

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE
ESPECIALIDAD EN NEFROLOGÍA

TÍTULO

**Cuantificación de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺⁺ en pacientes con
glomerulonefritis**

ALUMNO

ROLANDO CLAURE DEL GRANADO

TUTOR:

DR. RICARDO CORREA ROTTER

Jefe del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral

CO-TUTOR:

DR. LUIS EDUARDO MORALES BUENOSTRO

Médico Adscrito del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral

SEDE

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Ricardo Correa Rotter
Jefe del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
Tutor

Dr. Luís Eduardo Morales Buenrostro
Médico Adscrito del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
Co-Tutor

Dr. Luís Federico Uscanga Domínguez
Jefe del Departamento de Enseñanza
INNSZ

Dr. Rolando Claire Del Granado
Médico Residente del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
Alumno

A mi familia: Pá, Má, Alvi, Animaleja, Sergio y Ariane....por ellos estoy aquí, por ellos logré lo que soy....a ellos me debo.

A Déborah....gracias por estar presente, por el tiempo compartido, por escuchar, por dibujar nuevamente una sonrisa en mi rostro.

A mis “hermanos”....Pato, Loca, tío René y Lucho se que a la distancia siempre compartieron sueños y logros. Gracias por decir presente sobretodo estos últimos meses.

A Jorge-Arlette, Nacho-Mariana, Toño-Tere y Bernardo....hicieron de mi residencia algo que disfrute mucho, fueron unos muy buenos siete años; espero que la amistad que nos une no se pierda jamás.

Cow co. y Nena....por extender esa mano amiga siempre e incondicionalmente en los momentos más difíciles.

A mi familia mexicana....por permitirme ser parte de ella los últimos 6 años.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Correa-Rotter por todo el apoyo y su labor a lo largo de mi formación como nefrólogo.

Mi agradecimiento a Luís Eduardo Morales que contribuyó de forma decisiva en la redacción, elaboración y finalización de este proyecto.

ÍNDICE

I Introducción.....	
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Tolerancia.....	2
1.3 Células T reguladoras (Treg).....	3
1.4 ¿Cómo actúan las células Treg?.....	6
1.5 Papel de las células Treg en la enfermedad.....	7
1.6 Las células Treg y su papel en la Nefrología.....	8
1.6.1 Las células Treg y el Trasplante renal.....	9
1.6.2 Las células Treg y su papel en las glomerulonefritis.....	9
II Justificación.....	11
III Planteamiento del problema.....	12
IV Hipótesis.....	13
V Objetivos.....	14
VI Metodología.....	15
VII Análisis.....	16
VIII Resultados.....	20
IX Discusión.....	27
X Conclusiones.....	33
XI Anexos.....	34
XII Bibliografía.....	35

I INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes:

Las glomerulonefritis (GMN) se caracterizan por una amplia variedad de presentaciones clínicas, patrones histológicos y desenlaces. La alteración en la función, estructura y permeabilidad de los glomérulos, puede estar ocasionada por enfermedades inflamatorias y no-inflamatorias. Generalmente, el término glomerulonefritis implica patogenia de tipo inmune, sin embargo, no todo daño glomerular se atribuye a este proceso (ej. amiloidosis, nefropatía diabética)^{1,2}.

Dentro de la patogénesis del daño glomerular juegan un papel importante la respuesta inmune inicial, la extensión de la misma y su duración; estos parámetros determinan la extensión del daño y la progresión hacia glomerulosclerosis³. **Fig.1**

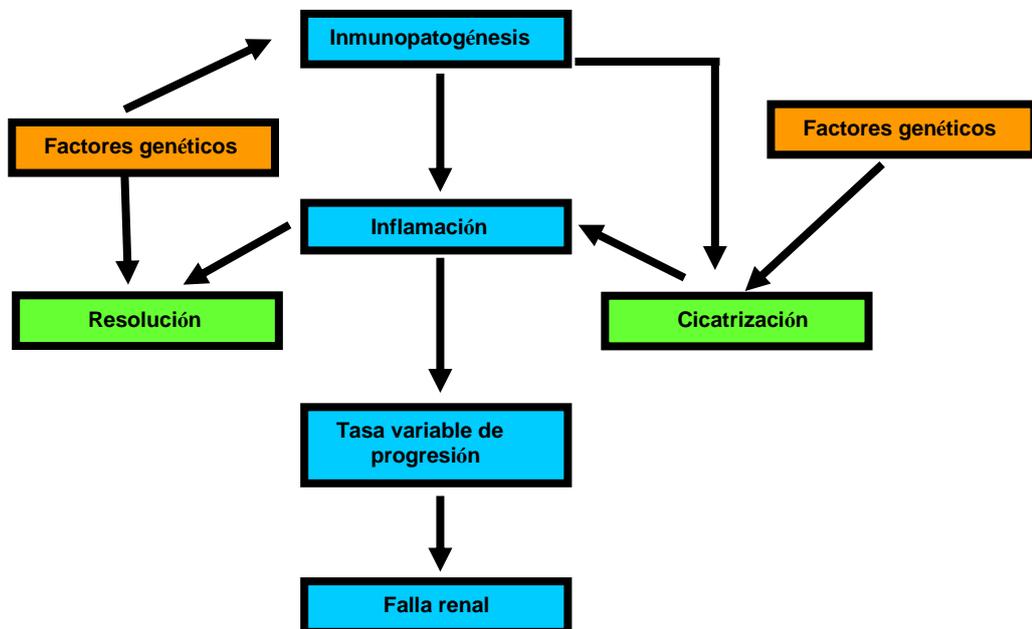


Fig.1 Mecanismos involucrados en la patogénesis del daño glomerular. Modificado Johnson RJ, Feehally J, ed. Comprehensive Clinical Nephrology. New York: Mosby; 2003: 243-253.

Los eventos que inician el daño glomerular, aún son poco entendidos y la evidencia directa de la patogénesis inmune es muy variable. La mayoría de las glomerulonefritis resultan de una respuesta inapropiada dirigida contra antígenos propios (auto-antígenos) al perder la tolerancia o de una respuesta alterada frente a antígenos extraños⁴. Aunque la evidencia directa de la patogénesis inmune es muy variable, quizás el mejor ejemplo del papel de la inmunidad adaptativa y el desarrollo de glomerulonefritis, lo constituyen las GMN con semilunas⁵.

Estudios *in vivo*, al igual que en modelos experimentales de GMN, han demostrado un papel central de las células T o de mecanismos efectoros mediados por estas células en relación al desarrollo y progresión del daño glomerular⁶. Por tanto, la presencia de una población de células reguladoras o supresoras como inicialmente fueron descritas, como lo son las células T reguladoras naturales (nTreg), constituyen un mecanismo importante en el control de células T y B auto-reactivas y en el mantenimiento de la tolerancia periférica.

1.2 Tolerancia

La tolerancia se caracteriza por la inactivación funcional de células T auto reactivas al encontrarse éstas con un antígeno, mientras permanecen vivas por un periodo extenso de tiempo en un estado de anergia.

La eliminación de la mayoría de los linfocitos auto-reactivos durante el desarrollo inmune (tolerancia central o tímica), constituye el principal mecanismo de discriminación entre lo propio y lo extraño, además de determinar la auto-tolerancia. La eliminación central, sin embargo, no es completa y hay evidencia de la existencia de células auto-reactivas en la periferia en individuos sanos con potencial para ocasionar enfermedades autoinmunes. Se han propuesto diferentes mecanismos que mantienen la tolerancia periférica, pudiendo ser éstos activos o pasivos. La ignorancia inmunológica, y la eliminación de células T

activadas por falta de señales de co-estimulación, la falta de factores de crecimiento o a través de señales de apoptosis (Fas-FasL) constituyen los mecanismos pasivos⁷.

Dentro de los mecanismos de tolerancia periférica activa, uno en particular parece jugar un papel importante y dominante, y está constituido por cierto tipo de células T que regulan a la baja, la activación y expansión de los linfocitos auto-reactivos. A pesar de que la existencia de esta población celular con capacidad supresora ya había sido propuesta desde 1970 por Gershon⁸, la falta de marcadores confiables que la identifiquen, hizo que se dudara de su papel en el mantenimiento de la tolerancia periférica e incluso de su existencia. No fue sino hasta mediados de los años 90 que tras el trabajo del grupo de Sakaguchi, el interés por esta población celular renació. Este trabajo identificó a una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ que co-expresaban la cadena α del receptor de IL-2 (CD25)⁹. A esta población celular se denomina actualmente como células T reguladoras naturales (nTreg) y son responsables de mantener la tolerancia periférica^{10,11}.

