



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”  
SERVICIO DE TRASPLANTES  
UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL UNAM-HGM**

**ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES ELEVADOS EN ORINA DE INTERLEUCINA 10 E  
INTERFERON GAMA CON LA PRESENCIA DE RECHAZO ACTIVO EN  
PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES**

TITULACIÓN POR TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA:  
**LUIS GARCÍA COVARRUBIAS**

TUTOR:  
PEDRO SAN CRISTOBAL ZEPEDA  
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN EN TRASPLANTES  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

CIUDAD DE MÉXICO. A 18 DE FEBRERO DE 2016



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.

**ÍNDICE:**

1.	RESUMEN	02
2.	INTRODUCCIÓN	03
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	08
4.	JUSTIFICACION	09
5.	HIPOTESIS	10
6.	OBJETIVOS	10
7.	METODOLOGÍA	11
	7.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	11
	7.2 Tamaño de la muestra	11
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	12
9.	VARIABLES	12
10.	PROCEDIMIENTOS	14
11.	ASPECTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD	18
12.	RESULTADOS	19
13.	DISCUSIÓN	29
14.	CONCLUSIONES	31
15.	REFERENCIAS	32
16.	ANEXOS	
	Anexo 1 Plan de Trabajo del protocolo	36
	Anexo 2 Hoja de Consentimiento Informado	37

**RESUMEN:**

**Introducción:** El único tratamiento efectivo para la enfermedad renal crónica terminal es el trasplante renal, siendo la principal causa de disfunción el rechazo activo. El estándar de oro para el diagnóstico es la biopsia renal, la cual implica un riesgo de complicaciones para su realización. Investigaciones previas han estudiado la presencia o ausencia de IL 10 en injertos rechazados, relacionados a nivel inmunopatológico así como de otras interleucinas. Estudios en trasplantes humanos muestran niveles elevados de IL-10 e INF- $\gamma$  en rechazo agudo y crónico. **Objetivo:** Demostrar la Asociación de los niveles elevados en orina de IL 10 e INF- $\gamma$  con la presencia de rechazo activo. **Material y Métodos:** Se realizó un estudio observacional, analítico, transversal en pacientes trasplantados a los 12 meses de seguimiento pos trasplante renal. A quienes se les realizó biopsia de protocolo pos trasplante renal y determinación en orina de IL-10 e INF- $\gamma$ , categorizándose la biopsia de acuerdo a la clasificación de BANFF. Se consideraron como variables: Edad, IMC, Género, tipo trasplante, No. Haplotipos, creatinina, función renal por MDRD, Clasificación BANFF, Niveles de IL-10 e INF- $\gamma$ . Se realizó un análisis estadístico calculándose un tamaño de muestra de 25 pacientes, con un error alfa 0.05%, obteniéndose medidas de tendencia central y determinando asociación entre Niveles de IL-10 e INF- $\gamma$  con la presencia de rechazo mediante el programa SPSS 21.0. **Resultados** No hay correlación entre los niveles de IL-10 e INF- $\gamma$  con la presencia de inflamación dentro del injerto. ( $p=0.389$ ,  $0.082$  y  $r=0.015$ ,  $0.061$  respectivamente) y los pacientes con inflamación presentaron con mayor frecuencia peor función del injerto, lo cual además se vio reflejado en la TFGe calculada por MDRD ( $p=0.019$ ) no por CKD-EPI ( $p=0.068$ ) y Nankivell ( $p=0.073$ ) en las cuales no alcanzó significancia estadística. **Conclusión:** La medición de estas citoquinas en orina puede utilizarse como un marcador del estado de inmunosupresión en el seguimiento y monitoreo de los pacientes al año pos trasplante renal.

**PALABRAS CLAVE:** Rechazo, injerto, Trasplante Renal, Biopsia, Interleucinas, Inflamación.

## INTRODUCCIÓN:

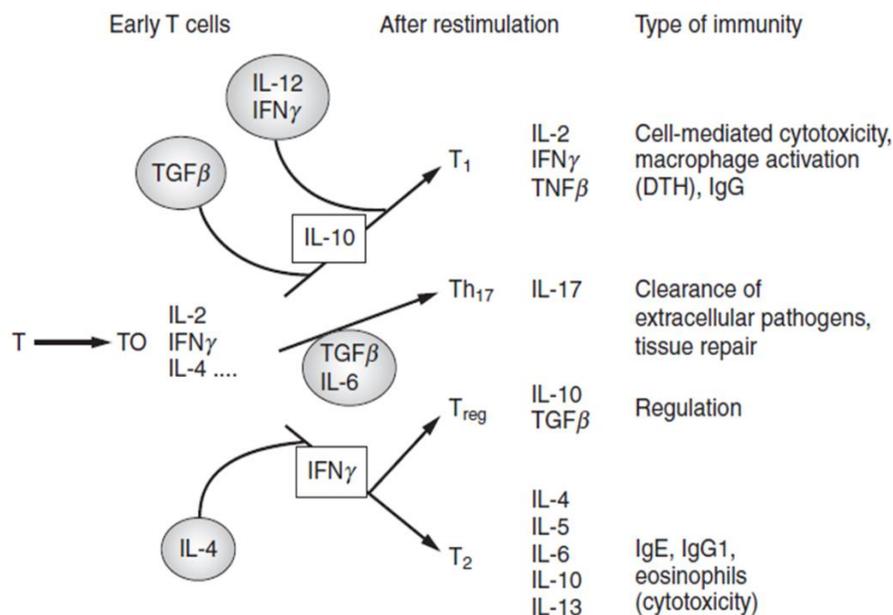
Las citoquinas regulan una compleja red de interacciones celulares median la respuesta inmune en el órgano trasplantado. Son proteínas que intervienen en la diferenciación y maduración de las células del sistema inmune, contribuyendo a la comunicación entre ella y en algunos casos, ejercen funciones efectoras directas. [1]

Se ha descrito un gran número de citocinas, que son sintetizadas localmente en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos. [1,2] La determinación de citocinas con fines diagnósticos, especialmente de las interleucinas (IL) 6 y 8, se ha utilizado en el estudio de la patología renal, infecciosa o no [3,4] tras conocer su producción en el riñón en respuesta a otras proteínas inductoras de su síntesis. Así, se han detectado elevaciones de las IL 6 y 8 en suero y orina de pacientes con infección urinaria, lo que podría convertirlas en un marcador diagnóstico útil en la clínica añadidos a los medios habituales de diagnóstico. [5,6] Especialmente importantes son las citocinas pro inflamatorias tipo 1 principalmente, Interferón Gama, (INF- $\gamma$ ) Interleucina 2 (IL-2) y CXCL-10, (proteína inducida por INF- $\gamma$ ); la IL-2 promueve la proliferación y diferenciación de células T mientras que el IFN- $\gamma$  activa las células inmunitarias y la presentación de antígenos por medio de la CXCL-10, que es un potente factor quimiotáctico de células inflamatorias y modula la expresión de moléculas de adhesión, que se producen en grandes cantidades después de la infección y durante el rechazo del injerto. [7,8] La producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 de células T implica tanto un estado transcripcional como post-transcripcional con la regulación, que sea capaz de detener significativamente la producción de citoquina [8]

Recientemente, varios inmunomediadores presentes en sangre periférica han sido detectados en la orina de pacientes con nefritis lúpica, pielonefritis en embarazo, así como en ancianos con

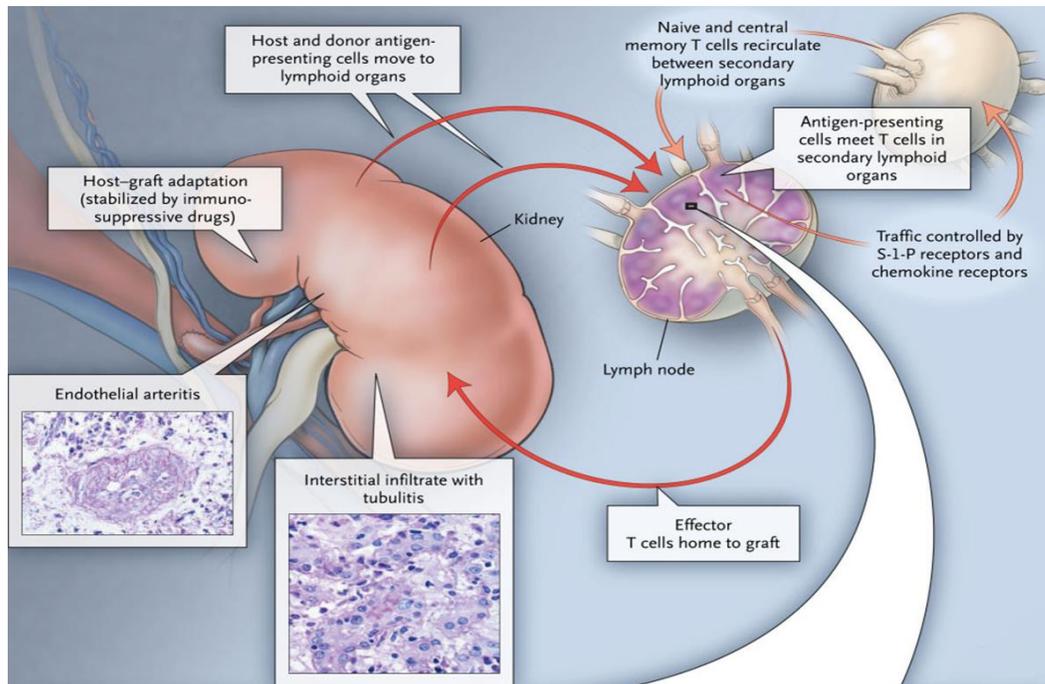
infecciones urinarias (UTI), por lo que ya se han propuesto como marcadores tempranos de enfermedad renal. [9,10]

Dado que la IL-10 es una citoquina Th2 primaria, su efecto en el contexto de un trasplante, requiere de la contribución simultánea de otras interleucinas, particularmente IL-4. Así dado que esta IL-10 no es una Th2 exclusiva, es importante determinar la regulación diferente de esta y otras interleucinas particularmente IL-2 e INF- $\gamma$ . [10,11]



**Fig. 1 Predominancia de la respuesta inmunológica según IL-10 o INF- $\gamma$**

Hay evidencia que ha demostrado la importancia de diferentes citoquinas en el rechazo renal agudo. A su vez se han encontrado niveles elevados de IL-2, IL-4, IL-10 e INF- $\gamma$  en plasma y orina de pacientes con rechazo. [10] Durante un episodio de rechazo se han detectado, niveles elevados de IL-1, IL-2R e ICAM-1 en el infiltrado inflamatorio así como en el tejido renal. [10,11]



**Fig. 2 Representación de la respuesta efectora inmunológica en injerto renal (Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. Philip F. Halloran. N Engl J Med 2004; 351(26):2715-29)**

