



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO DR. EDUARDO LICEAGA**

**ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CITOCINAS  
INFLAMATORIAS (mRNA) ASOCIADAS CON RECHAZO RENAL ACTIVO  
EN PACIENTES TRANSPLANTADOS**

**T É S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA:**

**DR. LUIS GARCÍA COVARRUBIAS**

**Director de Tesis:**

Dra. Gloria E. Queipo García  
Departamento de Genética  
Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga

**Comité Tutorial:**

Dr. Miguel Ángel Fonseca Sánchez  
Departamento de Genética  
Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga

Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra  
Unidad De Investigación  
Instituto De Oftalmología Fundación de Asistencia Privada  
Conde de Valenciana

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Enero 2021**



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.

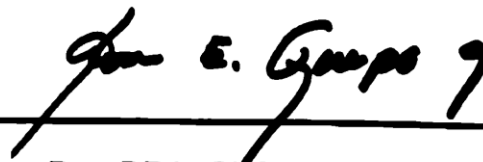
---

  
Dr. José de Jesús Rivera Sánchez  
NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE DE LA  
ENTIDAD Y/O CAMPO DISCIPLINARIO



---

ALUMNO : LUIS GARCIA COVARRUBIAS



---

Tutor: Dra. DRA. GLORIA E. QUEIPO GARCÍA  
Jefa de Servicio del Departamento de Genética

---

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
• <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
• <b>PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA</b> .....	34
• <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	38
• <b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	39
• <b>HIPÓTESIS</b> .....	39
• <b>OBJETIVOS</b> .....	39
Objetivo General.....	39
Objetivos Específicos.....	39
• <b>PACIENTES Y MÉTODOS</b> .....	40
Población de estudio.....	40
Criterios de inclusión.....	40
Criterios de exclusión.....	40
Diseño.....	40
Cálculo tamaño de muestra.....	41
• <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	42
• <b>PROCEDIMIENTOS</b> .....	42
• <b>RESULTADOS</b> .....	46
• <b>DISCUSIÓN</b> .....	55
• <b>CONCLUSIONES</b> .....	69
• <b>ASPECTOS ETICOS</b> .....	70
• <b>REFERENCIAS</b> .....	72
• <b>ANEXOS</b>	
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	89
CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	90

---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción conceptual de variables analizadas.....	45
Tabla 2. Análisis de variables categóricas. Diferencias por grupos.....	56
Tabla 3. El patrón de expresión proinflamatorio de Interleucinas en orina.....	58
Tabla 4. Niveles de Expresión de interleucinas en tejido y orina. ....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la respuesta efectora inmunológica en injerto renal.....	8
Figura 2. Mecanismos Moleculares de Activación de las células T.....	9
Figura 3. Línea del tiempo del Rechazo.....	13
Figura 4. . Mecanismos de rechazo mediado por anticuerpos.....	17
Figura 5. Fisiopatología del Rechazo .....	19
Figura 6. Predominancia de la respuesta inmunológica según IL-10 o INF- $\gamma$ .....	31
Figura 7. Diagrama de Flujo del desarrollo del Protocolo.....	44
Figura 8. Imagen representativa de la Biopsia percutánea.....	46
Figura 9. Clasificación de BANFF.....	47
Figura 10. Clasificación revisada (Banff 2013 )de rechazo mediado por anticuerpos.....	48
Figura 11. Pasos para la extracción de RNA de biopsias de tejido renal.....	49
Figura 12. Estandarización de la técnica de extracción de mRNA.....	50
Figura 13. Aislamiento y cuantificación de mRNA en tejido y orina.....	52
Figura 14. Detección de Gene específico renal.....	52
Figura 15. Categorización y obtención una n de pacientes conformada en los grupos.....	55
Figura 16. Imagen de la Detección de mRNA específico de Riñón en Orina.....	57
Figura 17. Expresión relativa de IL 8 en muestras de orina.....	59
Figura 18. Curva ROC de mRNA de IL8 en muestras de orina.....	60

## INTRODUCCION

La enfermedad renal crónica (ERC) es considerada una pandemia, principalmente en países en vías de desarrollo.<sup>1</sup> Dentro de todas las enfermedades crónicas no transmisibles, la ERC es la que tiene un mayor ascenso a lo largo del mundo.<sup>2</sup> Entre 1990 y 2017 la mortalidad global estandarizada de esta enfermedad aumento en un 41.5%, aumentando de 11.4 a 16.1 por cada 100 000 habitantes.<sup>3</sup> Así en 2016 la ERC era ya la 16ava causa de pérdida de años de vida de manera prematura en todo el mundo, y se espera que para el 2040 sea la 5ta causa<sup>4</sup>

México tiene la 6ta mortalidad más alta por ERC en el mundo.<sup>3</sup> Siendo en 2017 la segunda causa de muerte, sólo detrás de la enfermedad coronaria, teniendo en cuenta que en el 1990 representaba el 11vo lugar. Aunque nuestro país no tiene un registro nacional de ERC, se estima que en el 2017 había 14.5 millones de personas con esta enfermedad con una incidencia promedio de 392.<sup>2,3</sup> Además debemos de considerar que la Diabetes Mellitus y la Hipertensión, las 2 principales causas de ERC, tienen una alta prevalencia en México (según datos del reporte nacional de salud en 2019, el 10.3% de la población de 20 años o más tenían Diabetes y el 18.4% hipertensión).<sup>5</sup> El mismo reporte encontró además que el 75.2% de los adultos en México se encontraban en obesidad o sobrepeso, los cuales son considerados los principales factores de riesgo para estas enfermedades no transmisibles.<sup>5</sup> Se ha documentado un incremento en la mortalidad por ERC entre 1990 y 2017, siendo del 2.8% a nivel global, 33% en Latinoamérica y 102.3% en México; aunado a lo anterior, 7 estados de nuestro país se encuentran en los primeros lugares de mortalidad por esta

---

enfermedad en el mundo: Puebla (1), Tlaxcala (2), Tabasco (3), Veracruz (5), Estado de México (6), Morelos (8) y Guanajuato (10).<sup>3</sup>

Algunos autores argumentan que en la expresión fisiopatológica de la ERC, tanto en hombres como mujeres, los factores ambientales y determinantes sociales interactúan para determinar la ocurrencia, progresión y evolución de la enfermedad.<sup>6</sup>

Nuestro País tiene además pocos nefrólogos, centros de diálisis y hemodiálisis, así como pocos cirujanos de trasplantes y centros donde se realicen estos procedimientos de manera exitosa, y la mayoría de los que hay se encuentran en los principales centros urbanos siendo inaccesibles para muchos pacientes.<sup>7</sup> Un estudio reciente reportó que la mortalidad a 3 años en pacientes con ERC que requerían de terapia de sustitución renal (TSR) y que no tenían ningún tipo de seguridad social fue del 56.7%, siendo del 38.3% en aquellos que sí contaban con la misma.<sup>8</sup>

El trasplante renal, es reconocido ya como la mejor opción de tratamiento para pacientes con enfermedad renal terminal, puesto que además de mejorar la calidad de vida disminuye la mortalidad a largo plazo comparado con la diálisis y hemodiálisis.<sup>9,10</sup>

En nuestra nación con una población aproximada de 130 millones de habitantes se tiene una prevalencia de ERC estimada de 600 a 1200 pacientes por millón de habitantes, potenciales candidatos la mayoría de estos a un trasplante renal, y que es considerada una de las más altas en el mundo.<sup>11</sup> Aunado a la alta prevalencia de diabetes e hipertensión como se ha comentado, tenemos un sistema de Salud complejo y fragmentado.<sup>12</sup> En términos generales este se divide en 2 sectores, público y privado.<sup>12,13</sup> En la mayoría de los casos los pacientes sometidos a trasplante renal son aquellos que cuentan con algún tipo de seguridad social (aproximadamente el 45%); sin embargo la posibilidad de ser trasplantado para el resto (65%) es difícil y complicada,<sup>13,14</sup> lo que se evidencia con el

---

reporte del Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA), donde la tasa de trasplante es un estimado de 23 por millón de habitantes;<sup>15</sup> lo que se considera inadecuado debido al número de pacientes enlistados en espera de recibir un riñón para trasplante.<sup>15</sup>

Según CENATRA en México hay 17.089 pacientes en lista de espera para recibir un riñón en el registro del centro nacional de trasplantes (al 31 Diciembre 2019), la mayoría de ellos (60%) pertenecientes al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), seguido de la Secretaría de Salud (SSA) y Hospitales Privados, habiéndose realizado el año pasado un total de 2939 trasplantes de riñón, 2016 de Donador vivo y 923 de donador fallecido, la mayoría de estos (893) en la ciudad de México, seguido de Jalisco (398) y Guanajuato (207), correspondiendo el 56 % al IMSS, 23% a la SSA y 21% a Instituciones Privadas.<sup>16</sup>

Varios factores deben de tomarse en cuenta para parear al donador con su receptor para trasplante renal ya que el injerto actúa como un aloantígeno. En general cuando se trasplanta un tejido de un donador genéticamente diferente del receptor el aloantígeno del donador induce una respuesta inmune en el receptor contra el injerto. Esta respuesta puede destruir al injerto si no es controlada, lo que se conoce como rechazo del injerto.<sup>17,18</sup>

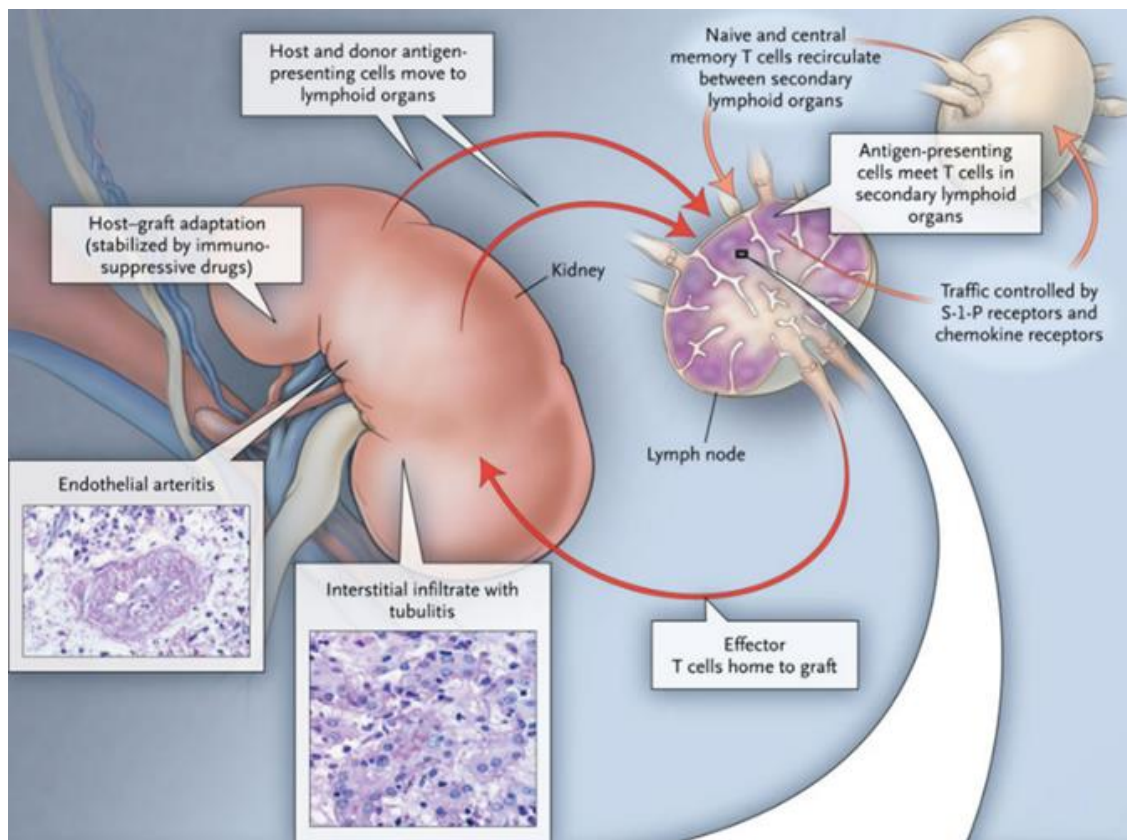
### 1.1 Inmunología Del Trasplante:

Como paso inicial, una vez realizado el trasplante hay una migración de las células activadas al Injerto; al entrar al sitio de inflamación, los leucocitos migran a través del endotelio vascular. Este proceso de migración es controlado por las citocinas y por interacciones celulares entre los leucocitos y el endotelio.<sup>19</sup> Las células activadas y de memoria expresan proteínas de adhesión, receptores de citocinas, y adhesinas, las cuales permiten la permanencia y migración en los tejidos periféricos.<sup>20,21</sup> En el trasplante, esta activación es dada predominantemente en los órganos linfoides secundarios, puesto que se ha visto que ratones carentes de órganos linfoides tienen



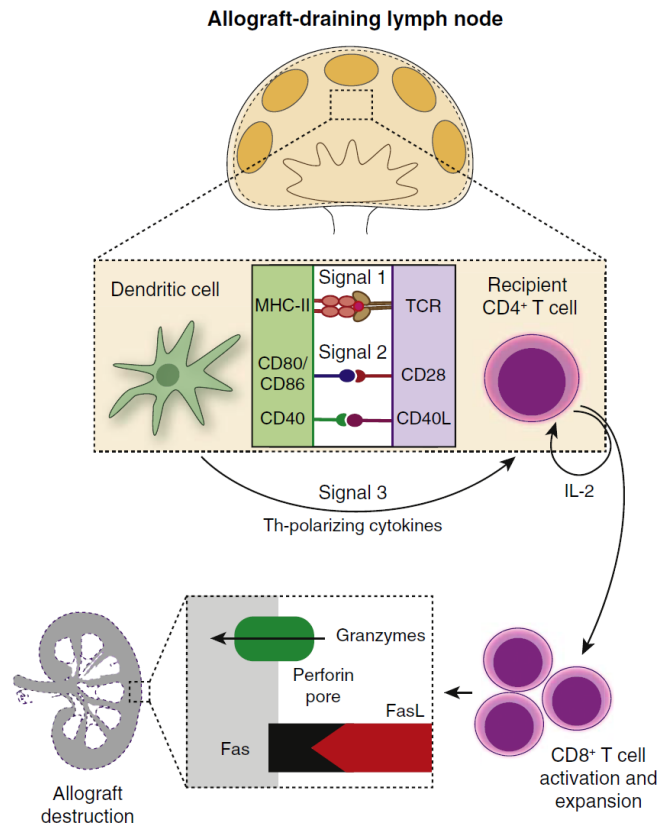
menos rechazo de injertos,<sup>22</sup> así como ratones esplenectomizados deficientes de  $LT\alpha$  or  $LT\beta$ .<sup>23</sup>

Los linfocitos activados por antígenos migran a los tejidos no linfoides,<sup>24,25</sup> y pueden mostrar preferencia tisular selectiva a sitios donde es más probable que reencuentren sus antígenos específicos.<sup>26</sup> Este proceso puede ser facilitado con un posterior reconocimiento como propio de los complejos linfocitos T con CMH II y los péptidos en el endotelio vascular.<sup>27</sup> (Fig. 1)



**Figura 1. Representación de la respuesta efectora inmunológica en injerto renal.** Tomado de Philip F. Halloran. *Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation*. *N Engl J Med* 2004; 351(26):2715-29).

I. Mecanismos de Citotoxicidad: Los linfocitos T citotóxicos o Natural Killer (NK), dañan destruyen a las células diana por la producción de moléculas líticas como Perforina y Granzima B y a través de la inducción de ligando Fas mediador de apoptosis. (Fig. 2).<sup>17</sup>



**Figura 2. Mecanismos Moleculares de Activación de las células Dentro del drenaje local de los ganglios linfáticos.** La interacción Células Dendríticas - Linfocitos T en presencia de aloantígenos ocasiona la activación en el receptor de las células T a través de mecanismos moleculares. Tomado de Stuart J. Knechtle. (2020) *Kidney Transplantation: Principles and Practice, (8th) Philadelphia. Elsevier, Inc. pp:9-35.*

II. Inmunidad Humoral. - La función de los linfocitos B es mejor conocida por su habilidad de producir anticuerpos (El mediador soluble o humoral de la respuesta inmune adaptativa). Además, las células B pueden actuar de manera importante como células presentadoras de antígenos, y así iniciar la respuesta celular inmune, y puede producir citocinas que pueden tanto activar como regular un amplio margen de células

---

inmunes. Además, estas contribuyen al desarrollo de órganos linfoides secundarios (Bazo y nódulos linfoides) y tienen por lo tanto un amplio margen respuestas inmunes más allá de su función obvia de generación de anticuerpos. Estos son los únicos componentes solubles de la respuesta inmune adaptativa y tienen un más amplio rango de distribución en los tejidos, más que sus contras partes del componente celular. Los anticuerpos, principalmente los que reconocen el HLA del donador, medían el rechazo hiper agudo, agudo y crónico humorales.<sup>24</sup>

Se han realizado esfuerzos para valorar en que caso el receptor de anticuerpos puede potencialmente reconocer células del donador, basado en ensayos de prueba cruzada por citotoxicidad.<sup>28</sup> Actualmente la genotipificación HLA del donador y receptor y el uso de perlas aisladas de antígenos HLA (PRA), permiten una valoración más precisa del título de anticuerpos donador-específicos (ADE), permitiendo la asignación del riesgo inmunológico pretrasplante.<sup>29, 30</sup>

A la fecha, aproximadamente el 30% de los pacientes en lista de trasplante están sensibilizados y tienen varios niveles de anticuerpos que pueden predecir al trasplante (prueba cruzada virtual) o que requieran de una estrategia de reducción de anticuerpos para el trasplante.<sup>31</sup> Además, el desarrollo de anticuerpos ADE de Novo postrasplante en pacientes no sensibilizados se asocia con una mayor frecuencia de Rechazo mediado por anticuerpos (RMA) Y peor sobrevida del injerto.<sup>32, 33</sup>

Así la patogenicidad de los ADE HLA varía de acuerdo a su especificidad con Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (CMH) teniendo un peor efecto en el injerto en comparación con los anticuerpos contra el CMH clase I.<sup>33, 34</sup>

---

Además, se han descrito anticuerpos no HLA (anti MICA y anti Angiotensina II) que tienen un efecto deletéreo en el injerto,<sup>35,36,37</sup> y más recientemente otros contra el endotelio y contra células apoptóticas.<sup>38,39</sup>

III. Presentación de antígenos a las células T CD4.- Esta tiene el efecto de organizar la respuesta inmune adaptativa y tiene que ser activada por los antígenos presentados en el contexto de moléculas del CMH II junto con señales co-estimuladoras. Las células B son muy efectivas como presentadoras de antígenos, dado que tiene una gran afinidad por el receptor específico de antígenos (BCR) y proliferan de manera clonal.<sup>39,40</sup> Sarwal y colaboradores identificaron transcritos de células B específicos (CD20, CD74) en injertos con rechazo resistente a esteroides con una mala evolución.<sup>41</sup> Por lo que en este contexto es notable que la depleción de células B a provado ser un tratamiento efectivo.<sup>42,43,44</sup>

IV. Producción de citocinas proinflamatorias.- Las células B tiene la capacidad de producir un número importante de citocinas después de la estimulación y por lo tanto pueden afectar una gran variedad de células inmunes.<sup>45</sup> La Interleucina 6 (IL6) es una citoquina requerida en respuesta por los anticuerpos T dependientes, pero las células B no pueden por sí mismas producir esta citocina y de esta manera contribuir de una forma autoinmune por ejemplo por la vía Th17.<sup>46,47</sup> La producción por células B de Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ) y de Interferón Gama (IFN $\gamma$ ) puede además promover la respuesta de las células Th1 T y la activación de macrófago.<sup>47-50,58</sup>

V. Células B como reguladoras de la respuesta inmune. - Hay evidencia de que las células B actúan no solo como efectores sino como inmunoreguladores, particularmente con la producción de Interleucina 10 (IL-10)<sup>42,44</sup> y quizá por toxicidad directa dependiente de Granzyma B.<sup>123</sup> La IL-10 producida por las células B ha

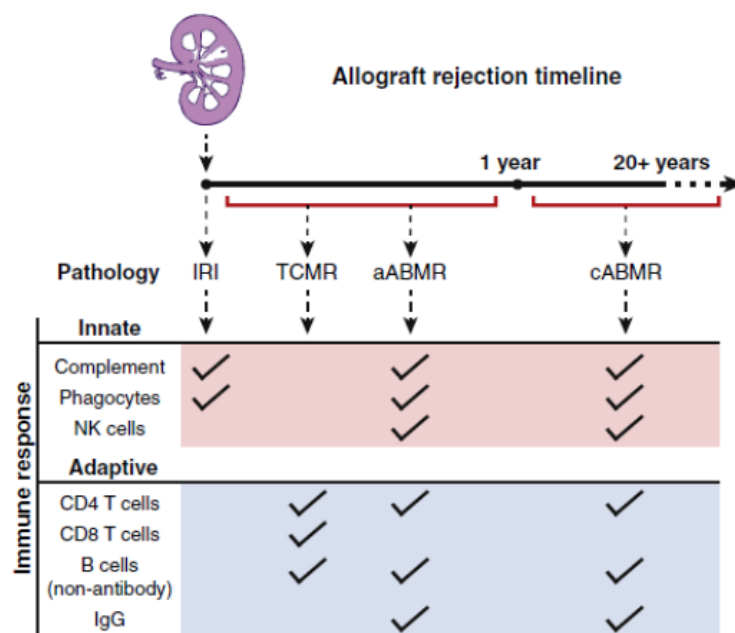
---

mostrado ser importante en modelos animales de autoinmunidad, y en humanos las células B productoras de esta citocina puede abarcar hasta el 5% de las células B circulantes, dividiéndose en subclases gracias a diferentes marcadores (CD5, CD1d, Tim-1, CD9, and CD80).<sup>53,54</sup> El potencial de la capacidad regulatoria de las células B ha sido identificado en muchas entidades autoinmunes así como en la tolerancia de trasplante y protección para el rechazo del injerto.<sup>55,56,57</sup> En particular el balance entre la producción de IL-10 y de citocinas proinflamatorias como la IL-6 es importante para regular la respuesta inmune.<sup>51</sup> Por ejemplo, un número muy bajo de CD24/CD38 células B transicionales que producen altos niveles de IL-10 versus TNF $\alpha$ , es asociado con una peor sobrevida del injerto en receptores de trasplante renal.<sup>58</sup> En contraste, pacientes con buena función del injerto libres de inmunosupresión, llamados operacionalmente como “tolerantes”, tienen un aumento significativo de células B totales, principalmente de memoria y células B CD1d y CD5, postulándose que tal vez en estos pacientes las células B actúan como un regulador negativo de la señal CD40, aun que en otros estudios los pacientes producen niveles elevados de IL 10 (por mayor proporción de células B) después de estimulación in vitro.<sup>55,56</sup>

