



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

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

**Adición de la prueba kSORT: perfil genético de transcripción en sangre
periférica, para el seguimiento de pacientes postrasplante renal.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ MANUEL ARREOLA GUERRA

TUTOR DE TESIS:

DRA. JOSEFINA ALBERÚ GOMEZ

Departamento de Trasplantes

CO-TUTOR:

DRA. NORMA ANGELICA BOBADILLA SANDOVAL

DR. LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO

Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral

Ciudad de México. Junio

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I. Resumen

Antecedentes: El rechazo agudo es la primera causa de pérdida del injerto posttrasplante renal (TR). Actualmente la vigilancia es basada en métodos poco sensibles y específicos como lo son la creatinina sérica y examen general de orina, mientras que el estándar de referencia es la biopsia renal, la cual tiene limitaciones dado que es un estudio invasivo que no puede ser realizado de forma rutinaria. La detección de microarreglos en sangre periférica mediante el ensayo kSORT (Kidney Solid Organ Rejection Test) ha demostrado predecir con una alta sensibilidad y especificidad la presencia de RA en el seguimiento pos TR. El objetivo del presente estudio es evaluar la eficacia y seguridad del empleo del ensayo kSORT para ajustar la inmunosupresión en el seguimiento de los primeros dos años postrasplante renal.

Metodología: Ensayo clínico controlado y sorteado, simple ciego, de pacientes receptores de trasplante renal. El grupo de intervención se realizó la vigilancia habitual aunada a la determinación del ensayo kSORT en los días 14, 45, mes 3, 6, 12, 18 y 24. En caso de ser positivo se realizó biopsia de injerto con el primer ensayo positivo. El grupo control recibió únicamente vigilancia habitual. Ambos grupos se realizaron biopsia por protocolo al mes 3 y 12 post TR. Los desenlaces principales se determinaron como: incidencia y gravedad de RA, función renal estimada mediante fórmula CKD-EPI e índice de fibrosis en biopsia por protocolo del mes 12. **Resultados:** Fueron incluidos 70 pacientes con una edad promedio de 36.5 años (min-max 19 – 74), con una muy similar proporción entre hombres y mujeres (H:M 37:33). El 52.8 % tenía antecedente de ERC de causa desconocida y solo el 12.8 % con Diabetes Mellitus. El 51.4 % (n= 36) recibieron un TR de donador cadavérico y el resto de donador vivo. Cuatro pacientes presentaron pérdida primaria del injerto y dos pacientes no continuaron seguimiento en la institución. De los 64 pacientes el 89.1 % presentó al menos un ensayo kSORT positivo. A dos años de seguimiento la incidencia de RA no fue diferente entre los grupos 34.3 vs 19.3, $p = 0.17$ ni en el subtipo histológico (RA celular: 15.6 % vs 6.4 % $p = 0.42$ RA humoral: 15.6 % vs 9.6 % $p = 0.71$). El índice de cronicidad de igual forma no fue distinto entre los grupos a los 12 meses (15.6 % vs 13.6 % $p = 0.19$). En cuanto la

TFG a partir del sexto mes se presentó una disminución significativa en comparación al grupo control (Sexto mes: 60.6 vs 73.2, $p = 0.03$ y mes 24: 52.8 vs 71.9 $p < 0.01$). La sensibilidad y especificidad del ensayo kSORT en el presente estudio fue 27.7 % (IC 95%, 4.3 – 51.2) y especificidad de 65.4 % (55.9 – 74.9).

Conclusiones: El agregar el ensayo kSORT no mejora la vigilancia habitual en los primeros dos años postrasplante renal.

II. Antecedentes

El trasplante renal (TR) es el tratamiento de elección para los enfermos que cursan con falla renal crónica con requerimientos de sustitución de la función, en los cuales no exista alguna contraindicación absoluta para el procedimiento¹. La evidencia acumulada demuestra las ventajas en calidad de vida y en años de supervivencia de los pacientes que reciben trasplante comparados con aquellos que permanecen en diálisis, independientemente del tipo de terapia dialítica, edad, etnia o padecimiento renal de base^{1,2}. Las cifras actuales reportadas en EEUU de supervivencia al primer año postrasplante para injerto y paciente en receptores de TR, ascienden a 95% y 90% para receptores de donante vivo (DV) y fallecido (DF), respectivamente³; la vida media calculada de estos injertos también ha incrementado progresivamente y en la actualidad se sitúa alrededor de 14 y 11 años para DV y DF, respectivamente⁴. Es ampliamente conocido que la supervivencia del injerto obedece a múltiples factores de orden inmunológico y no-inmunológico, sin embargo, la principal causa de pérdida de injerto se encuentra firmemente vinculada a rechazo, con evidencia de participación del brazo humoral de la respuesta inmune en la mayoría de los casos (anticuerpos específicos contra antígenos HLA).⁵

La principal causa de *disfunción aguda del injerto* es el rechazo agudo (RA). Diversos estudios han asociado los episodios de esta entidad con daño crónico estructural y funcional posterior.^{6,7} De esta forma, la certeza y el diagnóstico a tiempo de RA son indispensables para optimizar la terapia inmunosupresora y preservar la función del injerto. Hasta la actualidad, la única herramienta que permite

la confirmación de RA es la biopsia del injerto y los criterios histológicos diagnósticos para esta entidad han sido establecidos⁸. Sin embargo, esta herramienta de diagnóstico, además de ser invasiva, tiene otras limitaciones como errores de muestreo y alto costo, principalmente. Adicionalmente, alrededor del 10% de los pacientes con *función normal del injerto* tienen evidencia de RA en *biopsias de protocolo*, de manera que los centros que no utilizan esta modalidad de seguimiento para los receptores de trasplante renal (RTR) no tienen oportunidad de documentar el fenómeno inmunológico. Idealmente, una herramienta diagnóstica, no invasiva, para RA resultaría de extrema utilidad en el seguimiento de los pacientes RTR en virtud de que reduciría la necesidad de biopsias del injerto y permitiría adecuar el manejo inmunosupresor de manera eficiente.⁹ Así, la aplicación seriada de un ensayo con alta especificidad y sensibilidad para RA permitiría la detección del fenómeno inmunológico de manera más temprana comparado con el estándar actual (biopsia). Adicionalmente, el empleo seriado de una herramienta de estas características permitiría estratificar el riesgo inmunológico y un manejo pro-activo de la dosificación de medicamentos inmunosupresores, con el potencial de limitar el daño crónico, estabilizar la función del injerto y mejorar la supervivencia del mismo.

