

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



“Expresión génica de Granzima B, FOX P3 y factor de necrosis tumoral alfa TNF α en células de sangre periférica en el primer trimestre post-trasplante renal en niños bajo dos esquemas de tratamiento”

TESIS

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA SUB-ESPECIALIDAD EN:

NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. MAGDA VIANNEY SEGUNDO RUBIO.

ASESOR DE TESIS: DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO.

CO-ASESOR DE TESIS: M. en C. M^a INÉS PILAR GARCIA ROCA.

MÉXICO, DF. FEBRERO 2009



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.

TESIS:

“Expresión génica de Granzima B, FOX P3 y factor de necrosis tumoral alfa TNF α en células de sangre periférica en el primer trimestre post-trasplante renal en niños bajo dos esquemas de tratamiento”

DR. JOSÉ I. SANTOS PRECIADO
DIRECTOR GENERAL

DR. YOLANDA ROCIO PEÑA ALONSO.
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADEMICO

DRA MARA MEDEIROS DOMINGO.
DIRECTORA DE TESIS

M. en C. M^a INES del PILAR GARCIA ROCA.
CO-ASESORA DE TESIS

AGRADECIMIENTOS.

Doy gracias a Dios por darme la oportunidad y la salud para alcanzar mis metas.

Gracias a mis padres por todo su amor, comprensión, sacrificio y apoyo incondicional en todo momento, en especial a mi madre por darme la vida y fortaleza para cumplir mis metas, así como por la dura espera incondicional.

Gracias a mis hermanos y sobrinos porque con su presencia y amor me han dado la alegría y motivación para seguir adelante, los adoro.

Gracias a todos mis maestros por haberme brindado sus conocimientos y experiencias con las cuales he llegado a ser lo que soy principalmente:

Gracias Dra. Medeiros por apoyarme a mi ingreso en la sub-especialidad y enseñarme tanto de mis errores, por inculcarme el ahínco y fortalecer mi deseo por proyectos como este y el crecimiento profesional en todos los aspectos reforzando deficiencias día con día.

Gracias a M.C. Ma Inés del Pilar García Roca por su apoyo incondicional como asesora, amiga y por sus palabras incondicionales en todo momento para alcanzar mis objetivos personales y profesionales.

Sobre todo gracias a todos los niños que me dieron la oportunidad de conocerlos, convivir con ellos y enriquecer con su amor mi vida me los llevo en el corazón.

Magda Vianney.....

INDÍCE

1. Portada.....	1
2. Firmas.....	2
3. Agradecimientos.....	3
4. Índice.....	4
5. Objetivos.....	5
6. Antecedentes.....	6
7. Marco teórico.....	8
8. Planteamiento del problema.....	18
9. Justificación.....	19
10. Hipótesis.....	20
11. Características del lugar donde se desarrolló el estudio.....	21
12. Tipo de estudio.....	22
13. Limitaciones del estudio.....	23
14. Cronograma.....	24
15. Población.....	25
16. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	26
17. Plan de análisis estadístico.....	27
18. Definición de las variables con escala de medición.....	28
19. Material.....	29
20. Métodos.....	30
21. Financiamiento.....	33
22. Factibilidad y aspectos éticos.....	34
23. Medidas de seguridad.....	35
24. Tamaño de la muestra.....	36
25. Análisis estadístico.....	37
26. Resultados.....	38
27. Discusión.....	42
28. Conclusiones.....	44
29. Bibliografía.....	45

OBJETIVOS:

- **General:**

- Determinar si el esquema inmunosupresor influye en la expresión génica de diversas moléculas en pacientes pediátricos con trasplante renal.

- **Específicos:**

- Establecer los valores de expresión génica Granzima B, FOXP3 y TNF alfa en células sangre periférica en el primer trimestre post- trasplante renal.
- Determinar si los niveles de GB, FOXP3 y TNF se modifican según el tratamiento inmunosupresor.

ANTECEDENTES:

La enfermedad renal crónica tiene implicaciones diferentes en los niños que en los adultos, ya que afecta directamente el desarrollo normal. Actualmente el trasplante renal es un tratamiento bien establecido de la insuficiencia renal terminal. La mortalidad en el HIMFG ha mostrado una disminución drástica, siendo actualmente 4.3%, similar a la que presenta NAPRTCS de 4.8% esta mejoría se atribuye a una mejor inmunosupresión y vigilancia en el periodo pos-trasplante(1).

El objetivo del tratamiento inmunosupresor utilizado en el trasplante renal es prevenir el rechazo del injerto. Con algunas combinaciones actuales de inmunosupresores, la incidencia de rechazo agudo en el trasplante renal puede llegarse a situar en el 10 -15%. En el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” en el seguimiento de pacientes de 1997 a 2002, el 60% de los pacientes habían presentado al menos un episodio de rechazo agudo al año del trasplante, sin embargo en los últimos 5 años la incidencia de rechazo agudo ha disminuido notablemente con el uso de inducción con basiliximab (2).

Los esteroides han sido fundamentales en el tratamiento inmunosupresor del trasplante renal, sin embargo su uso se asocia en forma dependiente de la dosis con complicaciones infecciosas, óseas, cardiovasculares, metabólicas, cosméticas y retraso en el crecimiento (3-4). Desde hace varias décadas se han propuesto protocolos de inmunosupresión encaminados a disminuir la dosis de esteroides ya sea en la dosis diaria, en días alternos, uso por un periodo corto en el post-trasplante o bien los protocolos de “evitar esteroides” en donde ni siquiera se emplean en el post-trasplante inmediato (5, 6-39)

Sarwal y col. publicaron en 2001 y 2003 una serie de 57 niños en quienes la inmunosupresión se basó en inducción con Anti CD25 (Daclizumab) por seis meses, tacrolimus y mofetil micofenolato que fueron comparados con controles históricos para edad, raza y tipo de trasplante (cadáver o vivo relacionado) que recibieron tratamiento con esteroides, tacrolimus y micofenolato, encontrando que los pacientes que nunca recibieron esteroides tuvieron menor incidencia de rechazos agudos, mejor crecimiento, autoestima y adherencia terapéutica que los pacientes en terapia con esteroides (7, 10).

Actualmente el ácido ribonucleico puede aislarse fácilmente de células y ser utilizado para medir la expresión de diversas moléculas en forma cuantitativa por medio de PCR en tiempo real, por ejemplo se ha observado que la determinación de la expresión de Granzima B y Perforina permiten establecer el diagnóstico de rechazo agudo en pacientes adultos con una sensibilidad y especificidad de 80% sin necesidad de realizar una biopsia renal evitando de esta forma complicaciones asociadas(11).

En un estudio realizado por Sarwal y col. Estudiaron a las moléculas efectoras de linfocitos T citotóxicos que ya han sido analizadas como marcadores de rechazo agudo en receptores del injerto renal bajo el esquema de inmunosupresión con y sin esteroides, y demostraron que hay variación de la expresión de estas moléculas dependiendo del tiempo pos-trasplante así como dependiendo del esquema de inmunosupresión. Encontraron que los pacientes libres de esteroides con función estable del injerto mostraron un incremento de Granzima B, Perforina y Granulolisina el cual era mayor en el primer mes, se observó también un incremento de Granulolisina al término del primer año pos-trasplante en ausencia de rechazo agudo, Granzima B y Perforina no mostraron cambio. Lo que sugiere que los niveles de expresión génica de linfocitos T citotóxicos son importantes para la monitorización del riesgo de rechazo agudo en pacientes con régimen de inmunosupresión basado en esteroides, pero esto no puede ser aplicado de forma similar en pacientes libres de esteroides, se observó que el incremento temprano de los genes para linfocitos T citotóxicos en ausencia de rechazo agudo puede sugerir la activación de una respuesta adaptativa inmune temprana promoviendo una aceptación temprana del injerto en el protocolo sin esteroides (12).

MARCO TEORICO:

La enfermedad renal crónica tiene implicaciones diferentes en los niños que en los adultos, ya que afecta directamente el desarrollo normal. Actualmente el trasplante renal es un tratamiento bien establecido de la insuficiencia renal terminal. Se estima en unos 250.000 los trasplantes renales efectuados hasta ahora en el mundo, en nuestro país suman cerca de 1.500. Actualmente se ha observado que la sobrevida del injerto se ha incrementado y que es mejor en los pacientes con riñón de donador vivo relacionado que en los pacientes con riñón cadavérico (80% contra un 68% respectivamente). Los niños tienen la mejor sobrevida del injerto sobrepasando la que tienen los adultos receptores de riñón con HLA idéntico, aunque los adolescentes tienen la menor sobrevida del injerto a largo plazo y se ha atribuido a mala adherencia terapéutica. La mortalidad en el HIMFG ha mostrado una disminución drástica, siendo actualmente 4.3%, similar a la que presenta NAPRTCS de 4.8% esta mejoría se atribuye a una mejor inmunosupresión y vigilancia en el periodo post-trasplante(1).

En los últimos años muchos investigadores se han encargado de describir nuevas estrategias para el seguimiento de los pacientes con trasplante renal, entre las que destacan la aplicación de técnicas de biología molecular, todo esto gracias al proyecto genómico(13-14) que contó con el objetivo fundamental de revelar la totalidad de los genes que comprenden el genoma humano, identificándose 30 000.

La aplicación de la biología molecular en el campo del trasplante renal y del trasplante de órganos en general, abre importantes opciones con finalidad de diagnóstico y pronóstico. En la actualidad, la biología molecular nos permite un diagnóstico más precoz y preciso del rechazo agudo mediante la determinación de la expresión génica en biopsias o en células de la orina.