### 1.2 Rechazo del Injerto:

El rechazo celular (TCMR) es el tipo más común de rechazo con una incidencia del 20% en los receptores de trasplante renal, caracterizado por un infiltrado inflamatorio en el injerto que involucra a células epiteliales.<sup>18</sup> Este infiltrado está compuesto con células T CD8, CD4, monocitos, macrófagos, y células B. (Fig. 2) La secuencia de eventos que culminan en el rechazo celular incluye la migración de células al injerto, la cual depende de la producción de citoquinas por las células residentes en el injerto y de la interacción de las moléculas de adhesión en las células endoteliales e inmunes. Una vez en el injerto, las células efectoras

ejercen sus funciones causando daño al trasplante, jugando un papel importante principalmente las células T CD8 con sus funciones citotóxicas.<sup>18</sup>



**Figura 3. Línea del tiempo del Rechazo.**

A lo largo de la vida de un trasplante, el injerto y receptor están sujetos a estrés que es capaz de desencadenar daño y destrucción del injerto: Representación en línea del tiempo del ataque patológico que potencialmente experimenta el injerto y los tipos de células inmunes que contribuyen a ese daño, estratificado según la inmunidad innata y adaptativa. aABMR, Rechazo Agudo Mediado por anticuerpos; cABMR, Rechazo crónico mediado por anticuerpos; IgG, inmunoglobulina G; IRI, lesión por isquemia reperusión; NK, Natural killers; TCMR, Rechazo mediado por células. Tomado de Stuart J. Knechtle. (2020) *Kidney Transplantation: Principles and Practice*, (8th) Philadelphia. Elsevier, Inc. pp:9-35.

El rechazo del injerto es una inflamación con cambios patológicos específicos en el injerto, debido a que el Sistema inmune del receptor reconoce como no propios a los antígenos del injerto, con y sin disfunción del mismo. Tanto el Sistema inmune adaptativo como innato juegan un papel importante en el rechazo, siendo los linfocitos T las principales células que

---

reconocen al injerto. Existen otras moléculas co-estimuladoras y citoquinas que juegan un papel importante en esta interacción.<sup>60</sup>

a) Clasificación: De acuerdo con las características inmunológicas e histopatológicas, el rechazo del injerto renal puede clasificarse ampliamente en los siguientes tipos:

1. Rechazo Hiper agudo: Ocurre minutos después del trasplante, y se relaciona con anticuerpos preformados o por incompatibilidad ABO; actualmente es raramente visto debido a la realización de pruebas cruzadas pretrasplante.
2. Rechazo Agudo: Este tipo de rechazo se presenta en cualquier momento del postrasplante, generalmente dentro de semanas o meses, y se subdivide:<sup>61</sup>
  - Mediado por anticuerpos o Humoral: - ABMR: El cual usualmente demuestra la existencia de anticuerpos donador específico-circulantes y la evidencia histológica de daño mediado por anticuerpos en el riñón, como inflamación del glomérulo (glomerulitis), o de los capilares peritubulares (capillaritis peritubular).
  - Celular: TCMR: el cual se caracteriza por infiltrado linfocitario en los túbulos, intersticio y en ocasiones en la íntima arterial.
  - Rechazo Crónico: Este usualmente se desarrolla después de meses postrasplante, puede ser crónico mediado por anticuerpos o crónico celular.
  - Rechazo Mixto: el cual se una mezcla de Humoral y Celular y generalmente ocasiona en rechazo crónico.<sup>62</sup>

b) Etiología: Ciertos factores correlacionan con el riesgo aumentado de rechazo después del trasplante renal como son:<sup>62-64</sup>

- 
- Sensibilización previa – Panel reactivo de Anticuerpos Elevado.
  - Tipo de trasplante: Donador fallecido confiere más riesgo de rechazo.
  - Edad avanzada del donador.
  - Tiempo de isquemia prolongado.
  - Incompatibilidad del HLA.
  - Prueba cruzada células B positiva.
  - Incompatibilidad ABO.
  - Receptores jóvenes mayor riesgo que añosos.
  - Raza: Afroamericanos mayor riesgo que caucásicos.
  - Retraso en la función del Injerto.
  - Falta adherencia al tratamiento.
  - Episodios previos de rechazo.
  - Inadecuada inmunosupresión.

La incidencia global y prevalencia del rechazo agudo ha disminuido y la sobrevida del injerto ha aumentado con el uso adecuado de los inmunosupresores para inducción y mantenimiento, estimándose una incidencia de rechazo agudo al primer año es de alrededor del 7.9%, siendo menor en el donador vivo que en el fallecido.<sup>65</sup>

b) Fisiopatología:

1. *Rechazo mediado por anticuerpos.* - La principal característica es una disfunción rápida del injerto debido a inflamación. Una respuesta amnésica engendrada por una

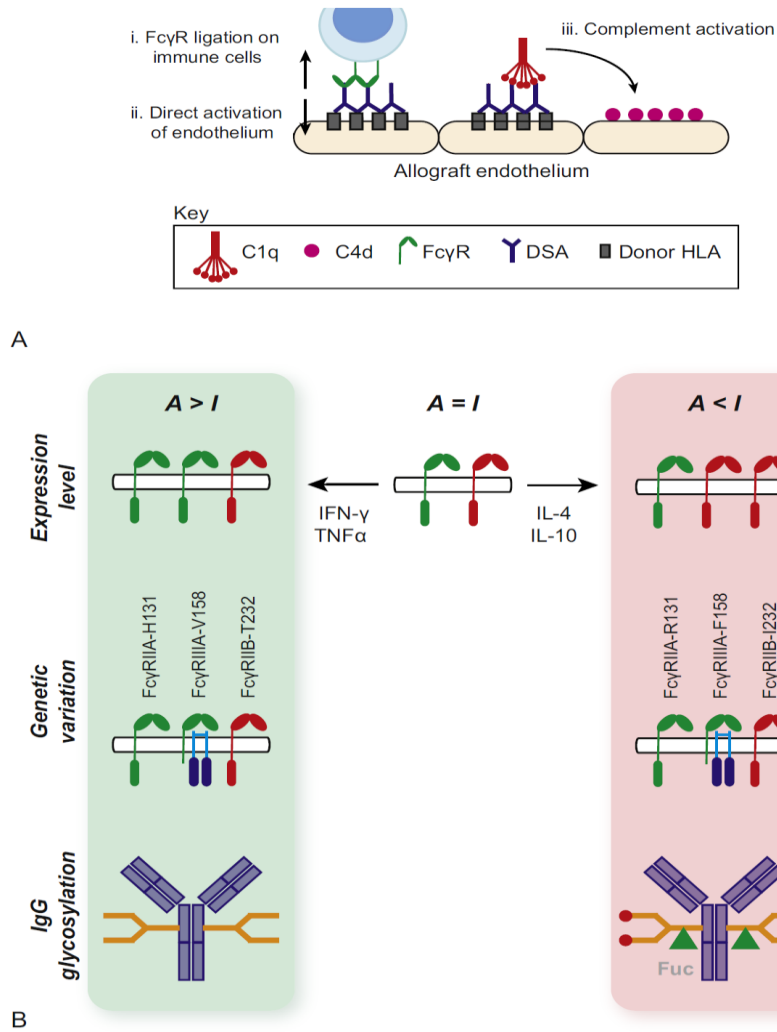


---

exposición previa hacia antígenos relevantes, genera rápidamente títulos altos de anticuerpos fijadores de complemento.<sup>66</sup> El principal objetivo de estos anticuerpos de memoria son los antígenos del CMH localizados en el endotelio de los capilares peritubulares y glomerulares del donador.<sup>67</sup>

Las células endoteliales dañadas liberan varias moléculas: Factor Von Willebrand y P-selectina, que promueven la agregación plaquetaria; citocinas y quimiocinas como la interleucina 1 $\alpha$ , interleucina 8 (IL 8), y la quimiocina ligando 2 (CCL2), que ocasionan adherencia de los leucocitos al glomérulo ( glomerulitis) o a los capilares peritubulares dilatados ( marginación ); y quimiotractantes C3a y C5a.<sup>60</sup>

El C4d, un marcador de activación clásica del complemento es encontrado con frecuencia en los capilares peritubulares (Fig. 4).<sup>64</sup> C5b dispara el ensamblaje del complejo de ataque de membrana (C5b–C9), que ocasiona necrosis endotelial y apoptosis, así como el desprendimiento de células endoteliales de la membrana basal, ocasionando microtrombos, con hemorragia y necrosis de la pared arterial e infarto ocurre en casos severos.<sup>67</sup>  
(fig. 4)