1.3 Células T reguladoras (Treg)

Esta subpoblación de células CD4⁺ puede ser de dos tipos: naturales e inducibles ó adaptativas.

Las Treg naturales se originan en el timo, constituyen entre el 5-10% de las células CD4⁺ en sangre periférica y expresan de forma constitutiva la cadena α (CD25) del receptor de IL-2 (IL-2R). Inicialmente se usó este marcador para identificarlas; sin embargo, en modelos murinos la presencia de inflamación o inducción inmune, hace que este marcador se exprese y permanezca por varios días tanto en células CD4⁺ como CD8⁺. En humanos, este marcador es menos confiable ya que los linfocitos T convencionales lo pueden expresar aún sin estar activados. Sin embargo, la expresión de altas concentraciones de CD25⁺ (CD25^{hi}

o CD25⁺⁺) en células humanas, constituye un mejor marcador para las Treg, pero los grupos difieren en cómo definir a las células CD25^{hi} ¹².

Se han buscado otros marcadores fenotípicos que pudieran ayudar a distinguir a las Células Treg de otros linfocitos T. Muchas de estas moléculas son expresadas de forma constitutiva por las células Treg, y son menos abundantes o se encuentran ausentes en otros linfocitos T. Estos marcadores incluyen el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el gen relacionado al receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GIRT), CD45RB, neurofilina y el gen 3 activador de linfocitos (LAG3) ^{13,14}.

Estas células también expresan un regulador transcripcional, llamado Foxp3, que constituye un gen maestro en el desarrollo y función de estas células. Constituye el marcador más específico para distinguir a las células Treg de otras poblaciones celulares, ya que está expresado predominantemente en células CD4⁺CD25⁺ y las células negativas para Foxp3 carecen de capacidad reguladora ^{15,16}. **Fig.2**

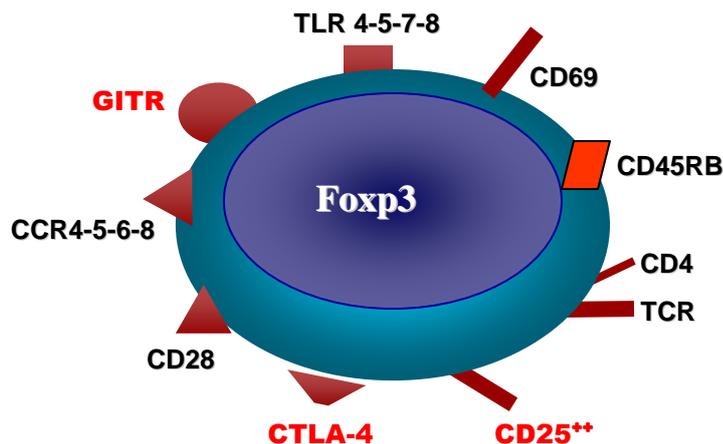


Fig.2 Esquema de una célula Treg expresando marcadores de superficie y factor de transcripción Foxp3, este último esencial en el desarrollo de esta población celular. Los marcadores que se expresan constitutivamente se muestran en color rojo.

La ausencia de este factor de transcripción Foxp3, está involucrada en la patogénesis de una enfermedad linfoproliferativa recesiva ligada al cromosoma X, tanto en ratones (scurfy) como en humanos. La enfermedad de scurfy, en los primeros, y los síndromes de desregulación inmune poliendocrinopatía-enteropatía, ligado al cromosoma X (IPEX) y el de desregulación autoinmune-alérgica, ligado a X (XLAAD) en los últimos¹⁷. Estas enfermedades se caracterizan por linfoproliferación, niveles séricos elevados de IgE, eosinofilia, infiltrados inflamatorios en diversos órganos como piel, tracto gastrointestinal, pulmón, hígado, etc. Esto demuestra que estas células juegan un papel importante en el control de la auto-inmunidad y que la falta de desarrollo o la alteración en su función determina la aparición de auto-inmunidad.

En la periferia las células Treg se originan de células T CD4⁺CD25⁻, a través de diferentes mecanismos como: exposición a dosis bajas y sostenidas de un antígeno, tolerancia oral, inmunoterapia (medicamentos inmunosupresores como: esteroides, inmunoglobulina anti-timocito, y sirolimus) y la acción de ciertas citocinas^{18,19}. **Fig.3**

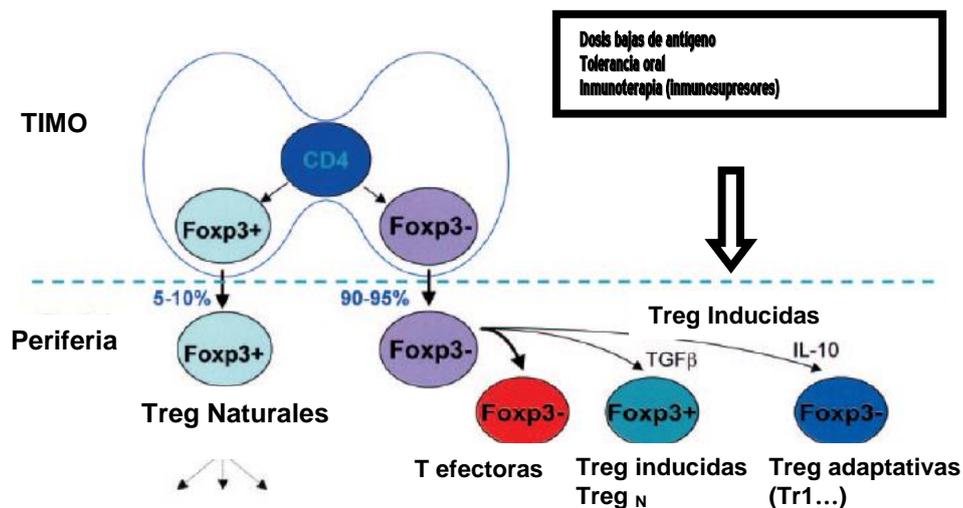


Fig-3. Mecanismos de origen de las células Treg en la periferia. Modificado J Am Soc Nephrol 17: 2644-2646, 2006.

1.4 ¿Cómo actúan las células Treg?

Estudios *in vitro*, han demostrado que las células Treg se caracterizan por estar en estado de anergia, a menos que le sean administradas altas concentraciones de IL-2, citocina que juega un papel fundamental para el desarrollo de las mismas en el timo y para su homeostasis y activación de la función supresora en la periferia²⁰. Las células Treg ejercen su función supresora mediante dos tipos de mecanismos: por contacto celular y a través de citocinas. *In vitro*, el mecanismo de acción dominante parece ser el mediado por contacto celular mediante CTLA-4 y su ligando CD80/CD86, PD1 – PD2 y sus respectivos ligandos PD-L1/PD-L2, y finalmente a través de citotoxicidad (perforina y granzima A). *In vivo*, los mecanismos de supresión no sólo incluyen los de contacto celular, sino también los mediados por las citocinas; IL-10 y TGF- β ²¹⁻²⁴. **Fig.4**

