.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (10): 1237–42.

Gregson, Aric L., Aki Hoji, Patil Injean, Steven T. Poynter, Claudia Briones, Vyacheslav Palchevskiy, S. Sam Weigt, et al. 2015. “Altered Exosomal RNA Profiles in Bronchoalveolar Lavage from Lung Transplants with Acute Rejection.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (12): 1490–1503.

Günther, Oliver P., Robert F. Balshaw, Andreas Scherer, Zsuzsanna Hollander, Alice Mui, Timothy J. Triche, Gabriela Cohen Freue, et al. 2009. “Functional Genomic Analysis of Peripheral Blood during Early Acute Renal Allograft Rejection.” *Transplantation* 88 (7): 942–51.

Halloran, Philip F., Konrad S. Famulski, and Jeff Reeve. 2016. “Molecular Assessment of Disease States in Kidney Transplant Biopsy Samples.” *Nature Reviews. Nephrology* 12 (9): 534–48.

Heidt, Sebastiaan, David San Segundo, Sushma Shankar, Shruti Mittal, Anand S. R. Muthusamy, Peter J. Friend, Susan V. Fuggle, and Kathryn J. Wood. 2011. “Peripheral Blood

Sampling for the Detection of Allograft Rejection: Biomarker Identification and Validation.” *Transplantation* 92 (1): 1–9.

Hollander, Zsuzsanna, David Lin, Virginia Chen, Raymond Ng, Janet Wilson-McManus, Andrew Ignaszewski, Gabriela Cohen Freue, et al. 2010. “Whole Blood Biomarkers of Acute Cardiac Allograft Rejection: Double-Crossing the Biopsy.” *Transplantation* 90 (12): 1388–93.

Horwitz, Phillip A., Emily J. Tsai, Mary E. Putt, Joan M. Gilmore, John J. Lepore, Michael S. Parmacek, Andrew C. Kao, et al. 2004. “Detection of Cardiac Allograft Rejection and Response to Immunosuppressive Therapy with Peripheral Blood Gene Expression.” *Circulation* 110 (25): 3815–21.

Huang, Da Wei, Brad T. Sherman, and Richard A. Lempicki. 2009. “Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources.” *Nature Protocols* 4 (1): 44–57.

Kanehisa, Minoru, Miho Furumichi, Mao Tanabe, Yoko Sato, and Kanae Morishima. 2017. “KEGG: New Perspectives on Genomes, Pathways, Diseases and Drugs.” *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D353–61.

Karason, Kristjan, Margareta Jernås, Daniel A. Hägg, and Per-Arne Svensson. 2006. “Evaluation of CXCL9 and CXCL10 as Circulating Biomarkers of Human Cardiac Allograft Rejection.” *BMC Cardiovascular Disorders* 6 (June): 29.

Kawasaki, Takumi, and Taro Kawai. 2014. “Toll-Like Receptor Signaling Pathways.” *Frontiers in Immunology* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.

Khatri, Purvesh, Silke Roedder, Naoyuki Kimura, Katrien De Vusser, Alexander A. Morgan, Yongquan Gong, Michael P. Fischbein, et al. 2013. “A Common Rejection Module (CRM) for Acute Rejection across Multiple Organs Identifies Novel Therapeutics for Organ Transplantation.” *The Journal of Experimental Medicine* 210 (11): 2205–21.

Khush, Kiran, and Shirin Zarafshar. 2017. “Molecular Diagnostic Testing in Cardiac Transplantation.” *Current Cardiology Reports* 19 (11): 118.

Kumar, Senthil, Nihar Mohapatra, Deeplaxmi Purushottam Borle, Ashok Choudhury, Shashwat Sarin, and Ekta Gupta. 2018. “Non Invasive Diagnosis of Acute Cellular Rejection after Liver Transplantation – Current Opinion.” *Transplant Immunology* 47: 1–9.

Lin, David, Zsuzsanna Hollander, Raymond T. Ng, Carol Imai, Andrew Ignaszewski, Robert Balshaw, Gabriela Cohen Freue, et al. 2009. “Whole Blood Genomic Biomarkers of Acute Cardiac Allograft Rejection.” *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 28 (9): 927–35.

Liu, Xiaoyou, Changgui Dong, Zhengyao Jiang, William K. K. Wu, Matthew T. V. Chan, Jie Zhang, Haibin Li, Ke Qin, and Xuyong Sun. 2015. “MicroRNA-10b Downregulation Mediates Acute Rejection of Renal Allografts by Derepressing BCL2L11.” *Experimental Cell Research*

333 (1): 155–63.

Lo, Denise J., Tim A. Weaver, David E. Kleiner, Roslyn B. Mannon, Lynn M. Jacobson, Bryan N. Becker, S. John Swanson, Douglas A. Hale, and Allan D. Kirk. 2011. “Chemokines and Their Receptors in Human Renal Allograft Transplantation.” *Transplantation* 91 (1): 70–77.

Loftheim, Håvard, Karsten Midtvedt, Anders Hartmann, Anna V. Reisæter, Pål Falck, Hallvard Holdaas, Trond Jenssen, Leon Reubsaet, and Anders Asberg. 2012. “Urinary Proteomic Shotgun Approach for Identification of Potential Acute Rejection Biomarkers in Renal Transplant Recipients.” *Transplantation Research* 1 (1): 9.

Loupy, Alexandre, Jean Paul Duong Van Huyen, Luis Hidalgo, Jeff Reeve, Maud Racapé, Olivier Aubert, Jeffery M. Venner, et al. 2017. “Gene Expression Profiling for the Identification and Classification of Antibody-Mediated Heart Rejection.” *Circulation* 135 (10): 917–35.