Los antecedentes del estudio que se propone tienen como fundamento una extensa línea de investigación conducida por la Dra. Sarwal et al. Recientemente¹⁰ han publicado los resultados obtenidos con la monitorización de pacientes RTR pediátrico. Biomarcadores de paneles de genes en sangre periférica fueron descubiertos por microarreglos en una sola institución y subsecuentemente fueron validados mediante PCR-cuantitativo en 12 programas de TR pediátrico. El modelo de 5 genes tiene sensibilidad de 91%, especificidad de 94%, valor predictivo positivo de 83%, valor predictivo negativo de 97% y una precisión del 92%, para identificar RA. De manera interesante, 8/12 muestras de pacientes con rechazo “Limítrofe” ó “borderline” en las biopsias fueron clasificados como rechazo agudo mediante el modelo de 5 genes.¹⁰

El mismo grupo de investigadores se dieron a la tarea de conducir un estudio numeroso, para identificar un perfil de transcripción que unificara a la población de RTR independientemente de la edad, causa de enfermedad renal terminal, comorbilidades, tipo de inmunosupresión (IS) utilizada en diferentes centros, de USA, México y Europa. La selección final de 17 genes consistentes en un grupo de 10 genes de población pediátrica y de 7 nuevos genes identificados permitieron la clasificación molecular de RA en pacientes adultos y pediátricos. A partir de estos antecedentes se generó un score el cual utiliza 14 de los 17 genes y mediante correlación de Pearson da un puntaje a cada gen detectado y lo compara con el perfil genético detectado en los pacientes con y sin rechazo, asignando un número de +1 o -1. El score tiene un puntaje de -13 a +13. Entre los pacientes en los que la prueba predijo “alto riesgo de rechazo” (Rechazo agudo Risk-Score ≥ 7), 90.24% fueron clasificados correctamente como RA, mientras que en pacientes en los cuales la prueba predijo tener “riesgo muy bajo de RA” (RA Risk-Score ≤ -7) 97.7% fueron clasificados correctamente como no-rechazo agudo basados en los hallazgos de las biopsias. Este modelo detectó por igual tanto rechazos agudos mediados por anticuerpos como aquellos mediados por células con una elevada probabilidad de predicción. La predicción de RA fue independiente del tiempo postrasplante. Estos 17 genes están incluidos en el ensayo kSORT (Kidney Solid Organ Rejection Test) y el algoritmo a partir de cual se genera el score de riesgo es llamado kSORT analysis suit (kSAS).¹¹

En un estudio recientemente publicado¹² con datos procedentes de nuestro Instituto, en el cuál se revisaron los resultados de las biopsias efectuadas por *disfunción* durante la evolución postrasplante de RTR de Enero de 2007 a diciembre de 2011 (n=223), se observó una incidencia de RA durante el primer año postrasplante de 11.8% en RTR de donante vivo y de 17.4% para los receptores de injerto de donante fallecido. A partir del mes de Mayo de 2013, fecha desde la cual se realiza biopsia de protocolo del 3er mes, se ha documentado una incidencia de RA *sub-clínico*, incluyendo rechazos limítrofes y mayores, de acuerdo a clasificación de Banff, de

52%. Esta cifra no tiene precedentes en el Instituto porque previamente no se efectuaba biopsia *de protocolo* del 3er mes.

El objetivo del presente estudio es evaluar la seguridad y eficacia de la adición de la prueba kSORT para guiar la intensidad de IS en el seguimiento de los pacientes RTT. La hipótesis planteada es que la adición del panel genético kSORT al seguimiento postrasplante renal, permitirá una mejor vigilancia del riesgo de RA lo que permitirá ajustar la IS acorde a este riesgo, disminuirá la incidencia y gravedad de RA lo que consecuentemente mejorará los índices de cronicidad en biopsia protocolizada del año y mejorará la tasa de filtrado glomerular calculada a uno y dos años de seguimiento.

III. Metodología:

Se trata de un ensayo clínico controlado, simple ciego, sorteado, para evaluar la adición de la prueba kSORT como guía para ajustar la IS durante la vigilancia clínica en el primer y segundo año postrasplante renal. El grupo control se vigilará mediante el método institucional estándar con dosis de IS estándar. (Figura 1)

A los pacientes ingresados al estudio se les determinó la prueba kSORT con la siguiente temporalidad: día 0, 14, 45, 90, 180, 365, 540 y 730 días además cuando exista disfunción del injerto. Fueron sometidos a biopsia del injerto renal ya sea por disfunción sin explicación evidente (aumento de la creatinina sérica >25% respecto de la basal ó 0.5 mg/mL por arriba de la creatinina sérica basal) o bien por protocolo en los meses 3 y 12. (Figura 2)

La aleatorización fue estratificada según su riesgo inmunológico (alto y bajo), definiendo alto riesgo como PRA >30%, segundo trasplante o presencia de anticuerpos donante específico pre-trasplante. De esta manera los pacientes quedaron asignados a dos grupos: 1) Grupo con seguimiento habitual. 2) Grupo donde el nivel de IS y la decisión de realizar biopsia dependía del resultado de kSORT.

a) Protocolo de inmunosupresión y seguimiento institucional

Actualmente, todos los RTR del Instituto, reciben alguna modalidad de terapia de inducción (Timoglobulina ó Basiliximab), dependiendo del riesgo inmunológico individual y la procedencia del injerto. Así, todos los pacientes RTR de DV, con un PRA <30% y sin presencia de anticuerpos HLA donante específico (ADE), reciben Basiliximab (anticuerpo monoclonal anti-IL2R; 2 dosis de 20mg c/u); la excepción son los RTR que comparten 2 haplotipos con su donante quienes no reciben inducción. Todos los receptores de injerto de donante fallecido (independientemente del % de PRA), los RTR de DV con presencia de anticuerpos HLA donante específico (independientemente del % de PRA) ó con %PRA ≥30%, reciben inducción con Timoglobulina® (preparación de anticuerpos policlonales de conejo, dosis total de 4.5mg/Kg de peso). Todos los pacientes deben contar con prueba cruzada linfocitaria (T/B) CDC-AHG negativa y aquellos con presencia de ADE (Single antigen, Luminex) deberán además tener prueba cruzada negativa por citometría de flujo.