Específicamente, el  $\text{IFN-}\gamma$  es producido por las células T (Th1), Natural Killers y macrófagos. Esta interleucina, regulan la actividad humoral e inducen la activación de células C citotóxicas responsables del rechazo del injerto. El hallazgo de que estas citoquinas pro inflamatorias se excretan en orina y de que su presencia se correlaciona con el desarrollo de daño renal, crea la idea de plantear un método diagnóstico relativamente sencillo, fácil y no invasivo y utilizable en la consulta de seguimiento. [11, 12,13]

Hasta la fecha la determinación de citoquinas en orina se asocia con estudios de investigación más que como herramienta diagnóstica. Principalmente, existen algunas discrepancias entre los autores sobre cuál es la mejor citoquina como marcador de un rechazo inminente. [12,13] Cabe destacar que la determinación de citocinas en orina es demostrable de actividad inflamatoria a nivel renal. [13,14]

Estudios en trasplantes humanos muestran niveles elevados de IL-10mRNA en rechazo agudo y crónico, y niveles séricos muy elevados al momento del trasplante en todos los pacientes. Niveles comparables se aprecian en injertos hepáticos de ratas trasplantadas tanto en caso de rechazo como tolerancia. La inhibición de la respuesta Th2 puede causar rechazo, el cual como ya se demostró, se asocia con IL-4 así como con citoquinas Th1, (IL-2 e INF-  $\gamma$ ) pese a la presencia de IL-10. [14]

Otras Investigaciones que han estudiado la presencia o ausencia de IL-10 en injertos rechazados, han relacionado esta y otras interleucinas a nivel inmunopatológico, basándose en el hecho de que muestras de injertos renales con rechazo refractario, presentan un infiltrado inflamatorio con altos niveles de células secretoras de IL-10 sugiriendo que esta IL-10 no inhibe el rechazo. Estas células aumentan la producción de INF-  $\gamma$ , la que puede ser regulada por IL-2 o IL-4 in vitro. [14,15]

Otra de las citocinas pro inflamatorias con potencial diagnóstico es la proteína derivada del interferón  $\gamma$  IP-10, ya que en otras publicaciones se demostró que la determinación de la proteína IP-10, (CXCL10) puede ser un marcador prometedor para este propósito. De hecho, esta citosina puede predecir la inflamación aguda clínica del injerto. (e.g. rechazo, nefropatía por BK) [16] Asociándose a que los niveles urinarios de esta correlacionan con la extensión de la tubulitis subclínica en 2 cohortes independientes de pacientes. [16, 17] Una limitante de estos estudios es que incluyeron grupos selectos de pacientes, por lo que el punto de corte de la determinación urinaria de CXCL10 para predecir inflamación clínico/subclínica no está bien establecido. [16 ,17, 18]

Se ha afirmado que la CXCL10 urinaria es biomarcador de inflamación túbulo intersticial, independientemente de la etiología, siendo las causas más importantes el rechazo y la infección por BK virus. [20,21]

Algunos investigadores en estudios previos publicaron evidencia que demuestra por primera vez la aplicabilidad diagnóstica de la CXCL10 en orina para la detección de inflamación del injerto. La

sensibilidad y especificidad es baja en algunos de estos, [17,18] dándose un punto de corte de 1.535ng/mmol. Siendo más específico para el diagnóstico un nivel de 2.586 ng/mmol. Otros autores, encontraron que niveles elevados en orina de CXCL10 se asociaron con función inferior del injerto aún en ausencia de rechazo clínico, sugiriendo por lo tanto a esta interleucina como marcador pronóstico más allá de la histología del injerto, requiriéndose de más estudios para definir su papel en los cambios limítrofes. [18,19]

Se sabe que los niveles de CXCL 10 en orina no reflejan directamente la inflamación vascular, lo que compagina con otros estudios sobre marcadores urinarios de rechazo donde el RNAm de granzyma A/B y de perforina se correlacionan poco con inflamación vascular, (Banff II) comparado con la tubulitis. (Banff Ia/b) [19, 20] Existe ya evidencia del diagnóstico de rechazo por medio determinación en orina de Granzyma B y Perforina pero que sin embargo están también presentes cuando hay casi cualquier causa de disfunción del injerto. [20]

Estudios previos multicéntricos han investigado el diagnóstico del rechazo por medios no invasivo mediante la determinación de niveles de RNAm en orina de CD3, inhibidor de Proteasa, CD103, CXC3, e interleucinas inflamatorias. (IL2, 4, 6,10) [21]



**Fig. 3 Fotografía de un injerto con rechazo hiperagudo.  
Se aprecia inflamación del injerto**

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

La enfermedad renal crónica terminal (ERC) es la 3era causa de enfermedad en la población adulta y la 10ma causa total de mortalidad en nuestro país. Se estima una incidencia anual de pacientes con insuficiencia renal crónica terminal (ERCT) es de 377 casos por millón de habitantes y se cuenta con alrededor de 52,000 pacientes en terapias sustitutivas en nuestro país, siendo potenciales candidatos la mayoría de estos a un trasplante renal. [22]

Esta patología, requiere de un tratamiento permanente sustitutivo de la función renal, ya sea la diálisis, hemodiálisis o el trasplante renal. Este último es el tratamiento de elección para pacientes con ERCT, pero el rechazo agudo es una de las principales causas disfunción y daño crónico del injerto, siendo ya sabido que la creatinina sérica es el principal marcador tardío de daño al injerto. [23,24]

Actualmente el rechazo activo es diagnosticado por medio de biopsia del injerto. La biopsia es un procedimiento invasivo, seguro, pero con cierto riesgo de sangrado y pérdida del injerto así como de error de muestreo y variabilidad de la interpretación. Por lo que la necesidad de realizar biopsias seriadas, podría ser peligroso para los receptores y tener un costo elevado para los mismos. [25]

El rechazo es la causa más importante de pérdida del injerto en los pacientes trasplantados, ocurre en el 10 al 30% de los pacientes dentro del primer año pos trasplante. [25,26] En la mayoría de los casos, existe tratamiento para el rechazo activo efectivo si se diagnostica este en su etapa inicial, por lo que podría ser una ventaja el disponer de un método de diagnóstico o escrutinio no invasivo oportuno que diagnostique rechazo activo antes de que se altere la función renal y sea clínicamente detectable permitiría reducir el daño en el injerto asociado a rechazo y la categorizar la inmunosupresión, en insuficiente o excesiva y minimizar los efectos de esta. [26,27]

Es bien reconocido que la persistencia del rechazo subclínico no tratado, se asocia con progresión a daño crónico e irreversible y deterioro de la función del injerto, por lo que la detección oportuna es importante para realizar una intervención terapéutica a tiempo. [28,29] En particular la inflamación subclínica intersticial y tubulitis predice pobre pronóstico del injerto. [29]

A la fecha, la creatinina sérica es ampliamente utilizada como la principal estrategia para monitorizar el injerto renal. Cuando se deteriora de un 10 a 20% se debe descartar un rechazo, realizándose la biopsia en muchos centros para determinar la causa de disfunción. Actualmente el estándar de oro es la biopsia de protocolo, la cual hasta la fecha solo ha sido adoptada como rutina en algunos centros de nuestro país. [28,29, 30] La evidencia apoya el uso de biopsias de protocolo detectándose rechazo agudo con función renal estable (rechazo subclínico) en un 3 al 5% de los injertos. [30] En muchos centros actualmente, la biopsia de protocolo del injerto de los 4 a 12 meses ha sido asociada como predictor de sobrevida del injerto. [30]

## **JUSTIFICACIÓN:**

La principal causa de pérdida del injerto renal en pacientes trasplantados es el rechazo activo. El diagnóstico de rechazo activo se realiza cuando ya hay disfunción del injerto por daño y se establece por medio de la biopsia que es un método invasivo con riesgo de complicaciones y pérdida del injerto. No existen en nuestro un país métodos estandarizado para el diagnóstico precoz de rechazo. Es el primer estudio de este tipo en población mexicana, (latina) la cual tiene un mayor riesgo de rechazo que la caucásica, donde se han descrito estudios similares previos. El poder identificar la presencia de inflamación y de rechazo subclínico (antes de la disfunción del injerto), mediante un método no invasivo disminuiría los costos del seguimiento pos trasplante, y mejoraría la sobrevida del mismo. Se determinará en orina por ser el sitio donde se encuentra la inflamación o daño a nivel local y será

IL-10 por ser de las principales citocinas reguladoras y de INF-  $\gamma$  que ha demostrado ser más específica en cuanto a inflamación secundaria a rechazo celular.

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:**

¿Si se tienen niveles elevados en orina de Interleucina 10 e Interferón Gama será más frecuente la presencia de inflamación y por ende de rechazo en pacientes trasplantados renales?

### **HIPÓTESIS:**

Nula: Los niveles elevados en orina con pacientes trasplantados renales de IL-10 e Interferón  $\gamma$  se asocian con la presencia de inflamación y rechazo corroborado por biopsia del injerto.

Alternativa: Los niveles elevados en orina de IL-10 e Interferón  $\gamma$  no se asocian con la presencia de inflamación y rechazo activo corroborado por biopsia del injerto.

### **OBJETIVO:**

1. Demostrar la Asociación de los niveles elevados en orina de IL 10 e Interferón gama con la presencia de inflamación y rechazo activo.
2. Verificar la factibilidad de la determinación en orina de estos marcadores como método de escrutinio en el seguimiento pos trasplante.
3. Medir las interleucinas en orina de los pacientes trasplantados renales al realizarse biopsia renal.
4. Determinar si la técnica de medición de estas citocinas en orina es efectiva.

## METODOLOGÍA :

Universo Estudio: Todos los pacientes pos trasplantados renales en este hospital con un año mínimo de seguimiento, sin rechazos previos.

Criterios de Inclusión: Pacientes que conserven función del injerto al momento de la medición, sin evento de rechazo en los 12 meses previos y sin contraindicación para biopsia renal de protocolo. (T. coagulación, EGO) (realizándose como método de seguimiento de la unidad de trasplante renal o por disfunción del injerto sin evidencia de proceso infeccioso ni alteración anatómica)

Criterios de Exclusión: Muestra insuficiente para determinación en orina de marcadores, o biopsia no diagnóstica, o deseen salir del estudio.