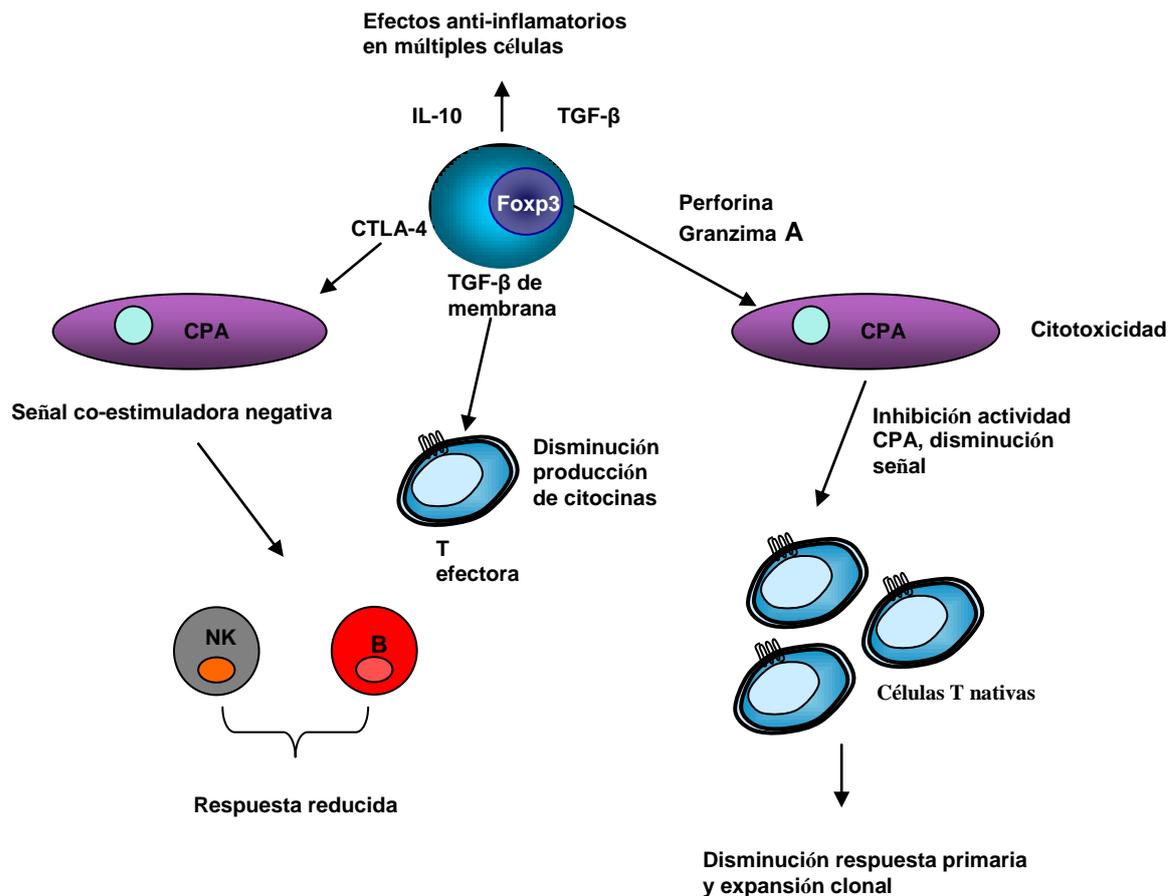


Fig. 4 Mecanismos propuestos por los cuales las células Treg ejercen su efecto supresor. CPA (célula presentadora de antígenos), NK (linfocito natural killer), IL-10 (interleucina 10), TGF- β (factor de crecimiento transformante β), CTLA-4 (receptor asociado a linfocitos T citotóxicos).

1.5 Papel de las células Treg en la enfermedad

Desde 1985 Sakaguchi y colaboradores, observaron en modelos animales que la ausencia o disminución de una subpoblación de células T causaba enfermedad autoinmune órgano específica y su transferencia la prevenía²⁵. Posteriormente, observaron que la transferencia de una población de células T, de la cual se había eliminado a las células Treg inducía enfermedad autoinmune multi-orgánica en animales. Por lo tanto, el concepto de las células reguladoras T CD4⁺ ha estado presente desde hace más de dos décadas.

Como se mencionó anteriormente, el concepto fue abandonado debido a la falta de marcadores que pudieran identificar adecuadamente a esta población celular; sin embargo, con los progresos logrados en el área, el concepto de las células Treg ha sido uniformemente aceptado, lo cual a renovado el entusiasmo acerca de la posibilidad de que estas células puedan tener aplicaciones terapéuticas en enfermedades autoinmunes asociadas a disfunción de esta subpoblación celular. Por ejemplo, se ha demostrado que las Treg son deficientes en número en pacientes con esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes²⁶⁻²⁸. En contraste, muchos estudios las han involucrado con la progresión del cáncer²⁹. En humanos, su número puede estar elevado en sangre periférica de pacientes con neoplasias y encontrarse un porcentaje elevado de Tregs en el tejido tumoral³⁰.

Las células Treg, también participan en el control de la alergia; la mejor evidencia constituyen los ensayos con inmunoterapia alérgeno-específica y el observar respuesta de los pacientes con resolución del cuadro^{11, 12}.

En relación al papel que tienen en la infección, la respuesta de las células Treg es variable, juegan un papel beneficioso al limitar las consecuencias de la infección (daño tisular asociado a la respuesta del huésped), como en la infección por el virus de la hepatitis C. Por otro lado, la supresión de su actividad o reducción en número en modelos animales, favorece la resolución de ciertas infecciones como las asociadas al virus del Herpes Simple, algunas variedades de plasmodios causantes del paludismo, y la Leishmania major¹².

1.6 Las células Treg y su papel en la Nefrología

1.6.1 Las células Treg y el Trasplante

El concepto de tolerancia inmunológica en el trasplante es diferente. Ésta no debe ser vista como una no respuesta completa frente al injerto, sino como una falta de respuesta efectora inmune que destruya al injerto con inmunocompetencia general conservada.

Las células T reguladoras involucradas en la tolerancia del injerto, no están limitadas a las células Treg; también se ha descrito el papel de las CD4⁺CD25⁻, CD8⁺ CD28⁻, NK ó DN T.³¹

Los estudios de Salama y cols. y de Game y cols. en 2003, sugieren que las células Treg regulan la alorespuesta anti-donador en la vía indirecta, la cual es importante en el desarrollo de la tolerancia en su fase de mantenimiento^{32,33}. Esto,

ha despertado el interés por desarrollar estrategias para expandir esta población celular como parte del tratamiento del trasplante.

Ciertos inmunosupresores usados en la terapia de inducción o de mantenimiento pueden expandir esta población celular. En estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, se ha observado, que el uso de globulina anti-timocito, el sirolimus, y los esteroides favorecen la actividad de las células Treg, a diferencia del uso de inhibidores de calcineurina que al inhibir IL-2, necesaria para el desarrollo de esta población celular, evitan su expansión, proliferación y consecuente desarrollo de tolerancia³⁴⁻³⁶.

1.6.2 Las células Treg y su papel en las Glomerulonefritis

Como se mencionó anteriormente, las células T efectoras juegan un papel importante en el desarrollo de las glomerulonefritis, por lo que se ha empezado a investigar si la deficiencia numérica o funcional de las células Treg es parte de la patogenia de las GMN. Es así, que en modelos murinos de GMN experimental anti-membrana basal glomerular, se ha demostrado que las células Treg inhiben este tipo de glomerulonefritis. El efecto protector no fue debido a la inhibición de la respuesta inmune inicial, sino más bien a la limitación del daño al órgano blanco³⁷. En otro modelo, se ha observado que protegen contra el daño renal crónico inducido por adriamicina, posiblemente al inhibir a células T efectoras o limitar el daño secundario a la activación del sistema inmune innato; este modelo, se asemeja a una glomérulo-esclerosis focal y segmentaria³⁸. Las células Treg pueden inhibir el daño asociado a la activación del sistema inmune innato que juega un rol importante en la progresión del daño crónico, en muchas de las enfermedades renales, entre ellas las glomerulonefritis³⁹. En humanos, se ha demostrado que el número de estas células está disminuido en pacientes con enfermedad de Goodpasture en los periodos de actividad y su número aumenta en los periodos de remisión⁴⁰. Algunos modelos animales que carecen de células

Treg desarrollan glomerulonefritis y títulos elevados de Anti-DNA de doble cadena, marcador asociado al diagnóstico de lupus eritematoso sistémico(LES)⁴¹. Sin embargo, algunos estudios como el de Bagavant y Tung; utilizando un modelo murino, demostraron la incapacidad de las células Treg para suprimir la glomerulonefritis lúpica y la sialoadenitis en ratones predispuestos al desarrollo de lupus⁴².

Si se toma en cuenta, que muchas de las glomerulonefritis tienen un origen autoinmune con respuestas humorales y celulares dirigidas contra antígenos glomerulares exógenos o endógenos, que el balance entre autoinmunidad y tolerancia está a favor de la primera en las glomerulonefritis y que la expansión o la transferencia del pool de células Treg en estudios experimentales inclina la balanza a favor de la tolerancia, hacen de estas células un potencial blanco terapéutico sobretodo en aquellas glomerulonefritis que tienen curso con recaídas y remisiones, como en las secundarias a LES, diversas formas de vasculitis y en la nefropatía por IgA con semilunas⁴.

Lo que se necesita ahora es explorar qué nefropatías humanas son capaces de ser reguladas por las células Treg y en cuáles su número está disminuido, o si la patógena del daño inmunológico está asociado a alteraciones en su función independientemente del porcentaje.

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que las células Treg juegan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia en humanos y modelos animales, por lo que su presencia podría participar activamente en la protección contra el desarrollo de enfermedades autoinmunes, el mantenimiento de tolerancia en el trasplante y en modelos murinos, evitando la progresión de daño renal crónico, el desarrollo de un cuadro parecido a la glomeruloesclerosis focal y segmentaria, y la glomerulonefritis anti-membrana basal.

Por lo anterior, se pueden plantear las siguientes preguntas:

1. ¿Está la población de células Treg disminuida en los pacientes con glomerulonefritis?
2. ¿Es diferente la proporción de células Treg en la población con LES y GMN no lúpicas?

II JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades glomerulares primarias o secundarias son causa del 90% de la Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT), con requerimiento de sustitución de la función renal. Esto, en Estados Unidos de América, implica un costo de aproximadamente 20 billones de dólares al año.

La GMN, no es una enfermedad única, implica una variedad de patrones histológicos, características clínicas y desenlaces, lo cual sugiere múltiples mecanismos patogénicos.

Estudios en glomerulonefritis humana y en modelos animales, han confirmado un papel central de las células T y mecanismos efectores mediados por éstas en el desarrollo y progresión del daño glomerular, que puede terminar en glomérulo esclerosis y finalmente en IRCT.

Recientemente, se describió el papel fundamental de las células Treg en el mantenimiento de la tolerancia en roedores y en humanos, por lo que estas células evitan el desarrollo de enfermedades autoinmunes al mantener la tolerancia periférica. Al igual que lo observado en estudios en modelos animales, los pacientes con enfermedades autoinmunes, presentan alteraciones funcionales o en el número de células Treg.

Dado que se puede expandir la población de células reguladoras autólogas por estimulación in vitro, existe una potencial aplicación terapéutica para el tratamiento de pacientes con diversas formas de glomerulonefritis. Se podría, de esta forma, reducir el uso de terapia inmunosupresora no específica y sus efectos adversos, así como la progresión de la glomerulonefritis a IRCT.

IV HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo:

1. La subpoblación de células CD4⁺CD25⁺⁺, se encuentra disminuida en pacientes con GMN activa.

Hipótesis Nula:

1. La subpoblación de células CD4⁺CD25⁺⁺, no se encuentra disminuida en los pacientes con GMN activa.

V OBJETIVOS

Objetivo Primario:

- Investigar si la subpoblación $CD4^+CD25^{++}$ (Treg), está disminuida en pacientes con GMN lúpica y no lúpica.

Objetivos secundarios:

- Identificar diferencias en la cantidad de células Treg, entre los diferentes tipos de GMN.
- Investigar si el número de células Treg guarda relación con el uso o no de medicamentos inmunosupresores.

VI METODOLOGÍA

a) Diseño. Es un estudio de casos y controles.

b) Población de este estudio. El grupo de casos en estudio, se obtuvo de la población de pacientes a quienes se les realizó una biopsia renal diagnóstica y cuyo resultado final fue el de glomerulonefritis lúpica o glomerulonefritis primaria. Los controles sanos provienen de la población de donadores renales, que como parte del manejo habitual en el Instituto, se realiza una biopsia al injerto renal durante la cirugía de procuración del órgano. Veinte de estos pacientes participaron en el protocolo para lo cual se les realizó cuantificación de células T reguladoras el día de la cirugía.

c) Grupos de estudio: Se formaron 3 grupos de poblaciones diferentes: 1) Grupo con GMN lúpica (grupo LES): Diez sujetos con nefropatía lúpica, 2) Grupo con GMN no lúpica (grupo GMN): Diez pacientes con glomerulonefritis primaria y/o secundaria no lúpica. 3) Grupo control: Veinte donadores renales pareados 1:1 por edad y género con los pacientes de los grupos previos.

d) Lugar de realización. Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

e) Período de tiempo. Enero de 2006 a julio del 2007.

f) Criterios de inclusión para este estudio:

Casos:

- Mayores de 18 años.
- Biopsia renal con diagnóstico de GMN lúpica o GMN primaria y/o secundaria.
- Que acepten su inclusión en el estudio y firmen el consentimiento informado.

Controles:

- Donadores renales sanos que cuenten con tejido analizable de la biopsia renal y conteo de células T reguladoras del día de la cirugía del trasplante.

g) Criterios de exclusión.

- Casos o controles que no cuenten con tejido en parafina para los estudios histopatológicos.

h) Tamaño de la muestra.

Dado que es un estudio de tipo exploratorio, se decidió este tamaño de muestra por conveniencia. Sin embargo, una vez que tuvimos los resultados, realizamos un cálculo del tamaño de muestra basados en diferencia de medias para muestras relacionadas, tomando los valores en % de células Treg para el total de pacientes (20 pacientes y 20 controles) mostrados en la tabla 3. Se incluyó en la fórmula una delta de 1.5, con una desviación estándar para los casos de 2.3 y para los controles de 1.7, con lo cual nos dio un tamaño de muestra de 19 pares. A su vez, con esos mismos valores calculamos el poder estadístico alcanzado con 20 pares y resultó en un poder del 82.5% (se requiere un mínimo del 80%). Con lo anterior, podemos decir que el tamaño de muestra total es suficiente para rechazar la hipótesis nula previamente referida.

i) Variables.

Variable dependiente: Número y % de Células T reguladoras.

Variables independientes: edad, género, tiempo de evolución de la enfermedad, tipo de presentación GMN, creatinina sérica, nitrógeno de urea, glucosa, depuración de creatinina calculada por MDRD, proteinuria en orina de 24 hrs., sedimento urinario, uso de inmunosupresores.

j) Definición de variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
%Treg	Cantidad relativa de células Treg en relación al total de células CD4.	Cuantitativa continua.	Porcentaje.
Número Treg	Cantidad absoluta de células Treg.	Cuantitativa continua.	Número de células
% Células T efectoras	Cantidad relativa de células con baja expresión de CD25	Cuantitativa continua.	Porcentaje
Número Células T efectoras	Cantidad absoluta de células T efectoras	Cuantitativa continua.	Número de células
Edad	Tiempo transcurrido desde su nacimiento hasta el momento de inclusión al estudio.	Cuantitativa continua.	Años.
Género	Condición orgánica que distingue al hombre de la mujer.	Nominal.	Masculino Femenino.
Uso de esteroides previo	Historia de uso de esteroides de manera crónica previo al ingreso.	Nominal	Dicotómica: Sí o No.
Uso de inmunosupresores previo	Historia de uso de inmunosupresores diferentes a esteroides de manera crónica previo al ingreso.	Nominal	Dicotómica: Sí o No.

Creatinina sérica	Nivel sérico de creatinina	Cuantitativa continua.	mg/dl
Tasa de filtrado glomerular estimada	Tasa de filtrado glomerular estimada por fórmula del MDRD.	Cuantitativa continua.	ml/min.

k) Procedimientos.

Selección de las muestras.

En el Instituto, se realizan un promedio de 5.3 biopsias mensuales, de las cuales 42% corresponden a LEG y 58% a otro tipo de GMN. Se seleccionaron pacientes a los cuales se les iba a realizar una biopsia renal percutánea (BRP) como parte del estudio de su enfermedad renal y que tras aceptar el procedimiento, firmaron el consentimiento informado. Los pacientes al momento de la BRP tenían diversas manifestaciones de enfermedad glomerular como síndrome nefrótico, síndrome nefrítico, o síndrome hematuria-proteinuria, lo que nos indica que en ese momento existía un proceso inflamatorio a nivel glomerular. Se seleccionaron dos grupos: uno conformado por pacientes con LES (n=10) y el segundo conformado por pacientes con sospecha de algún tipo de GMN primaria (n=10). Por otra parte, desde enero del 2004 en el Instituto se realiza de rutina una biopsia al riñón que se va a trasplantar, sea de donador vivo o de donador cadavérico. Dicha biopsia se hace inmediatamente antes del trasplante y es con fines de documentar el estado basal del órgano. Cabe señalar que con fines de otro protocolo, se realizó medición de células T reguladoras a un grupo de donadores y nosotros seleccionamos 20 de ellos como controles en el presente estudio, pareados por edad y género.

Análisis de citometría de flujo.

Se obtuvo 5 ml de sangre venosa con anticoagulante EDTA. Se realizó citometría de flujo con doble marcaje para cuantificar la población con CD4⁺CD25⁺⁺ (alta expresión de CD25 o CD25^{hi}), para lo cual se utilizó anti-CD25 conjugado con PE y anti-CD4 con FITC. Se usó un citómetro Beckton Dickinson FACScan®. En cada medición se contabilizaron 10000 células.

VII ANÁLISIS

Se utilizó estadística descriptiva de acuerdo al nivel de medición de las variables, apoyados en medidas de proporción, de tendencia central y de dispersión. Las variables continuas fueron evaluadas con la prueba *Z de Kolmogorov-Smirnov* para determinar el tipo de distribución. Todas ellas mostraron una distribución normal, por lo que se reportaron como medias y desviación estándar. Para comparar proporciones entre 2 grupos utilizamos *X² de Pearson* con corrección de Yates o *Prueba exacta de Fisher* según aplicara. Para comparación de las variables continuas entre los grupos 1 o 2 con sus respectivos controles, usamos *T pareada*, mientras que para comparar al grupo 1 contra el grupo 2, utilizamos *T de Student* para muestras no relacionadas. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

VIII RESULTADOS

Se estudiaron 20 casos (10 pacientes con GMN lúpica y 10 casos con GMN no lúpica) y sus respectivos controles, el 70% eran del género femenino con un promedio de edad de 33.4 ± 12.2 años (mínimo de 19 y máximo de 60 años) en los casos y de 33.7 ± 10.2 (mínimo de 23 y máximo de 56 años) para el grupo control, $p = 0.675$.