Los eventos de RA probados por biopsia son tratados con pulsos de metilprednisolona, 3 días consecutivos. Los pacientes con rechazos agudos celulares corticorresistentes (probados por biopsia) reciben Timoglobulina® (1.5 mg/Kg/peso corporal, por espacio de 7 días). Los pacientes con eventos de RA mediados por anticuerpos (rechazos humorales) son tratados mediante 3-5 sesiones de plasmaféresis (PF), aplicación de 100 mg de Inmunoglobulina por Kg de peso corporal después de cada sesión de PF y aplicación de rituximab 500 mg (anticuerpo monoclonal anti-CD20) al término del total de la última sesión de PF.

El esquema estándar de IS de inicio y de mantenimiento es a base de Tacrolimus, Micofenolato de Mofetilo y prednisona. Las dosis de Tacrolimus iniciales persiguen alcanzar niveles valle en sangre de 10 a 15 ng/mL hasta el 3er mes pos trasplante; posteriormente, en ausencia de RA durante el 1er trimestre (clínico ó por Bx de

protocolo) los niveles valle se sitúan entre 8 y 10 ng/mL durante el primer año pos trasplante. La dosis de mantenimiento de prednisona es de 5mg diarios y la de Micofenolato de Mofetilo de 1-1.5 g diarios.

La vigilancia habitual consta de determinación de creatinina y vigilancia clínica con la frecuencia determinada por el protocolo institucional, según el tiempo pos trasplante (tres veces por semana durante el primer mes, dos veces por semana durante el segundo mes, cada semana durante el tercer mes, de forma mensual a partir del cuarto mes hasta el primer año, posteriormente cada 3 meses). Se realiza biopsia del injerto renal por disfunción (sospecha clínica de rechazo: aumento de la creatinina sérica >25% respecto de la basal o 0.3 mg/mL por arriba de la creatinina sérica basal) o bien las biopsias de protocolo habituales (mes 3 y 12). El tratamiento se prescribe al resultado de la biopsia renal.

b) Ajuste de inmunosupresión en base al ensayo kSORT

En cuanto se encuentre un resultado de la prueba kSORT consistente con RA, se incrementó las dosis de IS de mantenimiento (Niveles promedio de tacrolimus 12-15 ng/mL), Mofetil Micofenolato 1.5 gr cada 24 horas y prednisona se mantendrá en 5 mg cada 24 hrs. Se llevó a cabo biopsia del injerto renal y en caso de demostrar RA, se administró el tratamiento antirechazo mediante aplicación de una dosis de metilprednisolona de 500 mg por vía intravenosa por día, durante 3 días consecutivos. En caso de que la biopsia renal demostrara un grado de rechazo que amerite otro tratamiento (rechazo celular $\geq 1b$ o bien de tipo humoral) se administró el tratamiento estándar. En caso de que el resultado kSORT continuara siendo consistente con RA, y en ausencia de disfunción, se mantuvieron las dosis incrementadas de IS y no se realizaría nueva biopsia del injerto. En caso de que el resultado de kSORT al año de seguimiento fuera negativo, la IS se disminuiría (Niveles de tacrolimus 8 – 10 ng/ml y mofetil micofenolato 500 mg cada 12 horas).

Para este estudio, las muestras de sangre fueron enviadas a los laboratorios de “Organi” para ser analizadas con el ensayo kSORT.

En el grupo control (vigilancia habitual), la toma de muestras para la prueba kSORT fueron obtenidas en las fechas pre-establecidas para el estudio, sin embargo, el tratamiento de estos pacientes no fue supeditado a los resultados de dicha prueba; los investigadores permanecieron cegados a dicho resultado para los pacientes de este grupo control, por ende, en este grupo no se llevó a cabo maniobra alguna basada en el resultado kSORT.

La interpretación de las biopsias se realizó únicamente por un Nefropatólogo del Insitituto (local) el cual como se comentó previamente, permaneció cegado a los grupos de intervención. Únicamente los investigadores y médicos que se encargaron del seguimiento y tratamiento de los pacientes, conocieron el resultado del ensayo kSORT del grupo de intervención, mientras que permanecieron cegados del resultado en el grupo control.

c) Cálculo del tamaño de muestra:

Con base a los registros histopatológicos de biopsias protocolizadas al año de seguimiento como de las deltas de TFG entre el mes 1 y mes 12. Si deseamos encontrar al menos un 10% de diferencia en la fibrosis entre grupos utilizando fórmula para diferencia de medias, se requieren 34 pacientes por grupo. $\{ [2S^2 (Z\alpha+Z\beta)^2] \div \Delta^2 \}$ Por otra parte tomando en cuenta la desviación estándar de la TFG al año de seguimiento en los pacientes de seguimiento de los últimos cuatro años ($\pm 21.01 \text{ ml/min}$). Si se quiere encontrar al menos una diferencia en la TFG estimada de 15 ml/min, se requieren 30 pacientes por grupo. Por último, tomando en cuenta la incidencia de rechazo agudo en biopsias protocolizadas del mes 3 (52%) si deseamos disminuir al menos al 20% dicha incidencia (la cual es mayor que la reportada en otros estudios), mediante fórmula para diferencia de proporciones,

$([2PQ (Z\alpha+Z\beta)^2] \div \Delta^2)$ se requerirían 34 pacientes por grupo de tratamiento. Estos cálculos se realizaron con un riesgo alfa de 0.05 y un poder de 0.8.