Lu, Brandon S., Andrew D. Yu, Xiaofeng Zhu, Edward R. Garrity Jr, Wickii T. Vigneswaran, and Sangeeta M. Bhorade. 2006. “Sequential Gene Expression Profiling in Lung Transplant Recipients with Chronic Rejection.” *Chest* 130 (3): 847–54.

Mariano, Diego C. B., Carmelina Leite, Lucianna H. S. Santos, Rafael E. O. Rocha, and Raquel C. de Melo-Minardi. 2017. “A Guide to Performing Systematic Literature Reviews in Bioinformatics.” *arXiv [q-bio.QM]*. arXiv. <http://arxiv.org/abs/1707.05813>.

Mas, V. R., C. I. Dumur, M. J. Scian, R. C. Gehrau, and D. G. Maluf. 2013. “MicroRNAs as Biomarkers in Solid Organ Transplantation.” *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 (1): 11–19.

Matz, Mareen, Katharina Fabritius, Christine Lorkowski, Michael Dürr, Jens Gaedeke, Pawel Durek, Joachim R. Grün, et al. 2016. “Identification of T Cell-Mediated Vascular Rejection After Kidney Transplantation by the Combined Measurement of 5 Specific MicroRNAs in Blood.” *Transplantation* 100 (4): 898–907.

Moher, D., A. Liberati, J. Tetzlaff, D. G. Altman, and for the PRISMA Group. 2009. “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement.” *BMJ* 339 (jul21 1): b2535–b2535.

Naesens, Maarten, and Minnie M. Sarwal. 2010. “Molecular Diagnostics in Transplantation.” *Nature Reviews. Nephrology* 6 (10): 614–28.

Nissaisorakarn, Voravech, John Richard Lee, Michelle Lubetzky, and Manikkam Suthanthiran. 2018. “Urine Biomarkers Informative of Human Kidney Allograft Rejection and Tolerance.” *Human Immunology* 79 (5): 343–55.

Paczesny, Sophie. 2018. “Biomarkers for Posttransplantation Outcomes.” *Blood* 131 (20): 2193–2204.

Rana, Abbas, Ruth L. Ackah, Gwilym J. Webb, Karim J. Halazun, John M. Vierling, Hao Liu, Meng-Fen Wu, et al. 2019. “No Gains in Long-Term Survival After Liver Transplantation Over

the Past Three Decades.” *Annals of Surgery* 269 (1): 20–27.

Rascio, Federica, Paola Pontrelli, Matteo Accetturo, Annarita Oranger, Margherita Gigante, Giuseppe Castellano, Maddalena Gigante, et al. 2015. “A Type I Interferon Signature Characterizes Chronic Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation.” *The Journal of Pathology* 237 (1): 72–84.

RBT. Accessed May 25, 2019a. <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2019/RBT-2019-1%20trim%20-%20Pop.pdf> . Accessed May 25, 2019b.

Ritchie, Marylyn D., Emily R. Holzinger, Ruowang Li, Sarah A. Pendergrass, and Dokyoon Kim. 2015. “Methods of Integrating Data to Uncover Genotype-Phenotype Interactions.” *Nature Reviews. Genetics* 16 (2): 85–97.

Scherer, Andreas, Andreas Krause, John R. Walker, Alexander Korn, Detlef Niese, and Friedrich Raulf. 2003. “Early Prognosis of the Development of Renal Chronic Allograft Rejection by Gene Expression Profiling of Human Protocol Biopsies.” *Transplantation* 75 (8): 1323–30.

Seddiki, Nabila, Vedran Brezar, Nicolas Ruffin, Yves Lévy, and Sanjay Swaminathan. 2014. “Role of miR-155 in the Regulation of Lymphocyte Immune Function and Disease.” *Immunology* 142 (1): 32–38.

Shannon, Casey P., Zsuzsanna Hollander, Janet Wilson-McManus, Robert Balshaw, Raymond T. Ng, Robert McMaster, Bruce M. McManus, Paul A. Keown, and Scott J. Tebbutt. 2012. “White Blood Cell Differentials Enrich Whole Blood Expression Data in the Context of Acute Cardiac Allograft Rejection.” *Bioinformatics and Biology Insights* 6 (April): 49–61.

Shen, Zhonghua, and Weihua Gong. 2015. “Identification of Candidate Biomarkers in Peripheral Blood for Cardiac Allograft Rejection Based on Bioinformatics Analysis.” *Annals of Transplantation: Quarterly of the Polish Transplantation Society* 20 (June): 312–19.

Sirota, Marina, and Minnie M. Sarwal. 2017. “Transplantomics: Toward Precision Medicine in Transplantation Research.” *Transplantation* 101 (8): 1777–82.

Sotolongo, B., T. Asaoka, E. Island, M. Carreno, V. Delacruz, D. Cova, C. Russo, et al. 2010. “Gene Expression Profiling of MicroRNAs in Small-Bowel Transplantation Paraffin-Embedded Mucosal Biopsy Tissue.” *Transplantation Proceedings* 42 (1): 62–65.

Sukma Dewi, Ihdina, Zsuzsanna Hollander, Karen K. Lam, Janet-Wilson McManus, Scott J. Tebbutt, Raymond T. Ng, Paul A. Keown, et al. 2017. “Association of Serum MiR-142-3p and MiR-101-3p Levels with Acute Cellular Rejection after Heart Transplantation.” *PloS One* 12 (1): e0170842.

Talayero, Paloma, Lola Alonso-Guirado, Guillermo Padilla, Haydee Artaza, Ana Dopazo, Fátima Sánchez-Cabo, Sarbelio Rodríguez-Muñoz, et al. 2017. “5-Gene Differential Expression Predicts Stability of Human Intestinal Allografts.” *Experimental and Molecular Pathology* 103 (2): 163–71.