**Figura 4. Mecanismos de rechazo mediado por anticuerpos**

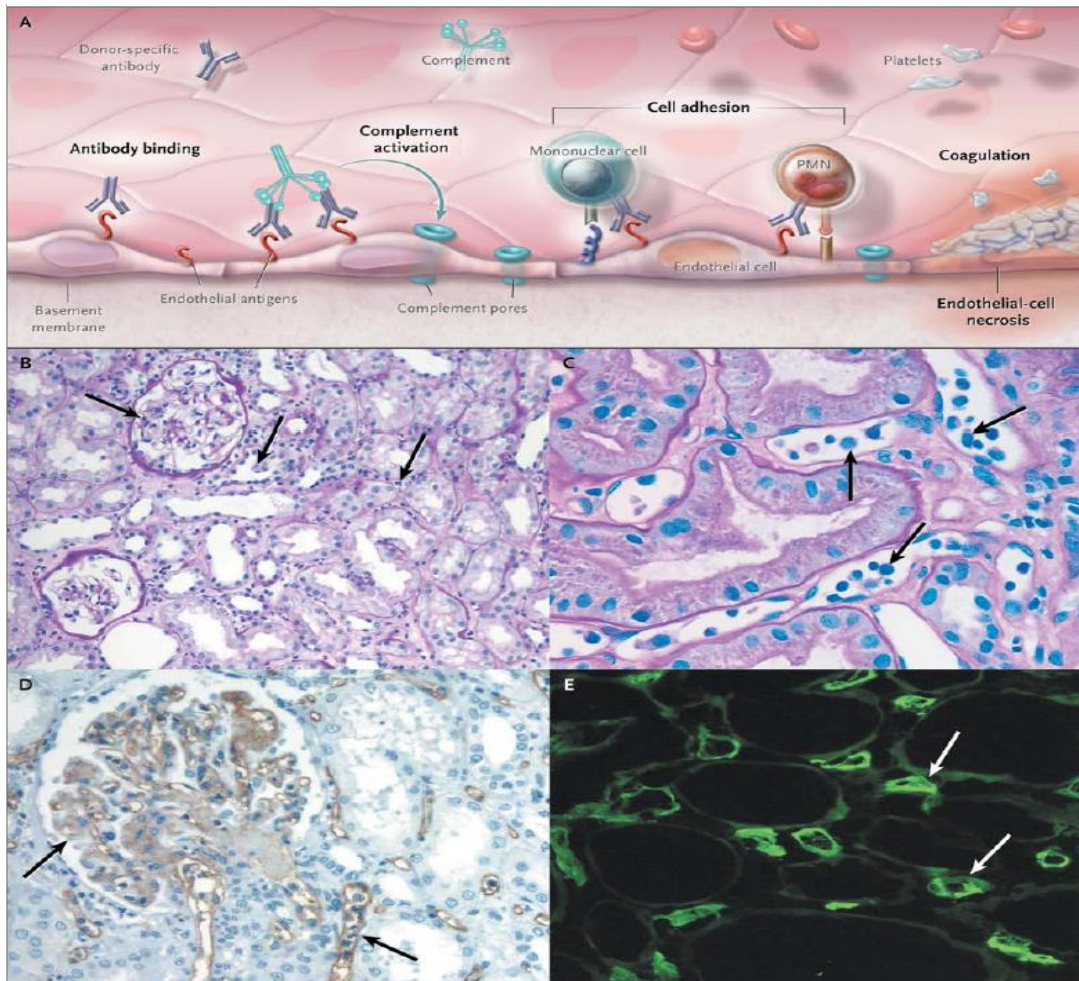
(A) anticuerpos donador específico (ADE) se unen al endotelio del injerto y pueden activar una gran variedad de mecanismos inflamatorios i) unión de complejos FcγR a las células inmunes como NK; ii) activación directa del endotelio del injerto a través reacción cruzada con moléculas de la superficie endotelial; iii) activación del complemento a través de la vía clásica. (B) Numerosos factores influyen la habilidad de la unión de IgG Fc para dirigir la inflamación y dañar el tejido. La expresión celular del complejo FcγR es regulada por las citocinas inflamatorias como TNFα e INFγ que aumentan sus niveles de expresión aumentando la activación y disminuyendo la inhibición. También los polimorfismos de FcγR pueden alterar su nivel de expresión o capacidad de señalización. Por último, la glicosilación de IgG altera la capacidad de los anticuerpos de interactuar. Receptor verde, activa FcγR (A). Receptor rojo, inhibe FcγR (I). Tomado de *Stuart J. Knechtle. (2020) Kidney Transplantation: Principles and Practice, (8th) Philadelphia. Elsevier, Inc. pp:9-35.*

---

2. *Rechazo Celular.* - Es la forma más común de rechazo agudo y es iniciado cuando los antígenos del donador se presentan a los linfocitos T del receptor por las células presentadoras de antígenos (APCs). Las células dendríticas inmaduras dentro del injerto llevan antígenos del donador del órgano trasplantado a los órganos linfoides del receptor y bazo; durante su viaje, estos antígenos maduran a APCs.<sup>69-72</sup> Las células dendríticas presentadoras de antígenos además participan circulando a través del injerto. Las APCs llegan entonces a los órganos linfoides donde activan a las células T del receptor. Estas, se diferencian en varios subgrupos y regresan entonces al injerto, donde toman parte en el daño ocasionado al injerto.<sup>69,77</sup> Las células Dendríticas y los Macrófagos presentan los antígenos a las células T de manera eficiente, cooperando con las células B que capturan y presentan también antígenos gracias a sus inmunoglobulinas de superficie y las moléculas del CMH II; más aún las células tubulares epiteliales y endoteliales pueden también presentar antígenos a las células T activadas.<sup>70-71</sup>

La sensibilización puede ocurrir en la periferia o en los órganos linfoides terciarios que se desarrollan dentro del riñón trasplantado.<sup>72</sup>

d) Patología: El estándar de oro para el diagnóstico del rechazo es la biopsia del injerto renal, el cual funciona de manera acuciosa para estratificar la severidad, diferenciar entre los diferentes tipos y guiar el tratamiento.<sup>84</sup>(fig. 5)



**Figura 5. Fisiopatología del Rechazo.**

Anticuerpos del donador se unen a los antígenos expresados en las células endoteliales de los vasos del injerto (panel A). La subsecuente activación del complemento y adherencia celular resultan en necrosis de las células endoteliales, seguido de depósito de plaquetas y coagulación. Los cambios histológicos correspondientes se observan en las imágenes B a E. Las células mononucleares se adhieren al endotelio del glomérulo (panel B flechas tinción PASS schiff) y los capilares peritubulares (panel c flechas tinción Pass schiff). Este proceso es acompañado por depósitos de C4d en el glomérulo y capilares peritubulares (panel D flechas; C4d tinción inmunohistoquímica) y los capilares peritubulares fuera de los túbulos renales ( Panel E flechas, tinción inmunofluorescencia C4d). *Tomado de Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. N Engl J Med. 2010;363(15):1451-1462*

Existían 2 clasificaciones mayores para el diagnóstico histopatológico de rechazo del injerto por biopsia: La Clasificación de BANFF y la Cooperative Clinical Trials in Transplantation (CCTT), la cual fue incorporada en la clasificación de BANFF en 1997, para

---

estandarizar el diagnóstico histopatológico de la biopsia del injerto y ha sido actualizada constantemente a intervalos regulares hasta 2017.<sup>74</sup> Cuando se realiza la biopsia del injerto renal, debe de tenerse adecuado tejido para el diagnóstico definitivo, la cual debe contener por lo menos 10 glomérulos y 2 arterias y un grosor de 3 a 4 micrones ( marginal de 7 a 10 glomérulos y 1 arteria, e insatisfactoria con menos de 7 glomérulos o sin arterias).<sup>86-88</sup>

La clasificación de BAFF utiliza una escala para valorar la presencia y el grado de cambios histopatológicos en diferentes compartimentos de la biopsia del riñón trasplantado. Se enfoca principalmente pero no de manera exclusiva en las características diagnósticas del rechazo.<sup>74</sup> De acuerdo con esta clasificación la escala es la siguiente:

- Categoría 1: Biopsia normal sin cambios específicos.
- Categoría 2: Rechazo mediado por anticuerpos AMR. - que se subdivide en agudo, crónico, y crónico activo.
- Categoría 3: Sospechoso o limítrofe para rechazo agudo celular.
- Categoría 4: Rechazo celular: se subdivide en agudo, crónico y crónico activo.
- Categoría 5: Fibrosis intersticial y atrofia tubular (IFTA).
- Categoría 6: otros cambios no considerados secundarios a rechazo agudo o crónico.<sup>74</sup>

Las características histológicas del Rechazo Humoral resultan de unos mecanismos bien establecidos efectores de los anticuerpos, principalmente por activación directa de las células endoteliales uniendo al CMH con la activación del complemento (vía clásica),<sup>75</sup> o por el reclutamiento y activación de las células inmunes que expresen receptores de la Porción Fc de Inmunoglobulina G (IgG) o receptores de complemento como neutrófilos, macrófagos, monocitos, células dendríticas y natural killers.<sup>76,77</sup> (Fig. 5)

---

e) Cuadro clínico: La mayoría de los pacientes que experimentan un episodio de rechazo agudo son asintomáticos y presentan disfunción del injerto evidenciado por exámenes de laboratorio, donde hay un aumento súbito de la creatinina a las del 25% arriba del nivel basal. Cualquier nueva presentación o empeoramiento de la proteinuria o de la hipertensión debería aumentar la sospecha de rechazo. En algunas ocasiones los pacientes con rechazo presentan fiebre, dolor en el injerto, hematuria, disuria, hipertensión, edema, y disminución del gasto urinario en casos avanzados.<sup>62</sup>

Una disminución gradual en la función del injerto con el tiempo es universalmente observada, lo que se conocía con anterioridad como nefropatía crónica del injerto, y que actualmente la clasificación de Banff la subdivide según el tipo de daño ocasionado al mismo (como Toxicidad por inhibidores de calcineurinas, rechazo crónico, etc.)<sup>74</sup>

f) Abordaje Diagnóstico: El abordaje en caso de presentar elevación de creatinina en los receptores de trasplante renal debe ser el mismo que cuando se evalúa una falla renal aguda tomando en cuenta además el diagnóstico de rechazo. La evaluación específica de la disfunción debe incluir 32 los siguientes estudios.<sup>60</sup>

- Descartar causas pre-renales: Verificar signos vitales ortostáticos, presión arterial, y valorar estado circulatorio.
- Descartar causas pos-renales, principalmente uropatía obstructiva con ultrasonido renal y vesical.
- Biometría hemática en busca de anemia o trombocitopenia para descartar causas hematológicas.
- Electrolitos séricos asociados con falla renal aguda o crónica
- Examen General de orina y urocultivo, para descartar infección.
- Recolección de orina en 24hrs para descartar proteinuria y glomerulopatía asociada (como glomerulopatía del trasplante).