Actualmente el ácido ribonucleico puede aislarse fácilmente de células y ser utilizado para medir la expresión de diversas moléculas en forma cuantitativa por medio de PCR en tiempo real, se ha observado que la determinación de la expresión de Granzima B y Perforina permiten establecer el diagnóstico de rechazo agudo en pacientes adultos con una sensibilidad y especificidad de 80% sin necesidad de realizar una biopsia renal(11). La búsqueda de otro tipo de moléculas tales como CD103, IP10 permite predecir el grado de infiltración tubular y provee información sobre la fisiopatología del rechazo(15)

Contamos con algunos estudios en la literatura internacional que se enfocan en descubrir el papel de la expresión génica de diferentes moléculas que pueden funcionar como marcadores de rechazo crónico en pacientes trasplantados renales como es el caso Perforina y la Granzima B, moléculas presentes en la activación de las células T citotóxicas que caracterizan al rechazo agudo, se ha observado que la Perforina es una proteína formadora de un poro y la Granzima B una serinpeptidasa componente fundamental de la maquinaria

lítica de las células citotóxicas que se presentan en rechazo agudo del injerto⁽⁴⁾. Estudios en adultos reportan la presencia de estas moléculas en la mayoría de los episodios de rechazo agudo, aunque se observó que no se correlaciona con los hallazgos histológicos de severidad del rechazo(16). El más significativo es aquel en el que determinan las cantidades de proteínas citotóxicas, codificadas por RNA mensajero, de las células urinarias procedentes de muestras de orina de pacientes que habían sido trasplantados de riñón, y en los que la biopsia había confirmado el rechazo agudo encontrando que las cantidades de Perforina y Granzima B codificadas por RNAm, eran más elevadas en las muestras de orina de los pacientes con rechazo agudo que en los que no se producía el rechazo. Los análisis demostraron que el rechazo agudo podía ser pronosticado con una sensibilidad y especificidad del 83 por ciento(11). Djamali y cols. demostraron la expresión de la Perforina y su relación con los episodios de rechazo agudo en pacientes adultos encontrándose que la expresión de Perforina es sensible pero no específica para el rechazo agudo en el trasplante renal.

El objetivo del tratamiento inmunosupresor utilizado en el trasplante renal es prevenir el rechazo del injerto. Con algunas combinaciones actuales de inmunosupresores, la incidencia de rechazo agudo en el trasplante renal puede llegarse a situar en el 10 -15%, resultados que difícilmente parecen mejorables.

En la revisión que hicimos de nuestra serie de receptores de riñón de 1997 a 2002, 60% de los pacientes habían presentado al menos un episodio de rechazo agudo al año del trasplante (1), sin embargo en los últimos 5 años la incidencia de rechazo agudo ha disminuido notablemente con el uso de inducción con basiliximab (2).

A pesar de los enormes logros conseguidos durante los últimos años en el manejo clínico de los pacientes sometidos a trasplante de un órgano sólido, el fracaso a largo plazo del injerto continúa siendo el obstáculo principal para el éxito de esta terapéutica. Actualmente el interés de los nuevos inmunosupresores reside en su capacidad de prevenir el daño renal crónico. Los avances en el conocimiento de los mecanismos que participan en la alorespuesta han permitido diseñar nuevos inmunosupresores capaces de actuar específicamente sobre los linfocitos T activados e incluso diseñar estrategias encaminadas hacia el objetivo de conseguir tolerancia específica (17).

El tratamiento inmunosupresor es imprescindible para el éxito de los trasplantes. La introducción de los fármacos inhibidores de la calcineurina revolucionó los resultados a corto plazo(18,19). Sin embargo, la cantidad de inmunosupresión que se emplea para cada paciente se decide con base en datos clínicos, histológicos y farmacocinéticos, sabiendo que conseguimos bloquear una respuesta inmunitaria de forma global, pero sin tener la certeza de qué es lo que necesitamos bloquear (20). Además, el tratamiento es de por vida y responsable de los efectos adversos que aparecen a largo plazo y que causan en gran medida la pérdida del injerto(21).

La misión principal del sistema inmunitario es defender a nuestro organismo frente a las agresiones externas por parte de los microorganismos y toxinas. Además, El alotrasplante es considerado por el sistema inmunitario como extraño y, por lo tanto, monta una

respuesta frente a él en forma de rechazo (22). Cuando se administra la inmunosupresión farmacológica en un paciente trasplantado, no sólo se inhibe la capacidad de responder frente al aloinjerto, sino que también se suprime el resto de respuestas que protegen al organismo frente a las agresiones (infecciones, tumores). Esta falta de selectividad inmunológica es la responsable del desarrollo de un estado de inmunodeficiencia y de la alta tasa de neoplasias, junto con otros efectos adversos que provocan la pérdida a largo plazo del aloinjerto(23). Por ello, el reto más importante en la investigación inmunológica en el trasplante de órganos es el esclarecimiento y la manipulación terapéutica de los mecanismos de inducción de tolerancia. La principal ventaja de la tolerancia inmunológica es la de la especificidad, puesto que sería capaz de mantener la respuesta frente a microorganismos y tumores mientras que no reaccionaría frente al órgano trasplantado. Dado que se trata de un mecanismo no farmacológico, no acarrearía los efectos adversos de los medicamentos y, por lo tanto, los beneficios a largo plazo serían claros. Actualmente, el gran impedimento que tiene desde el punto de vista práctico es la falta de marcadores clínicos que permitan establecer y monitorizar el estado de tolerancia(24,25).

Los mecanismos que participan en la tolerancia de aloantígenos son, en principio, los mismos que frente a los autoantígenos: deleción central de células T alorreactivas, deleción o anergia periférica de células T alorreactivas, la ignorancia periférica por las células T alorreactivas o la supresión activa de células T alorreactivas(26,27). De todos estos mecanismos sólo la supresión ha dirigido sus esfuerzos a generar un tipo de célula T encargado de controlar las respuestas de otras células T. En los últimos años ha adquirido un interés especial el estudio de poblaciones celulares con actividad supresora/reguladora.

CÉLULAS T REGULADORAS: Las células T “supresoras”, capaces de suprimir respuestas antígeno-específicas y de transferir esa tolerancia a otros animales, Sakaguchi reintrodujo el concepto de células T supresoras o reguladoras (Treg), en un modelo de enfermedad autoinmune inducida tras timectomizar a ratones a los tres días de edad. En estos ratones se demostró la ausencia de una población T CD4+ CD25+, que suponía el 5-10% del bazo y que, cuando se transferían de un ratón normal al timectomizado, evitaban el desarrollo de la enfermedad(28). Además de su papel en modelos de autoinmunidad, el papel regulador de estas células ha demostrado también efectos beneficiosos en la reacción de injerto frente a huésped (GVHD) o en el trasplante de islotes pancreáticos. El primer problema que existe con las células Treg es su identificación, dado que se han descrito diversas poblaciones inmunocompetentes con actividad reguladora(29-33). Las más estudiadas son las células T con fenotipo CD4CD25, habiéndose observado también funciones reguladoras en células T CD8+, células T gamma-delta, células NK, células CD3+ CD4- CD8-, o células NKT. Cada una de estas poblaciones celulares tiene distintos receptores celulares, ejercen su función mediante distintos mecanismos y actúan en distintos estadios de la respuesta inmunitaria. Las principales evidencias del papel de estas células en los mecanismos de tolerancia provienen de modelos animales donde se ha observado cómo las células CD8 supresoras ayudan a la discriminación entre lo propio y no propio y se diferencian durante la respuesta inmunitaria primaria para suprimir las respuestas secundarias y de memoria(34). Por otro lado, otro tipo de células CD8+ supresoras, las células CD8+ CD28-, reconocen complejos péptidos/MHC-I en las células dendríticas convirtiéndolas en tolerogénicas mediante la expresión de moléculas inhibitoras como ILT3 o ILT4 (“immunoglobulin like transcripts”). ILT3 e ILT4 interfieren con la inducción de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de

antígeno y tolerizan a las células T CD4+ helper. Por último, las células NKT y CD4+ se generan antes del contacto con el antígeno y actúan en las etapas tempranas de la respuesta innata y primaria, respectivamente. En concreto las células NKT que expresan receptores propios de células NK y el TCR $\alpha\beta$, el cual reconoce los complejos CD1d/glicolípidos. Los mecanismos mediante los que las células NKT regulan la inducción de tolerancia son complejos pero parecen interaccionar con las células CD4+ y CD8+ reguladoras y actuar mediante la secreción de citocinas supresoras (IL-4, IL-10 y TGF- β) (35,36).

Respecto al trasplante de órganos y a su importancia en los mecanismos inductores de tolerancia, de todas las poblaciones celulares con capacidad reguladora/supresora, la que más interés atrae es la de los linfocitos T reguladores que expresan CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2), conocidas como células Tregs. La expresión de esta molécula es muy elevada en las células Tregs humanas, por lo que se las define como células CD4+ CD25 high, en contraposición a las células T CD4+ efectoras recién activadas, en las que la expresión es más baja y transitoria. Se han descrito otros marcadores cuya expresión sirve para definir y seleccionar la población de células Tregs como CD45RB, CTLA-4, GITR o TNFRSF18 (“glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor”), CD134 (OX40) o CD62L. Como ocurre con CD25, ninguna de esas moléculas se expresa de forma exclusiva en las células Tregs. En cambio, la expresión del factor de transcripción FOXP3 en estas células se emplea como definitoria. Las mutaciones en el gen de FOXP3 causan un síndrome autoinmune letal en el ratón Scurfy y son responsables del síndrome humano IPEX (desregulación inmunitaria, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X. Tanto los ratones Scurfy como los pacientes con IPEX muestran cantidades muy bajas de células Tregs y una función supresora de esas células defectuosas. La diferenciación de la mayoría de células Tregs periféricas comienza en el timo tras la inducción de la expresión de FOXP3 en un subtipo de timocitos TCR $\alpha\beta$ con elevada afinidad por los complejos autoantígeno-MHC (37).