- Venner, J. M., L. G. Hidalgo, K. S. Famulski, J. Chang, and P. F. Halloran. 2015. "The Molecular Landscape of Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection: Evidence for NK Involvement through CD16a Fc Receptors." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 15 (5): 1336–48.
- Vitalone, Matthew J., Tara K. Sigdel, Nathan Salomonis, Reuben D. Sarwal, Szu-Chuan Hsieh, and Minnie M. Sarwal. 2015. "Transcriptional Perturbations in Graft Rejection." *Transplantation* 99 (9): 1882–93.
- Wain, Hester M., Elspeth A. Bruford, Ruth C. Lovering, Michael J. Lush, Mathew W. Wright, and Sue Povey. 2002. "Guidelines for Human Gene Nomenclature." *Genomics* 79 (4): 464–70.
- Wang, Anyou, and Minnie M. Sarwal. 2015. "Computational Models for Transplant Biomarker Discovery." *Frontiers in Immunology* 6 (September): 458.
- Wilflingseder, Julia, Heinz Regele, Paul Perco, Alexander Kainz, Afschin Soleiman, Ferdinand Mühlbacher, Bernd Mayer, and Rainer Oberbauer. 2013. "miRNA Profiling Discriminates Types of Rejection and Injury in Human Renal Allografts." *Transplantation* 95 (6): 835–41.
- Wilhelm, Markus J. 2015. "Long-Term Outcome Following Heart Transplantation: Current Perspective." *Journal of Thoracic Disease* 7 (3): 549–51.
- Wu, Zhenqian, Xiuyan Huang, Xiaodong Han, Zhongnan Li, Qinchao Zhu, Jun Yan, Song Yu, et al. 2016. "The Chemokine CXCL9 Expression Is Associated with Better Prognosis for Colorectal Carcinoma Patients." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 78 (March): 8–13.
- Zarkhin, Valeriya, and Minnie M. Sarwal. 2008. "Microarrays: Monitoring for Transplant Tolerance and Mechanistic Insights." *Clinics in Laboratory Medicine* 28 (3): 385–410.

### **Parte III**

## **Artigo 2 – Resultados preliminares: Metanálise de dados de transcriptoma para identificação de biomarcadores de rejeição ao transplante cardíaco.**

Autores: Sheyla Velasque Paladini, Rodrigo Haas Bueno, Raquel Calloni,  
Mariana Recamonde-Mendoza

### **Autor Correspondente**

Prof. Dr. Mariana Recamonde-Mendoza  
Instituto de Informática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Av. Bento Gonçalves, 9500, Setor IV, Building 43424, Office 225  
Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 91501-970

+55 51 33086843

[mrmendoza@inf.ufrgs.br](mailto:mrmendoza@inf.ufrgs.br)

## 1. INTRODUÇÃO

Embora as taxas de sobrevida de transplantados em curto prazo tenham aumentado ao longo dos anos, as de longo prazo mantêm-se com pouca melhora (KHATRI et al., 2013). Há demanda por novas drogas imunossupressoras contra a rejeição de enxertos, visto que as existentes provocam diversas implicações negativas no tratamento (CHEN et al., 2010); Ainda, o principal método de monitoramento da rejeição de transplantes cardíacos é a biópsia endomiocárdica, realizada periodicamente - um procedimento caro, invasivo, suscetível a erros de amostragem (como coleta de material representativo de fibrina, infiltração gordurosa ou fibrose) e a complicações graves (CALÉ et al., 2012).

Nesse contexto, pode ser promissora a análise de dados em larga escala gerados através de tecnologias “ômicas” - genômica, transcriptômica e proteômica - para obter novos insights visando à descoberta de biomarcadores específicos (WANG; SARWAL, 2015). “Biomarcador” é um termo amplo, que se refere a uma molécula ou assinatura biológica para um determinado estado fisiológico ou patológico, que podem ser qualificados como indicadores da predisposição, desenvolvimento ou prognóstico de doenças, e resposta à atividade farmacológica.

A quantidade de dados disponíveis em bancos de dados públicos de microarranjo tem crescido, e um dos grandes desafios é integrar dados de diferentes plataformas (MAROT, 2009). A metanálise é uma técnica estatística que permite integrar resultados de diferentes estudos primários independentes e possibilita a sua reprodutibilidade. Para que os estudos possam ser combinados, é necessário calcular a medida de efeito de cada estudo (RODRIGUES, 2010; SANTOS; CUNHA, 2013); para esses cálculos no contexto de ciências ômicas, realiza-se a metanálise integrando valores de  $p$  e/ou *fold change* em escala logarítmica ( $\log_{2}FC$ ) para cada

gene entre múltiplos experimentos (WALDRON; RIESTER, 2016; ZHOU et al., 2016). Isso permite aumentar a sensibilidade da análise, mitigando o problema do tamanho amostral reduzido e restrito poder estatístico que são usuais nesta abordagem (RAMASAMY et al., 2008).

Uma metanálise utilizando múltiplos estudos de microarranjo permite a identificação de potenciais candidatos a biomarcadores com hipóteses semelhantes. Variações biológicas, nas nomenclaturas gênicas, e na metodologias de análises experimentais e estatísticas entre os diferentes estudos muitas vezes resultam em achados distintos (CAHAN et al., 2007). Não há nenhuma diretriz clara quanto à escolha do modelo de metanálise mais adequado - a decisão requer basicamente considerações estatísticas e biológicas (CHANG et al., 2013); assim, este é um dos principais desafios desse tipo de estudo. Outros desafios que cabem destacar são etapas de pré-processamento de um estudo individual, incluindo a sumarização de sondas (*probes*) redundantes utilizando algoritmos específicos para cada plataforma (ZHAO et al., 2014).

Seguindo trabalhos anteriores que demonstraram o potencial de métodos de metanálise para análise de dados de transcriptoma na identificação de biomarcadores, o presente estudo tem como objetivo aplicar esta estratégia para integrar diferentes estudos transcriptômicos relacionados ao processo de rejeição ao transplante cardíaco e identificar genes candidatos a biomarcadores de rejeição.