## DISEÑO ESTADÍSTICO:

- Estudio observacional, analítico, transversal.
- Tamaño de la muestra calculado por diferencia de medias con nivel de confianza del 95%, a 2 colas y una potencia del 80%.
- Se realizaron medidas de tendencia central, así como pruebas para medir asociación (Índice f Cohen)
- La presentación resultados con gráficas de cajas y bigotes, polígono de frecuencias superpuestas, etc.
- Variables: Tabla 1.
- Cálculo del tamaño de la muestra:

$$n = \frac{2(Z_a + Z_b)^2 S^2}{d^2}$$

$$Z_a = 1.96$$

$$Z_b = 0.842$$

$$d = 6.7$$

$$S = 8.5$$

Intervalo confianza 95%

Error alfa 0.05

N = 25 pacientes

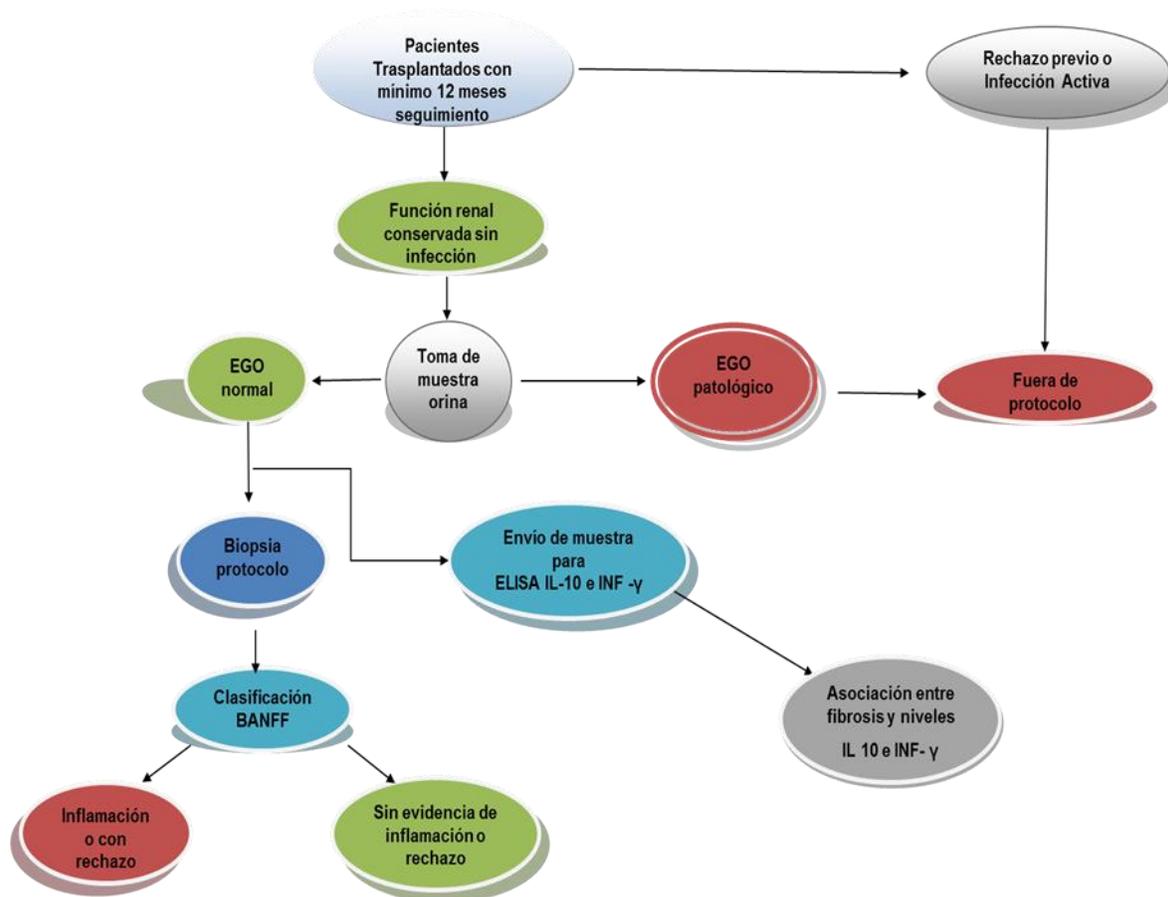
El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 21.0 e incluye en primer lugar, un análisis descriptivo de las distintas variables cuantitativas y cualitativas analizadas (rango e intervalo, media, error estándar de la media, desviación estándar, e intervalo de confianza de la media (con una probabilidad del 95%). La comparación de variables cuantitativas entre muestras independientes se realizará mediante t Student una vez convertidas las variables a logarítmicas que no cumplieran con distribución normal. La correlación entre variables cuantitativas se analizó mediante el test de Pearson, en los que existía determinación simultánea de varias interleucinas en orina.

En todos los casos se considerará una diferencia como significativa cuando la p sea menor de 0,05 (error alfa 5%). Para establecer el límite superior de normalidad de las dos citocinas estudiadas se consideró el valor de la media más 2 desviaciones estándar (95% de la población).

VARIABLE	UNIDAD	VALORES	Tipo de variable
Edad	Años	15 a 65	Cuantitativa discreta
Peso	Kilos	40 a 100	Cuantitativa continua
Sexo	Tipo	M o F	Cualitativa nominal
Talla	cm	140 A 180	Cuantitativa discreta
IMC		15 A 35	Cuantitativa discreta
Tiempo Postrasplante	Meses	12 A 24 MESES	Cuantitativa discreta
Tipo Trasplante		DV O DC	Cualitativa nominal
Inducción		SI O NO	Cualitativa nominal
Cr Basal	mg/dl	1 A 15	Cuantitativa continua
MRD basal	mg/dl X 1.72m2	5 a 20	Cuantitativa continua
Cr Biopsia	mg/dl	0.5 a 1.5	Cuantitativa continua
MDRD biopsia	mg/dl X 1.72m2	30 a 100	Cuantitativa continua
Biopsia Renal	BANF 2007	Rechazo Activo, crónico, humoral, celular	Cualitativa nominal
IL 10 en Orina	Niveles	106 copias por microgramo	Cuantitativa continua
Interferon alfa orina	Niveles	106 copias por microgramo	Cuantitativa continua

**Tabla 1. Variables analizadas**

Al cumplir el año de seguimiento, los pacientes que permanezcan con función renal, sin rechazos activos previos durante ese lapso, y a los que se les realizará biopsia como parte de su seguimiento al año, o con elevación de creatinina más del 30% de su basal, sin datos de infección, o alteraciones anatómicas, fueron invitados a participar en el estudio. Se les tomó una muestra de orina (aprox. 20ml) para examen general de orina y para determinación almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posterior determinación de IL-10 e Interferón Gama. (Fig. 4)



**Figura 4. Diagrama de Flujo del desarrollo del Protocolo**

**PROCEDIMIENTOS:****a) BIOPSIA RENAL**

Se realiza como parte del seguimiento en el servicio de Trasplantes del Hospital General de México. Previa autorización y firma del Consentimiento Informado propia al procedimiento. Sin evidencia de infección y tiempos de coagulación normal. Se realiza de manera percutánea, guiada en tiempo real por medio de ultrasonido, con anestesia local, (Lidocaína al 10%), dándose un disparo, con Aguja de 16 fr (BARD) con pistola marca MAGNUM (BARD) en el polo superior de la corteza renal. Se ratifica la viabilidad de la muestra en ese instante por medio de microscopía de luz por un médico Patólogo, considerándose como satisfactoria la toma de muestra de por lo menos 10 glomérulos. Se envía Un glomérulo para inmunofluorescencia y el resto a microscopia de luz. Se mantiene al paciente en reposo absoluto por 6 horas con 1000ml sol. Fisiológica 0.9%, furosemida 40mg, y posterior egreso a su domicilio con reposo por 24hrs más.



**Fig. 5 Imagen representativa de la realización de Biopsia Renal Percutánea Guiada por USG.**

**b) REALIZACIÓN DE PRUEBA DE ELISA:**

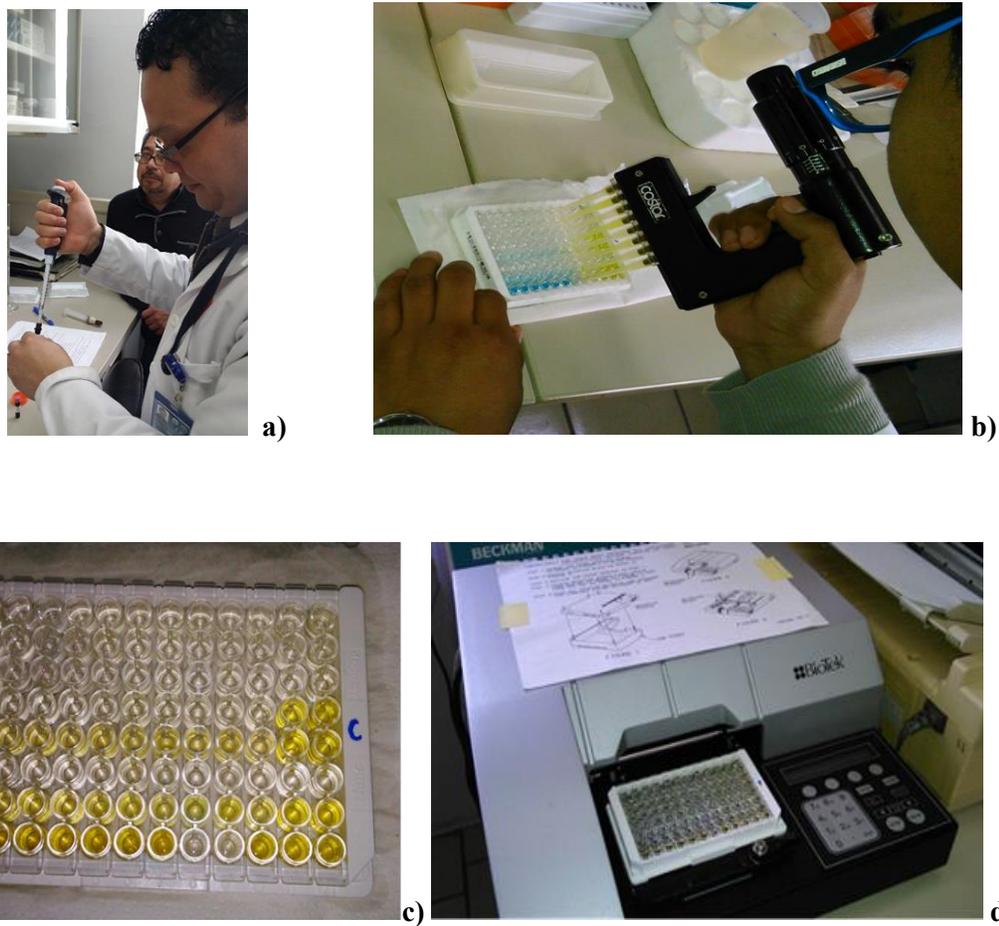
Las muestras de orina se centrifugaron a 3000 rpm y posteriormente fueron congeladas a - 20° para su almacenamiento y posterior proceso de determinación de interleucinas.

Se utilizó el Multi-Analyte ELISArray Kits QIAGEN® (QIAGEN Group) el cual además realiza la determinación simultánea por técnica de ELISA directo de IL2, IL4, IL5, IL6, IL 10, IL 12, IL 13, IL 17, INF  $\gamma$ , TNF a, TGF b, GCSF.