Estas células se conocen como células Tregs naturales (nTregs), en contraposición a las células Tregs que se pueden inducir (células iTregs) en condiciones específicas *in vitro*, como la presentación del antígeno por células dendríticas plasmocitoides en presencia de IL-2 y TGF- β . La transfección de FOXP3 en células CD4+ CD25- las convierte en células con capacidad supresora y, por otro lado, la hiperexpresión de un transgén de FOXP3 en ratones confiere capacidad supresora a las células CD4+ CD25- y CD4- CD8+, lo cual indica que la expresión de FOXP3 modula la capacidad funcional de las células Tregs. Este efecto parece ser dosis-dependiente puesto que sólo la disminución de expresión de FOXP3 es capaz de transformar células con función reguladora en función efectora(38,40). A pesar de ello, no se conoce aún el mecanismo molecular mediante el que FOXP3 media la capacidad supresora, pudiendo ser tanto por la inhibición directa de la señalización a través del TCR o, de forma indirecta, mediante la transcripción de un factor que inhiba las señales inducidas por la señalización a través del TCR. La importancia de FOXP3 parece radicar en su capacidad de amplificar y estabilizar la transcripción de genes específicos de regulación, lo que mantiene la homeostasis de las células Tregs, más que iniciar la generación de células Tregs. Por otro lado, ha aparecido cierto debate acerca de la utilidad de FOXP3 como marcador de células Tregs puesto que se ha descrito que FOXP3 se induce tras la estimulación a través del TCR y se duda de si la población inducida CD4+ CD25+ FOXP3+ es supresora o anérgica.

Dado el potencial que tienen las células Tregs en el control de las alorrespuestas en el trasplante de órganos, uno de los objetivos actuales es determinar si la monitorización de estas células puede servir de marcador de tolerancia inmunológica. Para ello, el primer paso consiste en determinar cómo se regula el número de estas células *in vivo*. Actualmente se ha estudiado la evolución de los números absolutos de células Tregs sanguíneas en pacientes trasplantados renales durante el primer año después del trasplante. Los datos muestran un descenso de las células CD4⁺ CD25⁺, FOXP3⁺ a los seis meses del trasplante para recuperarse parcialmente al año, aunque no alcanzan los niveles previos al trasplante(41).

A los dos años del trasplante, las células Treg aumentan y superan incluso los niveles basales (M.L.H. et al, manuscrito en preparación). Como ya se ha comentado anteriormente, es probable que el descenso inicial en sangre se corresponda con la infiltración tisular de las células durante el rechazo del injerto que suele ocurrir en los primeros seis meses del trasplante(41). De hecho, aquellos pacientes que sufren rechazo agudo muestran un menor número de células Tregs sanguíneas que los que no lo sufren(42). No obstante, un factor esencial a considerar en el trasplante en humanos, a diferencia de los modelos experimentales animales, es la influencia de múltiples factores ambientales y genéticos no controlados. Entre ellos, el que más destaca es el posible efecto de la inmunosupresión farmacológica a la que están sometidos los pacientes trasplantados de por vida. Por ello, una de las líneas de investigación más activas es la identificación de regímenes inmunosupresores que faciliten la generación y/o el mantenimiento de las células Tregs. No existen muchos datos acerca de la modulación de las células Tregs en el trasplante de otros órganos. En el caso del trasplante hepático, recientemente se ha descrito un traspaso de abundantes células Tregs desde el injerto a la circulación del receptor, que genera un microquimerismo necesario para evitar el rechazo del injerto hepático en los primeros momentos del trasplante. Más tarde en la evolución del trasplante hepático las células Treg parecen ser responsables en parte de la tolerancia operacional, y las cifras de estas células en sangre pueden caer en caso de producirse un episodio de rechazo(43). Las células con fenotipo Treg están disminuidas en receptores de un trasplante pulmonar que sufren rechazo crónico en forma de bronquiolitis obliterante respecto a aquellos que se mantienen estables(44).

En cuanto a la modulación de las células Tregs por la inmunosupresión, un factor a considerar respecto a las células Tregs en el trasplante de órganos sólidos es la coexistencia siempre con fármacos inmunosupresores, esenciales para evitar sobre todo las crisis de rechazo agudo. Los estudios animales muestran a las células Tregs específicas de donante como el elemento esencial de la tolerancia en el trasplante al suprimir los efectos citotóxicos de las células T efectoras, en contraposición a la supresión que se consigue con los fármacos inmunosupresores. Sin embargo, tolerancia e inmunosupresión no deben considerarse como dos extremos sin conexión dentro del trasplante, sino que se pueden conseguir cierto grado de tolerancia en presencia de fármacos inmunosupresores(45). Por ello, las posibles aplicaciones clínicas de las células Tregs en el trasplante de órganos deben explicarse en el contexto de los pacientes, que están recibiendo inmunosupresión de manera crónica. El objetivo es definir aquellos fármacos capaces de suprimir las respuestas de las células T efectoras mientras que mantienen, o incluso potencian, la actividad de las células T reguladoras. Los inhibidores de la calcineurina (ciclosporina, tacrolimus) y los inhibidores de mTOR (rapamicina, everolimus) son los inmunosupresores más establecidos en la clínica para prevenir el rechazo de aloinjertos. En línea con lo argumentado en el

párrafo anterior, parece que los inhibidores de mTOR favorecerían la acción de las células Tregs. Así, el grupo de Roncarolo demostró cómo la rapamicina, en presencia de altas dosis de IL-2, induce la proliferación de células Tregs mientras que inhibe la proliferación de las células T efectoras *in vitro*. D. San Segundo y cols mostraron por primera vez en un estudio transversal en pacientes trasplantados renales, cómo el tratamiento prolongado con inhibidores de la calcineurina produce un descenso en el número de células Tregs circulantes, mientras que la rapamicina es capaz de conservar esas células en sangre. Además, el tratamiento con rapamicina es capaz de recuperar los niveles sanguíneos de células Tregs descendidos tras un tratamiento con inhibidores de la calcineurina. Es decir, la ciclosporina y el tacrolimus tienen un efecto deletéreo sobre las células Tregs, aunque la capacidad supresora y los niveles de expresión de FOXP3 son semejantes en las células CD4+ CD25 high de ambos grupos de pacientes, tratados con inhibidores de calcineurina o con inhibidores de mTOR. Estos resultados los corroboran hallazgos previos en modelos animales(46,47).

Los fármacos inmunosupresores que inhiben inespecíficamente la respuesta inmunitaria para evitar el rechazo acarrear gran número de efectos adversos responsables del rechazo crónico. Por ello el principal objetivo en el trasplante es alcanzar una ausencia de respuesta inmunitaria frente a los aloantígenos del donante sin necesidad de administraciones prolongadas de fármacos inmunosupresores. En los últimos años las células T reguladoras sobre todo aquellas que muestran el fenotipo CD4, CD25 y FOXP3 conocidas como células Tregs han demostrado su capacidad de controlar las respuestas inmunitarias frente a aloantígenos del donante por lo que poseen un gran potencial en el establecimiento de tolerancia del trasplante *in vivo*. La mayoría de las evidencias proceden de modelos experimentales aunque últimamente han aparecido trabajos que abordan el papel de las células tregs en el contexto clínico del trasplante. En dicho contexto un factor esencial a considerar es la presencia de inmunosupresión farmacológica en prácticamente el 100% de los pacientes. Hallazgos recientes demuestran como existen fármacos que favorecen la inducción o mantenimiento de las células Tregs en pacientes trasplantados. De todos ellos los inhibidores mTOR se muestran como los que más favorecen el desarrollo de tregs en el trasplante de órganos actual. Estrategias que se plantean en un futuro cercano son la estimulación *ex vivo* de células tregs purificadas con aloantígenos del donante o incluso la transfección con FOXP3 de células alorreactivas CD4, CD25.

Dos anticuerpos monoclonales humanizados nuevos, basiliximab y Daclizumab, han sido también aprobados para su utilización después de trasplante, basados en su capacidad de reducir la incidencia de episodios del rechazo agudo(20).

Los esteroides son anti inflamatorios no específicos. Actúan disminuyendo las citoquinas y las moléculas de superficie celular por una disminución de las moléculas de expresión en las células endoteliales. Inhiben la actividad enzimática de la fosfolipasa A2, lo cual resulta en una disminución de eicosanoides y en la respuesta inflamatoria del rechazo a órganos trasplantados. Pero como los esteroides tienen un amplio espectro de acción, de igual manera tienen una gran variedad de efectos adversos en varios órganos como por ejemplo: facies cushingoide, acné, úlcera péptica, incremento de la susceptibilidad a la infección, necrosis aséptica de cabeza de fémur, retraso en el crecimiento, hipertensión, etc. Estos han

sido fundamentales en el tratamiento inmunosupresor del trasplante renal, sin embargo su uso se asocia en forma dependiente de la dosis con complicaciones infecciosas, óseas, cardiovasculares, metabólicas, cosméticas y retraso en el crecimiento (3,4). Desde hace varias décadas se han propuesto protocolos de inmunosupresión encaminados a disminuir la dosis de esteroides ya sea en la dosis diaria, en días alternos, uso por un periodo corto en el post-trasplante o bien los protocolos de “evitar esteroides” en donde ni siquiera se emplean en el post-trasplante inmediato.

La minimización en la dosis de los esteroides ha demostrado tener la ventaja de disminuir las complicaciones óseas y cardiovasculares, así como oftálmicas (menos cataratas) con discreto beneficio sobre el crecimiento a costa de mayor incidencia de rechazo agudo, esta situación ha cambiado con los nuevos medicamentos inmunosupresores. El tratamiento con días alternos mejora notablemente el crecimiento de los pacientes, pero tiene mayor incidencia de mala adherencia.