Con base a estos cálculos, se determinó la necesidad de reclutar al menos 34 pacientes por grupo de estudio.

d) Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva según el nivel de medición. Para las variables categóricas se utilizó frecuencias relativas y absolutas. Para las variables continuas se evaluó la distribución de la variable mediante prueba de Kolmogorov Smirnov. Las variables de distribución normal fueron descritas con medias y desviación estandar, mientras que las variables de distribución anormal se describieron mediante medianas e intervalos intercuartilares. La comparación entre los grupos de las características generales y de los desenlaces se realizaron para variables ordinales mediante Chi^2 o prueba exacta de Fisher, según corresponda. Para variables continuas de distribución normal se utilizó prueba T de Student y para variables continuas de distribución anormal, prueba U de Mann Whitney. El valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. Se utilizó para el análisis software STATA versión 11.1 y Excel 2013.

El presente estudio fue diseñado bajo los principios de la declaración de Helsinki, aprobado por el comité de ética institucional con el número 1217. Clinical Trials identifier: NCT02581436

IV. Resultados

Fueron incluidos 70 pacientes entre junio del 2014 a diciembre del 2015. La edad promedio de los receptores de TR fue de 36.5 años (min-max 19 – 74), con una muy

similar proporción entre hombres y mujeres (H:M 37:33). El 52.8 % tenía antecedente de ERC de causa desconocida y solo el 12.8 % Diabetes Mellitus.

Siete pacientes presentaron antecedente de un trasplante previo y el 28.9 % (n=20) presentaron ADE pre trasplante. El 51.4 % (n= 36) recibieron un trasplante renal de donador cadavérico, 32.8 % (n= 23) de donador vivo relacionado y 15.7 % (n=11) de vivo no relacionado.

Treinta y cinco pacientes fueron asignados a cada grupo de intervención. Únicamente como causas de ERC el grupo de intervención presentó una menor proporción de ERC debida a glomerulonefritis (5.7 vs 25.7 %, p =0.04). El resto de las características generales fueron similares entre los grupos. (Tabla I)

Variable	Todos (n=70)	Intervención (N=35)	Control (N=35)	P
Demografía				
Rec Edad, m (DE)	36.5 (12.4)	38.4 (13.7)	34.6 (10.8)	0.19
Rec Male, n (%)	37 (52.8)	18 (51.4)	19 (54.2)	0.81
Don Edad, m (DE)	39.1 (12.1)	38.5 (12.2)	39.1 (12.1)	0.64
Don Masc, n (%)	34 (48.5)	17 (48.5)	17 (48.5)	1.0
Etiología ERC				
Desconocida, n (%)	37 (52.8)	19 (54.2)	18 (51.4)	0.81
Diabetes Mellitus, n (%)	9 (12.8)	6 (17.1)	3 (8.5)	0.28
HAS, n (%)	7 (10)	4 (11.4)	3 (8.5)	1.0
GMN, n (%)	11 (15.7)	2 (5.7)	9 (25.7)	0.04
Otras, n (%)	6 (8.5)	4 (11.4)	2 (5.7)	0.67
Terapia Sustitutiva				
Sin TS, n (%)	11 (15.7)	4 (11.4)	7 (20)	0.51
Hemodiálisis, n (%)	24 (34.2)	11 (31.4)	13 (37.1)	0.80
Dial Peritoneal, n (%)	28 (40)	15 (42.8)	13 (37.1)	0.80
Ambas, n (%)	7 (10)	5 (14.2)	2 (5.7)	0.42
Tiempo TS, med (IIC)	24 (8 – 46)	24 (9 – 48)	22 (4 – 36)	0.29
Riesgo Inmunológico				
PRA c I, med (IIC)	3 (0.5 – 8.5)	4 (1 – 8)	1.5 (0 – 9)	0.14
PRA c II, med (IIC)	2 (0 – 5)	2 (0 – 4)	1.5 (0 – 5)	0.70
ADE pre TR, n (%)	20 (28.9)	10 (29.4)	10 (28.5)	1.0
TR previo, n (%)	7 (10)	4 (11.4)	3 (8.5)	1.0
HLA MM, m (DE)	6.4 (2.7)	6.7 (2.6)	6.2 (2.8)	0.43
Trasplante				
Vivo rel, n (%)	23 (32.8)	11 (31.4)	12 (34.2)	0.79

Vivo no rel, n (%)	11 (15.7)	4 (11.4)	7 (20)	0.32
Cadáverico, n (%)	36 (51.4)	20 (57.1)	16 (45.7)	0.33
Isq cal (min), m (DE)	2.4 (1.8)	2.1 (1.5)	2.7 (2)	0.19
Isq fría (hrs), m (DE)	10.1 (9.8)	10.6 (9.5)	9.5 (10.2)	0.99
Inmunosupresión				
Timoglobulina, n (%)	44 (62.8)	24 (68.5)	20 (57.1)	0.32
Basiliximab, n (%)	22 (31.4)	10 (28.5)	12 (34.2)	0.61
Sin Inducción, n (%)	4 (5.7)	1 (2.8)	3 (8.5)	0.61
TAC prom a, m (DE)	11.2 (1.2)	11.8 (1.1)	10.7 (1.1)	<0.01
MMF prom a, m (DE)	1.2 (0.2)	1.2 (0.2)	1.1 (0.1)	0.35

Tabla I: Características generales de la población incluida y de los grupos de intervención. Rec: Receptor; Don: Donador; ERC: Enfermedad Renal Crónica; HAS: Hipertensión Arterial Sistémica; GMN: Glomerulonefritis; TS: Terapia Sustitutiva; ADE: Anticuerpo donador específico; PRA: Panel reactivo de anticuerpos; Isq: Isquemia; TAC: Tacrolimus; MMF: Acido Micofenólico; prom a: promedio anual.