Una vez descongeladas, se depositaron en tubos que contengan 20 ml de una solución estabilizadora; los tubos se centrifugaron a 3000 rpm, desechando el sobrenadante, el botón celular se lavó dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Una vez obtenido el botón celular, se realizó la determinación de IL-10 e Interferón Gama por medio de la técnica de ELISA en el Laboratorio de Inmunología de la unidad de Medicina experimental, de la facultad de medicina de la UNAM- HGM. Fig. 6 (No se manejó información genética solo se determinó interleucinas en orina por técnica de ELISA)

**Pasos generales de la prueba de ELISA.**

1. Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo.
2. Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
3. Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo
4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
5. Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima
6. Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo
7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
8. Adición del substrato
9. Unión del substrato a la enzima
10. Desarrollo del color y medición por cromatografía.



**Fig. 6 Método de Elisa. A) Toma de suero con micropipeta. B) Depósito de anticuerpos en los pocitos. C) rejilla de suero de 6 pacientes con complejos Antígeno/Anticuerpo en distintas diluciones. D) Lectura de las rejillas por cromatografía de luz.**

Se analizó posteriormente si hay asociación y el grado de correlación de haberla entre los hallazgos de acuerdo a la clasificación de BANFF de las biopsias renales, (Fig. 7, 8) con los niveles de IL-10 e Interferón Gama encontrados en las muestras de orina en los mismos pacientes.

## 1. Normal

### 2. Cambios mediados por anticuerpos (puede coincidir con categorías 3, 4, 5 y 6)

Se basa en la demostración de anticuerpos contra el donante, C4d y patología del injerto

- **Depósitos de C4d sin evidencia morfológica de rechazo activo**

C4d+; presencia de anticuerpos contra el donante; ausencia de signos de rechazo agudo o crónico celular o humoral (p. ej., g0, cg0, ptc0); no laminación ptc (<5 láminas en microscopio electrónico); no NTA-like con mínima inflamación. Los casos con cambios *borderline* simultáneos se consideran indeterminados

- **Rechazo agudo mediado por anticuerpos<sup>1</sup>**

C4d+; presencia de anticuerpos antidonante circulantes y evidencia morfológica de daño tisular agudo, como:

- I. NTA-like con mínima inflamación
- II. Inflamación en capilares peritubulares y/o glomerulares (ptc/g >0) y/o trombosis
- III. Inflamación transmural arterial/necrosis fibrinoide v3

- **Rechazo crónico activo mediado por anticuerpos<sup>1</sup>**

C4d+; presencia de anticuerpos anti-donante circulantes y evidencia morfológica de daño tisular crónico, tales como dobles contornos en capilares glomerulares y/o multilaminación de membrana basal de capilares peritubulares y/o fibrosis intersticial/atrofia tubular y/o engrosamiento fibrointimal en arterias

**3. Cambios *borderline*:** «sospecha» de rechazo agudo mediado por células T (puede coincidir con categorías 2, 5 y 6). Esta categoría se usa cuando no hay arteritis intimal, pero sí hay focos de tubulitis (t1, t2 o t3) con leve infiltración intersticial (i0 o i1) o infiltración intersticial (i2, i3) con leve tubulitis (t1)

### 4. Rechazo agudo mediado por células T (puede coincidir con categorías 2, 5 y 6)

- **Rechazo agudo mediado por células T o rechazo celular agudo**

- IA. Casos con inflamación intersticial significativa (> 25% del parénquima afectado, i2 o i3) y focos de tubulitis moderada (t2)
- IB. Casos con inflamación intersticial significativa (>25% del parénquima afectado, i2 o i3) y focos de tubulitis grave (t3)
- IIA. Casos con arteritis intimal leve-moderada (v1)
- IIB. Casos con arteritis intimal grave que afecta a >25% del área luminal (v2)
- III. Casos con arteritis «transmural» y/o cambios fibrinoides arteriales y necrosis de células de capa media muscular con infiltrado inflamatorio linfocítico acompañante (v3)

- **Rechazo crónico activo mediado por células T**

«Vasculopatía crónica del injerto» (fibrosis de la intima arterial con infiltrado inflamatorio mononuclear en la fibrosis; formación de neointima)

**5. Fibrosis intersticial y atrofia tubular sin evidencia de ninguna etiología específica** (puede incluir esclerosis vascular y glomerular no específicas, pero la gravedad se gradúa por los hallazgos túbulo-intersticiales)

**Grado**

- I. Fibrosis intersticial leve y atrofia tubular (<25% del área cortical)
- II. Fibrosis intersticial moderada y atrofia tubular (26-50% del área cortical)
- III. Fibrosis intersticial grave y atrofia tubular (>50% del área cortical)

**6. Otros:** cambios no considerados secundarios a rechazo agudo y/o crónico (pueden incluir lesiones aisladas g, cg, o cv y coincidir con categorías 2, 3, 4 y 5)

---

<sup>1</sup> Sospechoso de rechazo mediado por anticuerpos si no se demuestran C4d (en presencia de anticuerpos) o anticuerpos (con C4d+) en presencia de evidencia morfológica de daño tisular.

**Fig. 7 Clasificación de BANFF 2007 División de acuerdo a los hallazgos de la biopsia. Sis B, Mengel M, Haas M et al. Banff'09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. Am J Transplant 2010; 10: 464-71**

Estructura	Lesión	Definición y grados
Intersticio	Tubulitis	<ul style="list-style-type: none"> <li>t0: ausencia células mononucleadas en túbulos</li> <li>t1: Focos con 1-4 células por sección tubular (o por 10 células tubulares)</li> <li>t2: Focos con 5-10 células por sección tubular (o por 10 células tubulares).</li> <li>t3: Focos con &gt;10 células por sección tubular (o por 10 células tubulares) o presencia de al menos 2 áreas de destrucción de la basal tubular con i2/i3 y t2 en otros sitios de la biopsia.</li> </ul>
	Inflamación intersticial células mononucleadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>i0: No hay o es trivial (&lt;10% del parénquima no fibrosado).</li> <li>i1: En el 10 a 25% del parénquima</li> <li>i2: En el 26 al 50% del parénquima</li> <li>i3: En &gt; del 50% del parénquima</li> </ul>
Vasos	Arteritis intimal	<ul style="list-style-type: none"> <li>v0: No hay arteritis</li> <li>v1: Arteritis intimal leve a moderada en al menos una arteria</li> <li>v2: Arteritis intimal severa con disminución de su luz en al menos el 25%</li> <li>v3: Arteritis transmural y/o necrosis fibrinoide de la media con infiltrado linfocítico.</li> </ul>
	Capilaritis peritubular	<ul style="list-style-type: none"> <li>ptc0: ptc cortical no significativa o &lt;10% de CPTs con inflamación</li> <li>ptc1: &gt; 10% PTCs con capilaritis, máximo 3-4 células inflamatorias en luz</li> <li>ptc2: &gt; 10% PTCs con capilaritis, máximo 5-10 células inflamatorias en luz</li> <li>ptc3: &gt; 10% PTCs con capilaritis, máximo &gt; 10 células inflamatorias en luz</li> </ul>
Glomerulos	Glomerulitis	<ul style="list-style-type: none"> <li>g0: No hay glomerulitis</li> <li>g1: Glomerulitis en menos del 25% de glomérulos</li> <li>g2: Segmental o global en 25 a 75% de glomérulos</li> <li>g3: Principalmente global en &gt;75% de glomérulos</li> </ul>

**Fig.8. Clasificación de BANFF 2007. Estructura, tipo de lesión y cuantificación en grados o puntos. Sis B, Mengel M, Haas M et al. Banff'09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. Am J Transplant 2010;10:464-71**

#### ASPECTOS ETICOS:

#### LEY GENERAL DE SALUD:

Artículo 100.- La investigación en seres humanos se desarrollará conforme a las siguientes bases

Artículo 101.- Quien realice investigación en seres humanos en contravención a lo dispuesto en esta Ley y demás disposiciones aplicables, se hará acreedor de las sanciones correspondientes.

#### REGLAMENTO D ELA LEY GENERAL DE SALUD

- ARTÍCULO 13.-En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar.

- ARTÍCULO 16.- En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.
- ARTÍCULO 17.- Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. Para efectos de este Reglamento, las investigaciones se clasifican en las siguientes categorías; I.- Investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquéllos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

## **RESULTADOS:**

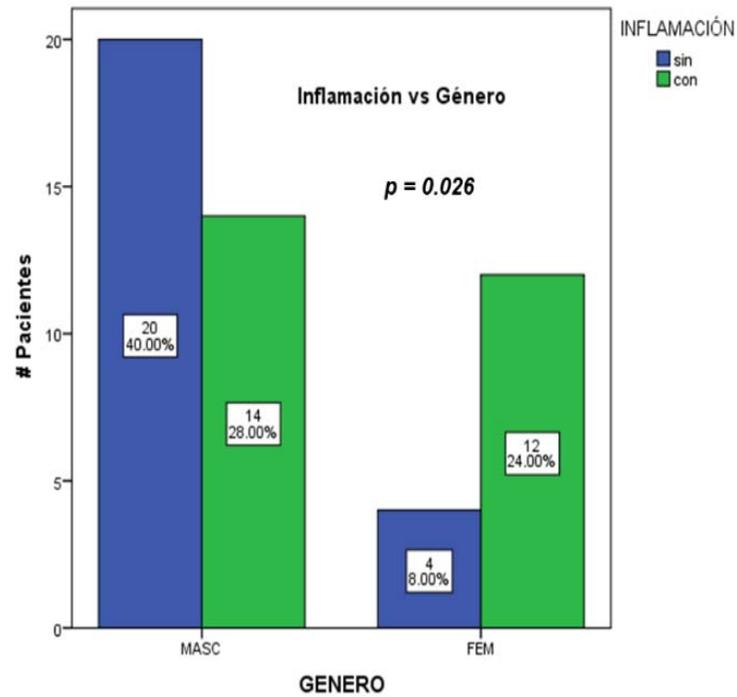
### **Características Demográficas:**

Se incluyó un total de 50 pacientes, 34 de estos (68%) de género masculino y 26 (32%) género femenino, con una edad promedio de  $31.7 \pm 9.9$  años, con un peso de  $64.91 \pm 13.84$  kg, una estatura de  $1.60 \pm 0.10$ mts y un índice de masa corporal (BMI) de  $24.97 \pm 4.07$ . El tiempo pos trasplante promedio fue de  $20.38 \pm 11.73$  de todos los pacientes incluidos, 39 de estos (78%) fueron de trasplantes de donador vivo, y 11 (22%) de donador fallecido. Tabla 1, Fig. 9 y 10.