GMN lúpica

Dentro del grupo de pacientes con glomerulonefritis lúpica ($n=10$), el promedio de edad fue de 27.8 ± 8.9 años similar a sus controles cuyo promedio fue de 29.3 ± 7.7 años ($p = 0.14$). Como era esperado, dominó el género femenino con 9 (90%), que fue igual en ambos grupos por el pareo.

Respecto a la GMN lúpica, el 50% correspondía a una GMN tipo IV y el otro 50% a una GMN tipo III; el 70% estaba asociada a una GMN tipo V (clasificación ISN/RPS), mientras que el 30% restante tenía una forma pura (2 pacientes con una tipo IV y 1 paciente con una tipo III). Dichos pacientes tenían un índice de actividad máximo de 14 y un mínimo de 1 con una media de 6 ± 4.6 , mientras que el índice de cronicidad tuvo un máximo de 9 y un mínimo de 0 con una media de 2.7 ± 3.2 . Se muestran características demográficas y de laboratorio de los pacientes al momento de la biopsia renal percutánea en la **Tabla 1**.

Tabla.1 Características generales y resultados de histopatología renal. GMN lúpica (n=10)			
Edad (años)	27.8±8.89		
Género (F/M)	9 / 1		
Glucemia (mg/dl)	90.1±13		
BUN (mmol/l)	18.5±9.49		
Creatinina sérica (mg/dl)	1.13±0.96		
Albúmina sérica (gr/dl)	2.5±0.63		
MDRD (ml/m/1.73m ²)	89.9±34.1		
Proteinuria de 24 hrs (gr)	5.9±5.35		
Tipo GMN clasificación	III	1	
ISN/RPS	IV	3	
	III + V	4	
	IV + V	2	

Glomerulonefritis no lúpicas.

Del grupo de pacientes con glomerulonefritis no lúpica (n=10), la mitad correspondió al género femenino al igual que sus controles. El promedio de edad fue de 39 ± 12.9 años mientras que en sus controles el promedio fue de 38.1 ± 11.0 años ($p = 0.37$), $p = 0.37$.

Desde el punto de vista histopatológico, el 90% presentaron una GMN primaria, con la siguiente distribución: GMN Membranosa 2 casos, Nefropatía por IgA 2 casos, Glomeruloesclerosis focal y segmentaria 2 casos, GMN Membrano proliferativa tipo II 2 casos y GMN Pauci-inmune 1 caso. Un solo caso (10%) presentó una GMN secundaria (correspondió a una glomerulopatía diabética). Se muestran algunas características demográficas y de laboratorio de los pacientes al momento de la biopsia renal percutánea en la **Tabla 2**.

Tabla.2 Características generales y resultados de histopatología renal. GMN no lúpica (n=10)		
Edad (años)	39±12.92	
Género (F/M)	5 / 5	
Glucemia (mg/dl)	94.1±20.81	
BUN (mmol/l)	23.49±14.78	
Creatinina sérica (mg/dl)	1.4±1.21	
Albúmina sérica (gr/dl)	2.44 ± 0.75	
MDRD (ml/m/1.73m2)	93±63.38	
Proteinuria de 24 hrs (gr)	7.11±5	
Tipo GMN	Membranosa primaria	2
	Glomeruloesclerosis focal y segmentaria primaria	2
	Membranoproliferativa tipo II	2
	Nefropatía por IgA	2
	Proliferativa extra-capilar Pauci-inmune	1
	Glomerulopatía diabética	1

Cuantificación de células Treg en sangre periférica (CD4⁺CD25⁺⁺)

Como se muestra en las figuras 5 y 6, se tomó como marcador de la población de células Treg, la alta expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25⁺⁺).

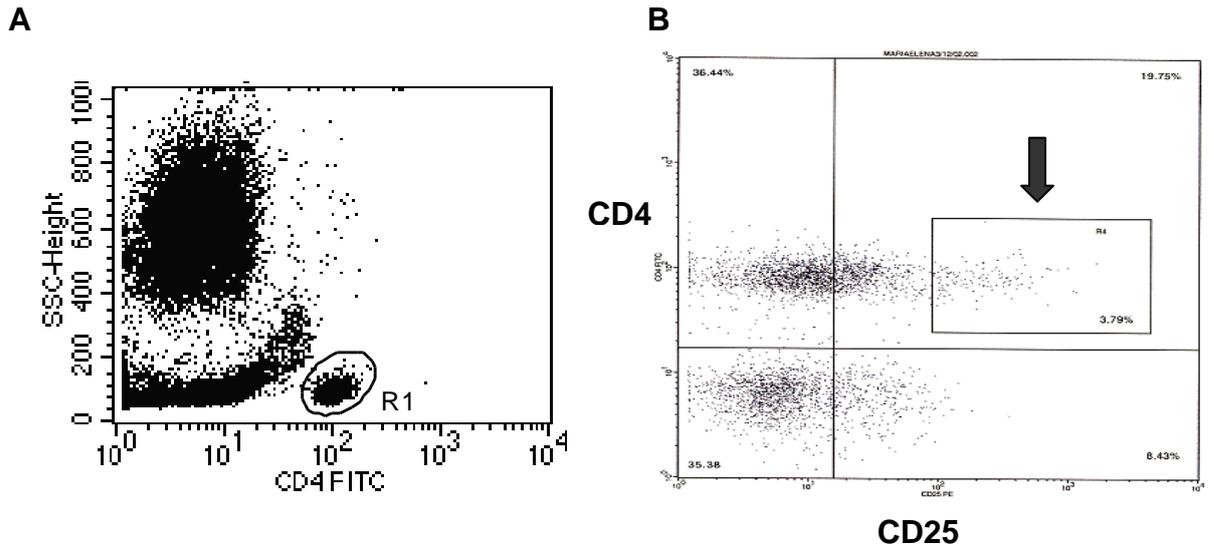


Fig.5 Muestra representativa del análisis de citometría de flujo con doble marcaje para identificar células $CD4^+CD25^{++}$. (A) Selección población linfocitos $CD4^+$. (B) Selección linfocitos $CD4^+$ con alta expresión de $CD25$ ($CD25^{++}$ o $CD25^{hi}$), como se señala en la ventana (flecha negra)

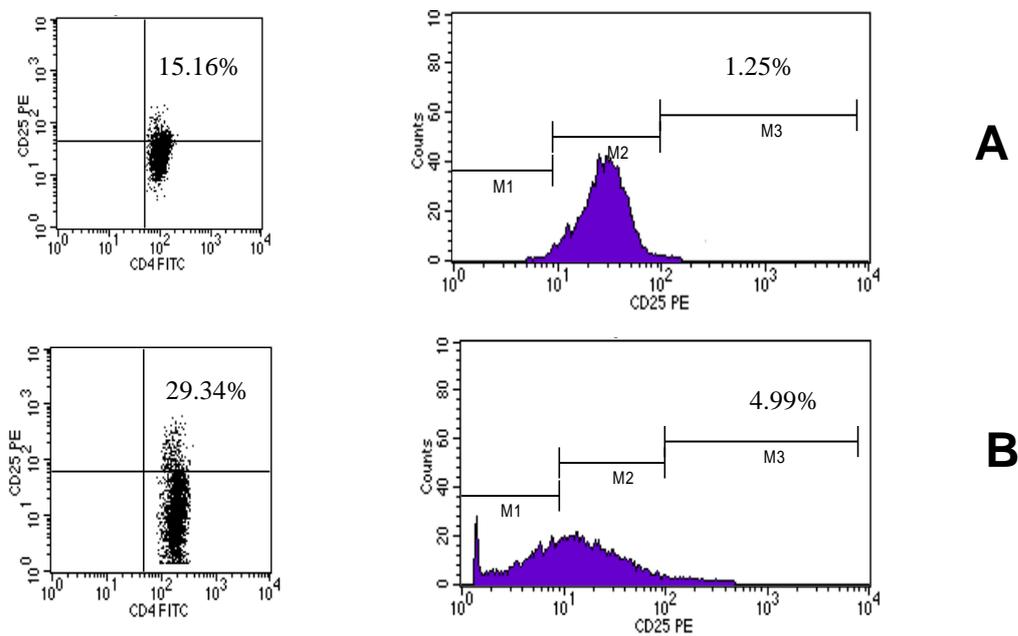


Fig.6 Muestra representativa de un paciente con glomerulonefritis (A) y su respectivo control (B), se observa de izquierda a derecha el porcentaje de células $CD4^+CD25^{++}$ seleccionas por citometría de flujo y cuantificadas por intensidad media de fluorescencia (alta expresión de $CD25$).