Diversos grupos de trasplante pediátrico han propuesto esquemas de inmunosupresión en los que o bien se retiran los esteroides poco tiempo después del trasplante, o bien se da terapia de inducción prolongada con Anti-CD25. Sarwal y col. publicaron en 2001 y 2003 una serie de 57 niños en quienes la inmunosupresión se basó en inducción con Anti CD25 (Daclizumab) por seis meses, tacrolimus y mofetil micofenolato que fueron comparados con controles históricos para edad, raza y tipo de trasplante (cadáver o vivo relacionado) que recibieron tratamiento con esteroides, tacrolimus y micofenolato, encontrando que los pacientes que nunca recibieron esteroides tuvieron menor incidencia de rechazos agudos, mejor crecimiento, autoestima y adherencia terapéutica que los pacientes en terapia con esteroides (7,10).

El rechazo agudo continúa siendo una causa importante de falla del injerto y predispone a su vez al desarrollo de rechazo crónico, por esto es importante detectarlo a tiempo. Para que la creatinina sérica se eleve dos décimas es necesario haber perdido el 50% de la función renal, por lo que existe un creciente interés por el desarrollo de marcadores no-invasivos que permitan diagnosticar rechazo agudo. La determinación en células de sangre periférica del RNA que codifica para las moléculas citotóxicas Granzima B, Perforina y ligando de Fas correlaciona con el rechazo agudo tanto en trasplante hepático como renal. El estudio de la expresión génica en células urinarias de Perforina y Granzima B correlaciona con rechazo, Perforina con sensibilidad de 88% y especificidad de 79%, CD103 participa en la ubicación de los LT CD8+ en el espacio intratubular por su interacción con la E-caderina, y el grado de infiltración tubular en la biopsia correlaciona con la cantidad de CD103 en células urinarias. La determinación de FOXP3, que caracteriza a los linfocitos T reguladores, permite predecir la evolución del rechazo agudo y distinguir a los pacientes que van a responder al tratamiento con esteroides, todos estos estudios se han realizado en el esquema con esteroides. (48,51)

En un estudio realizado por Sarwal y col. Estudiaron a las moléculas efectoras de linfocitos T citotóxicos que ya han sido analizadas como marcadores de rechazo agudo en receptores del injerto renal bajo el esquema de inmunosupresión basado en esteroides, y demostraron que hay variación de la expresión de estas moléculas dependiendo del tiempo pos-trasplante así como dependiendo del esquema de inmunosupresión comparando el manejo basado en esteroides y el segundo libre de esteroides. Encontrándose que los pacientes libres de

esteroides con función estable del injerto mostraron un incremento de Granzima B, Perforina y Granulolisina el cual era mayor en el primer mes, se observó también un incremento de Granulolisina al término del primer año pos-trasplante en ausencia de rechazo agudo, Granzima B y Perforina no mostraron cambio. Lo que sugiere que los niveles de expresión génica de linfocitos T citotóxicos son importantes para la monitorización del riesgo de rechazo agudo en pacientes con régimen de inmunosupresión basado en esteroides, pero esto no puede ser aplicado de forma similar en pacientes libres de esteroides, se observó que el incremento temprano de los genes para linfocitos T citotóxicos en ausencia de rechazo agudo puede sugerir la activación de una respuesta adaptativa inmune temprana promoviendo una aceptación temprana del injerto en el protocolo sin esteroides (12).

La identificación temprana de rechazo en el trasplante de órganos trasplantados sin la necesidad de biopsia renal intenta reducir la morbilidad de los pacientes así como la detección y tratamiento temprano lo que mejoraría la supervivencia del injerto. Para este fin numerosos marcadores periféricos de rechazo del injerto han sido evaluados para el diagnóstico potencial usando la técnica RT-PCR. Esta técnica es superior al análisis convencional realizado por biopsia ya que se asocia a complicaciones y errores de muestreo las cuales pueden ser evitadas. Los marcadores periféricos identificados por RT-PCR pueden ser usados como herramientas diagnósticas importantes para la supervivencia clínica. Los recientes estudios han sido una correlación entre rechazo agudo y la regulación de moléculas efectoras de linfocitos T citotóxicos tales como Granzima B, Perforina y Granulolisina. El rechazo agudo y crónico son factores de mayor riesgo para falla de la función del injerto y falla renal crónica. La terapia de inmunosupresión mejora los resultados del órgano trasplantado aunque todos están basados en el manejo con esteroides. Los más recientes protocolos de inmunosupresión libres de esteroides se han desarrollado para evitar las influencias multisistémicas de los corticosteroides tales como infección, hipertensión, hiperlipidemia, descenso en el crecimiento y efectos cosméticos. Se ha observado que el protocolo sin esteroides mejora la función renal del trasplantado comparando Schwartz de 94 vs. 76.8, se ha observado reducción en la incidencia de rechazo agudo 4.6 vs. 27.9% con una $p=0.02$, observándose además mejoría en el modelo de crecimiento al año pos-trasplante, así como encontrarse libres de los efectos relacionados con los esteroides todo esto reportado en la serie realizada por la Dra. Sarwal y cols quienes cuentan con la serie más completa de pacientes en manejo sin esteroides.

Los esteroides inhiben las células T efectoras y a los linfocitos T citotóxicos efectoras. La expresión de moléculas efectoras de linfocitos T citotóxicos en injertos renales puede variar por lo tanto en la terapia basada con y sin esteroides, lo que puede causar un impacto en la capacidad para predecir rechazo agudo en los pacientes sin esteroides basándose en las moléculas de los linfocitos T citotóxicos efectoras. Los cambios en los niveles de inmunosupresión post-trasplante los cuales se llevan a cabo en los primeros 3-4 primeros meses, pueden también alterar los niveles de estos genes de linfocitos T citotóxicos al tiempo post-trasplante. Lo que puede ser una variable de confusión para la interpretación de la elevación en la expresión génica de linfocitos T citotóxicos.

Se ha reportado que el incremento de la expresión génica de niveles de Granulolisina, Perforina y Granzima B fueron insignificantes en el primer mes pos-trasplante en el grupo

con inmunosupresión basada en esteroides, a diferencia del grupo de pacientes sin esteroides quienes muestran un incremento en la expresión génica de linfocitos T citotóxicos en el primer mes observándose que este incremento era mayor el primer mes sin cambios significativos posteriormente.

Por lo que se ha observado que la expresión génica de linfocitos T citotóxicos puede variar dependiendo del tiempo post-trasplante así como con el esquema inmunosupresor, la expresión temprana de linfocitos T citotóxicos durante el primer mes pos-trasplante en el protocolo libre de esteroides en ausencia de disfunción clínica del injerto o infección. No se observa en pacientes con inmunosupresión basada en esteroides lo que sugiere que los esteroides juegan un rol pivote en la supresión de los linfocitos T citotóxicos en el pos-trasplante, se ha argumentado que la elevada expresión de linfocitos T citotóxicos observada durante el rechazo en los pacientes tratados con esteroides puede reflejar el incumplimiento del tratamiento o diferencias en el metabolismo de los esteroides, o que se trate de una señal de activación del sistema inmune, por ejemplo reducción del tratamiento esteroideo por incumplimiento o rechazo agudo elevaría la expresión de linfocitos T citotóxicos.

Los hallazgos en pacientes libres de esteroides caracterizados por la elevación de la expresión génica de linfocitos T citotóxicos sugiere una posible respuesta adaptativa, inmunomodulación en el receptor con la activación de células T en ausencia de tubulitis, puede ser que se promuevan mecanismos inmunológicos para la aceptación del injerto. La reducción en el rechazo agudo clínico comparado con la terapia basada en esteroides, la mejoría de la función renal a un año pos-trasplante y la frecuencia baja de rechazo agudo subclínico soportan la naturaleza benigna de esta temprana activación de las células T en los pacientes sin esteroides. La correlación entre el rechazo agudo y la respuesta de células citotóxicas en los pacientes libres de esteroides han sugerido que son necesarios estudios adicionales para valorar mecanismos de rechazo en receptores de injerto renal en manejo con inmunosupresión libre de esteroides así como valorar la significancia de los linfocitos T citotóxicos.

La inmunosupresión libre de esteroides puede favorecer la aceptación del injerto basado en los hallazgos de que los esteroides han mostrado interferencia con el proceso activo de inducción de tolerancia del injerto. El rol exacto de los esteroides en la activación de los linfocitos T citotóxicos no es claro. Pero se ha involucrado a estos con la regulación de células T periféricas e intratímicas, así como la apoptosis tímica. Se ha especulado que los esteroides interfieren con el proceso de selección positiva de células reguladoras o la selección negativa de células T alo reactivas en el periodo de adaptación de timo a la aceptación del injerto, los efectos de los esteroides sobre las células T helper y sobre los genes relacionados con la apoptosis lo que interferiría con la inducción de tolerancia periférica.