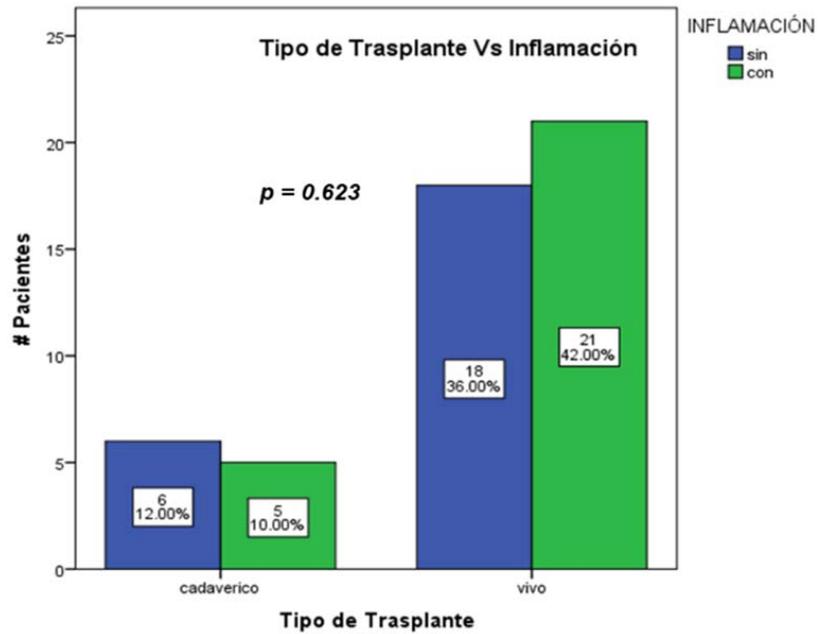
VARIABLES	RESULTADOS
<b>GENERO</b>	
Masculino	34(68%)
Femenino	16(32%)
Edad (años)	31.74 ± 9.97
Peso (kg)	64.91 ± 13.84
Altura (mts)	1.60 ± 0.10
IMC*	24.97 ± 4.07
<b>TIPO DE TRASPLANTE</b>	
TRDV	39(78%)
TRDF	11(22%)
Tiempo desde el trasplante (meses)	20.38±11.73
<b>INDUCCION</b>	
Basiliximab	37(74%)
Timoglobulina	13(26%)
<b>TIPO DE INMUNOSUPRESION</b>	
CMP	15(30%)
TMP	34(68%)
SMP	1(2%)
<b>NIVEL DE INMUNOSSUPRESION</b>	
Normal	11(22%)
Bajo	10(20%)
Alto	3(6%)
<b>EGO**</b>	
Con proteinuria	14(28%)
Sin proteinuria	36(72%)
Creatinina (mg/dl)	1.81 ± 1.56
BUN (mg/dl)	21.51 ± 18.21
Urea (mg/dl)	51.73 ± 38.10
Albumina (g/dl)	4.25 ± 0.35
MDRD (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	55.27 ± 22.46
CKD- EPI (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	67.68 ± 24.90
NANKIVELL (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	58.58 ± 21.29
CK (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	67.68 ± 24.90
<b>NIVELES DE INTERLEUCINAS</b>	
IL 10 (pg/mL)	7.51 ± 7.4
INF- γ (pg/mL)	7.37 ± 4.8
PUNTAJE INFLAMACIÓN	2.78 ± 2.84

**Tabla 2. Características Demográficas**

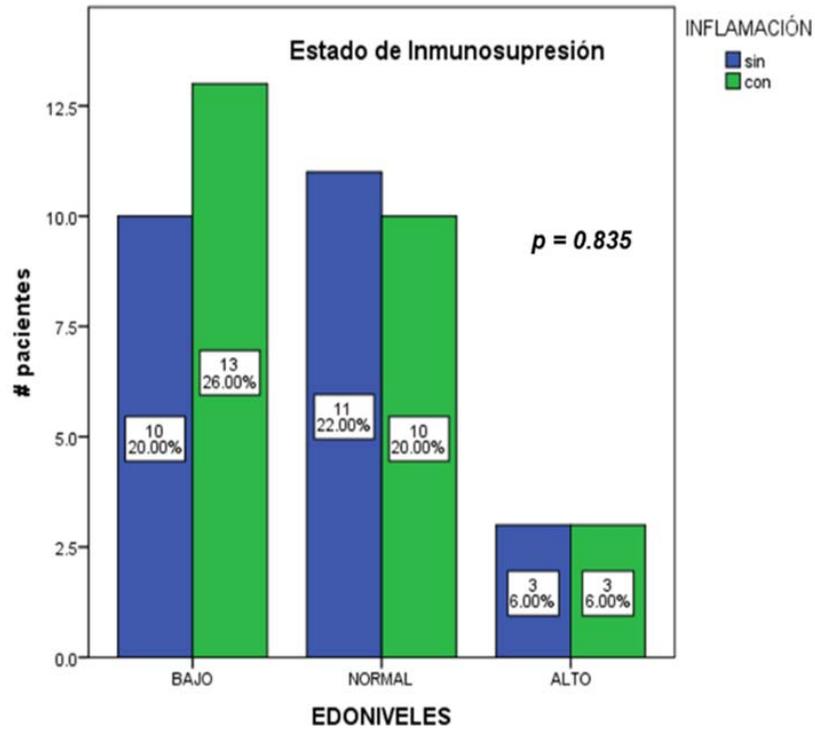
\*IMC, Índice de masa corporal. \*\* EGO, Examen General de Orina.



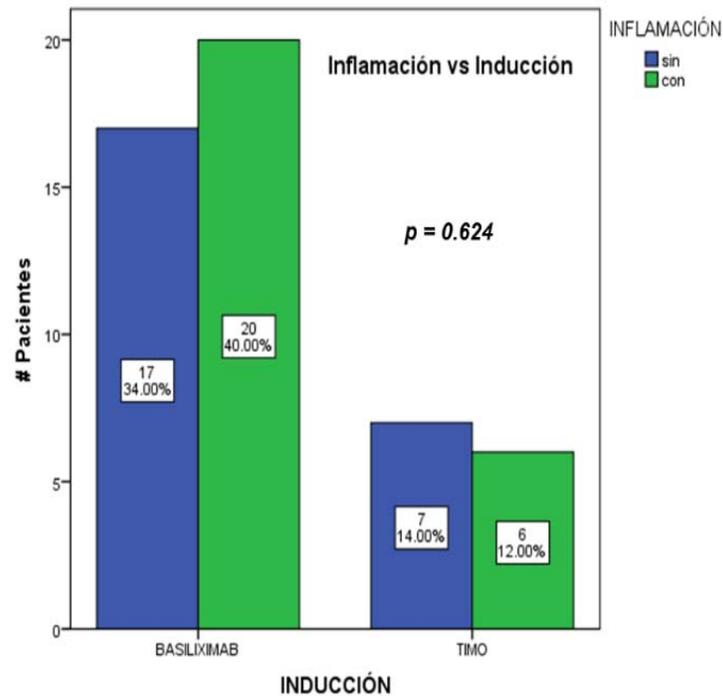
**Fig. 9** Presencia de inflamación en Biopsias renales según el género



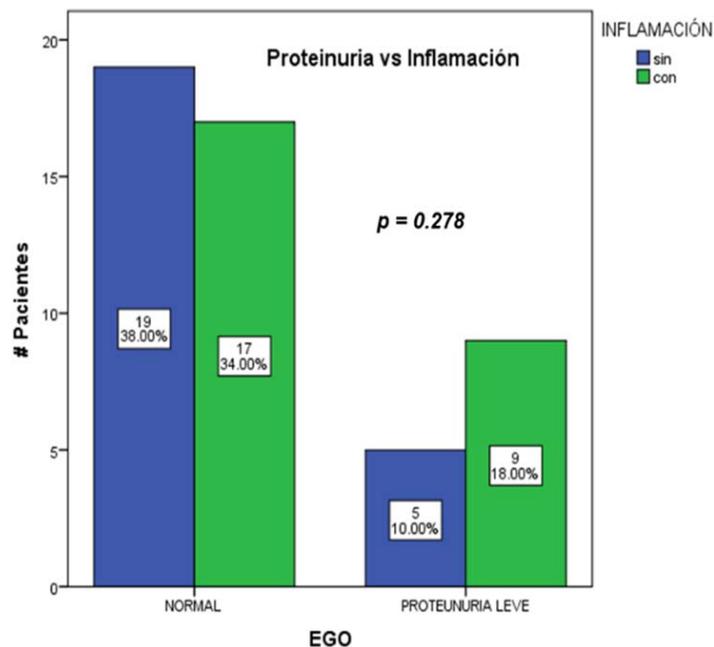
**Fig. 10** Tipo de trasplante y presencia de inflamación.



**Fig. 11 Niveles de ICN e Inflamación.**



**Fig. 12 Tipo de Inducción e inflamación por Biopsia.**



**Fig. 13. Presencia de proteinuria o no según grado de inflamación.**

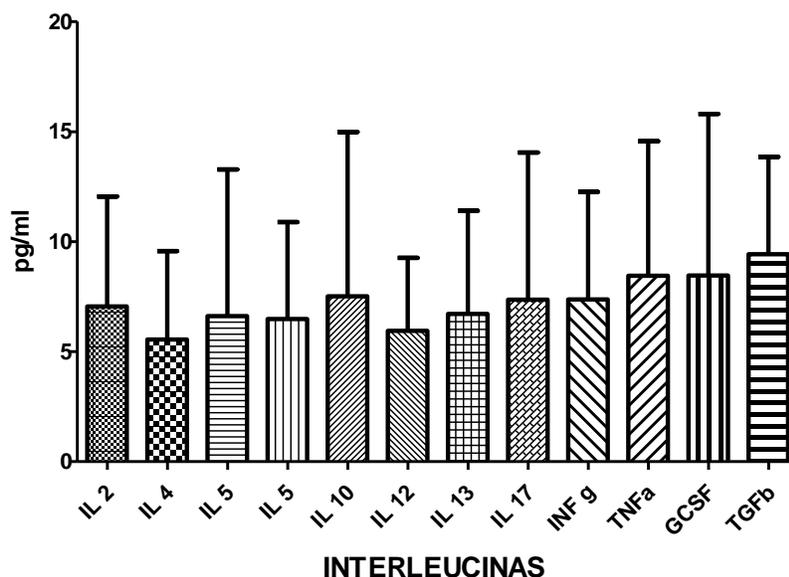
#### Interleucinas:

Como parte del Kit de ELISA, se realizó la determinación simultánea además de las Interleucinas del estudio de las otras que incluía el kit y se realizó de la misma forma su cuantificación por cromatografía y expresión en unidades Log 10 para la realización de pruebas paramétricas. Tabla 3,