## **2. MÉTODOS**

Nesse estudo metanalítico, seguimos os seguintes passos: 1) Busca manual de dados públicos de transcriptoma; 2) Pré-processamento e Análise de expressão diferencial; 3) Metanálise; 4) Interpretação dos resultados. Os itens 1 e 2 são componentes da análise indireta, visando a avaliação conjunta de múltiplos dados de expressão. Em todas as etapas, foram

utilizados pacotes do Bioconductor/R (R 3.6.0 for Windows) e ferramentas web de domínio público já bem consolidadas para as respectivas análises em que foram aplicadas.

## **2.1 BUSCA MANUAL DE DADOS PÚBLICOS**

Realizamos a busca por dados de transcriptoma nas bases de dados públicas Gene Expression Omnibus (GEO) e ArrayExpress Archive of Functional Genomics Data (ArrayExpress). Adicionalmente, utilizou-se da busca na literatura realizada em revisão sistemática anterior (PALADINI et al., 2019). Para ambas as buscas, foram utilizados os termos “allograft, rejection”, “transplant”, “heart”, “cardiac”, "gene expression profiling", "transcriptome", "biomarker", "biological marker" e seus respectivos entre termos.

A seleção se deu pelos seguintes critérios: a) estudos transcriptômicos baseados nas técnicas de microarray ou RNA-seq; b) realizados em humanos; c) com grupos e amostras claramente descritos para possibilitar a comparação dos perfis de expressão gênica; d) estudos que disponham dos dados brutos ou, alternativamente, da matriz expressão gênica pré-processada, verificando-se sua qualidade previamente; e) estudos com data de publicação posterior a 2001, priorizando-se estudos publicados após 2007 em razão da melhor precisão de tecnologias mais recentes.

## **2.2 PRÉ-PROCESSAMENTO**

O pré-processamento dos dados de transcriptoma foi realizado por normalização dos dados de expressão gênica e por anotação de sonda. Primeiramente foi realizado o pré-processamento individual dos chips, onde procedeu-se a correção de background, a fim de remover efeitos locais que tornam algumas áreas do chip mais brilhantes sem razões biológicas

e eliminar sinais de hibridização cruzada. Esta etapa foi realizada de acordo com as especificações de origem das plataformas de microarranjo dos chips utilizados (*Affymetrix* ou *Agilent*).

### **2.2.1 Chips Affymetrix**

Os dados brutos provenientes das bases de dados públicas foram importados para o R, e processados pelo algoritmo RMA (*robust multichip analysis*) (IRIZARRY et al., 2003; BOLSTAD et al., 2003) com o pacote *oligo* - Com esse método realiza-se as etapas de correção de background, transformação dos dados por aplicação de logaritmo com base 2, normalização pelo método *quantile* e sumarização das sondas (*probesets*) para obter um único valor de expressão para cada gene. (CARVALHO et al., 2006). Como resultado do RMA, tem-se uma matriz de expressão gênica pronta para análises posteriores.

As sondas foram anotadas utilizando a nomenclatura padrão de símbolo do gene (*gene symbol*) definido pelo HUGO *Gene Nomenclature Committee* (HGNC) por meio de pacotes de anotação específicos da plataforma, disponíveis no repositório Bioconductor, ou a partir de anotações fornecidas pela empresa responsável pela plataforma. As sondas com anotação para mais de um símbolos do gene, ou que não possuíam anotação, foram excluídos da análise. Para modelar e corrigir possíveis efeitos em lote (*batch effects*) - termos usado para descrever a heterogeneidade técnica (diferentes protocolos de experimentais, manipuladores, lotes de reagentes, etc.) (GOH et al., 2017) - os dados foram submetidos ao algoritmo SVA (*surrogate variable analysis*) (LEEK; STOREY, 2007).

### **2.2.2 Chips Agilent e plataformas customizadas**

Da mesma forma como procedido para os chips *Affymetrix*, os dados brutos provenientes das bases de dados públicas foram importados para o R. Os chips *Agilent* foram processados seguindo os passos recomendados pelo *limma* (RITCHIE et al., 2015). Para correção de background, utilizou-se o método *normexp* com *offset* de 50; a normalização intra-arranjo (*within-array normalization*) ocorreu utilizando o método *quantile*, e a normalização entre arranjos (*between-array normalization*) foram realizados utilizando o método *quantile*. As sondas foram anotadas utilizando a nomenclatura padrão de símbolo do gene (*gene symbol*) definido pelo HUGO *Gene Nomenclature Committee* (HGNC) por meio de pacotes de anotação específicos da plataforma, disponíveis no repositório Bioconductor, ou a partir de anotações fornecidas pela empresa responsável pela plataforma. Caso esta anotação não estivesse disponível, a sequência de nucleotídeos das sondas foi anotada com símbolo de gene por meio de alinhamento ao banco de sequências de transcritos humanos V29 do *Gencode*, utilizando o *software* BLAST *Command Line Applications* (ALTSCHUL et al., 1990). Sondas anotadas para mais de um símbolo de gene (*gene symbol*) ou que não possuíam anotação foram excluídos da análise. Para modelar possível *batch effects*, os dados foram também submetidos ao algoritmo SVA.

Para as plataformas customizadas seguimos a mesma metodologia descrita, processando os dados seguindo os passos recomendados pelo *limma*.

## 2.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL

A análise da expressão diferencial consiste na identificação dos genes diferencialmente expressos entre duas condições comparadas; chega-se esse resultado comparando-se os grupos definidos quanto ao seu perfil de expressão gênica.