Por lo que se ha confirmado que la presencia de niveles iguales o mayores de expresión génica de células T citotóxicas se presentan en los pacientes estables con inmunosupresión sin esteroides a diferencia de los pacientes que cursan con niveles elevados de pacientes con esteroides que cursan con rechazo. Lo que sugiere que los niveles de la expresión génica de linfocitos T citotóxicos son importantes en los pacientes con esquema basado en esteroides para monitorizar el riesgo de rechazo agudo, pero no puede ser aplicado al

esquema sin esteroides por lo que un buen marcador diagnóstico no invasivo de los pacientes que reciben esteroides deberá interpretarse con precaución en los pacientes con inmunosupresión sin esteroides. En este último grupo la elevación temprana de los niveles de expresión génica de linfocitos T citotóxicos puede involucrar una activación de respuesta adaptativa inmune que promueva la aceptación temprana del injerto en este protocolo de tratamiento(12).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

- Los pacientes con terapia libre de esteroides tienen mayor expresión de genes de Linfocitos T citotóxicos en sangre periférica en ausencia de rechazo agudo del injerto.
- No se sabe como es la expresión de marcadores de inflamación como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF alfa) y de los Linfocitos T reguladores (FOXP3)

JUSTIFICACIÓN:

- Los esteroides inhiben a las células T efectoras de inflamación y linfocitos T citotóxicos.
- La expresión de moléculas de linfocitos T citotóxicos es mayor en los pacientes con terapia libre de esteroides,
- Estas moléculas se han empleado como marcadores de rechazo agudo.
- Es importante conocer el perfil de expresión génica de marcadores de LT citotóxicos, LT reguladores y de inflamación en células de sangre periférica de pacientes bajo dos esquemas de inmunosupresión.

HIPOTESIS:

- La expresión génica Granzima B y TNF α alfa en sangre periférica varía con el tiempo post-trasplante.
- La expresión de GB y FOXP3 pero no de TNF α es mayor en pacientes que reciben tratamiento sin esteroides.

CARACTERISTICAS DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL ESTUDIO.

El hospital Infantil de México “Federico Gómez” es un Instituto Nacional de Salud ubicado en la calle Dr. Márquez 162 colonia Doctores en la delegación Cuahutemoc, este hospital de tercer nivel atiende a población abierta referida de todo las instituciones de salud del Distrito Federal, área metropolitana y resto de la Republica Mexicana con una cobertura de 24hrs al día y los 365 días del año.

El servicio de nefrología pediátrica ubicado en el 4to piso en el ala posterior izquierda de la infraestructura hospitalaria, se encuentra dirigido por el Dr. Benjamín Romero Navarro quien en conjunto con el servicio de cirugía pediátrica conforman el departamento de trasplantes bajo la dirección de la Dra. Mara Medeiros y donde se realiza un promedio de 30 cirugías de trasplante de injerto renal anual y se atiende a todos los pacientes post-operados de trasplante renal en la consulta externa.

TIPO DE ESTUDIO:

- Se realizo un estudio prospectivo, abierto en los pacientes que reciban trasplante renal en nuestra Institución.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

- Tamaño de la muestra (actualmente 20 pacientes).
- Tiempo de seguimiento.
- Es poco probable que se presente rechazo agudo del injerto en los primeros tres meses debido a que todos los pacientes reciben tratamiento de inducción con anti-CD25.
- Para fines de titulación se realizo análisis de la información en el primer trimestre post-trasplante pero el proyecto contempla un seguimiento a dos años.

CRONOGRAMA

- Enero-Febrero 2008: Realizar Marco teórico y recabar antecedentes.
- Marzo-Julio 2008 captura de datos y determinación de niveles séricos.
- Julio 2008 análisis de datos obtenidos
- Julio 2008 redacción de conclusiones.
- Julio 2008 presentación de tesis

	2007		2008						
	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
Realizar marco teórico y recabar antecedentes									
Presentación de proyecto de tesis									
Captura de datos y determinación de niveles sérico									
Análisis de datos obtenidos									
Redacción de conclusiones									
Presentación de tesis									

POBLACION:

- Pacientes del HIMFG, de cualquier edad y género, con diagnóstico de post-operados de trasplante renal con toma mensual de muestras de sangre (PAX GENE) en los primeros tres meses del post-trasplante.

CRITERIOS DE INCLUSION, EXCLUSION Y ELIMINACION

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Edad de 2 a 18 años.
- Receptores de primer trasplante renal ABO compatible.
- Aceptación por escrito para participar en el estudio

CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Intolerancia a los medicamentos de estudio.
- Afección hepática de cualquier índole.
- Pacientes receptores de segundo o tercer trasplante.
- PRA (panel reactivo a la población) mayor del 20%.
- Que hayan recibido esteroides seis meses antes del trasplante renal.

CRITERIOS DE ELIMINACION:

- Pacientes con rechazo agudo vascular.
- Pacientes que presenten dos episodios de rechazo agudo con un lapso entre ellos igual o menor a 3 meses, recurrencia de la enfermedad renal primaria en el injerto que amerite uso de esteroides.

PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO:

Se llevo acabo el análisis estadístico de los datos obtenido mediante:

- Estadística descriptiva
- Tabla de frecuencias
- Descripción de la población
- Correlación entre niveles séricos de FOXP3, Granzima B, TNF alfa corregidos por el valor del control interno 18s rRNA con la presencia de rechazo

Se hará una descripción de las características demográficas y clínicas en ambos grupos.

Las diferencias entre ambos grupos serán analizadas mediante la prueba t de Student o Mann Whitney.

Los cambios en la expresión génica mensual se evaluarán en cada grupo mediante ANOVA.

DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES:

1. Edad: variable cuantitativa continua expresada en años
2. Sexo: Variable cualitativa dicotómica (masculino y femenino)
3. Tipo de Trasplante renal: Variable cualitativa dicotómica (donador vivo relacionado y donador cadavérico)
4. Valores de expresión génica en células de sangre periférica de TNF alfa, FOXP3, Granzima B y 18s: Variable cuantitativa expresada en logaritmo natural del numero de copias por μg de RNA por gen objetivo/18s rRNA
5. Creatinina sérica trimestral: Variable cuantitativa continua expresada en mg/dl
6. Peso: Variable cuantitativa continua expresada en kilogramos
7. Tensión arterial: Variable cuantitativa continua expresada en mmHg.
8. Infección Pos-trasplante: Variable cualitativa dicotómica (si y no)
9. Días de hospitalización: Variable cuantitativa continua expresada en días.

MATERIAL Y METODOS

RECURSOS HUMANOS:

3 Licenciados en Química Fármaco Biológica.

1 Medico pediatra especialista en nefrología con doctorado en ciencias medicas.

1 residente de 5to año de nefrología pediátrica.

RECURSOS MATERIALES

- Tubos cónicos esterilizados.
- Tubos PAX GENE.
- Solución de PBS 1x..
- 1 frasco de RNAlater.
- Micro tubos de 1.7ml esterilizados.
- Puntas para micro pipeta de 100-1000µl.
- Puntas para micro pipeta de 2-200 µl.
- Puntas para micro pipeta de 1-10µl.
- Jeringas de 1ml.
- Agua libre de RNAsa.
- Kit QIA schredder.
- Mini KIt (250) RNAeasy.
- Kit Taq Man (reverse transcription reagents).
- Primers y Probes para Perforina, Fox P3, 18s, TNF alfa.
- Campana de flujo laminar.
- 1 microcentrifuga.
- 1 vortex.
- 1 Nanodrop.
- 1 termociclador.
- 1 equipo de tiempo real.
- 1 computadora persona hp pavilion zv5000.
- 1 impresora Lexmark x1 100 series.

METODOLOGÍA

Los pacientes serán aleatorizados mediante una tabla de números aleatorios para recibir uno de los siguientes esquemas de inmunosupresión:

GRUPO I TERAPIA HABITUAL:

- Basiliximab (Simulect) Anti CD25

10mg en < 35Kg

20mg en > 35Kg

Diluir en 50ml de Solución Glucosada al 5%, pasar IV en 30 minutos el día del trasplante renal y en el 4o. día post-operatorio.

- Mofetil micofenolato (CellCept, Roche)

900mg/m²sc/día dividido en dos tomas. Inicia un día antes del trasplante renal y se ajusta la dosis según la cuenta de leucocitos en sangre.

- Metilprednisolona

2 bolos de metilprednisolona 10mg/kg (Días 1 y 2 del trasplante renal)

- Prednisona

Se inicia en 2o. día post-operatorio 2mg/Kg/día, máximo 60mg/día V.O.

Reducción progresiva de la dosis para ser a las dos semanas de 1mg/kg/día y al mes de 0.5mg/kg/día. A los seis meses es de 0.12 a 0.15mg/kg/día y se mantiene a largo plazo.

- Tacrolimus

Se inicia en el post-operatorio cuando la creatinina sérica es menor de 3mg/dL a dosis de 0.10mg/kg dividido cada 12 horas, la dosis se ajusta para alcanzar niveles en valle entre 5 y 10ng/mL

GRUPO II SIN ESTEROIDES (ESQUEMA DE STANFORD) (31)

- Daclizumab Anti CD25 (Zenapax, Roche)

2mg/Kg IV 4 horas antes del trasplante

Se diluye en 50ml de solución salina y se administra IV en 30 minutos.

Posteriormente dosis de 1mg/Kg se administrará en las semanas 2,4,5,6,8,11,15,19 y 23 para alcanzar una dosis acumulada de 10mg/kg a los 6 meses post-trasplante.

- Mofetil micofenolato (CellCept, Roche)

900mg/m²sc/día dividido en dos tomas. Inicia el día del trasplante renal.
La dosis se disminuye a 600mg/m²SC a las dos semanas post-trasplante.

- Tacrolimus

Se inicia el día del trasplante a dosis de 0.15mg/kg dividido cada 12 horas, la dosis se ajusta para alcanzar los siguientes niveles en valle según el tiempo pos-trasplante:

Semanas 1 y 2 12-15 ng/mL

Semanas 3-8: 10-12 ng/mL

Semanas 9-12: 8-10 ng/mL

Semanas 13-20: 5-7 ng/mL

Mas de 20 semanas: 3-5 ng/mL

Todos los pacientes que sean de riesgo alto o intermedio para infección por CMV recibirán profilaxis con ganciclovir o valganciclovir por 100 días.