Fig. 14

<b>CITOQUINAS</b>	<b>PROMEDIO / DE</b>
LOGIL2	0.790 ± 0.199
LOGIL4	0.676 ± 0.216
LOGIL5	0.726 ± 0.247
LOGIL6	0.738 ± 0.237
LOGIL10	0.763 ± 0.279
LOGIL12	0.723 ± 0.199
LOGIL13	0.757 ± 0.232
LOGIL17	0.766 ± 0.263
LOG INF- $\gamma$	0.808 ± 0.213
LOG TNFa	0.860 ± 0.222
LOG GCSF	0.848 ± 0.226
LOG TGFb1	0.944 ± 0.148

**Tabla 3. Log 10 de niveles de citoquinas en orina**



**Fig. 14 Niveles de Citoquinas en pg/ml en los 50 pacientes (con y sin inflamación)**

#### **Inmunosupresión.-**

Con respecto al esquema de inducción esta fue en a base de Basiliximab (40mg dividido en 2 dosis) en 37 (74%) y Timoglobulina (1.5mg/kg 3 dosis) en 13 (26%) de estos. El esquema de inmunosupresión de mantenimiento fue alguno de los siguientes: Mofetil Micofenolato (500mg cada 8hrs) + Ciclosporina (100 a 150mg cada 12hrs) + Prednisona (5mg al día) en 15 (30%), Tacrolimus (2 a 4mg cada 12hrs) + Mofetil Micofenolato (500mg cada 8hrs) + Prednisona (5mg al día) en 34 (68%) y 1 paciente (2%) con Sirolimus (2mg cada 12hrs) en lugar de inhibidor de calcineurinas. El estado de inmunosupresión se clasifico conforme a los niveles de Inhibidor de calcineurinas de la siguiente forma: (Normal niveles de 150 a 250 ng/ml de ciclosporina, o de 7 to 10 ng/ml de tacrolimus). Inmunosupresión baja en 23 (46%) normal en 21 (42%) y alta en 6 (12%) pacientes.

Fig. 11, 12, 13

**Biopsia Renal.-**

En lo referente a la Biopsia renal, en 26 pacientes (52%) mostró inflamación en la biopsia y en 24 de estos (48%) no había presencia de esta. La presencia de fibrosis en la Biopsia se reportó en 31 pacientes, (62%) rechazo agudo celular o humoral en 9(18%) y otros cambios inespecíficos en 10; (20%) No se encontró diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los niveles de IL-10 e IFN- $\gamma$  por medio de ANOVA. ( $p=0.467$  and  $p=0.063$  respectivamente) Conforme a la clasificación de BANNF el puntaje promedio de inflamación en la biopsia fue de  $2.78 \pm 2.84$ .

**Función Renal.-**

Al evaluarse la función renal, la Creatinina promedio fue de  $1.81 \pm 1.5$  mg/dl, el BUN de  $21.51 \pm 18.21$ , y la Urea de  $51.73 \pm 38.10$ . La Tasa de Filtrado Glomerular estimada (TFGe) por diferentes fórmulas fue: de  $55.27 \pm 22.46$  ml/min por MDRD,  $65.76 \pm 26.7$  ml/min por CKD-EPI,  $67.68 \pm 24.90$  ml/min por Cockroff-Gault y de  $58.58 \pm 21.29$  ml/min por Nankivell. (Fig. 14, 15)

Al comparar las características de ambos grupos (con y sin inflamación) con respecto a las características demográficas, parámetros bioquímicos, y niveles de citocinas medidos se muestran en la tabla 4.

Existió diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en lo que concierne a la Cr y TFGe por las diferentes fórmulas. Como se puede apreciar en la tabla 2, no existieron interacciones estadísticamente significativas entre el nivel de interleucinas y más de un factor (como lo indica la  $p > 0.2$ ) por lo que no se procedió con el análisis multivariado. Cambios estadísticamente significativos para todas las variables se aprecian en la tabla 4.

	<b>BIOPSIA SIN INFLAMACIÓN</b>	<b>BIOPSIA CON INFLAMACIÓN</b>	<b>Valor de p</b>
<b>GENERO</b>			
Masculino	20(40%)	14(28%)	<b>0.026*</b>
Femenino	4(8%)	12(25%)	
Edad	30.58 ± 9.82	32.81 ± 10.19	0.436
Peso	65.10 ± 13.04	64.73 ± 14.81	0.927
Altura	1.62 ± 0.852	1.59 ± 0.11	0.313
IMC	24.54 ± 3.61	2.23 ± 2.08	0.476
<b>TIPO TRASPLANTE</b>			
TRDV	18(36%)	21(42%)	0.623
TRDF	6(12%)	5(10%)	
<b>TIEMPO DESDE EL TRASPLANTE</b>			
<b>INDUCCION</b>	16.83 ± 10.44	23.65 ± 12.10	<b>0.038*</b>
Basiliximab	17(34%)	20(40%)	0.624
Timoglobulina	7(14%)	6(12%)	
<b>TIPO INMUNOSUPRESION</b>			
CMP	7(14%)	8(16%)	0.610
TMP	17(34%)	17(34%)	
SMP	0(0%)	1(2%)	
<b>NIVELES INMUNOSUPRESION</b>			
normal	11(22%)	10(20%)	0.835
bajo	10(20%)	13(26%)	
alto	3(6%)	3(6%)	
<b>EGO</b>			
con proteinuria	19(38%)	17(34%)	0.278
sin	5(10%)	9(18%)	
Creatinina (mg/dl)	1.34 ± 0.33	2.23 ± 2.08	<b>0.040*</b>
BUN (mg/dl)	16.25 ± 9.20	26.37 ± 22.83	<b>0.045*</b>
Urea (mg/dl)	41.70 ± 22.47	60.98 ± 46.85	<b>0.073</b>
Albumina (g/L)	4.41 ± 0.28	4.10 ± 0.34	<b>0.001*</b>
MDRD (ml/min/1.73 m2)	62.85 ± 18.83	48.27 ± 23.58	<b>0.019*</b>
CKD- EPI (ml/min/1.73 m2)	72.84 ± 19.88	59.23 ± 30.77	0.068
NANKIVELL (ml/min/1.73 m2)	64.15 ± 17.42	53.45 ± 23.49	0.073
<b>NIVELES INTERLEUCINAS</b>			
IL 10(pg/ml)	0.79 ± 0.27	0.73 ± 0.28	0.435
INT γ (pg/ml)	0.82 ± 0.17	0.79 ± 0.24	0.610

**Tabla 4. Comparación de las Variables de acuerdo a la presencia o no de inflamación por Biopsia. \* p < 0.05.**

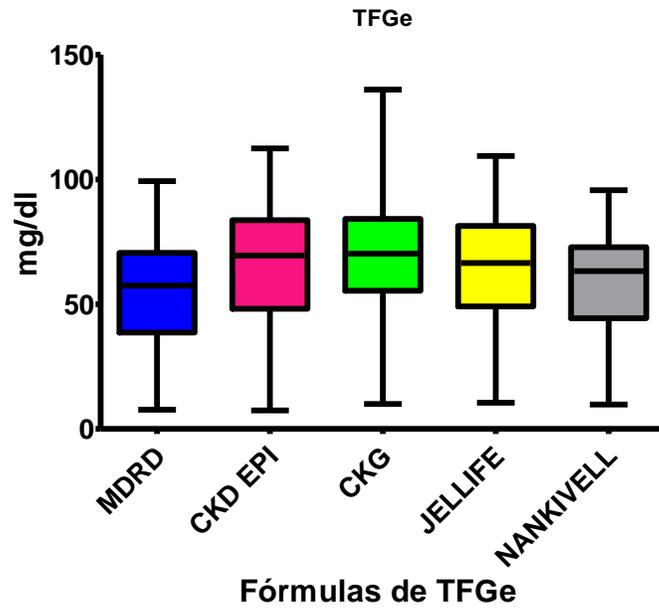


Fig. 15 TFGe por las diferentes fórmulas en los 50 pacientes (con y sin inflamación)