- 
- En pacientes con sospecha descartar infección virus BK o CMV con PCR.
  - Búsqueda de anticuerpos donador específico.
  - Ultrasonido Doppler renal con medición de índices arterial y venoso
  - Algunos centros utilizan ya la medición de DNA libre, el cual puede ser positivo aun antes del aumento de creatinina, sugiriendo un posible rechazo.<sup>138</sup>

El diagnóstico del mismo se ha facilitado por métodos más sensibles de detección de anticuerpos y por la identificación de activación del complemento en las biopsias del injerto por la tinción de C4d, sin embargo la forma crónica de este rechazo puede ocurrir en ausencia de depósitos de complemento en la biopsia.<sup>78,79</sup> Se ha visto actualmente que análisis de transcritos pueden además asistir en hacer una valoración más acertada en este el tipo de rechazo al compararla con la biopsia más en ausencia de C4d.<sup>80,81</sup>

g) Tratamiento: El tratamiento se enfoca según el tipo de rechazo que se haya diagnosticado, la severidad de la lesión por histología, la cronicidad, y las comorbilidades del receptor.<sup>82,83</sup>

- Rechazo Hiper Agudo. - No existe tratamiento efectivo, culminando siempre con la nefrectomía del injerto, siendo la principal medida la prevención a través de la remoción de anticuerpos preformados antes del trasplante con plasmaféresis, aplicación de inmunoglobulina y de Rituximab, y el uso de inmunosupresores de inducción. Además, la prueba cruzada pretrasplante por complemento o por citometría de flujo, que de ser positiva está contraindicado el trasplante hasta que esta sea negativa después de tratamiento de desensibilización.<sup>82</sup>

- 
- Rechazo Mediado por Anticuerpos. - El tratamiento del rechazo agudo mediado por anticuerpos depende además del nivel de anticuerpos. Existen diferentes esquemas de tratamiento sin un estándar de referencia para el mismo.
    - i) Plasmaféresis: 3 a 5 sesiones diarias, seguidas de la aplicación cada una de inmunoglobulina Intravenosa (IVIG) (100 to 200 mg/kg) y una dosis final de Rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>).
    - ii) IVIG: Inmunoglobulina al final de la última sesión de plasmaféresis a una dosis 2g/kg.
    - iii) Bortezomib: Inhibidor de células plasmáticas (1.3 mg/m<sup>2</sup>) utilizado solo o en combinación con plasmaféresis e inmunoglobulina.
    - iv) Esplenectomía, ya no se utiliza, teniendo solo reportes anecdóticos de tratamiento efectivo en rechazos refractarios.
    - v) Optimizar la dosis y niveles de mantenimiento de la inmunosupresión.<sup>60,82</sup>
  - Rechazo Celular (células T). - El tratamiento está basado principalmente en la severidad de la lesión. -
    - i) Metilprednisolona intravenosa (250 a 1000 mg diarios) contra las células T, B y macrófagos; por 3 a 5 días.
    - ii) Timoglobulina. – Globulina antitimocítica IV (1 to 1.5 mg/kg) contra los receptores de células T, variando los esquemas de duración de 3 a 7 días, basado en los niveles de Cd3.
    - iii) Optimizar a dosis y el nivel de inmunosupresión de mantenimiento.<sup>60</sup>



- 
- Rechazo crónico. - Dado que el rechazo mediado por anticuerpos es el principal mecanismo de rechazo crónico, se utiliza el mismo tratamiento que el ABMR, pero generalmente las medidas pueden ser inefectivas con Cr arriba de 3 mg/dl y /o proteinuria masiva.<sup>83</sup>

h) Pronóstico: El rechazo agudo predispone a la disfunción crónica del injerto. En caso de rechazo mediado por células T, este tiene una mejor sobrevida del injerto, principalmente cuando hay respuesta al tratamiento, y la creatinina sérica retorna a niveles basales previos al rechazo. Aquellos que ocurren a los 3 meses postrasplante, que no responden a tratamiento (creatinina sérica no retorna al 75% de su valor basal) se asocian con pobre sobrevida del injerto. La aparición ADEs en cualquier momento postrasplante se asocia con una disminución del 5% de sobrevida del injerto por año comparado con aquellos que no lo presentan. Por lo tanto, cada episodio de rechazo requiere ser tratado y monitorizado estrechamente, optimizando el régimen de inmunosupresión de mantenimiento.<sup>84,85</sup>

i) Complicaciones: Dentro de las complicaciones asociadas con el rechazo agudo de las más graves es la falla del injerto si no es tratado a tiempo y de manera apropiada. Aun así, después del tratamiento, hay una asociación con una menor sobrevida del injerto después de cada episodio de rechazo, más aún si es de tipo humoral. El tratamiento del rechazo agudo aumenta el estado de inmunosupresión y confiere mayor riesgo en el paciente, así como los efectos secundarios de los medicamentos: mayor riesgo cardiovascular, desarrollo de diabetes postrasplante, dislipidemia, mayor riesgo de neoplasias a largo plazo, así como infecciones oportunistas como Citomegalovirus (CMV), virus BK (Polioma Virus), infecciones por Hongos o microorganismos atípicos.<sup>60</sup>

---

### 1. 3 Biopsia Renal:

La Biopsia Renal (BR) continúa siendo el estándar de oro para el diagnóstico de cualquier disfunción del riñón, incluyendo los nativos e injertos renales. Además del diagnóstico, los datos histopatológicos pueden proveer de información con respecto a la severidad de la enfermedad, actividad y grado de cronicidad que pueden guiar al tratamiento.<sup>86</sup> La BR ha sido ampliamente utilizada en la práctica clínica por más de 100 años. Este procedimiento es considerado seguro con una tasa aceptable de complicaciones.<sup>86</sup> La BR de manera percutánea fue introducida por primera vez en 1940 y guiada por ultrasonido desde los años cincuenta.<sup>87</sup> Durante la década de los 80s las agujas manuales dieron paso a los dispositivos automáticos para biopsias,<sup>88</sup> los que hacen de este un procedimiento más seguro. Sin embargo, las complicaciones son altamente dependientes de la técnica y protocolo de diferentes países como lo demostró un estudio realizado por el registro Noruego de Biopsias (1988–2010), influyendo un gran número de factores. La Biopsia percutánea en el Riñón Nativo se piensa que tiene un bajo riesgo, pero no está exento de los mismos. Sin embargo, los riesgos y complicaciones de la biopsia del injerto son menos permisibles debido a las siguientes razones:

- 1.- La poca disposición de órganos es un problema común mundialmente, por lo que hay relativamente pocos estudios que incluyen datos de la biopsia del injerto.
- 2.- En Segundo lugar, los receptores solo tiene un riñón solitario funcionante con función renal menos preservada.
- 3.- En tercer lugar, los estudios de la biopsia del injerto datan de hace 25 años, y hay escasos datos recientes. Progreso en la seguridad de la Biopsia se han alcanzado con el uso de dispositivos automatizados y guía por ultrasonido.<sup>87</sup> La frecuencia de complicaciones varía de acuerdo con diferentes épocas. En los pasados 10 años no existen estudios con gran número de casos para investigar las complicaciones de la biopsia del injerto.<sup>92</sup>

---

Un estudio publicado en 2003 con un gran número de pacientes,<sup>90</sup> reportó la seguridad de las biopsias de “protocolo” del injerto renal, más que de las biopsias por indicación; existen menos complicaciones asociadas en las biopsias de protocolo vs por “indicación”, debido a que la biopsia de los injertos en situación normal (protocolo) es más segura que en un riñón problemático (por indicación). Esto quiere decir que la frecuencia de complicaciones en la biopsia del injerto por indicación se espera que sea mayor que en las de protocolo. Sin embargo, la mayoría de los centro realizan biopsias del injerto por indicación más que por protocolo. Desafortunadamente existen muy pocos datos de la seguridad y complicaciones de la biopsia del injerto renal por indicación, por lo que se necesita determinar los riesgos y complicaciones en la era moderna. Una revisión de los pasados 10 años describe solo un estudio en la seguridad de la biopsia.<sup>96</sup> Sin embargo solo incluyó niños y adolescentes sin diferenciar la indicación de la misma.<sup>91</sup>

Así, al compararse las biopsias de protocolo vs las biopsias por indicación las complicaciones fueron las siguientes : Hematoma (1.11% vs 2.6%), hematuria macroscópica (2.23% vs 1.9%), fístula arteriovenosa (0 vs 2.4%), pérdida del injerto (0% vs 0.04%), transfusión (0.74% vs 0.14%), requerimiento de intervención radiológica (0.37% vs 0.04%), perforación intestinal (0 vs 0.09%), e intervención quirúrgica (0 vs 0.09%).<sup>86</sup> En una cohorte de pacientes de biopsia por indicación, existen un gran número de pacientes con hematuria macroscópica con necesidad de transfusión e intervención radiológica. Pese a la mayor incidencia de intervenciones radiológicas en el grupo de biopsias por indicación el numero sigue siendo muy bajo. Complicaciones mucho más severas como pérdida del injerto y perforación se presentan mucho más raramente.<sup>92</sup>

---

En resumen, se cree que aún que se requiera un gran volumen de transfusión, la biopsia del injerto por indicación no presenta más riesgo complicaciones severas que las presentes en las biopsias de protocolo. Inexplicablemente los resultados demuestran que el riesgo de complicaciones severa después de realizar una biopsia en un riñón normal, pueden ser más altas que las que se presentan en un riñón inflamado.<sup>93</sup>

Furness et al, en un estudio con 318 pacientes con biopsia del injerto renal por indicación, 7 pacientes (2.7%) experimentaron complicaciones severas como: hematuria macroscópica con falla renal aguda obstructiva en 6 casos y hematuria macroscópica en 1 caso.<sup>90</sup> Posteriormente Nicholson et al. también en biopsias del injerto por indicación, todas con falla renal para monitorizar la respuesta al tratamiento de rechazo, no encontró mayor riesgo con el uso de diferentes calibres de agujas, (14, 16, o 18)<sup>93</sup> presentando hematuria macroscópica el 8% de los casos, disminuyendo al 2.3% en otras series cuando es realizada por nefrólogos experimentados, en tiempo real guiadas por ultrasonido y de preferencia con un dispositivo automatizado.<sup>92,93</sup> Además antes de cada biopsia se recomienda normalizar la presión arterial y estudiar la coagulación lo mejor posible y cualquier medicamento para la coagulación debe ser suspendido antes de la biopsia. Algunos autores recomiendan además el uso de Desmopresina 30min antes de la biopsia, análogo de la hormona antidiurética con poca actividad vasopresora que puede mejorar el tiempo de sangrado y disminuir el riesgo de sangrado y tamaño del hematoma pero que tiene efectos adversos como trombosis o hiponatremia.<sup>90-96</sup>

Sin embargo a la fecha, ningún estudio ha podido predecir que pacientes presentarán hemorragia post biopsia, siendo el único factor de riesgo encontrado el reportar “sólo médula” en el histopatológico (P<0.001), así Beckingham et al. mencionan que puede

---

deberse a las largas ramas de vasos y tractos colectores en la médula interna, por lo que es imperativo el diferenciar la corteza de la médula por ultrasonido y hacer la biopsia lo más superficial en la corteza. Una vez que la punta de la aguja se evidencia cerca de la cápsula renal y se evita la lesión medular es poco probable el sangrado post biopsia.<sup>96</sup>

Con respecto a la Biopsia de Protocolo, generalmente está indicada en todos los receptores de trasplante renal con proteinuria inexplicable o elevación de la creatinina sérica. Todos los pacientes son ingresados para la realización del procedimiento y antes de la misma deben de tener una presión sistólica menor a 180mmHg. Anti agregantes plaquetarios y antitrombóticos (eg, aspirina, omega-3, inhibidores GP IIb/IIIa, dipiridamol, y AINES) deben de ser discontinuados 7 días antes de la misma y la warfarina por lo menos 3 días antes o el tiempo de protrombina haya sido normalizado. Pentoxifilina tampoco debe de ser tomada un día antes de la biopsia. Todas las biopsias deben de ser guiadas por ultrasonido en tiempo real por personal experimentado. Antes de la realización de esta, la piel sobre la biopsia debe de estar libre signos de infección.<sup>86</sup> El paciente debe seguir indicaciones como sostener la respiración por 5 segundos, posteriormente guiada por ultrasonido (con transductor de 3.5MHz con visualización en tiempo real de la aguja), se localiza el polo superior y se anestesia el tracto de la aguja. Dos cilindros de tejido renal de 1cm de longitud son recomendados, usándose un dispositivo automatizado de preferencia, variando el tamaño de la aguja de 16 a 8 G. Inmediatamente después de la biopsia se debe descartar sangrado, hematoma o fístula arteriovenosa por ultrasonido. Todos los pacientes deben mantenerse en reposo por lo menos 2hrs post biopsia y mantener en posición supina y descanso en su domicilio en decúbito. La duración del procedimiento debe durar en promedio 20 a 30 minutos. Para detectar sangrados o complicaciones los signos vitales