A determinação dos genes diferencialmente expressos (DE) para todas as plataformas foi realizada utilizando-se o pacote limma, para ambiente estatístico R (RITCHIE et al., 2015). Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram valor de  $p < 0,01$  e valor absoluto de *fold change* em escala log ( $\log_2FC$ ) maior que 1.

## 2.4 METANÁLISE

Após o pré-processamento os genes e seus respectivos valores-p e  $\log_2FC$  calculados durante análise de expressão diferencial foram importados para realização da metanálise (RITCHIE et al., 2015). Adicionalmente, utilizando o pacote metaMA no R (MAROT et al., 2009), calculou-se para cada gene de cada estudo o tamanho de efeito imparcial (*unbiased*), ou seja, correção de viés (LEEK; STOREY, 2007; LAKENS, 2013).

Desta forma, no seguimento das análises, escolhemos manter apenas os genes representados em no mínimo 60% dos estudos individuais. Os valores-p de cada gene entre todos os estudos individuais foram unidos via método *Product of ranks* (PR) com o pacote R metaDE. PR é um teste estatístico não paramétrico conservador, baseado em classificação, que combina conjuntos de dados de diferentes origens para aumentar o poder da identificação. É um modelo robusto contra o ruído em um experimento de microarranjo, e ainda retém a sensibilidade, assim apropriado para dados heterogêneos (LAING; SMITH, 2011).

Os genes com valor-p corrigido pelo método *false discovery rate* (FDR) resultante menor que 0,05 foram filtrados. Desses genes resultantes, apenas os que tinham direções de



efeito concordantes em no mínimo 70% dos estudos foram considerados relevantes para a análise de enriquecimento funcional subsequente (CHANG et al., 2013).

## 2.5 ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

Para investigação de enriquecimento funcional, a lista de genes identificada na metanálise foi analisada pelo *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v 6.8, usando anotações de vias biológicas do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Os valores-p foram calculados de acordo com um teste exato de Fisher modificado (*escore* EASE DAVID) e ajustados para testes de múltiplas hipóteses usando o método de Benjamini-Hochberg.

## 3. RESULTADOS

Na busca manual de dados públicos foram encontrados sete estudos, publicados entre 2004 e 2014, que utilizaram diferentes plataformas para analisar o conjunto de genes diferencialmente expressos na rejeição de transplantes cardíaco (com classificação ISHLT  $\geq 2$ ) quando comparados a amostras sem rejeição. Observou-se grande variedade nos tamanhos amostrais de ambos os grupos entre os estudos encontrados, conforme sumarizado na **Tabela 1**.

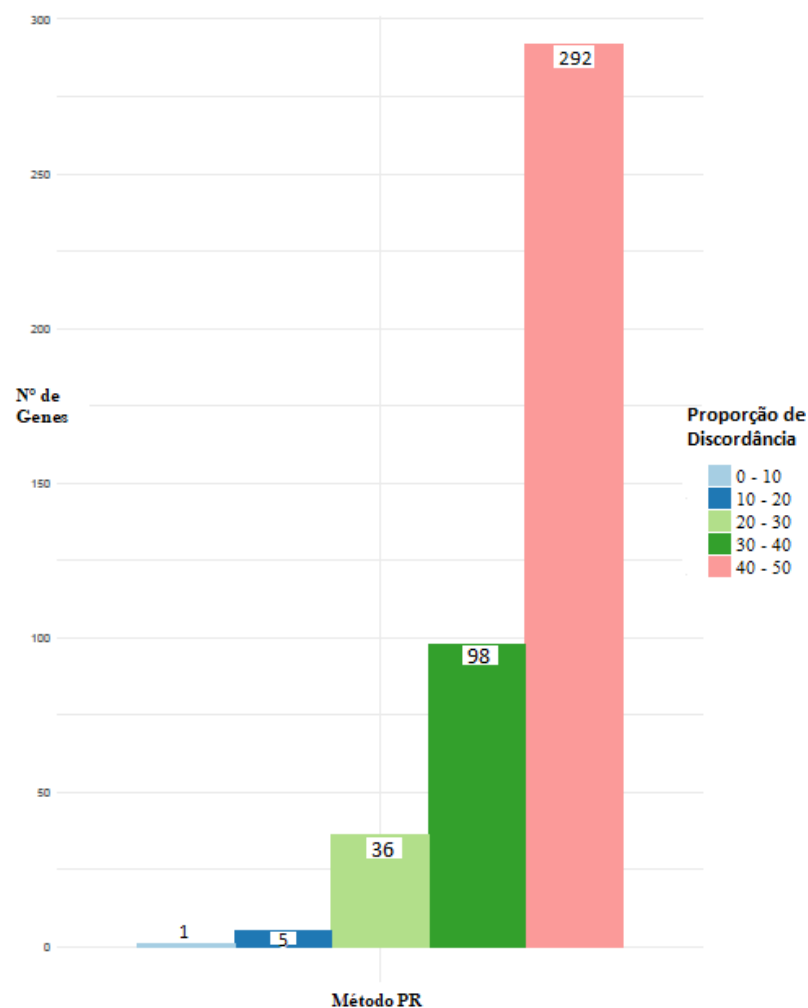
**Tabela 1** - Dados públicos relacionados à rejeição de transplante cardíaco utilizados na metanálise do presente estudo.