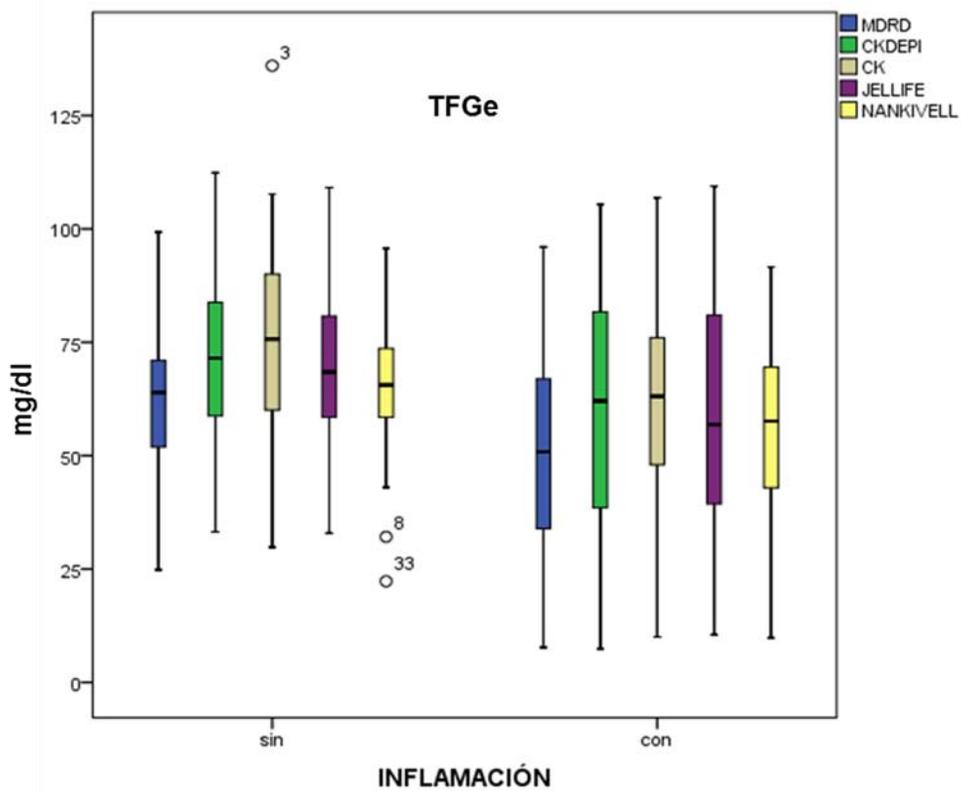
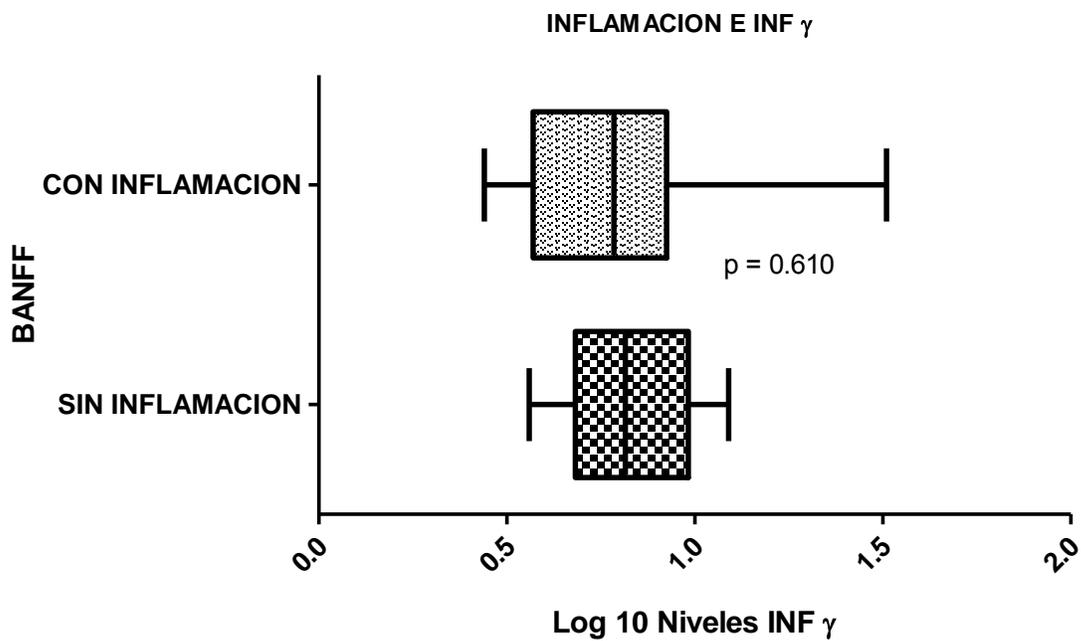
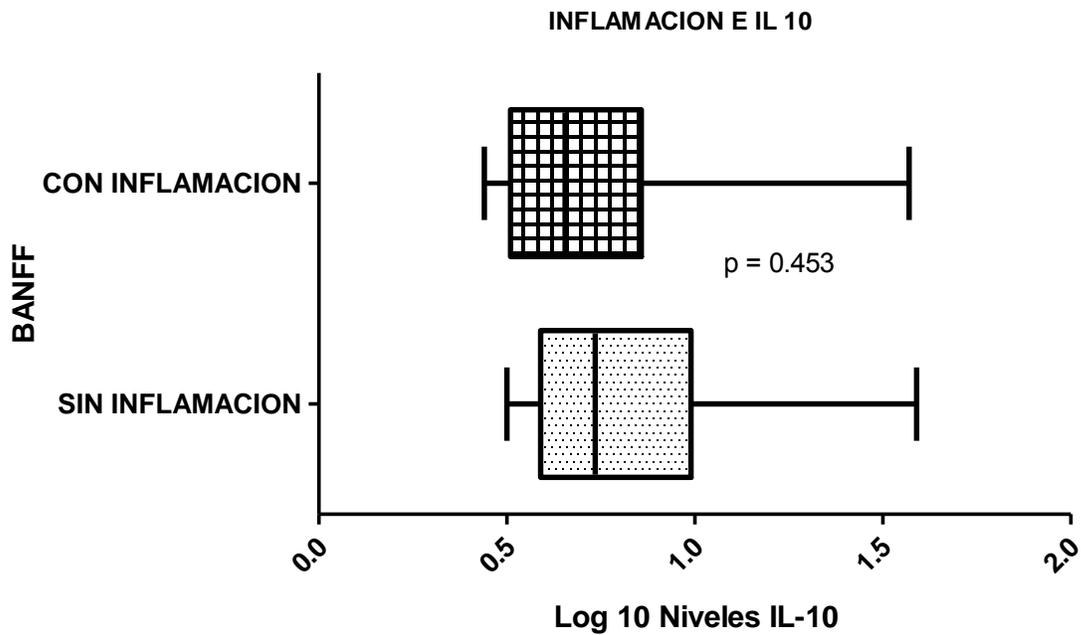
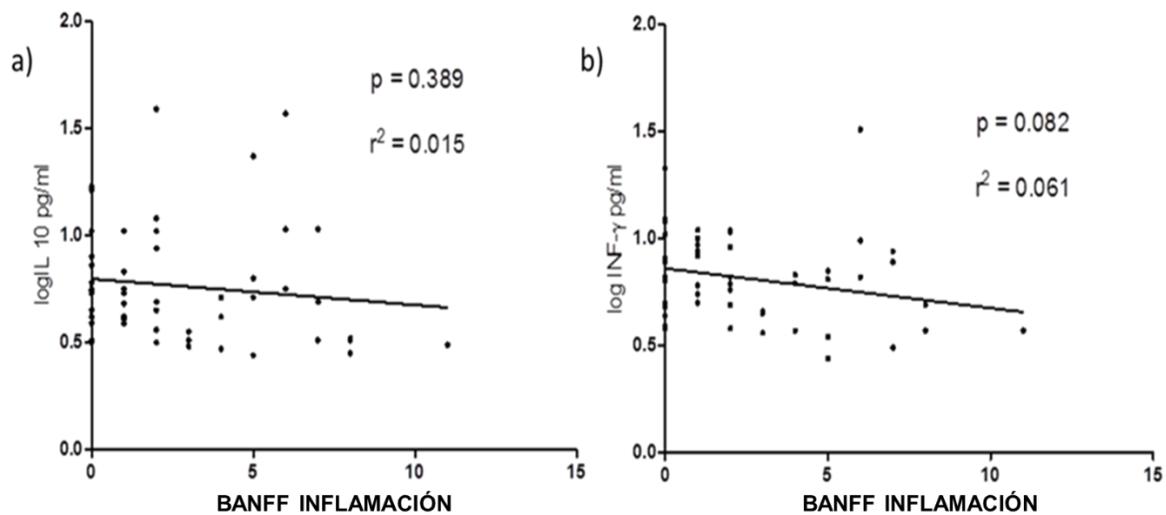


Fig. 16 Tasa de Filtrado Glomerular Estimada (TFGe) según las diferentes fórmulas en los 2 grupos con y sin inflamación.



**Fig. 17 Niveles de a) IL-10 y b) INF  $\gamma$  según la presencia o no de inflamación. Se tomó como significativa  $p < 0.05$ .**



**Fig. 18 Regresión lineal. a) Niveles Log IL 10 vs Puntaje de Inflamación por BANFF. b) Niveles Log INF  $\gamma$  vs Puntaje de Inflamación por BANFF.**

## DISCUSIÓN:

Estudios previos demostraron por primera vez la aplicabilidad diagnóstica del IFN- $\gamma$  en orina para la detección de inflamación del injerto, mostrando que los niveles urinarios correlacionan con la severidad de la tubulitis subclínica en 2 cohortes independientes de pacientes. [31, 32] Fig. 16, 17, 18

Una limitación de estos estudios es que se incluyeron un grupo muy selecto de pacientes por lo que el nivel de corte de los niveles urinarios de INF- $\gamma$  y la proteína CXCL10 para predecir la inflamación clínica /subclínica no está bien establecido. [32,33]

La sensibilidad y especificidad es baja en algunos artículos previos, [32,33] dando un nivel de corte de 1.535ng /mmol. Otros autores encontraron que niveles elevados urinarios de CXCL-10 (proteína derivada del INF- $\gamma$ ) estaban asociados con una pobre función del injerto aún en ausencia de rechazo

clínico, sugiriendo por lo tanto que esta citoquina podía ser un más allá de la biopsia renal, un marcador pronóstico, requiriéndose futuros estudios para definir su rol su papel en los cambios limítrofes. [33]

Es sabido que los niveles de CXCL 10 en orina no reflejan de manera directa inflamación vascular, lo cual corrobora con otros estudios sobre marcadores urinarios de rechazo. [33, 34]

Los resultados muestran que no hay correlación entre los niveles de IL-10 e INF- $\gamma$  con la presencia de inflamación dentro del injerto. ( $p = 0.389, 0.082$  y  $r = 0.015, 0.061$  respectivamente) Como era de esperarse, si hubo diferencia entre los 2 grupos (con inflamación y sin inflamación) con respecto a la Creatinina, BUN y Urea, ( $p = 0.40, 0.045$  y  $0.073$  respectivamente) y los pacientes con inflamación presentaron con mayor frecuencia peor función del injerto, lo cual fue además, se vio reflejado en la TFGe calculada por MDRD ( $p = 0.019$ ) no por CKD-EPI ( $p = 0.068$ ) y Nankivell ( $p = 0.073$ ) en las cuales no alcanzó significancia estadística. Fig. 15, 16, 17

Además el tiempo pos trasplante fue estadísticamente significativo en aquellos que desarrollaron inflamación vs aquellos que no la presentaron, quizá debido a que se requiere un mayor tiempo pos trasplante para que se perpetúe esta de manera crónica en el injerto.

Al tratar de subdividir en grupos aquellos que presentaron rechazo activo y los que no, tanto humoral como celular, no existió diferencias significativas con respecto a estas interleucinas. (IL10  $p = 0.95$ , INF- $\gamma$   $p = 0.1$ ) aun que se ha sugerido que el incremento en IL-10, la “citocina anti-inflamatoria”, afecta de manera positiva la sobrevida del injerto. [34,35] Los resultados sugieren que unos niveles bajos de IL-10 e INF- $\gamma$  podrían funcionar de mayor manera como un indicador de la polarización hacia la respuesta y citoquinas anti-inflamatorias y la actividad reguladora de células B, más que la expresión aislada de IL-10.

Esto podría ayudar a explicar las inconsistencias entre los primeros artículos reportados referentes a estas moléculas. [36] Este trabajo ofrece nuevas pistas tanto para el mecanismo de hipo-reactividad donador-específica como para la descripción de la utilidad potencial de utilizar estas citosinas como una importante herramienta inmunológica de monitoreo.

Cabe destacar que los niveles y el tipo de esquema de inmunosupresión no influyen la presencia o ausencia de inflamación, quizá porque en la mayoría de los pacientes la determinación de los niveles de inhibidor de calcineurinas (ICN) se encontró en rangos normales o altos.

Por lo que se requeriría de un estudio más grande multicéntrico de estas 2 citoquinas para confirmar y amplificar estos importantes hallazgos preliminares.

Los niveles urinarios de IL-10 e IFN- $\gamma$  no estuvieron correlacionados con el diagnóstico de Fibrosis Intersticial / Atrofia Tubular (Nefropatía crónica del injerto) como con la presencia de rechazo activo o infección como sugieren otros estudios. [37]

## **CONCLUSIONES:**

El presente trabajo de investigación demuestra que en los pacientes pos trasplantados renales con una función renal estable (expresada por medio de la Tasa de filtrado Glomerular) se puede apreciar la supresión en muchos de ellos, de los parámetros inmunológicos como niveles elevados en orina de IL-10 e IFN- $\gamma$ , contribuyendo al estado de inmunosupresión y mantenimiento de la aceptación del injerto.