Los pacientes que presenten rechazo agudo corroborado por biopsia renal serán tratados con tres bolos de metilprednisolona 10mg/kg IV. En caso de pertenecer al grupo sin esteroides, no recibirán más esteroides después de los bolos.

SEGUIMIENTO

Todos los pacientes serán vigilados en la consulta externa de nefrología. Se tomará creatinina sérica, niveles de tacrolimus, niveles de acido micofenolico, examen general de orina, sangre y orina para PCR y proteinuria de 12 horas con la siguiente periodicidad:

Cada semana los primeros dos meses

Cada dos semanas del segundo al sexto mes

Cada mes hasta los 12 meses

Cada tres meses el segundo año del trasplante

Se realizará biopsia renal de protocolo en el momento de trasplante (0), y a los 6, 12 y 24 meses post/trasplante.

Se comparará la función renal, expresión génica en orina y sobrevida de injerto y pacientes en ambos grupos a los 12 y 24 meses después del tratamiento.

TECNOLOGIA UTILIZADA

La función renal se evaluará mediante la determinación de creatinina sérica, cálculo de la depuración de creatinina por fórmula de Schwartz y proteinuria de 12 horas.

Todas las biopsias renales con sospecha de rechazo agudo serán teñidas para C4d.

La determinación de la expresión del ARNm de FOXP3, TNF α y Granzima B en orina se ha reportado como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de rechazo agudo celular así como biomarcadores de tolerancia inmunológica. No se sabe si sus valores cambian según el tipo de inmunosupresión.

EXTRACCION DE MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA

Se colectaran 2.5mL de sangre en tubo de PAXGene, se obtiene la capa de mononucleares mediante centrifugación de gradiente con Lymphoprep®, se les agrega 150 μ l de RNAL.

Las muestras serán congeladas a -70°C hasta que sean procesadas para el aislamiento del ARN.

AISLAMIENTO DE RNA

El ARN será obtenido de mononucleares de sangre periférica utilizando un kit comercial (RNA easy mini kit, QIAGEN).

La cantidad de ARN obtenida será cuantificada por espectrofotometría y se hará la transcripción reversa de 1 μ g de ARN total para obtener el ADN complementario (cDNA) utilizando un kit comercial (Taqman reverse transcription kit, Applied Biosystems).

PCR EN TIEMPO REAL

La secuencia de los primers y la sonda fluorogénica para la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) para Granzima B, FOXP3, TNF α y el 18S ARN ribosomal está descrita en la literatura.

FINANCIAMIENTO:

Los gastos del proyecto fueron absorbidos por el Hospital Infantil de México que es una institución comprometida con la sociedad y la niñez mexicana en la formación de recursos humanos de excelencia clínica y en investigación este compromiso lo adopto desde su fundación por el Dr. Federico Gómez y a lo largo de los años se ha esmerado en la evaluación de guías de manejo, diagnóstico y terapéutica de las diferentes enfermedades que aquejan a nuestra niñez. Además se ha caracterizado siempre por ir a la vanguardia en investigación innovando siempre técnicas diagnósticas o terapéuticas utilizando y perfeccionando los últimos avances internacionales.

Se contó con el financiamiento de fondos federales dispuestos por el “Hospital Infantil de México Federico Gómez”, protocolo HIM/2007/019.

ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio se fundamenta en la experimentación previa realizada en otros países. Fundamentado y respetando los lineamientos éticos de Helsinki, apegándose a lo establecido en el reglamento de La Ley General de Salud en materia de investigación para la salud.

Una vez aprobada la investigación por el comité de enseñanza, investigación y ética del Hospital Infantil de México se obtuvo el consentimiento/asentimiento informado de los padres y pacientes. El estudio fue realizado por profesionales de salud con conocimientos y experiencia para el manejo material biológico-infeccioso, bajo la responsabilidad de la institución, que cuenta con los recursos humanos y materiales para la preservación del material biológico y garantizar el bienestar de los pacientes, prevaleciendo siempre el criterio de respeto a la dignidad y protección de los derechos individuales.

Además la probabilidad de los beneficios esperados supera los riesgos predecibles tomando en cuenta que es un método no invasivo y no compromete la vida de los pacientes.

El estudio es de riesgo mayor que el mínimo por tratarse de la asignación aleatorizada de tratamientos.

Se tiene contemplado la realización de cuatro biopsias renales de protocolo (al momento del trasplante, 6, 12 y 24 meses después), ya que han demostrado ser de gran utilidad en el manejo de los pacientes pediátricos post-trasplante renal, pudiendo identificar problemas como rechazo agudo, rechazo crónico, toxicidad por medicamentos, reproducción de la enfermedad original o enfermedad linfoproliferativa post-trasplante antes de otras manifestaciones clínicas (42, 51), también se emplean para medir eficacia y predecir disfunción renal en estudios clínicos (52, 53). Nos apegamos a las normas internacionales e institucionales para la realización de estudios clínicos.

MEDIDAS DE SEGURIDAD:

Los lugares de procesamiento de las muestras fueron los laboratorios de nefrología del departamento de nefrología y el laboratorio de investigación en nefrología. Las muestras de sangre y orina fueron recolectadas con las técnicas de asepsia y antisepsia habituales. Los estudios de laboratorio se realizaron en el laboratorio central y laboratorio de nefrología por lo que sus derivados fueron procesados de acuerdo a estándares aceptados y establecidos. Los productos derivados de la extracción de ARN fueron desechados de acuerdo a los lineamientos establecidos de cada proceso y recogidos por el departamento de control de medio ambiente de nuestra institución para su adecuada disposición final.

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

- En nuestro hospital se realizan de 30 a 35 trasplantes por año. Se tiene contemplado ingresar a 60 pacientes en el estudio. Del inicio a la fecha se han realizado 24 trasplantes, 18 de ellos han completado tres meses de seguimiento.

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó una hoja de captura de datos en el programa Excell donde se recolectaron los datos de cada paciente en los que se incluía nombre, número de expediente, fecha de trasplante, fecha de cada visita de seguimiento, con los valores de creatinina, reporte de EGO y cifras de tensión arterial por visita, fecha de biopsia, resultado de la biopsia, número de copias de Granzima B, TNF alfa, FOXP3 y 18s rRNA. Esta hoja de cálculo se extrapoló para poder ser utilizada en el programa de análisis estadístico SPSS para realizar el análisis y realizar medidas de tendencia central en las variables cualitativas, frecuencias, medias y correlaciones estadísticas. La expresión del gen objetivo se dividió entre el control interno 18S rRNA. Cuando el valor del gen objetivo fue cero, el valor se normalizó asignando un valor igual a la mitad del valor mínimo del grupo, para poder hacer la transformación a logaritmo. La expresión de genes depende de la calidad de la muestra de sangre periférica, y uno de los elementos que se consideran para decidir si es o no de buena calidad es el control interno (18S rRNA) que debe de ser por lo menos en el orden de 10×10^7 , todas las muestras tuvieron el control interno por arriba de esta cifra

Se realizaron varias hojas en Excell una con las copias por μg de RNA total, y otra con los valores corregidos con el control interno (gen/18s) que como no todas las columnas tienen una distribución normal no se puede aplicar T de student sino la prueba de ANOVA, y finalmente otra con los valores normalizados por 18s y transformados a logaritmo y con lo cual se logra tener una distribución normal y se pueden aplicar pruebas paramétricas, realizándose posteriormente la representación gráfica.

RESULTADOS:

Se realizaron 24 trasplantes renales del periodo comprendido de junio 2007 a junio 2008 a quienes se les tomó muestra de sangre mensual recolectada en tubo de PAX GENE y se aleatorizaron en 2 grupos de tratamiento ya descritos.

Se incluyeron a 18 pacientes que completaron un seguimiento de 3 meses pos-trasplante renal, de los cuales 10 pertenecían al grupo con esteroides y 8 al grupo sin esteroides (Daclizumab) procesándose un total 72 muestras de sangre para la expresión génica correspondían a la muestra tomada el día del trasplante, primero, segundo y tercer mes del trasplante renal, las cuales fueron procesadas para la extracción de RNAm y expresión génica de Granzima B, FOXP3, TNF alfa y 18s rRNA esta última usada como control interno.

En la Tabla 1 se muestra la demografía de los pacientes, la edad promedio fue de 14 años en ambos grupos, 14 pacientes recibieron injerto de donador vivo relacionado.

Tabla 1. Demografía de los pacientes.

	Grupo con esteroides n=10	Daclizumab n=8	Todos n=18
Edad (2años ± DS)	14.4 ±1.83	14.5 ±1.19	14.44 ±1.54
Genero (Fem./Masc)	3/7	3/5	6/12
Hallazgos de biopsia cero.			
Normal	3	3	6
Aterosclerosis.	1	1	2
Gloméruloesclerosis:			
Focal.	0	1	1
Global.	0	1	1
Muestra insuficiente.	2	0	2
Sin muestra.	4	2	6
Tipo de injerto:			
Donador vivo	7	7	14
Donador fallecido	3	1	4
Riesgo para CMV:			
Alto	1	2	3
Intermedio	8	6	14
Bajo	1	0	1

Se realizó un análisis sobre la presencia de complicaciones en cada esquema inmunosupresor para comparar la presencia de estas por grupo de tratamiento lo cual se describe en la Tabla 2, los pacientes tratados con esteroides tuvieron mas infecciones, sin embargo no alcanzó significancia estadística. Como era de esperarse, todos los niños tratados con esteroides tuvieron hipertensión post-trasplante, mientras que solo el 62% de los pacientes en el grupo daclizumab. La ganancia de peso fue notoriamente mayor en el primer mes en los pacientes tratados con esteroides.

Tabla 2. Frecuencia de Complicaciones en el primer trimestre pos-trasplante.