En la tabla 3 mostramos las diferentes poblaciones celulares evaluadas, comparando casos vs. sus controles pareados. Dicha comparación se hizo de manera separada para GMN lúpica, GMN no lúpica y para la población total de casos. Como se puede ver en dicha tabla, el número y porcentaje de células Treg en sangre periférica es menor para el total de los casos de GMN (n=20) en comparación con sus controles (14.33 ± 21.30 vs. 24.94 ± 16.70 $p = 0.048$ y 2.58 ± 2.35 % vs. 4.20 ± 1.73 % $p = 0.007$, respectivamente). Por el contrario, el porcentaje de células con una baja expresión de CD25 (CD25⁺ o CD25^{lo}), que corresponden a los linfocitos T efectores fue mayor en los pacientes con GMN en comparación con sus controles (74.17 ± 20.61 vs. 46.71 ± 17.78 con una $p = 0.001$), aunque la diferencia en el número absoluto de dichas células no alcanzó significancia (356.56 ± 237.24 vs. 275.82 ± 130.52 con una $p = 0.179$).

Para determinar si existía alguna diferencia en número y porcentaje de células Treg CD25⁺⁺ en relación al tipo de GMN se compararon ambos grupos por separado. En relación a las GMN lúpica, el número y porcentaje de las células CD4⁺CD25⁺⁺ fue menor que en sus controles ($p = 0.005$ y $p = 0.001$, respectivamente); mientras que para el grupo de GMN no lúpica, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número o porcentaje de células CD4⁺CD25⁺⁺ comparados con sus controles ($p = 0.965$ y $p = 0.485$, respectivamente). Por otro lado, el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ (linfocitos T efectores) era mayor tanto en la GMN no lúpica ($p = 0.010$) como en la GMN lúpica ($p = 0.015$), ver **Tabla 3 y Fig. 7**.

Tabla.3 Número total y porcentaje de leucocitos, linfocitos, células CD4⁺CD25⁺, y células CD4⁺CD25⁺⁺ en los dos grupos de pacientes y sus respectivos controles. GMN lúpica (n=10) y GMN1a (n=10). Análisis por citometría de flujo.

Parámetro	GMN	Casos		Grupo Control		Valor de P	
		Número de células	Porcentaje de células (%)	Número de células	Porcentaje de células (%)		
Leucocitos	LES (10)	5573 ± 1416	-	6740 ± 1816	-	0.176	
	GMN no LES (10)	6820 ± 2504	-	7630 ± 1199	-	0.417	
	Total (20)	6196 ± 2080	-	7185 ± 1565	-	0.119	
Linfocitos	LES (10)	894 ± 380	17 ± 8	1575 ± 933	23 ± 11	0.032	0.088
	GMN no LES (10)	1736 ± 742	26 ± 10	1521 ± 587	20 ± 8	0.453	0.091
	Total (20)	1315 ± 718	21 ± 10	1548 ± 760	22 ± 10	0.932	0.287
Linfocitos CD4+	LES (10)	323 ± 152	36 ± 6	624 ± 377	39 ± 6	0.018	0.182
	GMN no LES (10)	630 ± 316	35 ± 5	584 ± 246	38 ± 7	0.712	0.355
	Total (20)	476 ± 288	39 ± 6	604 ± 310	36 ± 6	0.154	0.126
Linfocitos CD4+25+	LES (10)	250 ± 166	75 ± 21	270 ± 146	45 ± 19	0.738	0.015
	GMN no LES (10)	463 ± 257	74 ± 21	281 ± 121	49 ± 17	0.079	0.010
	Total (20)	356 ± 237	74 ± 21	275 ± 130	47 ± 18	0.179	<0.001
Linfocitos CD4+25++	LES (10)	5 ± 4.1	1.8 ± 1.8	26 ± 17	4.5 ± 1.9	0.005	0.001
	GMN no LES (10)	24 ± 27	3.2 ± 2.7	24 ± 17	3.8 ± 1.6	0.965	0.485
	Total (20)	14 ± 21	2.6 ± 2.3	25 ± 17	4.1 ± 1.7	0.048	0.007

Si comparamos el número y porcentaje de las células CD4⁺CD25⁺⁺ entre pacientes con GMN lúpica y GMN primaria, hay una clara tendencia a ser menores en el primer grupo, aunque sin alcanzar diferencia estadística (5.1 ± 4.1 vs. 23.6 ± 27.3 $p = 0.062$ y 1.8 ± 1.8 vs. 3.2 ± 2.7 $p = 0.191$, respectivamente).

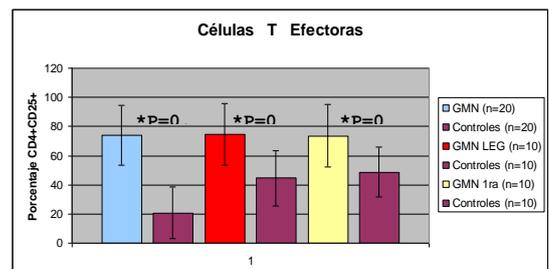
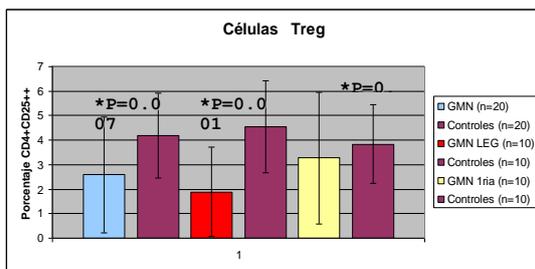


Fig.7 (A) Porcentaje de células Treg (CD4+CD25++) en pacientes con GMN y sus respectivos controles comparados como grupo (n=20), y analizados por separado de acuerdo a su etiología: GMN lúpica (n=10) y GMN primaria (n=10). (B) Porcentaje de células T efectoras (CD4+CD25+) en pacientes con GMN y sus respectivos controles comparados como grupo (n=20), y analizados por separado de acuerdo a su etiología: GMN lúpica (n=10) y GMN primaria (n=10)

Efecto del uso de inmunosupresores sobre el porcentaje de células Treg

De los 20 pacientes con GMN, 14 se encontraban recibiendo algún tipo de medicamento inmunosupresor al momento de la biopsia renal percutánea (GMN lúpica n=10 y GMN no lúpica n=4). De estos 14 pacientes, sólo 2 tenían tratamiento con esteroides exclusivamente, el resto tenía otro medicamento como parte de su esquema, como azatioprina, ciclofosfamida o micofenolato de mofetilo. Ninguno de los 14 pacientes se encontraba recibiendo un inhibidor de calcineurina al momento de la cuantificación de las células Treg. No se encontraron diferencias en el porcentaje de células Treg, entre pacientes que se encontraban recibiendo medicamentos inmunosupresores y aquellos sin tratamiento inmunosupresor (2.1 ± 1.8 vs. 3.7 ± 3.3 $p = 0.164$). **Fig.8**

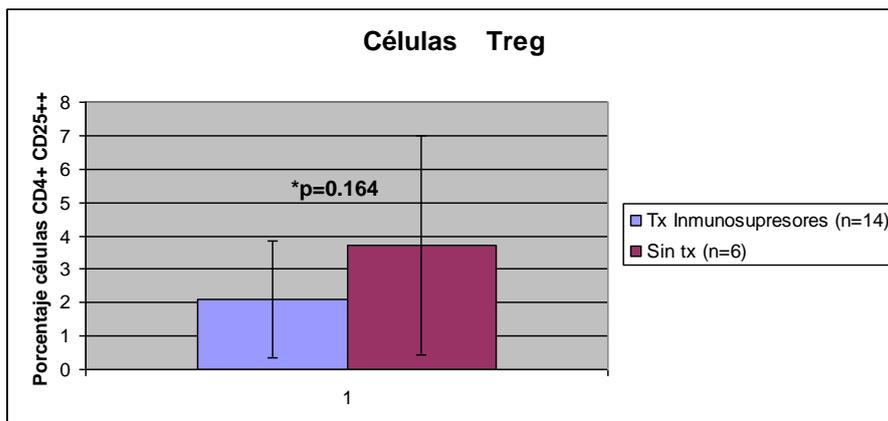


Fig.8 Porcentaje de células Treg (CD4+CD25++). No se encuentran diferencias significativas en relación al uso o no de medicamentos inmunosupresores y el porcentaje de estas células.