a) Desenlaces

Cuatro pacientes presentaron falla primaria del injerto y dos más no continuaron seguimiento, ninguno de los cuales contaron con alguna determinación de kSORT. Treinta y dos pacientes por cada grupo de estudio continuaron su seguimiento. De los 64 pacientes incluidos el 87.5 % presentó al menos un ensayo kSORT positivo. En la toma del sexto mes se presentó una menor proporción (no significativa) de ensayos positivos en el grupo de intervención, mientras que en el mes 18 una proporción menor de pacientes del grupo control presentó el ensayo kSORT positivo (30.4 vs 4 %, $p=0.02$). (Tabla 2)

Variable	Todos (n = 64)	Intervención (n= 32)	Control (n= 32)	P
kSORT				
Día 14, n (%) (32/32)	31 (48.4)	16 (50)	45 (46.8)	0.80
Día 45, n (%) (32/32)	29 (45.3)	14 (43.7)	15 (46.8)	0.80
Mes 3, n (%) (31/32)	21 (33.3)	12 (38.7)	9 (28.1)	0.37
Mes 6, n (%) (32/32)	21 (32.8)	7 (31.8)	14 (43.7)	0.06
Mes 12, n (%) (29/31)	8 (13.3)	4 (13.7)	4 (12.9)	1.0
Mes 18, n (%) (23/24)	8 (17)	7 (30.4)	1 (4.1)	0.02
Mes 24, n (%) (23/25)	9 (22.9)	6 (26.1)	5 (20)	0.73
kSORT positivo, n (%)	57 (89.1)	30 (93.7)	27 (84.3)	0.23
Num positivos, med (IIC)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	2 (1 – 2.5)	0.89

Tabla 2. Ensayo kSORT positivo (sugerente de rechazo) por grupo de intervención.

A 63 pacientes se les realizó al menos una biopsia durante su seguimiento. El grupo de intervención presentó una mayor cantidad de biopsias realizadas comparado con el grupo control (2.9 vs 2.2, $p < 0.01$). La incidencia de rechazo agudo (no limítrofe) fue de 26.9 % a 21 meses de seguimiento. No existió diferencia entre los grupos de estudio en cuanto incidencia de rechazo agudo. El grupo de intervención presentó una mayor proporción de biopsias con alteraciones limítrofes (36 vs 22, $p=0.05$). El resto de los subtipos histológicos no fue distinto entre los grupos. Cuarenta y cinco pacientes se realizaron determinación de ADE post TR, presentando una incidencia del 36.3 %, la cual de igual forma que con el RA, no presentó diferencia entre los grupos.

La fibrosis intersticial y atrofia tubular fueron similares entre los grupos, tanto en la biopsia tiempo 0 como en la biopsia del mes 12.

La función renal (Tasa de filtrado glomerular estimada mediante fórmula CKD-EPI) presentó un mayor declive en el grupo de intervención, siendo significativamente menor a partir del mes 6 hasta el final del seguimiento.

Tipo de rechazo	Todo el grupo (n=63)	Intervención (n=32)	Control (n=31)	P
Biopsias, m (DE)	2.6 (1.1)	2.9 (0.9)	2.2 (1.1)	<0.01
- Num total, n	167	95	72	
- Normal, n	84	44	40	0.69
- Limítrofe, n	58	36	22	0.05
- RA Celular, n	7	5	2	0.25
- RA Humor, n	15	8	7	0.52
- RA Mixto, n	3	2	1	1.0
Rechazo Agudo				
Rechazo Todos, n (%)	48 (76.1)	26 (81.2)	22 (70.9)	0.33
Rec No Limítrofe, n (%)	17 (26.9)	11 (34.3)	6 (19.3)	0.17
-Limítrofe, n (%)	41 (65.1)	24 (75.0)	17 (54.8)	0.09
-RA Celular, n (%)	7 (11.1)	5 (15.6)	2 (6.4)	0.42
-RA Humoral, n (%)	8 (12.7)	5 (15.6)	3 (9.6)	0.71
-RA Mixto, n (%)	2 (3.1)	1 (3.1)	1 (3.2)	1.0
ADE de novo				
ADE de novo, n (%)	16 (36.3)	9 (42.8)	7 (30.4)	0.39
Tiempo a ADE (meses)	10.9 (4.1 – 15)	14.1 (4.4 – 16)		0.15

Med (IIC)			6.1 (0.1 – 13.3)	
Fibrosis				
Fibrosis pre-TR, m (DE)	6.5 (4.1)	6.1 (4)	6.1 (2.5)	0.31
Fibrosis post-TR, m (DE)	14.6 (10.7)	15.6 (10.7)	13.6 (10.9)	0.19
Delta, m (DE)	8.5 (10.1)	9.1 (9)	7.9 (11.3)	0.32
Función Renal				
TFG mes 1, m (DE)	69.5 (22.1)	65.9 (21.3)	73.2 (22.2)	0.18
TFG mes 3, m (DE)	66.7 (18.8)	64.1 (17.6)	69.2 (20)	0.28
TFG mes 6, m (DE)	66.9 (23.6)	60.6 (20.6)	73.2 (24.9)	0.03
TFG mes 12, m (DE)	62.4 (20.9)	55.6 (18.1)	69.2 (21.5)	<0.01
TFG mes 18, m (DE)	66.7 (19.8)	59.9 (17.7)	72.4 (20)	0.01
TFG mes 24, m (DE)	62.7 (20.4)	52.8 (17.7)	71.9 (18.7)	<0.01
Infecciones				
IVU, n (%)	37 (52.8)	35 (53.1)	18 (56.2)	0.80
Num IVU, m (DE)	0.87 (1.1)	1.03 (1.3)	0.81 (0.9)	0.82
Nefritis por BK, n (%)	4 (5.7)	2 (5.7)	2 (5.7)	1.0
Otras inf virales, n (%)	7 (10.9)	6 (18.7)	1 (3.1)	0.11
Gastroenteritis, n (%)	2 (3.1)	1 (3.1)	1 (3.1)	1.0

*45 pacientes tienen determinación de ADE post TR

Tabla 3. Desenlaces

b) Desempeño diagnóstico

De las 167 biopsias analizadas 25 (14.9 %) fueron catalogadas como rechazo agudo, 58 (34.7 %) con alteraciones limítrofes y 84 (50.2 %) sin alteraciones de importancia. De las biopsias catalogadas como RA, 7 (4.1 %) se catalogaron como rechazo celular, 15 (8.9 %) con rechazo mediado por anticuerpos y 3 (1.7 %) con rechazo mixto.