	Grupo con esteroides n=10	Daclizumab n=8	Todos n=18
Pacientes con infección en los primeros 3 meses/sin infección n (%)	6 / 4 (60%)	4 / 4 (50%) ^{NS}	10 / 8
Días de hospitalización por infección	4.8 ± 5.8	4.8 ± 6.6 ^{NS}	4.8 ± 6.06
Hipertensión arterial pos-trasplante n (%)	10 (100%)	5 (62.5%) [†]	15 (83.3)
Presencia de Rechazo agudo.	0	0	0
* Ganancia de peso Kg. ± DS			
1er mes	3.56 ± 3.13	0.56 ± 0.55*	2.22±2.7
3er mes	6.88 ± 3.62	4.65 ± 2.59*	5.88 ± 3.32

* t de student en el incremento de peso entre esteroides y sin esteroides en el 1er mes (p=0.01), en el 3er mes (p=0.16)

† Chi cuadrada p= 0.02

NS= No significativo

La evolución de creatinina con el tiempo de trasplante renal en cada grupo de tratamiento inmunosupresor, se muestra en la Tabla 3. La creatinina sérica desciende mas rápido en el grupo tratado con esteroides, encontrando una diferencia significativa en el primer mes, sin embargo al tercer mes el valor de creatinina sérica es similar en ambos grupos

Tabla 3. Creatinina Sérica (CrS) en el primer trimestre pos-trasplante renal.

CrS	Grupo con esteroides	Daclizumab	Valor de P*	Todos
Basal	9.48 ± 3.36	10.13 ± 5.29	0.75	9.77 ± 4.20
1er mes	0.94 ± 0.14	1.14 ± 0.21	0.021	1.03 ± 0.21
3er mes	1.10 ± 0.23	1.11 ± 0.22	0.90	1.10 ± 0.22

t de Student grupo Con esteroides vs. sin esteroides

Los hallazgos de expresión génica en células de sangre periférica de FOXP3, Granzima B y TNF α según el esquema inmunosupresor se describen en la tabla 4. No encontramos diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en la expresión de los genes estudiados al compararlos mes con mes. Sin embargo al realizar la prueba de ANOVA para muestras repetidas por grupo encontramos que no hubo diferencia en la expresión de Granzima B (Figura 1), los pacientes con esteroides modifican significativamente la expresión de FOXP3 y de TNF alfa, disminuyendo en forma significativa en el primer mes para posteriormente aumentar, mientras que el grupo con Daclizumab mantiene estable la expresión de los genes estudiados (Figuras 2 y 3).

Tabla 4. Expresión Génica en células de sangre periférica.

Gen.	Con Esteroides.	Daclizumab.
Fox P3 (LN copias/18s rRNA) promedio± DS		
FoxP3 Basal	7.06 ± 1.73*	8.350 ± 1.51 †
FoxP3 1er mes	6.370 ± 1.56	6.863 ± 1.48 †
FoxP3 3er mes	7.240 ± 1.58	6.838 ± 1.73 †
Granzima B (LN copias/18s rRNA)		
GranzimaB Basal	6.79 ± 1.26	8.30 ± 8.30 †
Granzima B 1er mes	7.390 ± 2.06	8.613 ± 1.88 †
Granzima B 3er mes	8.190 ± 1.49	7.625 ± 1.86 †
TNFα (LN copias/18s rRNA)		
TNFα Basal	5.283 ± 1.15*	5.965 ± 1.74 †
TNFα 1er mes	4.856 ± 0.84	5.670 ± 1.10 †
TNFα 3er mes	5.811 ± 1.06	5.732 ± 1.69 †

* ANOVA para muestras repetidas P=0.0259 en el grupo con esteroides.

** ANOVA para muestras repetidas P=0.0001 en el grupo de esteroides.

† No significativo t deStudent Con Esteroides vs. Daclizumab

Fig. 1 Expresión Génica de Granzima B en cada Grupo.

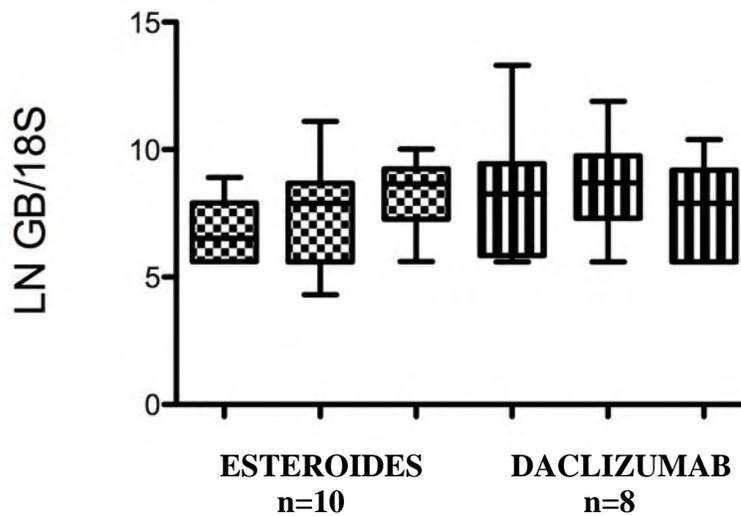


Fig. 2 Expresión Génica de FOXP3 en cada Grupo.

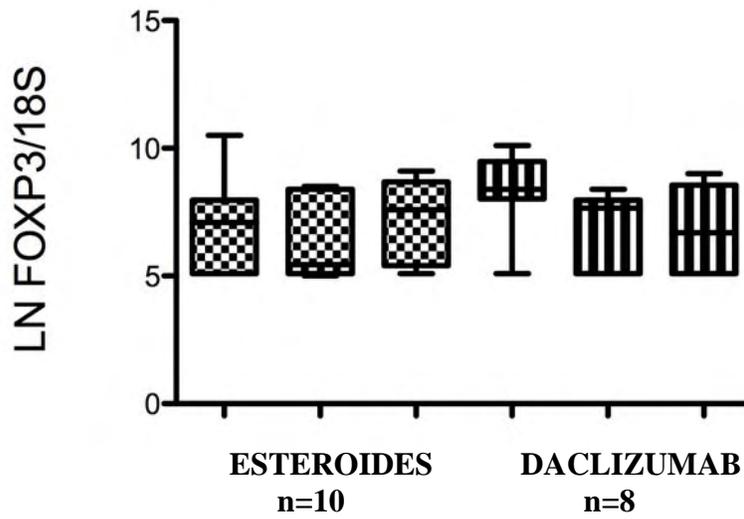
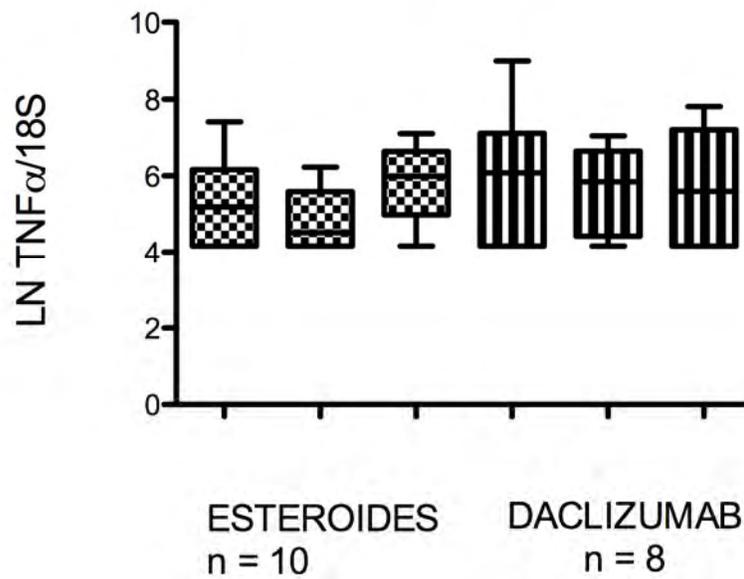


Fig. 3 Expresión Génica de TNF α en cada Grupo.



DISCUSIÓN:

El objetivo del tratamiento inmunosupresor utilizado en el trasplante renal es prevenir el rechazo del injerto por lo que en este estudio con los resultados obtenidos podemos decir que el tratamiento sin esteroides es una buena opción terapéutica en pacientes pediátricos ya que los pacientes de ambos grupos cursan con similar creatinina sérica a los 3 meses pos-trasplante renal.

El descenso de creatinina fue mas rápido en el grupo de esteroides, observamos una diferencia estadísticamente significativa en la CrS del primer mes siendo menor en el grupo con esteroides, esto puede explicarse por los niveles mas altos de tacrolimus que se utilizan en el grupo con Daclizumab (12 y 15 ng/dL) a diferencia de el grupo con esteroides, en el que los niveles séricos objetivo son entre 5-10ng/dL, y la discreta elevación de creatinina en el grupo de daclizumab puede deberse a efecto nefrotóxico del fármaco; la biopsia que se realizará a los seis meses servirá para esclarecer este punto, sin embargo la creatinina sérica a los 3 meses es similar en ambos grupos.

Ningún paciente de cursó con rechazo agudo del injerto en el primer trimestre, datos que concuerdan con los estudios realizados por la Dra. Sarwal y cols. ya que los episodios de rechazo se presentan después del primer trimestre.

La hipertensión pos-trasplante es un factor de riesgo para desarrollar nefropatía crónica del trasplante. Encontramos menor prevalencia hipertensión arterial en el grupo tratado con daclizumab, el impacto de este beneficio será evaluado con el seguimiento a largo plazo.