---

deben de ser monitorizados dentro de 6hrs después de la biopsia. La presión sanguínea debe ser controlada lo mejor posible (ideal <140/90mmHg).<sup>86</sup>

Si se presenta hematuria macroscópica, dolor en la espalda o abdominal o mareos o nauseas se recomienda realizar Biometría hemática, Examen general de orina y sodio sérico. Ultrasonido debe de realizarse para detectar cualquier complicación. Todos los pacientes deben recibir seguimiento hasta de 1 año. Así las principales Complicaciones que pueden presentarse son: hematoma, hematuria, hidronefrosis, fistula arteriovenosa, transfusión sanguínea, Anemia, pudiendo llegar a requerirse Nefrectomía del injerto y muerte.<sup>86, 87</sup>

#### 1.4 Citocinas y Quimiocinas:

Las quimiocinas juegan un papel crucial en el tráfico de leucocitos bajo condiciones normales y en el escenario de inflamación estéril y rechazo. Existen más de 40 diferentes, pertenecientes a 2 mayores familias estructurales reconocidas por un rango de receptores expresados en las células inmunes: quimiocinas CC O  $\beta$  (e.g. MIP-1 $\alpha/\beta$ , [CCL3/4] reguladas en la activación expresión normal de Células T y secretadas. [RANTES o CCL5], y proteína quimiotractante de monocitos [MCP- 1 o CCL2]) la que atrae a las células T, monocitos /macrófagos, células dendríticas, NK, u otras  $\alpha$  quimiocinas o citocinas como Interleucina 8 (IL-8 ó CXCL8), IFN $\gamma$ , las cuales atraen a los neutrófilos y células T.<sup>97-101</sup> Un gran número de modelos experimentales de trasplantes han demostrado la importancia de las quimiocinas mediando la infiltración celular inmune en el rechazo agudo y crónico.<sup>101-104</sup>

---

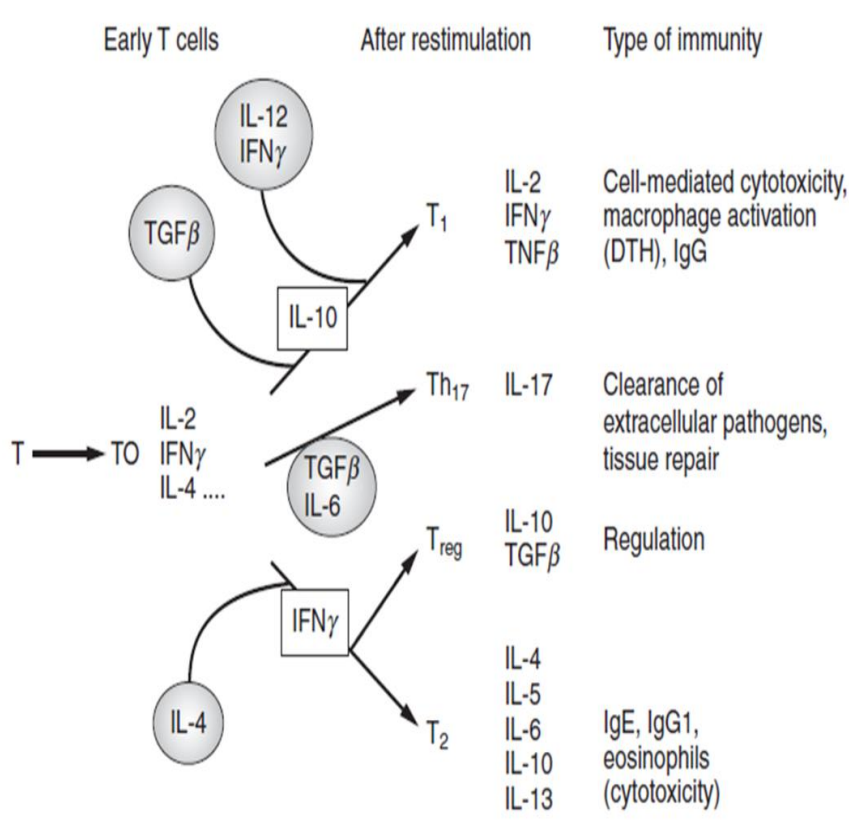
Las citoquinas regulan una compleja red de interacciones celulares que median la respuesta inmune en el órgano trasplantado. Son proteínas que intervienen en la diferenciación y maduración de las células del sistema inmune, contribuyendo a la comunicación entre ellas y en algunos casos, ejercen funciones efectoras directas.<sup>102</sup>

Se ha descrito un gran número de citocinas, que son sintetizadas localmente en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos.<sup>105-106</sup> La determinación de citocinas con fines diagnósticos, especialmente de las interleucinas (IL) 6 y 8, se han utilizado en el estudio de la patología renal, tras conocer su producción en el riñón en respuesta a otras proteínas inductoras de su síntesis.<sup>106-108</sup>

Especialmente son importantes las citocinas pro inflamatorias tipo 1 principalmente, Interferón Gama (INF- $\gamma$ ), Interleucina 2 (IL-2) y CXCL-10, (proteína inducida por INF- $\gamma$ ); la interleucina 2 (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 que modula la expresión de moléculas de adhesión, que se producen en grandes cantidades después de la infección y durante el rechazo del injerto.<sup>109-110</sup>

La producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 en las células T implica tanto un estado de regulación transcripcional como postranscripcional, que sea capaz de detener significativamente la producción de citoquina.<sup>109</sup>

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 la IL-10 no es Th2 exclusiva, es importante determinar la regulación diferente de esta y otras interleucinas particularmente IL-2 e INF- $\gamma$ .<sup>109,113</sup>



**Figura 6. Predominancia de la respuesta inmunológica según IL-10 o INF- $\gamma$ .** Tomado de Peter Morris, *Kidney Transplant, BA, 2016, 3ra, Elsevier.*

Hay evidencia que ha demostrado la importancia de diferentes citoquinas en el rechazo renal agudo. A su vez se han encontrado niveles elevados de Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4), IL-10 e INF- $\gamma$  en plasma y orina de pacientes con rechazo.<sup>10</sup> Durante un episodio de rechazo se han detectado, niveles elevados de Interleucina 1 (IL-1), e ICAM-1 en el infiltrado inflamatorio, así como en el tejido renal.<sup>113-114</sup>



---

Específicamente, el 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 T citotóxicas. El hallazgo de que estas citoquinas proinflamatorias 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, no invasivo y aplicable en la consulta de seguimiento.<sup>113-115</sup>(Fig. 6)

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.<sup>116-117</sup> Cabe destacar que la determinación de citocinas en orina es una muestra de actividad inflamatoria a nivel renal.<sup>115-116</sup>

Estudios previos en trasplantes en humanos, muestran niveles en sangre elevados de mRNA de IL-10 en pacientes con rechazo agudo y crónico, y niveles séricos muy elevados de IL 10 al momento del trasplante en todos los pacientes.<sup>124</sup> 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 IFN-  $\gamma$ ) pese a la presencia de IL-10.<sup>58</sup>

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 IFN-  $\gamma$ , la que puede ser regulada por IL-2 o IL-4 in vitro.<sup>116-119</sup>

Entre las citocinas pro inflamatorias con potencial diagnóstico se encuentra la proteína derivada del Interferón  $\gamma$  (IP-10), con la cual se demostró que la determinación de esta

---

proteína y su receptor (CXCL10) pueden ser un marcador de rechazo.<sup>117</sup> De hecho, esta citocina puede predecir la presencia inflamación aguda del injerto con repercusión clínica (como rechazo o nefropatía por virus BK)<sup>118</sup> correlacionándose los niveles urinarios de esta la extensión de la tubulitis subclínica en 2 cohortes independientes de pacientes,<sup>118,119</sup> pero con la limitante de estos estudios de que incluyeron grupos selectos de pacientes, por lo que el punto de corte de la determinación urinaria de CXCL10 para predecir la inflamación clínica/subclínica no está bien establecido.<sup>118-120</sup>

Se ha afirmado también 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.<sup>121-122</sup> 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 en el injerto.<sup>122</sup>

Existe ya evidencia del diagnóstico de rechazo por medio determinación en orina de Granzyma B y Perforina las cuales sin embargo, están también presentes cuando hay cualquier causa de disfunción del injerto.<sup>123</sup>

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).<sup>124</sup>

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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.<sup>127</sup>

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 postrasplante.<sup>126,127</sup> 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 el rechazo activo antes de que se altere la función renal y sea clínicamente detectable permitiendo reducir el daño en el injerto asociado a rechazo y categorizar la inmunosupresión, en insuficiente o excesiva y así minimizar los efectos de esta.<sup>127,128</sup>

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.<sup>128,129</sup>

En particular la inflamación subclínica intersticial y tubulitis predice pobre pronóstico del injerto.<sup>128</sup> A la fecha, la creatinina sérica es ampliamente utilizada como la principal estrategia para monitorizar el injerto renal.<sup>128</sup>

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.<sup>128,129</sup> 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.<sup>129</sup> 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.<sup>127,129</sup>

La transición epitelial a mesenquimal (EMT) es considerada como el mediador progresivo de daño renal desencadenando en fibrosis intersticial y atrofia tubular.<sup>131</sup>

El diagnóstico es realizado en base a las características clínicas, la función renal, y los hallazgos de la biopsia renal. De cualquier forma, las características clínicas y la función renal sólo establecen el nivel de daño, y la biopsia recordemos que es un procedimiento invasivo. La orina contiene proteínas que reflejan la inflamación y fibrosis renal, por lo que un estudio iterativo de la expresión genética en orina podría proveer información que correlacionara la evolución del injerto con los hallazgos histológicos.<sup>132</sup>

Los Marcadores del EMT en el tejido renal usan tinciones histoquímicas<sup>132,133</sup> sin embargo la detección de marcadores urinarios puede ser difícil en muchas situaciones como infecciones del tracto urinario o infección por citomegalovirus.<sup>134,135</sup> La diferente expresión genética observada por algunos autores hasta 75 días postrasplante puede reflejar diferencias relacionadas con un daño histológico que inicia.<sup>131,135</sup>

El rechazo del injerto renal se asocia a cambios moleculares en el tejido renal, que refleja cambios transcripcionales en las células residentes (por ejemplo, el interferón gamma induce cambios en el endotelio del donador) o cambios en las poblaciones celulares como