<b>Referência</b>	<b>Plataforma</b>	<b>Número de acesso</b>	<b>Rejeição</b>	<b>Não rejeição</b>	<b>N total</b>
KARASON et al 2006	<i>Affymetrix Human Genome</i>	GSE4315	3	3	6
HOLLANDER et al 2013	<i>Affymetrix Human Genome</i>	GSE33970	7	11	18
			7	11	18
HOLWEG et al 2011	<i>Agilent-012097 Human IA Microarray</i>	GSE9377	7	9	16
HORWITZ et al 2004	<i>Affymetrix Human Genome</i>	GSE5967	7	7	14
MORGUN et al 2006	<i>NIAID - Hsab</i>	GSE2596	14	25	39
SHANNON et al 2012	<i>Affymetrix Human Genome</i>	GSE87301	10	16	26
DENG et al 2006	<i>Cardiac Allograft Rejection Detection Microarray</i>	GSE2445 GPL1923	12	24	36
		GSE2445 GPL1926	9	48	57
		GSE2445 GPL1927	8	56	64

Através da metanálise dos dados de transcriptoma listados na Tabela 1, foi obtido um conjunto de 432 genes DE no processo de rejeição (i.e, FDR < 0,05, de acordo com as estatísticas calculadas pelo método PR). Para refinar este conjunto de hipóteses, observou-se o nível de concordância entre os estudos no que se refere à direção de efeito dos genes identificados (**Figura 1**). Pode-se notar que uma grande proporção dos genes identificados, ainda que associados a uma expressão diferencial seja estatisticamente significativa de acordo com o método PR, possuem discordância quanto ao tipo de alteração na expressão entre os estudos integrados. Portanto, foram considerados como potenciais biomarcadores apenas os

genes que possuem observações discordantes quanto à direção de efeito em no máximo 30% dos estudos, ou seja, concordantes em no mínimo 70% dos estudos individuais. Seguindo este critério, foram identificados 42 genes relevantes. Destes, 20 genes possuem tendência a ter sua expressão aumentada no processo de rejeição (*up-regulated*), enquanto 22 tendem a estar diminuídos (*down-regulated*) nesta condição (**Tabela 2**). Esta lista de genes foi considerada como candidatos promissores a biomarcadores de rejeição ao transplante cardíaco, tendo em vista que foi detectada expressão diferencial consistente na grande maioria dos estudos analisados.

**Figura 1** - Observação do nível de discordância entre os estudos integrados quanto à direção de efeito dos genes resultantes da metanálise



**Tabela 2** - 42 genes diferencialmente expressos no processo de rejeição, com direção de efeito concordantes em no mínimo 70% dos estudos. FDR: *False discovery rate*.

<b>Gene Symbol</b>	<b>Expressão diferencial</b>	<b>FDR</b>
ACTR2	Upregulated	0,019333333
ACVR1	Upregulated	0,043647059
APOE	Downregulated	0,020324324
ARPC5	Upregulated	0,047362694
ATF5	Upregulated	0,023220126
CCL19	Upregulated	0,048957143
CD6	Upregulated	0,047934177
CD84	Upregulated	0,002666667
CDC42	Downregulated	0,036866426
CS	Downregulated	0,023220126
CXCR6	Upregulated	0,040127796
FBXL5	Downregulated	0,038888889
FBXW7	Downregulated	0,008956522
FGR	Downregulated	0,018765432
GLS	Upregulated	0,013128205
GZMB	Upregulated	0,024071429
IL2	Upregulated	0,043261628
INPP4A	Upregulated	0,01875
ITGAL	Downregulated	0,01875
ITGAX	Downregulated	0,023220126
MAPK8	Downregulated	0,01875
MR1	Upregulated	0,029643836
NFE2L3	Upregulated	0,048957143
OXA1L	Downregulated	0,029457944
PDE4D	Upregulated	0,042935673
PMM2	Downregulated	0,041899705
POU2F2	Downregulated	0,030155172
PSEN1	Downregulated	0,030155172
PTPN6	Downregulated	0,00936
RGS10	Upregulated	0,022692308
RPL22	Downregulated	0,030675105
STAT1	Upregulated	0,01875
STK17A	Upregulated	0,033574803
TCL6	Upregulated	0,030155172
TNFAIP2	Downregulated	0,023220126
TNFRSF10C	Downregulated	0,043468927
TUFM	Downregulated	0,039467105
TXNRD1	Downregulated	0,017457627
UBE2J1	Downregulated	0,03940339
USP7	Upregulated	0,030155172
YWHAB	Downregulated	0,044304348
ZNF318	Downregulated	0,028524272

Para melhor compreender a função biológica destes potenciais biomarcadores, a lista de genes foi utilizada como entrada na ferramenta DAVID para a verificação das vias a ela associadas. Dentre os resultados encontrados (**Tabela 3**), destacamos três vias principais (em negrito): *Natural killer cell mediated cytotoxicity*, *Cytokine-cytokine receptor interaction* e *Chemokine signaling pathway*.

**Tabela 3** – Principais vias associadas aos 42 genes resultantes da metanálise

<b>Termo</b>	<b>P-valor</b>	<b>Genes</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>FDR (%)</b>
<b>hsa04062: Chemokine signaling pathway</b>	0,0064	CDC42, FGR, CXCR6, CCL19, STAT1	6,3765	7,0255
<b>hsa04650: Natural killer cell mediated cytotoxicity</b>	0,0129	ITGAL, PTPN6, TNFRSF10C, GZMB	7,7773	13,7536
<b>hsa04060: Cytokine-cytokine receptor interaction</b>	0,0160	TNFRSF10C, CXCR6, CCL19, ACVR1, IL2	4,8808	16,7456
hsa05131: <i>Shigellosis</i>	0,0276	CDC42, MAPK8, ARPC5	11,1191	27,2770
hsa05212: <i>Pancreatic cancer</i>	0,0284	CDC42, MAPK8, STAT1	10,9480	27,9595
hsa05132: <i>Salmonella infection</i>	0,0444	CDC42, MAPK8, ARPC5	8,5737	40,3886
hsa04810: <i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	0,0525	CDC42, ITGAL, ITGAX, ARPC5	4,5182	45,8786
hsa04660: <i>T cell receptor signaling pathway</i>	0,0619	CDC42, PTPN6, IL2	7,1162	51,7199
hsa04722: <i>Neurotrophin signaling pathway</i>	0,0850	CDC42, PSEN1, MAPK8	5,9302	63,6581
hsa05169: <i>Epstein-Barr virus infection</i>	0,0875	USP7, ITGAL, MAPK8	5,8330	64,7465