Por lo tanto se concluye que la medición de estas citoquina en orina puede utilizarse como un marcador del estado de inmunosupresión en el seguimiento y monitoreo de los pacientes al año pos trasplante renal.

**REFERENCIAS:**

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 7ma, Madrid 2012, Interamericana: 501- 4.
2. Fietta P, Costa E, Delsante G. Interleukins (ILs), a fascinating family of cytokines. Part I: ILs from IL-1 to IL-19. *Theor Biol Forum* 2014; 107(1-2):13-45.
3. Halloran PF1. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351(26):2715-29.
4. Benson M, Jodal U, Agace W, et al. Interleukin IL-6 and IL-8 in children with febril urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria. *J Infect Dis* 1996; 174:1080-4.
5. Otto G, Braconier J, Andreasson A, Svanborg C. Interleukin-6 and disease severity in patients with bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. *J Infect Dis* 1999; 179: 172-9.
6. Wada T, Yokoyama H. Detection of urinary interleukin 8 in glomerular diseases. *Kidney Int* 1994; 46: 455-60.
7. Should IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-2 be considered predictive biomarkers of acute rejection in liver and kidney transplant? Results of a multicentric study. Millán O, Valdivia R, Segundo S, et al. *Clin Immunol* 2014 Oct;154(2):141-5
8. Lee DW1, Faubel S, Edelstein CL. 4. Cytokines in acute kidney injury (AKI). *Clin Nephrol* 2011; 76(3):165-73.
9. Smith SD, Wheeler MA, Lorber MI, Weiss RM. Temporal changes of cytokines and nitric oxide products in urine from renal transplant patients. *Kidney Int* 2000; 58: 829-37.
10. Adhya Z1, Borozdenkova S, Karim MY. The role of cytokines as biomarkers in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(10):3273-80.
11. Stasikowska O1, Wagrowska-Danilewicz M. Chemokines and chemokine receptors in glomerulonephritis and renal allograft rejection. *Med Sci Monit* 2007; 13(2):31-6.

12. Trostel J, Garcia GE. Endogenous Inhibitors of Kidney Inflammation. *J Nephrol Res* 2015; 1(2):61-8.
13. Jimenez R, Ramirez R, Carracedo J, et al. Cytometric bead array (CBA) for the measurement of cytokines in urine and plasma of patients undergoing renal rejection. *Cytokine* 2005;32: 45-0
14. Kassir K, Vargas-Shiraishi O, Zaldivar F, Berman M, Singh J, Arrieta A. Cytokine profiles of pediatric patients treated with antibiotics for pyelonephritis: potential therapeutic impact. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:1060-63.
15. Schaub S, Nickerson P, Rush D, et al. Urinary CXCL9 and CXCL10 levels correlate with the extent of subclinical tubulitis. *Am J Transplant* 2009; 9: 1347–53.
16. Jackson JA, Kim EJ, Begley B, et al. Urinary Chemokines CXCL and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. *Am J Transplant* 2011; 11: 2228–34.
17. Ho J, Rush DN, Karpinski M, et al. Validation of Urinary CXCL10 as a marker of borderline, subclinical, and clinical tubulitis. *Transplant* 2011; 92: 878–82.
18. Oliveira G, Xavier P, Murphy B, Neto S, Mendes A, Sayegh MH, et al. Cytokine analysis of human renal allograft aspiration biopsy cultures supernatants predicts acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(2):417-22
19. Tatapudi R, Muthukumar T, Dadhania D, et al. Noninvasive detection of renal allograft inflammation by measurements of mRNA for IP-10 and CXCR3 in urine. *Kidney Int* 2004; 65(6):2390-97.
20. Corrales-Tellez E1, Vu D, Shah T, Hutchinson I, Min DI. Association between granzyme B and perforin I polymorphisms and allograft outcomes in Hispanic kidney transplant recipients. *Clin Transplant* 2013; 27(3): E308-15.

21. Hu H, Aizenstein BD, Puchalski A, Burmania JA, Hamawy M, M Knechtle SJ. Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J Transplant* 2004; 4: 432–37.
22. García-García G, Gutiérrez-Padilla AJ, Chávez-Iñiguez J, et al. Identifying undetected cases of chronic kidney disease in Mexico. Targeting high-risk populations. *Arch Med Res*. 2013 Nov;44(8):623-27.
23. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant* 2011; 11:2093-109.
24. Williams WW, Taheri D, Tolkoff-Rubin N, Colvin RB. Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8:110-21.
25. Meier-Kriesche HU, Schold JD and Kaplan B: Long-term renal allograft survival: Have we made a significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004; 4:1289-95.
26. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, Cosio FG: Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009; 9:527-35.
27. Rush DN, Nickerson P, Gough J, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:2129–34.
28. Buchmann TN, Wolff T, Bachmann A, et al. Repeat true surveillance biopsies in kidney transplantation. *Transplant* 2012; 93:908–13.
29. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006; 6(9):2006–12.
30. Loupy A, Vernerey D, Tinel C, et al. Subclinical Rejection Phenotypes at 1 Year Post-Transplant and Outcome of Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(7):1721-31
31. Langone AJ, Chuang P. The management of the failed renal allograft: an enigma with potential consequences. *Semin Dial* 2005;18(3):185-87.

32. Hu H, Kwun J, Aizenstein BD, Knechtle SJ. Noninvasive detection of acute and chronic injuries in human renal transplant by elevation of multiple cytokines/chemokines in urine. *Transplant* 2009; 87: 1814–20.
33. Hirt-Minkowski, Amicoa, J. Hob, C, et al. Urinary CXCL10 and Allograft Inflammation. *Am J Transplant* 2012; 12: 1811–23.
34. Zhang Q1, Liu YF1, Su ZX2, Shi LP1, Chen YH1. Serum fractalkine and interferon-gamma inducible protein-10 concentrations are early detection markers for acute renal allograft rejection. *Transplant Proc* 2014; 46(5):1420-25.
35. J. Lo Denise, Kaplan Bruce, D. Kirk1 Allan. Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nat Rev Nephrol* 2014;10,215–25
36. Suthanthiran Manikkam, Schwartz Joseph E, Ding Ruchuang. Urinary-Cell mRNA Profile and Acute Cellular Rejection in Kidney Allografts. *N Engl J Med* 2013; 369:20-11.
37. Jin ZK, Xu CX, Tian PX, et al. Immune monitoring in kidney transplant recipients could predict acute rejection by a new method: flow cytometric microcarrier assay. *Transplant Proc.* 2013;45(4):1508-10

## ANEXO 1

**PLAN DE TRABAJO**

**ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES ELEVADOS EN ORINA DE INTERLEUCINA 10 E  
INTERFERON  $\gamma$  CON LA PRESENCIA DE RECHAZO ACTIVO EN PACIENTES  
TRASPLANTADOS RENALES**

	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>FECHA</b>	<b>LUGAR</b>
1	Sesiones académicas	12 Febrero al 30 Mayo 2014	HGM
2	Presentación de protocolo	22 Abril 2014	HGM
3	Revisión por el comité	7 Mayo 2014	HGM
1	Selección de pacientes	1 de Mayo 2014 al 31 Diciembre 2015	HGM depto. Trasplantes
2	Captura de Datos	1de Julio 2014 al 31 Diciembre 2015	HGM depto. Trasplantes
3	Toma de muestras en orina y almacenamiento	1de Julio 2014 al 31 Diciembre 2015	Laboratorio Inmunología UME, UNAM-HGM
4	Realización de biopsias de los injertos	1 de Julio 2014 al 31 Diciembre 2015	HGM depto. Trasplantes
5	Determinación de IL-10 e IP-10 en en muestras orina	30 de Julio 2014 al 31 Diciembre 2015	Laboratorio Inmunología UME, UNAM-HGM
6	Clasificación de las biopsias de acuerdo BANFF.	1de Julio 2014 al 31 Diciembre 2015	HGM depto. anatomía patológica
7	Recolección y análisis de resultados	al 30 Diciembre 2015	HGM depto. Trasplantes

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL  
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**  
**Título del protocolo: ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES ELEVADOS EN ORINA DE  
INTERLEUCINA 10 E INF- $\gamma$  CON LA PRESENCIA DE RECHAZO ACTIVO EN  
PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES**

Investigador principal: Dr. Luis García Covarrubias

Sede donde se realizará el estudio: Servicio de Trasplantes Unidad 304b

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Este estudio corresponde a una investigación sin riesgos. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

Una de las principales causas por las que deja de funcionar adecuadamente un trasplante de riñón es el rechazo, y desafortunadamente cuando el médico se da cuenta del mismo ya hay cierto daño al riñón, por lo que la idea es encontrar una herramienta que nos permita detectar que está sucediendo un rechazo antes de que se dañe el injerto. No hay estudios en México donde se midan estas moléculas en la orina, y saldría a largo plazo menos costoso y más fácil.

Este Estudio tiene como objetivos: demostrar la utilidad de la medición de estas moléculas en orina y diagnosticar el rechazo antes de que ocurra daño al riñón.

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha observado que las moléculas de IL-10 e INF- $\gamma$  se encuentran en concentraciones más altas de lo normal en pacientes con daño al riñón, especialmente en caso de rechazo. Así, con este estudio se tratará de observar si usted está en riesgo de presentar un rechazo antes de que haya daño al riñón. Esta investigación permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido de la medición de estas moléculas en orina y tratar de lograr una mayor vida útil del riñón.

En caso de aceptar participar en el estudio se obtendrá información de su expediente clínico, además se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos, y se le tomará una muestra de orina (5 ml) antes de la realización de la biopsia llevada a cabo como parte de su consulta de seguimiento al cumplir por lo menos 12 meses de que fue trasplantado.

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria, no habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.

## HOJA 2 DE 2

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL  
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**  
**Título del protocolo: ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES ELEVADOS EN ORINA DE  
INTERLEUCINA 10 E INF-  $\gamma$  CON LA PRESENCIA DE RECHAZO ACTIVO EN  
PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES**

Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio, ni recibirá pago por su participación, además en el transcurso del estudio usted podrá solicitar información sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y Ética del Hospital General de México, en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio o dese retirarse del mismo, puede comunicarse las 24hrs los 365 días a través de:

Dra. Estela García Elvira, presidente de la Comisión de Ética. Teléfono 27892000 ext. 1330

Dr. Luis García Covarrubias. Celular: 044 5520831684.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del Paciente

\_\_\_\_\_  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del 1er Testigo

\_\_\_\_\_  
Lugar y Fecha

\_\_\_\_\_  
Parentesco

\_\_\_\_\_  
Dirección

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del 1er Testigo

\_\_\_\_\_  
Lugar y Fecha

\_\_\_\_\_  
Parentesco

\_\_\_\_\_  
Dirección

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ La naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del Investigador Principal (Dr. Luis García Covarrubias)