Tomando en cuenta aquellas biopsias con relación temporal con la toma de prueba kSORT (\pm 30 días entre la toma de muestra y la realización de la biopsia), se analizó el desempeño diagnóstico de 125 biopsias. La mediana de tiempo entre la biopsia y la toma de muestra kSORT fue simultánea (el mismo día) (min- max -28 días y + 28 días).

Tomando como desenlace el rechazo incluyendo las alteraciones limítrofes, la prueba kSORT presentó una sensibilidad de 30.3 % (IC 95%,17.4 – 43.2) y especificidad de 63.7 % (51.7 – 75.8). En cuanto el desempeño para la predicción de rechazo agudo (sin incluir las alteraciones limítrofes) se encontró una

sensibilidad de 27.7 % (4.3 – 51.2) y especificidad de 65.4 (55.9 – 74.9). El resto de los indicadores de desempeño diagnóstico se presentan en la Tabla IV.

<i>Desenlace</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Valor predictivo positivo</i>	<i>Valor predictivo negativo</i>
Rechazo Agudo	27.7 (4.3 – 51.2)	65.4 (55.9 – 74.9)	11.9 (0.9 – 22.8)	84.3 (75.9 – 92.7)
RA + AL	30.3 (17.4 – 43.2)	63.7 (51.7 – 75.8)	40.4 (24.4 – 56.5)	53 (41.6 – 64.3)

Tabla IV. Desempeño diagnóstico del ensayo kSORT para desenlaces de Rechazo agudo (sin incluir alteraciones limítrofes) y de RA + AL (Rechazo Agudo más alteraciones limítrofes).

V. Discusión

En el presente estudio el ensayo kSORT no demostró ser una herramienta útil en el seguimiento pos trasplante renal en nuestro medio. En el grupo de intervención a pesar de tener mayor número de biopsias de injerto comparado con el grupo control (2.9 vs 2.2, $p < 0.01$), no fue posible la detección de una mayor proporción de pacientes con rechazo agudo subclínico, ni la detección de mayor gravedad histológica en los episodios de RA ni de forma general ni en el subtipo histológico de los episodios de RA (RA celular: 15.6 % vs 6.4 % $p = 0.42$ RA humoral: 15.6 % vs 9.6 % $p = 0.71$).

De la misma forma no se encontró diferencia en los índices de fibrosis en biopsias realizadas por protocolo a los 12 meses post TR (15.6 % vs 13.6 % $p = 0.19$).

En cuanto la tasa de filtrado glomerular es de llamar la atención la disminución en el grupo de intervención, siendo significativamente menor que la observada en el grupo control a partir del mes 6 de seguimiento. Este hallazgo por sí mismo no se explica por diferencias en las características entre los grupos (Tabla 1). Aunque la exposición a tacrolimus fue mayor en el grupo de intervención, ambos grupos presentaron niveles promedio altos en el seguimiento. (11.8 vs 10.7 ng/ml, $p < 0.01$)

La ineficacia como herramienta de seguimiento del ensayo kSORT en nuestro medio radica fundamentalmente en la baja capacidad predictiva para rechazo agudo (Tabla IV) que va de la mano con una muy alta prevalencia de ensayos positivos (El

89.1 % de los pacientes presentó al menos un ensayo positivo). Este mal desempeño para la predicción de rechazo agudo contrasta con los estudios originales de validación de la prueba diagnóstica en donde la sensibilidad, especificidad y valores predictivos fueron mayores del 85 %.^{10,11} Sin embargo tanto los investigadores principales como la comunidad de trasplantes veía indispensable la validación del ensayo en estudios prospectivos y en diversas poblaciones para la adecuada interpretación y evaluación del ensayo.¹³

Recientemente fue publicado el estudio ESCAPE en el cual se evaluaba la capacidad predictiva del ensayo kSORT y de ELISPOT para la predicción de rechazo agudo en una cohorte de pacientes post TR con biopsia por protocolo a los 6 meses de seguimiento. Fueron incluidos 75 pacientes, con una incidencia de RA a los 6 meses de 29.3 %. El 20 % de los pacientes presentaron positividad para kSORT. La sensibilidad reportada fue del 63.6 % (41.2 – 86), especificidad 98.1 % (93.5 – 100), VPP 93.3 (77.3 – 100) y VPN 86.6 (77.2 – 96.1).¹⁴

De forma general la explicación de esa gran diferencia en el desempeño diagnóstico tiene dos posibles vertientes. La primera de ellas el origen racial de los pacientes incluidos. México debido al mestizaje, tiene una población muy heterogénea en cuanto HLA se refiere lo que le confiere una alta inmunogenicidad. Sin embargo se debe tomar en cuenta que en el ensayo original, fueron incluidos 23 pacientes pediátricos de un centro Mexicano (Hospital Infantil del México “Federico Gómez”). En dicho estudio ningún ensayo kSORT en pacientes del centro Mexicano fue erróneo en su clasificación de rechazo o no rechazo.¹¹

Otro importante factor a considerar es la temporalidad pos trasplante de la toma de muestra del ensayo. Durante los primeros meses post trasplante, las posibilidades de presentar eventos de RA son mayores que en el seguimiento a largo plazo. Adicionalmente la mayor prevalencia de infecciones en especial de origen viral secundario a una mayor IS, afecta la respuesta inmunológica en dicho periodo. Es muy factible que el periodo pos-trasplante inmediato y durante el primer año – como el aquí estudiado- sea un grupo distinto al analizado en el estudio original de

validación de la prueba diagnóstica. Aunque en el estudio original, se asevera que el desempeño diagnóstico es independiente al tiempo post trasplante, el grupo de adultos incluidos, únicamente el grupo de Barcelona (n=16) contribuyó con biopsias por protocolo a los 6 meses post- trasplante. Por lo tanto no existieron biopsias por protocolo en adultos antes del primer semestre pTR y las analizadas fueron únicamente por disfunción.