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Fatores como citocinas para diferenciação e proliferação e quimiocinas para recrutamento de outras células imunologicamente ativas são liberados pelas células T e macrófagos (EDEMIR et al 2008). O padrão de expressão de citocinas e quimiocinas como CCL9, IL2 (MILLÁN et al., 2013), STAT1 (KHATRI et al., 2013), CXCR6 (JIANG et al., 2010) são exploradas com importância bem estabelecida nos mecanismos de sinalização ativadas em rejeição a transplante. Esses genes são associados às vias mais significativas encontradas: Interação entre receptores de citocinas (hsa04060); sinalização de quimiocinas (hsa04062); citotoxicidade mediada por células natural killer (hsa04650).

A Via de sinalização de quimiocinas (hsa04062) possui maior associação, estando relacionada com 5 genes dentre os 42 potenciais biomarcadores identificados no nosso estudo. As quimiocinas -famílias de citocinas - e seus receptores são consolidados na literatura em estudos de transplantes, demonstrando papel importante principalmente na resposta inflamatória resultante da rejeição após o transplante; já quimiocinas inflamatórias são expressas em resposta ao estresse e à infecção (BARKER et al, ). Estudos com biópsias de transplantes renal e cardíaco demonstraram que a expressão de muitos receptores de quimiocinas e seus ligantes estavam associados à rejeição aguda (WU et al, 2016) .

A observação da via de citotoxicidade mediada por células NK (hsa04650) sugere que estas células podem participar indiretamente da rejeição a órgãos. Um possível mecanismo seria a facilitação da ação de células T alorreativas, causando desta forma a inativação ou redução de células NK (KITCHENS et al, 2006).

Neste estudo apresentamos os resultados preliminares da metanálise de dados de transcriptoma, buscando possíveis biomarcadores a rejeição ao transplante cardíaco, dentre os quais destacaram-se os genes CCL9, IL2, STAT1, CXCR6. Esses genes podem ser

direcionadores de hipóteses para pesquisas futuras, porém, enfatizamos que se trata de resultados de um estudo exploratório que necessitam validação experimental.

Um dos grandes desafios foi estabelecer um protocolo de metanálise para conjuntos de dados de diferentes plataformas, em razão da grande gama de métodos disponíveis na literatura. A fim de aprimorar o estudo e refinar os resultados, pretendemos dar continuidade ao trabalho através da análise do conjunto de dados de transcriptoma coletados com diferentes modelos estatísticos de metanálise (modelos de efeitos fixo, aleatório e etc.), comparando os genes identificados por cada método, investigando o potencial de integrar os achados de múltiplos métodos de metanálise, e explorando técnicas de biologia de sistemas para interpretação mais robusta dos resultados.

## 5. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. Basic Local Alignment Search Tool, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1990.9999>>.

BARKER, C. et al. Transplantation and inflammation: implications for the modification of chemokine function. *Immunology*. Disponível em: doi:10.1111/imm.12332. v. 143, p. 138-145, 2014.

BOLSTAD, B. M. et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* , [s. l.], v. 19, n. 2, p. 185–193, 2003.

CAHAN, P. et al. Meta-analysis of microarray results: challenges, opportunities, and recommendations for standardization, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2007.06.016>.

CALÉ, R. et al. Complications of endomyocardial biopsy after heart transplantation. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.repce.2011.12.011>.

CARVALHO, B. et al. Exploration, normalization, and genotype calls of high-density oligonucleotide SNP array data. *Biostatistics* , [s. l.], v. 8, n. 2, p. 485–499, 2007.

CHANG, L.-C. et al. Meta-analysis methods for combining multiple expression profiles: comparisons, statistical characterization and an application guideline. *BMC bioinformatics*, [s. l.], v. 14, p. 368, 2013.

CHEN, R. et al. Differentially expressed RNA from public microarray data identifies serum



protein biomarkers for cross-organ transplant rejection and other conditions. PLoS computational biology, v. 6, n. 9, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000940>

EDEMIR, B. et al. Activation of counter-regulatory mechanisms in a rat renal acute rejection model. BMC Genomics, v. 9, 2008.

GOH, W. W. B.; WANG, W.; WONG, L. Why Batch Effects Matter in Omics Data, and How to Avoid Them. Trends in biotechnology, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 498–507, 2017.

HEDGES, L. V.; HEDGES, L. V.; OLKIN, I. Statistical Methods for Meta-Analysis. [s.l.] : Academic Press, 1985.

IRIZARRY, R. A. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gng015>>.

JIANG, X. et al. Expression of CXCR6 on CD8+ T cells was up-regulated in allograft rejection. Transplant Immunology. V. 22, n. 4, p. 179-183, 2010.

KHATRI, P. et al. A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation. The Journal of experimental medicine, [s. l.], v. 210, n. 11, p. 2205–2221, 2013.

KITCHENS, W. et al. The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance. Transplantation. v. 27, n. 6, p. 811-817, 2006.

LAING, E.; SMITH, C. P. RankProdIt: A web-interactive Rank Products analysis tool. BMC research notes, [s. l.], v. 3, p. 221, 2010.

LEEK, J. T.; STOREY, J. D. Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate

variable analysis. *PLoS genetics*, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 1724–1735, 2007.

MAROT, G. et al. Moderated effect size and P-value combinations for microarray meta-analyses. *Bioinformatics*, [s. l.], v. 25, n. 20, p. 2692–2699, 2009.

MILLÁN, O. et al. Intracellular IFN- $\gamma$  and IL-2 expression monitoring as surrogate markers of the risk of acute rejection and personal drug response in de novo liver transplant recipients. *Cytokine*. v. 61, n 2, p. 556-564, 2013.