IX DISCUSIÓN

Si bien el concepto de la existencia de una población celular con capacidad reguladora/supresora fue propuesto desde los años 70, no es sino hasta ahora y gracias a los trabajos de Sakaguchi y Shevach que el concepto de linfocitos T reguladores es reconocido. Al aceptar la existencia de esta población celular y el papel fundamental que juega en el mantenimiento de la tolerancia periférica, ha surgido un creciente interés por la posibilidad de que esta población celular pudiera ser utilizada con fines terapéuticos para tratar un gran número de enfermedades que están asociadas a disfunción de esta población celular entre ellas las GMN. Por ejemplo, se ha demostrado que las células Treg se encuentran alteradas ya sea en función o en número en pacientes con esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, miastenia gravis y otras enfermedades autoinmunes^{26-28,43}. Sin embargo, es importante hacer notar que actualmente, nuestro conocimiento sobre la deficiencia funcional o en número de las células Treg, está limitada al estudio de éstas células aisladas de sangre periférica y analizada por ensayos *in vitro*, que pueden o no ser representativos de los defectos de la supresión *in vivo*⁴⁴.

A pesar de que muchos factores como los genéticos y ambientales son importantes en el desarrollo de las GMN, el mecanismo inmune juega un papel fundamental tanto como factor de inicio de la enfermedad así como al determinar el daño a órgano blanco y la progresión del mismo, que pueden llevar a glomeruloesclerosis y finalmente a enfermedad renal crónica; por lo que muchas formas de GMN tienen un origen autoinmune, y es muy importante la participación de los linfocitos T tanto efectoras como reguladores/supresores (entre ellos las células Treg) en la patogenia de estas enfermedades. Estudios recientes proveen evidencia importante de que la inmunidad mediada por células T efectoras es suficiente para iniciar o amplificar las lesiones renales inflamatorias, esto independientemente del depósito de anticuerpos⁴⁵.

Se podría hablar entonces de un balance entre células T efectoras y células T reguladoras (Treg, Tr1, Th3, etc.) y el inclinar la balanza a favor de las primeras favorecería el desarrollo de glomerulonefritis. Es así, que se pueden encontrar pruebas a favor de este desequilibrio, como en el trabajo de Sakatsume y colaboradores⁴⁶ que mostraron un incremento en la cantidad de células T en la orina de pacientes con diversas formas de GMN como nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Shöenlein y GMN asociada a anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilo. La cantidad de estas células en orina se correlacionó con la magnitud del infiltrado inflamatorio en la biopsia renal.

Los resultados del presente trabajo demuestran la pérdida de este balance ya que se encontró un mayor número y porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25⁺ en comparación con el número y porcentaje de células CD4⁺CD25⁺⁺ (Treg) siendo significativo en pacientes con GMN lúpica. Estos resultados, contrastan con los observados por Bagavant y Tung⁴² en ratones predispuestos a desarrollar lupus (NZM2328) y utilizando un modelo de timectomía al tercer día, (modelo d3tx) demostraron la incapacidad de las células T CD25⁺ para suprimir GMN lúpica y sialoadenitis que se desarrolló en éstos. Sin embargo, ellos utilizaron para la transferencia celular linfocitos marcados como CD25⁺ y no CD25⁺⁺ y esto, podría explicar el por qué de sus hallazgos, y la falla en la supresión, ya que muchas de las células que fueron transferidas a estos ratones probablemente correspondían a células T efectoras que no tienen alta expresión de CD25; la proporción de estas últimas podría haber sido mayor e inclinar la balanza a favor de la autoinmunidad y no de la tolerancia. En contraste, algunos modelos animales que carecen de células Treg desarrollan GMN y títulos elevados de anticuerpos anti-DNA de doble cadena⁴¹.

El incrementar el tamaño del pool de células Treg y no por mucho, hace posible nuevamente inclinar la balanza a favor de la tolerancia como lo demuestran Wolf y colaboradores³⁷, quienes utilizando un modelo experimental de GMN anti-membrana basal glomerular en ratones, demostraron que la

transferencia de células Treg mejoraba significativamente las alteraciones renales. Ellos atribuyen el efecto protector a la inhibición del daño a órgano blanco y no a la inhibición de la respuesta inmune inicial.

Otros modelos animales han demostrado la importancia del papel de las células Treg en el desarrollo de GMN y en la progresión del daño renal, como el estudio de Wang y colaboradores³⁸ quienes demostraron que la transferencia de células Treg Foxp3⁺ tenían efecto protector contra el daño inmunológico y la progresión de la enfermedad en un modelo de enfermedad renal crónica con proteinuria inducida por adriamicina; modelo que se asemeja a la glomeruloesclerosis focal y segmentaria humana. Nuevamente, el incrementar la cantidad de células Treg y reestablecer el equilibrio a favor de la tolerancia explica el por qué la reducción en esta población celular puede contribuir al desarrollo de GMN.

Los estudios en humanos, en relación a esta población celular, son escasos y también se desconoce qué patologías renales pueden ser reguladas por las células Treg. La poca evidencia disponible del papel de estas células en las GMN humana proviene del trabajo de Salama y colaboradores⁴⁰ que demostraron que las células Treg juegan un rol importante en pacientes con síndrome de Goodpasture, ya que inhiben la respuesta inmune dirigida contra la cadena $\alpha 3$ de la colágena de tipo IV. Sus datos demuestran fehacientemente que bajo condiciones en las cuales la auto-tolerancia está disminuida, como lo constituye un número y/o función reducida de las células Treg, se desarrolla enfermedad autoinmune. El encontrar un número mayor de células Treg en relación a las células T reactivas, en pacientes con remisión y no en periodos de actividad de la enfermedad o en la fase aguda, sugiere que la expansión del pool de esta población celular podría prevenir el daño tisular posterior al inhibir la respuesta autoinmune mediada por células T.

Por los resultados obtenidos, donde como grupo se observó un menor número y porcentaje de células Treg en pacientes con GMN lúpica y no así en

pacientes con otro tipo de GMN, se puede inferir, que la eficacia de estas células como reguladores es variable; esto, pudiera depender de la patogenia de la enfermedad. También la eficacia de la respuesta supresora puede estar determinada por ciertas características individuales, ya que si se analiza individualmente el porcentaje de células Treg, éste varía de individuo a individuo.

Quedan aún muchas preguntas por responder en relación a esta población celular; una de ellas es, si el uso concomitante de medicamentos inmunosupresores altera el funcionamiento de esta población celular o si estos pudieran permitir una función adecuada. La mejor evidencia sobre el uso de medicamentos inmunosupresores y la función de las células Treg se encuentra en estudios realizados en pacientes con trasplante renal donde se observa que el uso de inhibidores de calcineurina en la terapia de mantenimiento y el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la cadena α del receptor de IL-2 como el basiliximab en la terapia de inducción, al inhibir a la IL-2 (factor clave en el desarrollo de células Treg en la periferia) evitan la generación, expansión y proliferación de esta población celular³⁶. En contraste, el uso de sirolimus como parte del esquema inmunosupresor en la fase de mantenimiento y el uso globulina anti-timocito en la fase de inducción, no afectan el número y/o función de las células Treg y más bien favorecen su generación, expansión y función, además de inhibir de manera preferente la expansión de células T efectoras^{34, 35}. En relación a nuestros pacientes, 16 de los 20 (80%) estudiados, se encontraban recibiendo algún tipo de medicamento inmunosupresor; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el número o porcentaje de células Treg al compararlos con aquellos pacientes sin tratamiento inmunosupresor al momento de realizar la BRP; esto, podría explicarse, porque ninguno de los 16 pacientes se encontraba recibiendo algún tipo de inhibidor de calcineurina que pudiera interferir con la diferenciación de las células Treg en la periferia, aunque también el bajo número de pacientes sin inmunosupresores pudo contribuir al resultado. Todos los pacientes con tratamiento inmunosupresor se encontraban recibiendo esteroides como parte de su esquema. La mejor evidencia de que el uso de esteroides no interfiere

con el desarrollo o función de las células Treg proviene de estudios en enfermedades alérgicas, donde se ha observado que los esteroides al inducir la producción de IL-10 promueven el desarrollo y función de estas células. El tratamiento *in vitro* con esteroides incrementa la expresión de Foxp3 en linfocitos CD4⁺ de individuos sanos⁴⁷. El tratamiento con esteroides inhalados o tomados en pacientes con asma bronquial, incrementa la expresión de Foxp3 en células CD4⁺ y el número de células CD4⁺CD25⁺ aisladas en sangre periférica⁴⁸.