Una de las observaciones más importantes del presente estudios es que incluso en el grupo control en el cual no se conocía el estatus del ensayo kSORT para determinar conductas terapéuticas, la incidencia de ensayo kSORT positivo presentó su punto más alto de incidencia a los 14 días pos trasplante 46.8 % y disminuyó paulatinamente hasta el 12.9 % a los 12 meses, con una negativización espontanea en prácticamente la totalidad de los casos. Por lo tanto el verdadero significado del ensayo kSORT no queda esclarecido.

Aunque la metodología para detectar los genes involucrados en RA tiene un fundamento estadístico en conjunto con la plausibilidad biológica, es relevante mencionar que la mayoría de los genes del ensayo son de origen monocítico los cuales son fundamentales para la activación de las células T y han sido implicados en rechazo agudo.¹⁵ El periodo postraplante inmediato es característicamente el de mayor depleción de células T, debido a la utilización de inmunoglobulina anti-linfocito, mayor dosis de tacrolimus, ácido micofenólico y prednisona, aunado a otros tratamientos como el valganciclovir. El efecto de estas drogas en la inmunobiología del monocito es variado y ninguna de ellas los afecta de forma directa.^{16,17}

Durante los primeros 6 meses post trasplante la activación de monocitos CD16+ (pro-inflamatorios) se encuentra aumentada a pesar del tratamiento inmunosupresor.¹⁸ Debido al origen monocítico de los genes implicados en el ensayo kSORT y la prevalencia decreciente de kSORT positivos, pudieran estar traduciendo una elevada activación monocítica en el periodo pos trasplante temprano, la cual no se manifestaría como RA debido a todos los factores de depleción linfocítica propinadas por la IS de inducción y mantenimiento. De esta

manera una hipótesis plausible es que los genes monocíticos manifestados en la prueba kSORT son necesarios pero no suficientes para la manifestación fenotípica del RA. Sin embargo, esto representa solo una hipótesis cuya demostración requeriría un estudio metodológicamente diferente.

La principal limitación del presente estudio fue la dificultad que implicó en este periodo de tiempo aumentar la IS en el grupo de intervención. En específico el promedio de niveles de tacrolimus, esto debido a que en los primeros meses post trasplante el objetivo es mantener niveles mayores a 10 ng/ml en todos los pacientes y la tolerancia al incremento de niveles fue una limitante. De la misma forma, la tolerancia al incremento del ácido micofenólico no fue significativa entre los grupos. Sin embargo, el grupo de intervención presentó siempre niveles adecuados de tacrolimus y dosis adecuada de MMF además que en todos los casos del primer ensayo positivo kSORT, se realizó biopsia del injerto. Por lo tanto se reitera que la principal limitante para la eficacia del presente estudio fue la falta de capacidad predictiva del ensayo kSORT.

VI. Conclusiones:

El ensayo kSORT no es superior a la vigilancia habitual en los primeros dos años pos trasplante renal. Esta baja eficacia se explica debido al desempeño diagnóstico que presentó la prueba en nuestro medio.

VII. Referencias

- 1.- Suthanthiran M, Strim TB. Renal transplantation. N Engl J Med 1994; 331:365.
- 2.- Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. N Engl J Med 1999; 341:1725.
- 3.- U.S. Department of Health & Human Services. Disponible en: <http://optn.transplant.hrsa.gov> [Acceso: 14 de diciembre de 2012].

- 4.-OPTN & STRT Annual Data Report 2011. Am J Transplant 2012; 12 (Suppl 1).
- 5.-Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. Am J Transplant 2012; 12:388.
- 6.- Merier-Kriesche HU, Ojo A, Hanson J. Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era. Transplantation 2000; 70:1098.
- 7.- Pallardo LM, et al. Acute rejection and late renal trasplant failure: Risk factors and prognosis. Nephrol Dial Transplant 2004; 19:2937.
- 8.- Racusen LC. The Banff schema and differential diagnosis of allograft dysfunction. Transplant Proc 2004; 36:753-754.
- 9.- Thierry A, Thervet E, Vuiblet V, et al. Am J Transplant 2011; 11:2153.
10. Li L, Khatri P, Sigdel TK, Tran T, Ying L, et al. A peripheral blood diagnostic test for acute rejection in renal transplantation. Am J Transplant 2012; 12:2710.
- 11.- Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: Results of the multicenter AART study. PLoS Med 2015; 20: 12(2): e1001790
- 12.- Hernández-Méndez EA, Oropeza-Barrera I, Dávila-Castro JJ, Sánchez-Cedillo A, Navarro-Vargas L, et al. Incidencia de rechazo agudo en pacientes con disfunción del injerto renal. Rev Invest Clin 2013; 65: 412-9
- 13.- Abecassis M, Kaplan B. Transplantation: Biomarkers in transplantation – the devil is in the detail. Nat Rev Nephrol. 2015; 11: 204-5
- 14.- Crespo E, Roedder S, Sigdel T, Hsieh SC, Luque S, et al. Molecular and Functional Noninvasive Immune Monitoring in the ESCAPE Study for Prediction of Subclinical Renal Allograft Rejection. Transplantation. 2017; 101: 1400-1409
- 15.- T Rowshani AT, Vereyken EJ. The role of macrophage lineage cells in kidney graft rejection and survival. Transplantation. 2012; 94: 309-18
- 16.- van den Bosch TP, Kannegieter NM, Hesselink DA, Baan CC, Rowshani AT. Targeting the Monocyte-Macrophage Lineage in Solid Organ Transplantation. Front Immunol. 2017 16; 8:153

17.- Vereyken EJ, Kraaij MD, Baan CC et al. A shift towards pro-inflammatory CD16+ monocyte subsets with preserved cytokine production potential after kidney transplantation. PLoS One. 2013 Jul 29;8(7):e70152