---

infiltración y activación de células T efectoras y macrófagos en el rechazo celular, o marginación y activación de linfocitos NK en el rechazo mediado por anticuerpos.<sup>136,137</sup>

Conforme las células infiltrantes del injerto son activadas primariamente por los órganos linfoides antes de viajar e infiltrar el injerto<sup>138</sup> se ha planteado que los cambios moleculares que ocurren en las biopsias del injerto renal en el rechazo agudo mediado por anticuerpos pueden además reflejarse en cambios a nivel de las células inmunes circulatorias en sangre y por ende en la orina.<sup>139</sup> Dado la falta de un método no invasivo así como de marcadores suficientemente validados para la detección del rechazo mediado por anticuerpos, el objetivo de este estudio fue el desarrollar y validar un test basado en mRNA en orina que fuera no invasivo que permitiera detectar el rechazo mediado por anticuerpos después del trasplante renal, basado en algunos estudios donde se empezó con la estandarización de esta técnica en orina.<sup>139</sup>

Grandes hallazgos en años recientes en estudios de biomarcadores han indicado que la expresión de genes o concentración de proteínas en muestras no invasivas como células sanguíneas, suero u orina pueden ser marcadores diagnósticos de rechazo del injerto evitando la necesidad de biopsia,<sup>139,140</sup> como lo demuestra Matz y cols. que encontraron significancia estadística en la expresión de mRNA de Mica-A, IP-10 e IL-8 en pacientes con rechazo celular, humoral, infección, y función renal estable.<sup>140</sup>

A su vez encontró niveles reducidos de expresión de mRNA de IL-8 en suero de pacientes con FI/AT comparado con los otros grupos (con rechazo humoral y celular), proponiéndolo como un método fácil y rápido de sospechar FI/AT con la simple medición de la expresión de mRNA de IL-8, lo anterior explicado por la población celular dominante en este tipo de

---

pacientes ( monocitos), y que las células productoras de IL 8 migran hacia el injerto para producir la interleucina en esa zona, lo que se ha encontrado en otras enfermedades como cirrosis, fibrosis quística o pulmones trasplantados, no así en injertos renales.<sup>142, 143</sup> sin embargo si en orina como lo han demostrado otros estudios.<sup>55</sup>

---

**3**  
**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 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 postrasplante, 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 el RNAm de 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.

---

4

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Habrá una mayor expresión en orina de mRNA que codifica para IL 2, IL 4, IL 6, IL8, IL 10, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y TGF- $\beta$  en presencia In inflamación y por ende de rechazo en pacientes trasplantados renales?

5

### **HIPÓTESIS**

Se observará una sobre expresión (2x más) en orina de mRNA de IL 2, IL 4, IL 6, IL8, IL 10, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y TGF- $\beta$  en pacientes trasplantados renales con rechazo activo vs pacientes sin rechazo activo.

6

### **OBJETIVO:**

1. General. -

Analizar los patrones de expresión de mRNA de interleucinas inflamatorias asociadas con inflamación y/o rechazo renal activo en pacientes trasplantados.

6.2 Secundarios. -



- 
1. Categorizar y obtener una n de pacientes conformada en los grupos: Con Rechazo y Sin Rechazo.
  2. Detección de mRNA específico de riñón en orina, y estandarizar la técnica.
  3. Evaluar a expresión de mRNA en biopsias de tejido.
  4. Correlacionar la expresión de mRNA de orina y riñón con los datos clínicos.

## 7

### PACIENTES Y METODOS

#### Universo estudio:

Pacientes pos trasplantados renales en el HGM con función renal estable (Creatinina < 2) después del primer mes del trasplante, con expediente clínico completo y que acudan a seguimiento en la institución.

#### Criterios de Inclusión:

- Pacientes sometidos a biopsia del injerto por cumplir 1er año pos trasplante (biopsia de protocolo indicada como seguimiento por servicio trasplantes). Del 1 enero 2017 al 31 diciembre 2018.
- Pacientes sometidos a biopsia por disfunción del injerto (elevación en 2 tomas consecutivas de > 30% de la Cr. basal o proteinuria persistente >300mg/dl).
- Sin proceso infeccioso activo. (EGO Y urocultivo normal).
- Sin alteración anatómica por USG que explique la disfunción.

---

Criterios de exclusión:

- Muestra de tejido insuficiente para clasificación BANFF o almacenar tejido.
- Muestra de orina insuficiente o sin obtención de mRNA en la misma.
- Que no deseen participar en el estudio o retirarse del mismo.

Diseño estadístico:

Tipo de Estudio. -

- Observacional.
- Transversal.
- Analítico.

Variable dependiente. - Presencia de Rechazo humoral activo. (Clasificación BANFF)

Variable Independiente. - mRNA = IL 2, IL 4, IL 6, IL8, IL 10, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y TGF- $\beta$

Covariables. - Edad, Sexo, IMC, Tipo trasplante, Tiempo a la BX, Cr, MDRD, CKD EPI,

Inducción, Inmunosupresores.

Cálculo del Tamaño de la Muestra. -

- Diferencia de Medias 2 grupos independientes  
Formula: 
$$n = \frac{2S^2 (Z\alpha + Z\beta)^2}{d^2}$$
- A una cola
- Error  $\alpha = 0.05 = 95\%$
- Error  $\beta = 0.2 =$  poder estadístico del 80%.
- $G1 = 0.35 \pm 0.45$  (FOLD CHANGE) (*MOL MED 13, VOL.5 # 6, pp: 315-324, MAY-JUNE 2007*)
- $G2 = 2.92 \pm 5.95$  (FOLD CHANGE)
- Tamaño del efecto(d)= 0.612
- Relación  $N2/N1 = 1$ 
  - Tamaño de la muestra = **58**

## ÁLISIS ESTADÍSTICO

Como paso inicial se describieron las características demográficas de los pacientes incluidos en medidas de tendencia central, y para las variables categóricas en porcentajes. Posteriormente se dividió a los pacientes en dos grupos de acuerdo con el desenlace final (con y sin rechazo), y se calcularon las diferencias con la prueba U de Mann (variables continuas) o  $\chi^2$  para variables categóricas según correspondiera. La correlación entre variables cuantitativas se analizará mediante el test de Pearson, en los que existía determinación simultánea de varias interleucinas en orina.

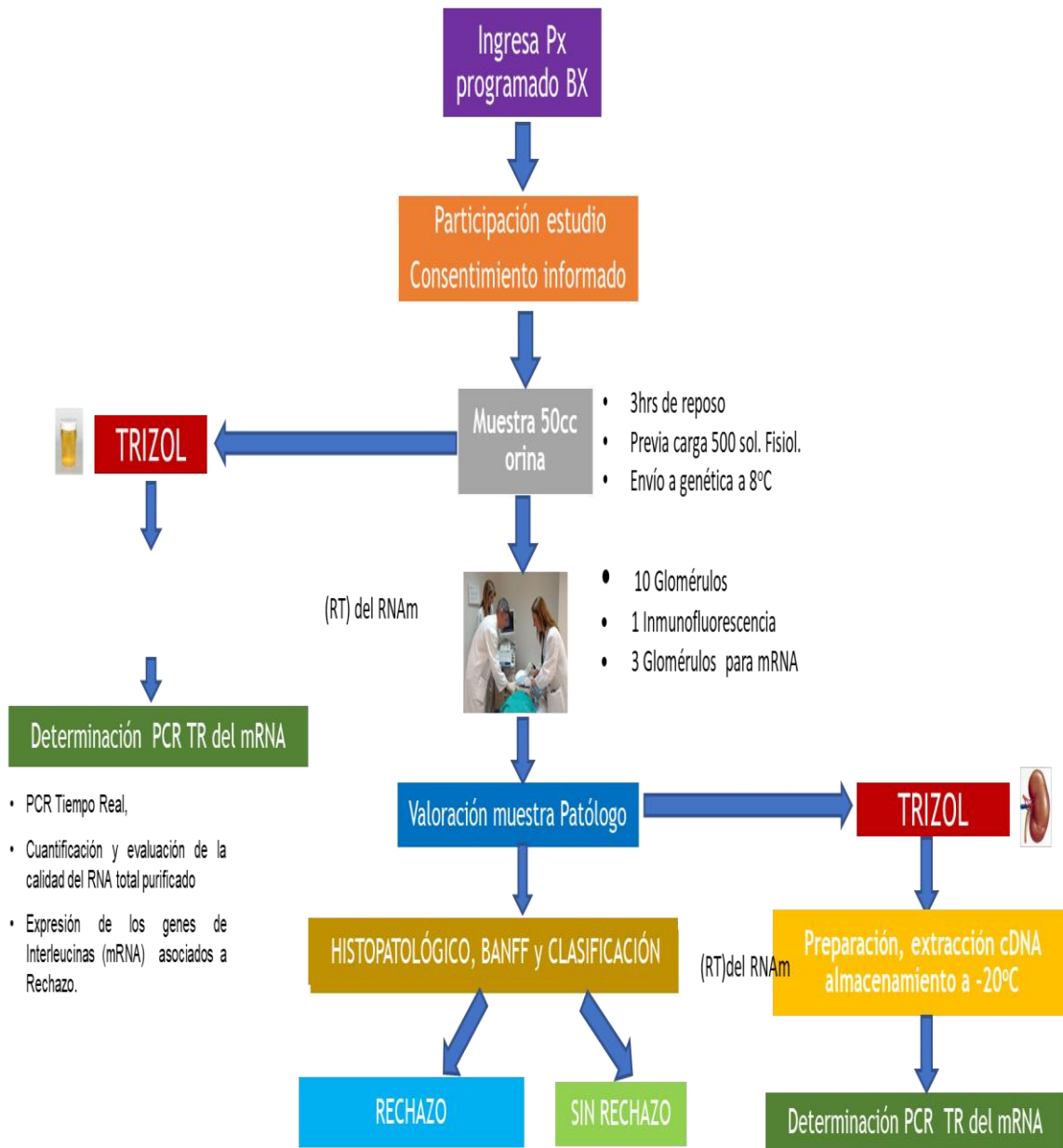
En todos los casos se considera una diferencia como significativa cuando la p sea menor de 0,05 (error alfa 5%). Para establecer el límite superior de normalidad de expresión de mRNA de las citocinas estudiadas se consideró el valor de la media más 2 desviaciones estándar (95% de la población).

Por último, se evaluó la sensibilidad y especificidad del riesgo de mortalidad obtenido de las dos escalas por separado dándose un punto de corte en el que se apreciaban los valores más altos; lo que se obtuvo calculando el área bajo la curva ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic). Se utilizaron los programas MS Excel 2016 (Microsoft USA 2017) y SPSS 22.0 (IBM 2014) para el análisis estadístico.

---

### Descripción de la Metodología. –

Pacientes a quienes se les realizó biopsia por disfunción o por protocolo postrasplante renal, fueron invitados a participar en el estudio. Se les tomó una muestra de orina (50ml) para examen general de orina y para determinación de mRNA de las interleucinas señaladas y en tejido de mRNA de las citocinas IL 2, IL 4, IL 6, IL8, IL10, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y TGF- $\beta$ , clasificándose aparte la biopsia de acuerdo a la clasificación de BANFF 2013. (Fig. 7).