PALADINI, S. et al., Identification of Candidate Biomarkers for Transplant Rejection from Transcriptome Data: A Systematic Review. **Mol Diagn Ther**. <https://doi.org/10.1007/s40291-019-00397-y>. 2019.

RAMASAMY, A. et al. Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. *PLoS medicine*, [s. l.], v. 5, n. 9, p. e184, 2008.

RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research*, [s. l.], v. 43, n. 7, p. e47, 2015.

RODRIGUES, C. L.; ZIEGELMANN, P. K. *Metanálise: Um Guia Prático*. 2010. Disponível em: <<https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/16571>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

ROSA, G. J. de M. et al. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982007001000018>.

SANTOS E CUNHA. *Interpretação Crítica dos Resultados Estatísticos de uma Meta-Análise: Estratégias Metodológicas*. Disponível em: <<https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/16571>>.

Acesso em: 25 maio. 2019. *Millenium*, v. 44. p. 85-98, 2013.

WALDRON, L.; RIESTER, M. Meta-Analysis in Gene Expression Studies. *Methods in molecular biology*, [s. l.], v. 1418, p. 161–176, 2016.

WANG, A.; SARWAL, M. M. Computational Models for Transplant Biomarker Discovery. *Frontiers in immunology*, [s. l.], v. 6, p. 458, 2015.

WU, Z. et al. The Chemokine CXCL9 Expression Is Associated with Better Prognosis for Colorectal Carcinoma Patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 78, p 8–13, 2016.

ZHAO, S. et al. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PloS one*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e78644, 2014.

ZHOU, G. et al. Comprehensive Transcriptome Meta-analysis to Characterize Host Immune Responses in Helminth Infections, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004624>>

## **Parte IV**

### **Conclusões e Perspectivas**

No primeiro artigo, realizamos uma análise descritiva abrangente da literatura relacionada a fim de identificar o conhecimento consolidado e as direções de pesquisas futuras. Concluimos que, a partir da análise de alterações moleculares em tipos distintos de transplantes, pode-se obter informações úteis sobre a fisiopatologia da rejeição - como a identificação de mecanismos compartilhados que podem permitir maior especificidade e sensibilidade no diagnóstico. Assim, confirmamos que o perfil de transcriptoma é uma técnica promissora para avançar na busca de biomarcadores de rejeição de transplantes. Ainda, resumimos as evidências presentes sobre genes diferencialmente expressos e miRNAs já publicados, destacando os candidatos mais promissores a biomarcadores da rejeição. Observamos uma alta consistência entre estudos para os CXCL9, CXCL10, STAT1, miR-142-3p e hsa-miR-155, os quais apresentaram evidência mais consistente para expressão aumentada relacionada a rejeição, enquanto hsa-miR-28-5p foi consistentemente reduzido nesta condição.

No segundo artigo, buscamos analisar o perfil de expressão gênica em larga escala oriundos de estudos prévios relacionados à rejeição de transplante cardíaco a partir de técnicas de metanálise e ferramentas de bioinformática para identificar candidatos a biomarcadores de forma mais robusta e investigar seu papel funcional. Apresentamos os resultados preliminares da metanálise de dados de transcriptoma com foco no transplante cardíaco, com um total de 42 genes apresentando alta concordância no padrão de expressão diferencial entre os sete conjuntos de dados analisados, sendo candidatos promissores a biomarcadores de rejeição ao transplante cardíaco.

Em ambos os artigos, o gene STAT1 foi destacado como candidato a biomarcador de rejeição, estando associado a viabilidade celular e resposta patogênica. Além disso, ambos os estudos destacaram a atividade de granzimas no processo de rejeição a transplantes; no primeiro artigo a GZMA, e no segundo, a GZMB. Ambos os estudos encontraram quimiocinas como potenciais biomarcadores - respectivamente, os genes CXCL9 e CCL9 (a classificação corresponde à posição das suas cisteínas amino-terminais). As quimiocinas regulam a resposta inflamatória resultante da rejeição de aloenxerto após o transplante. Ainda, destacamos a via *Chemokine signaling pathway* (hsa04060), enriquecida entre os genes significativos da metanálise (Artigo 2) e consistentemente associada a genes desregulados na rejeição de aloenxerto a partir da análise de múltiplos órgãos (Artigo 1).

A busca para preencher as lacunas de conhecimento existentes no que se refere a biomarcadores de rejeição a transplantes, em particular ao transplante cardíaco, se mostrou uma tarefa difícil, agravada pela heterogeneidade dos estudos e questões ainda em aberto na validação de resultados baseados em transcriptômica. Futuramente, pretendemos complementar essa pesquisa por meio de novas investigações, já que os avanços em técnicas de metanálise tem sido otimizados por desenvolvimentos metodológicos, como o uso de aprendizado de máquina e inteligência artificial, *softwares* e modelos específicos para meta-regressão complexa, e métodos de estimativa robusta de variância em estudos com tamanho amostral pequeno e integração de múltiplos estudos de metanálise para apoio à decisão em medicina e outros campos (Gurevitch et al, 2018).

Nossa pesquisa teve, pois, caráter exploratório; todavia, a despeito de suas limitações, a coleção de genes promissores e de biomarcadores de miRNAs encontrados, com seus correspondentes padrões de expressão diferencial, pode auxiliar na formulação de novas hipóteses sobre ferramentas de diagnóstico de rejeição a serem testadas em estudos posteriores.

Concluimos, enfim, que a análise transcriptômica pode ser uma estratégia aplicável e útil na busca de biomarcadores para identificar de forma precisa pacientes com risco de rejeição a transplantes, mas que desenvolvimentos metodológicos e padronização de protocolos experimentais ainda se fazem necessários para torná-la ainda mais robusta.