Finalmente, si bien el expandir esta población celular pudiera constituir una nueva y atractiva arma terapéutica en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, entre ellas las GMN, además pudiera limitar el uso de medicamentos inmunosupresores o permitirnos usar aquellos que incrementan la función o expansión de las células Treg evitando así los efectos secundarios de estos. Debemos de tomar en cuenta los efectos de la inmunosupresión no específica inducida por las células Treg, en las infecciones, sobre todo de tipo crónico, así como en el desarrollo o progresión de neoplasias. Una forma de evitar estas complicaciones, sería el uso de células Treg antígeno-específicas. No cabe duda que es necesario profundizar en estas líneas de investigación a fin de conocer mejor el rol de dichas células y su potencial terapéutico.

X CONCLUSIONES

- El número total y porcentaje de células Treg en sangre periférica de pacientes con GMN, está disminuido.
- El subgrupo de pacientes con GMN lúpica, mostró los valores más bajos de células Treg, aunque no alcanzó diferencia estadística.
- Aquellos pacientes con GMN no lúpica, mostraron una proporción similar de células Treg que sus controles sanos.
- La proporción de pacientes con células $CD4^+CD25^{lo}$ (células T efectoras) fue mayor para ambos grupos, comparado con los controles sanos.
- No hubo diferencias en el número y proporción de células Treg, entre los pacientes que recibían o no inmunosupresores.

XI ANEXOS

a) Cronograma.

Documentación bibliográfica: Enero/2006 hasta el final del estudio.

Revisión y aprobación interna del protocolo: Junio-octubre/2006.

Revisión y aprobación externa del protocolo: Noviembre/2006-febrero/2007.

Revisión y aprobación por el Comité de Ética: Octubre/2006.

Recolección de datos: Desde la aprobación del Comité de Ética.

Análisis de resultados: Continuo durante el estudio y el final, al momento de completar los grupos de estudio.

Presentación del trabajo terminado: Junio-Julio/2007.

Examen de Tesis y Titulación: Noviembre-febrero/2007-2008.

b) Aspectos éticos. Este estudio cumple con todos los puntos señalados en los convenios internacionales sobre investigación en humanos. Se respetó la confidencialidad de la información. No hubo ningún estudio invasivo exclusivo para el presente protocolo. Las maniobras invasivas o tomas de muestras de sangre, eran parte del manejo habitual de los pacientes con glomerulonefritis. Los controles sanos, eran parte de otro protocolo aprobado por el Comité de Ética Institucional y que firmaron consentimiento informado.

XII BIBLIOGRAFIA

1. Johnson RJ, Rennke H, Feehally J. Introduction to Glomerular Disease: Pathogenesis and Classification. In: Johnson RJ, Feehally J, ed. *Comprehensive Clinical Nephrology*. New York: Mosby; 2003: 243-253.
2. Hricik DE, Chung-Park M, Sedor JR. Glomerulonephritis. *N Engl J Med*. 339: 888-889, 1998.
3. Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in Glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 13: (Suppl 1):10-15, 1998.
4. Salama AD. Tipping the Balance in Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 16: 1169-1171, 2005.
5. Tipping PG, Holdsworth SR. T Cells in crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17: 1253-1263, 2006.
6. Rosenkranz AR, Knight S, Sethi S, Alexander SI, Cotran RS, Mayadas TN: Regulatory interactions of alpha-beta and gamma-delta T cells in Glomerulonephritis. *Kidney Int* 58: 10055-1066, 2000.
7. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101: 455-458, 2000.
8. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18: 723-737, 1970.
9. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Itoh M, Toda M, Asano M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164, 1995.
10. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of auto reactive T cells and represent a unique lineage on immunoregulatory cells. *J Immunol* 160: 1212-1218, 1998.
11. Verhagen J, Blazer K, Cezmi AA, Mübeccel A. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy: T-Regulatory Cells and More. *Immunol Allergy Clin N Am* 26: 207-231, 2006.

12. Rouse BT. Regulatory T cells in health and disease. *J Internal Med* 262: 78-95, 2007.
13. Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116: 949-959, 2005.
14. Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheg J, Zhao Y. The phenotypic characterization of Naturally occurring Regulatory CD4+CD25+ T Cells. *Cellular and Molecular Immunology*. 3: 189-195, 2006.
15. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061, 2003.
16. Campbell DJ and Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature Rev Immunol* 7: 305-310, 2007.
17. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24: 209-226, 2006.
18. Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, Macallan DC. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nature Rev Immunol* 7: 231-237, 2007.
19. Rothstein DM. Immunosuppression and Regulation: Cast in New Light? *J Am Soc Nephrol* 17: 2644-2646, 2006.
20. Shevach E.M. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 389-400, 2002.
21. Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 4: 338-344, 2005.
22. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22:531, 2004.
23. Wan YY, Flavell RA. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 212: 114-130, 2006.
24. Zhang L, Yi H, Xia XP, Zhao Y. Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance. 39: 269-276, 2006.
25. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T-cell subset. A evidence for the active

- participation of T cells in natural self-tolerance: deficit of a T-cell subset as possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med* 161:72-87, 1985.
26. Ehrenstein MR. et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J. Exp. Med.* 200: 277-285, 2004.
 27. Lindley S. et al. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92-99, 2005.
 28. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199: 971-979, 2004.
 29. Sakaguchi S et al. Immunologic tolerance maintained by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182: 18-32, 2001.
 30. Zou W. regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 295-307, 2006.
 31. Jiang S, Lechler RI. Regulatory T Cells in the Control of Transplantation Tolerance and Autoimmunity. *Am. J. Transplant.* 3: 516-524, 2003.
 32. Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH: CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am. Soc. Nephrol* 14: 1643-1651, 2003.
 33. Game DS, Hernández-Fuentes MP, Chaudhry AN, Lechler RI: CD4+CD25+ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 14: 1652-1661, 2003.
 34. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for Anti-Thymocyte Globulin: Induction of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells. *J Am Soc Nephrol* 2006.
 35. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cradevi P, Cugini D, Monteferrante G, Aiello S, Cassis L, Gotti E, Gaspari F, Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. Regulatory T Cells and T Cell Depletion: Role of Immunosuppressive Drugs. *J Am Soc Nephrol* 18: 1007-1018, 2007.
 36. Najafian N, Albin MJ, Newell KA. How Can We Measure Immunologic Tolerance in Humans? *J Am Soc Nephrol* 17: 2652-2663, 2006.

37. Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, Mayer G, Gunsilius E, Rosenkranz AR. CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 16: 1360-1370, 2005.
38. Wang YM, Zhang GY, Wang Y, Hu M, Wu H, Watson D, Hori S, Alexander IE, Harris DCH, Alexander SI. Foxp3- transduced polyclonal regulatory T cells protect against chronic renal injury from Adriamycin. *J Am Soc Nephrol* 17: 697-706, 2006.
39. Majan D, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Wang YM, Alexander SI, Harris DCH. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 2731-2741, 2006.
40. Salama AD, Chaudhry AN, Holthaus KA, Mosley K, Kalluri R, Sayegh MH, Lechler RI, Pusey CD, Lightstone L. Regulation by CD25⁺ lymphocytes of autoantigen-specific T-cell responses in Goodpasture's (anti-GBM) disease. *Kidney Int* 64: 1685-1694, 2003.
41. Schlöndorff D. Poor CD4⁺CD25^{high} T-regulatory-cell function in patients with LES. *Kidney Int* 71: 1092-1093, 2007.
42. Bagavant H and Tung KSK. Failure of CD25⁺ T Cells from Lupus-Prone Mice to suppress Lupus Glomerulonephritis and Sialoadenitis. *J Immunol.* 175: 944-950, 2005.
43. Crispín JC, Martínez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 21: 273-276, 2003.
44. Bluestone JA. Regulatory T-cell Therapy: is it ready for the clinic? *Nat. Rev. Immunol.* 5: 343-349, 2005.
45. Bagavant H, Deshmukh US, Gaskin F, Fu SM. Lupus Glomerulonephritis revisited 2004: autoimmunity and end-organ damage. *Scand. J. Immunol.* 60: 52-60; 2004.
46. Sakatsume M, Xie Y, Ueno M, Obayashi H, Goto S, Narita I, Homma N, Tasaki K, Suzuki Y, and Gejyo F. Human Glomerulonephritis Accompanied by Active

Cellular Infiltrates Shows Effector T Cells in Urine. *J Am Soc Nephrol* 12: 2636-2644, 2001.

47. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukine 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and is inhibited by T helper type 1 (Th1) and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.* 195: 603-616, 2002.
48. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Wooley NJ, Hense G, Rucket B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114: 1425-1433, 2004.