También observamos que hay una menor ganancia de peso en el primer mes del pos trasplante renal, los niños con esteroides subieron 3.5 kg. mientras que los del grupo de Daclizumab tan solo 0.56kgs en el primer mes pos-trasplante , este hallazgo pierde significancia a los 3 meses pero los pacientes con esteroides continúan ganando mayor peso. Posiblemente la liberación de la dieta y la integración del paciente a una vida social normal influya en la ganancia de peso en ambos grupos.

En cuanto a la expresión génica no encontramos diferencia al comparar los valores de TNF alfa, granzima B y FOXP3 mes con mes en ambos grupos; sin embargo, al estudiar la variación intragrupo mediante la prueba de ANOVA para muestras repetidas encontramos que los pacientes en el grupo con esteroides tienen un descenso significativo en la expresión de TNFalfa y FOXP3 en el primer mes que se recupera en el 3er mes mientras que la expresión de los genes estudiados es estable en el grupo de Daclizumab.

En los últimos años las células T reguladoras, sobre todo aquellas que muestran el fenotipo CD4, CD25, FOXP3 conocidas como células Tregs han demostrado su capacidad de controlar las respuestas inmunitarias frente a aloantígenos del donante por lo que poseen un

gran potencial en el establecimiento de tolerancia del trasplante in vivo, en realidad el uso de medicamentos inmunosupresores impiden el desarrollo de tolerancia. La determinación de FOXP3 en células de sedimento urinario permite identificar a los pacientes con rechazo agudo del injerto renal que responderán al tratamiento con esteroides, los pacientes que expresan FOXP3 responden y recuperan la función renal, mientras que los pacientes que no expresan FOXP3 tienen mala evolución. No sabemos cuál es la implicación de la expresión de FOXP3 en sangre en relación a la evolución de la función del injerto y del rechazo, pero un descenso en la expresión implica menor número de células T reguladoras circulantes. Es necesario seguir a los pacientes por más tiempo para poder conocer las implicaciones biológicas de estos hallazgos.

Una gran limitante de nuestro estudio es que no hubo eventos de rechazo agudo en el primer trimestre por lo que no se pudo realizar una correlación entre los niveles de Granzima B y la presencia de rechazo.

Esta aún pendiente evaluar el costo-beneficio del esquema libre de esteroides, que si bien es más caro puede convenir si se previenen complicaciones y se mejora la supervivencia a largo plazo de injerto y paciente.

CONCLUSIONES:

El esquema de tratamiento sin esteroides que emplea Daclizumab por seis meses es mejor que el esquema sin esteroides ya que los pacientes tienen función renal similar a los 3 meses, menor frecuencia de hipertensión y menor ganancia de peso.

La expresión génica de Granzima B, FoxP3 y TNF alfa es similar en ambos grupos en los primeros tres meses, pero en el grupo con Esteroides la expresión de TNF alfa y FOXP3 disminuye en forma significativa en el primer mes y se eleva nuevamente en el tercer mes, mientras que en el grupo tratado con Daclizumab la expresión génica permanece estable los primeros tres meses.

Es necesario incluir a más pacientes y prolongar el seguimiento para determinar el beneficio del esquema de Daclizumab en la supervivencia de injerto y paciente a largo plazo, así como en el perfil de expresión génica.

BIBLIOGRAFIA:

1. Medeiros M, Romero B, Valverde S, Delgadillo R, Varela-Fascinetto G, Muñoz R, 2005 Trasplante renal en pediatría. *Revista de Investigación Clínica* 57:230-236.
2. Delgadillo R 2005 Comparación de dos esquemas de inmunosupresión en el primer año post-trasplante renal. Tesis para obtener el grado de Nefrología pediátrica. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina UNAM/Hospital Infantil de México, México.
3. Hricik DE, Kupin WL, First MR 1994 Steroid-free immunosuppression after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 4:S10-16.
4. Hricik DE 2002 Steroid-free immunosuppression in kidney transplantation: an editorial review. *Am J Transplant* 2:19-24.
5. Veenstra DL, Best JH, Hornberger J, Sullivan SD, Hricik DE 1999 Incidence and long-term cost of steroid-related side effects after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 33:829-839.
6. Tejani A, Butt KM, Rajpoot D, Gonzalez R, Buyan N, Pomrantz A, Sharma R 1989 Strategies for optimizing growth in children with kidney transplants. *Transplantation* 47:229-233.
7. Sarwal MM, Yorgin PD, Alexander S, Millan MT, Belson A, Belanger N, Granucci L, Major C, Costaglio C, Sanchez J, Orlandi P, Salvatierra O, Jr. 2001 Promising early outcomes with a novel, complete steroid avoidance immunosuppression protocol in pediatric renal transplantation. *Transplantation* 72:13-21.
8. Chakrabarti P, Wong HY, Scantlebury VP, Jordan ML, Vivas C, Ellis D, Lombardozi-Lane S, Hakala TR, Fung JJ, Simmons RL, Starzl TE, Shapiro R 2000 Outcome after steroid withdrawal in pediatric renal transplant patients receiving tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 70:760-764.
9. Ratcliffe PJ, Dudley CR, Higgins RM, Firth JD, Smith B, Morris PJ 1996 Randomised controlled trial of steroid withdrawal in renal transplant recipients receiving triple immunosuppression. *Lancet* 348:643-648.
10. Sarwal MM, Vidhun JR, Alexander SR, Satterwhite T, Millan M, Salvatierra O, Jr. 2003 Continued superior outcomes with modification and lengthened follow-up of a steroid-avoidance pilot with extended daclizumab induction in pediatric renal transplantation. *Transplantation* 76:1331-1339.
11. Baogui L, Hartono. Noninvasive Diagnosis of Renal-Allograft Rejection by Measurement of Messenger RNA for Perforin and Granzyme B in Urine. *New England Journal of Medicine* 2001;344:947-54.
12. Satterwhite T, Chua Mei-Sze, Sarwal M, PT. 2003 Increased expression of cytotoxic effector molecules: Different interpretations for steroid-based and steroid-free immunosuppression. *Pediatric Transplantation* 7:53-58.
13. Lander ES, Linton LM, Birren B. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
14. Venter JC, Adams MD, Myers EW. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-1351.

15. Tatapudi RR, Muthukumar T, Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mARN for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int* 2004;665:2390-2397.
16. Morris-Stiff, Khanna, Bukilica. Quantification of intragraft expression of Granzyme B and perforin in acute renal allograft rejection *British Journal of surgery* 2001;88(5):739.
17. Fine RN, Alonso EM, Fischel JE, Bucuvalas JC, Enos RA, Gore-Langton RE 2004 Pediatric transplantation of the kidney, liver and heart: summary report. *Pediatr Transplant* 8:75-86.
18. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378-383.
19. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 1289-1295.
20. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2005; 351: 2715-2729.
21. Wong W, Venetz J-P, Tolfokk-Rubin N, Pascual M. 2005 immunosuppressive strategies in kidney transplantation: which role for the calcineurin inhibitors? *Transplantation* 2005; 80: 289-296.
22. Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001; 1:97-102.
23. Magee CC, Pascual M. Update in renal transplantation. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1373-1388.
24. Newell KA, Larsen CP. Tolerance assays: measuring the unknown. *Transplantation* 2006; 81: 1503-1509.
25. Najafian N, Albin MJ, Newell KA. How can we measure immunologic tolerance in humans? *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2652-2663.
26. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: shutting lymphocytes off. *Science* 1998; 280: 243-248.
27. Healy JJ, Goodnow CC. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 645-670.
28. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda 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* 1995; 155: 1151-1164.
29. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4⁺ CD25⁺ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001; 193: 1311-1317.
30. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxivitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945-1953.
31. Jonuleit H, Scmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323-6327.
32. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004; 114: 1198-1208.
33. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195-201.
34. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8⁺CD28⁺ T cells. *Int Immunol* 1998; 10: 775-783.

35. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 877-900.
36. Jiang X, Kojo S, Harada M, Ohkohchi N, Taniguchi M, Seino K-I. Mechanism of NKT cell-mediated transplant tolerance. *Am J Transplant* 2007; 7: 1482-1490.
37. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27: 20-21.
38. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+ CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4:337-342.
39. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-1061.
40. Wang YY, Flavell RA. Regulatory T -cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007; 445: 766-770.
41. Veronese F, Rotman S, Smith RN, Pelle TD, Farrell ML, Kawai T, et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3+cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7: 914-922.
42. San Segundo D, Fernández-Fresnedo G, Rodrigo E, Ruiz JC, Lopez-Hoyos M, Arias M. Monitoring of regulatory T cell subpopulations in renal transplant patients during the first year posttransplantation: influence of immunosuppression. *Transplant Proc.*
43. Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Kusters JG, Metselaar HJ, Tilanus HW, et al. Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transplant* 2006; 12: 277-284.
44. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, Paschetto E, Morosini M, Cascina A, et al. Regulatory CD4+ CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 2004; 77: 762-766.
45. Newell KA, Larsen CP, Kirk AD. Transplant tolerance: converging on a moving target. *Transplantation* 2006; 81: 1-6.
46. San Segundo D, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gomez-Alamillo, Merino R, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+ CD25+ FOXP3+regulatory T cells in renaltransplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: 550-557.
47. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, Domenig C, Sayegh MH, Strom TB. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 2003; 19: 503-514.
48. Gorczynski RM, Adams RB, Levy GA, Chung SW 1996 Correlation of peripheral blood lymphocyte and intragraft cytokine mRNA expression with rejection in orthotopic liver transplantation. *Surgery* 120:496-502.
49. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, Strom TB 1998 Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 66:562-566.
50. Dugre FJ, Gaudreau S, Belles-Isles M, Houde I, Roy R 2000 Cytokine and cytotoxic molecule gene expression determined in peripheral blood mononuclear cells in the diagnosis of acute renal rejection. *Transplantation* 70:1074-1080.
51. Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Susal C 2003 Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 3:1121-1127.