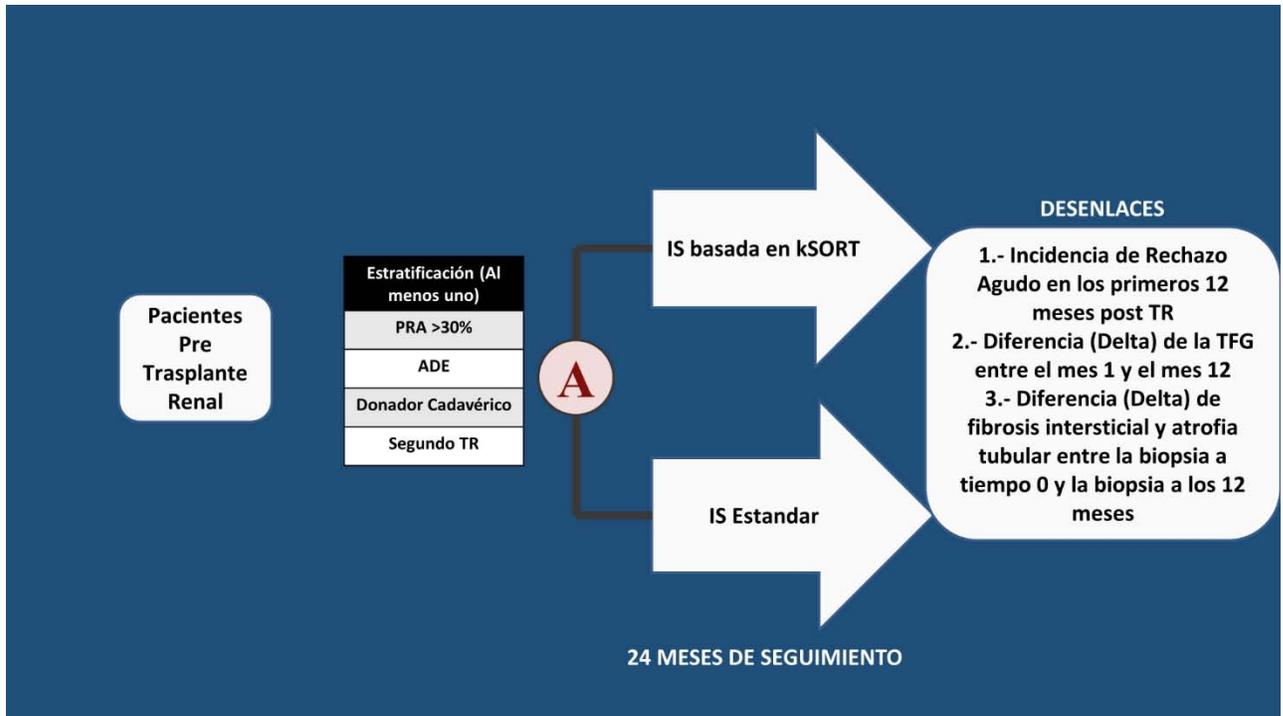


Figura 1. Diseño básico del estudio. TR: Trasplante Renal, A: Aleatorización, IS: Inmunosupresión, TFG: Tasa de Filtrado Glomerular

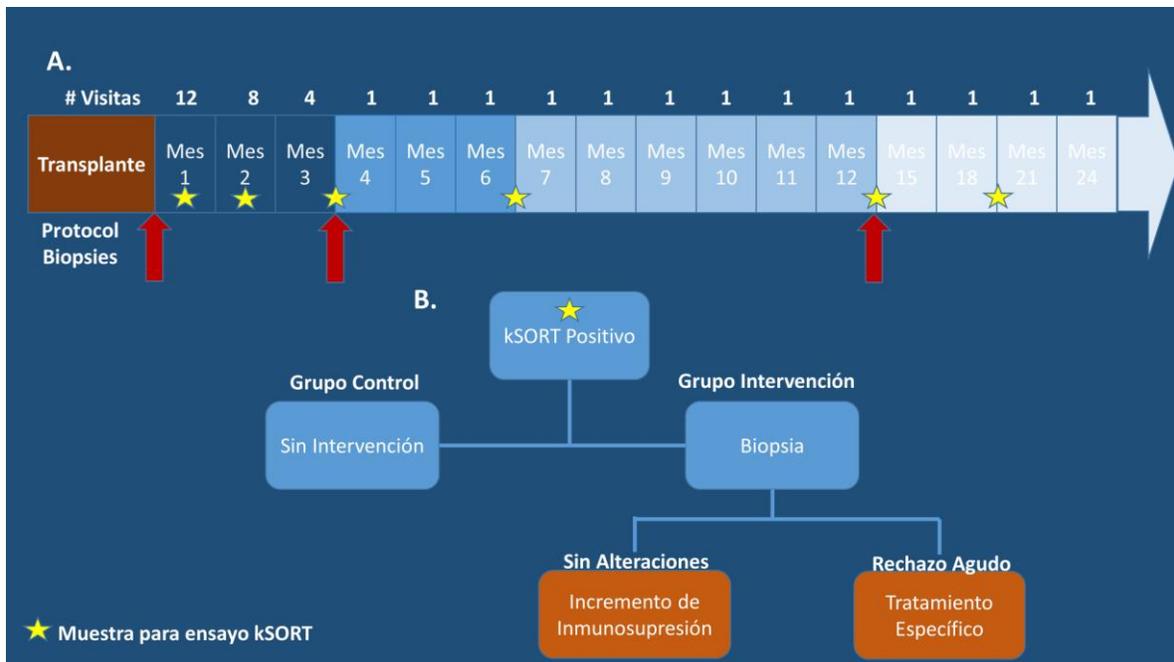


Figura 2. Protocolo de vigilancia y maniobras de pacientes incluidos. A. Número de visitas y tiempos para toma de muestra del ensayo kSORT. B. Algoritmo de decisión en base a la positividad del ensayo kSORT.