**Figura 7. Diagrama de Flujo del desarrollo del Protocolo**  
Categorización y obtención una n de pacientes conformada en los grupos

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 1.72m <sup>2</sup>	5 a 20	Cuantitativa continua
Cr Biopsia	mg/dl	0.5 a 1.5	Cuantitativa continua
MDRD biopsia	mg/dl X 1.72m <sup>2</sup>	30 a 100	Cuantitativa continua
Biopsia Renal	BANF 2007	Rechazo Activo, crónico, humoral, celular	Cualitativa nominal
RNA <sub>m</sub> IL 10 RNA <sub>m</sub> INF $\gamma$ RNA <sub>m</sub> IL 2 RNA <sub>m</sub> IL 6 RNA <sub>m</sub> TGF $\beta$ RNA <sub>m</sub> TNF $\alpha$ RNA <sub>m</sub> IL 13	niveles de expresión niveles de expresión niveles de expresión niveles de expresión niveles de expresión niveles de expresión niveles de expresión		Cuantitativa Continua Cuantitativa Continua Cuantitativa Continua Cuantitativa Continua Cuantitativa Continua Cuantitativa Continua Cuantitativa Continua

**Tabla 1. Variables analizadas**

Variables: Edad, IMC, Género, tipo trasplante, No. Haplotipos, creatinina, función renal por MDRD, Clasificación BANFF, Niveles de expresión de mRNA IL 2, IL 4, IL 6, IL8, IL 10, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y TGF- $\beta$  ( tabla 1).

---

9.

**PROCEDIMIENTOS:**

- 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 16Fr (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.



**Figura 8. Imagen representativa de la realización de Biopsia Renal Percutánea Guiada por USG.**

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 mono-nucleadas	<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>

**Figura 9. Clasificación de BANFF. 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*



---

**Acute/active ABMR; all three features must be present for diagnosis<sup>1,2</sup>**

1. Histologic evidence of acute tissue injury, including one or more of the following:
  - Microvascular inflammation ( $g > 0^3$  and/or  $ptc > 0$ )
  - Intimal or transmural arteritis ( $v > 0$ )<sup>4</sup>
  - Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause
  - Acute tubular injury, in the absence of any other apparent cause
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following:
  - Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d  $> 0$  by IHC on paraffin sections)
  - At least moderate microvascular inflammation ( $Ig + ptc \geq 2$ )<sup>5</sup>
  - Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated<sup>6</sup>
3. Serologic evidence of donor-specific antibodies (DSAs) (HLA or other antigens)

**Chronic, active ABMR; all three features must be present for diagnosis<sup>1,7</sup>**

1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including one or more of the following:
  - Transplant glomerulopathy (TG) ( $cg > 0$ )<sup>8</sup>, if no evidence of chronic thrombotic microangiopathy
  - Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (requires EM)<sup>9</sup>
  - Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes<sup>10</sup>
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following:
  - Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d  $> 0$  by IHC on paraffin sections)
  - At least moderate microvascular inflammation ( $Ig + ptc \geq 2$ )<sup>5</sup>
  - Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated<sup>6</sup>
3. Serologic evidence of DSAs (HLA or other antigens)

**C4d staining without evidence of rejection; all three features must be present for diagnosis<sup>11</sup>**

1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d  $> 0$  by IHC on paraffin sections)
  2.  $g = 0$ ,  $ptc = 0$ ,  $cg = 0$  (by light microscopy and by EM if available),  $v = 0$ ; no TMA, no peritubular capillary basement membrane multilayering, no acute tubular injury (in the absence of another apparent cause for this)
  3. No acute cell-mediated rejection (Banff 97 type 1A or greater) or borderline changes
- 

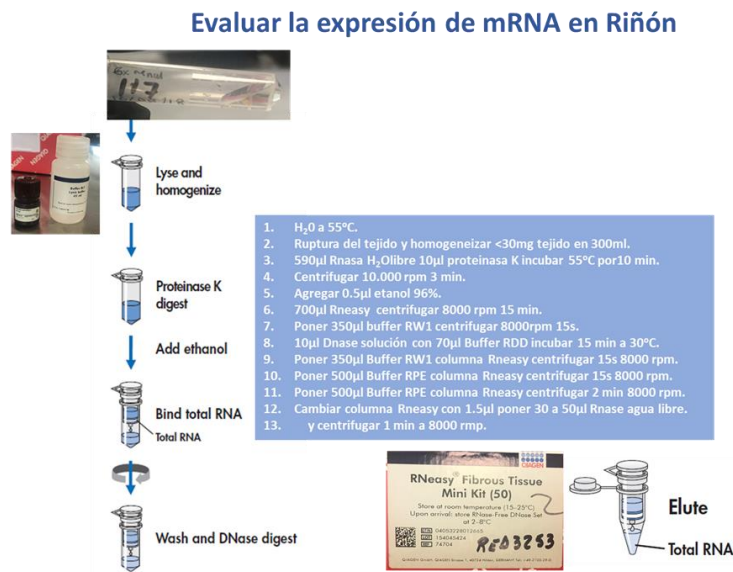
**Figura 10. Clasificación revisada (Banff 2013) de rechazo mediado por anticuerpos (ABMR) en injertos renales. *American Journal of Transplantation* 2014; 14: 272–283**

- Realización de Prueba de RNAm:

**b.1. Extracción de RNA de biopsias de tejido renal y orina:**

Para obtener el RNA total, las muestras embebidas en buffer RLT fueron lisadas utilizando un homogeneizador de tejidos (Polytron). El procedimiento fue realizado en hielo, con 1-3 impulsos de 10 seg a máxima velocidad y descansos de 20 seg. evitando calentar la muestra. Posteriormente y acorde a las instrucciones del fabricante, (Quiagen. FibrousTissue Mini Kit) la muestra fue centrifugada a 12,000 g por 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, al sobrenadante, el cual contiene el RNA, se le añadieron 200 µl de

isopropanol y esta mezcla será depositada en la columna de extracción. Se realizarán lavados a la columna y se realizará la eliminación de DNA genómico mediante un ensayo enzimático con DNAsal, seguido de lavados y la elución del RNA en 60 µl de agua libre de nucleasas. (fig. 7)



A.

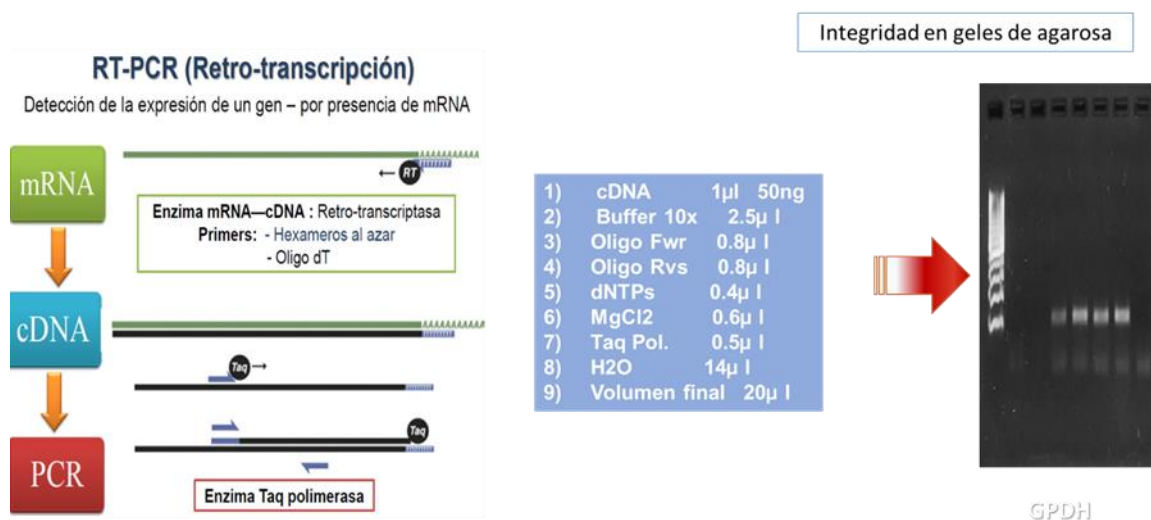
### Preparación fase 1 Extracción RNA Con TRIZOL



B.

**Figura 11. Pasos para la extracción de RNA de biopsias de tejido renal**

**b.2. Cuantificación y evaluación de la calidad del RNA total purificado:** La cuantificación del RNA total será realizada en un equipo nanodrop. Las moléculas de RNA tienen una relación de densidad óptica 260/280 mayor de 1.8 lo cual indica que el RNA se encuentra limpio de proteínas que pudieran interferir con nuestros análisis o afectar la estabilidad del RNA. Las muestras seleccionadas debieron de cumplir con este criterio. Así mismo, la integridad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa, esto con el fin de evaluar la calidad de la extracción del RNA.



**Figura 12. Estandarización de la técnica de extracción de mRNA.**  
 Se usa un gen señuelo (GPDH)

**b.3. Transcripción reversa (RT) del RNAm:** Para obtener los perfiles de expresión génica se realizó la retrotranscripción de los mensajeros de las biopsias del tejido renal y orina utilizando el RT2 FirstStrand Kit (Quiagen). De manera inicial, 3 µl (25ng) de RNA total, son

---

sumados a la mezcla que contiene: 0.80µl de primers RT 10X; 0.20 µl de dNTPs con dTTP (100mM); 1.5 µl de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/µl); 0.80 µl de buffer RT 10X; 0.90 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0.10 µl de inhibidor de RNasa (20 U/µl) y 0.20µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasa, que en total suman 7.5 µl por reacción. La mezcla fue mezclada suavemente e incubada por 5 min en hielo. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Maxygenell (Axygen), programando un ciclo de tres temperaturas a 16°C por 2 min; 42°C por 1 min; 50°C por 1 s; seguido de un paso de 85°C por 5 min y un paso final a 4°C∞. Al finalizar la reacción la mezcla fue diluida con 112.5 µl de buffer TE.

- Expresión de los genes de Interleucinas (RNAm) asociados a Rechazo.

Se analizó la expresión de las biopsias de tejido renal y orina mediante la plataforma RT-PCR Array (Quiagen), diseñada acorde a lo descrito en resultados. Estas sondas están dispuestas en placas de 96 pozos a los cuales se les agregará 20 µl de la mezcla final del Mix de reacción (100 µl del RT más 2000µl de PCR Master Mix). La placa será sellada y centrifugada a 1000 RPM por 1 min. La lectura se realizó en un equipo StepOne Plus (AppliedBiosystems) programando la reacción con un paso a 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. Los resultados fueron exportados a archivos XLS, insertados en una matriz y evaluados mediante el uso del software Quiagen PCR Analyser mediante un análisis  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . Se utilizará la expresión del grupo de pacientes sin rechazo por biopsia como calibrador y los genes de expresión constitutiva como normalizadores.

## Evaluar la expresión de RNAm en Riñón

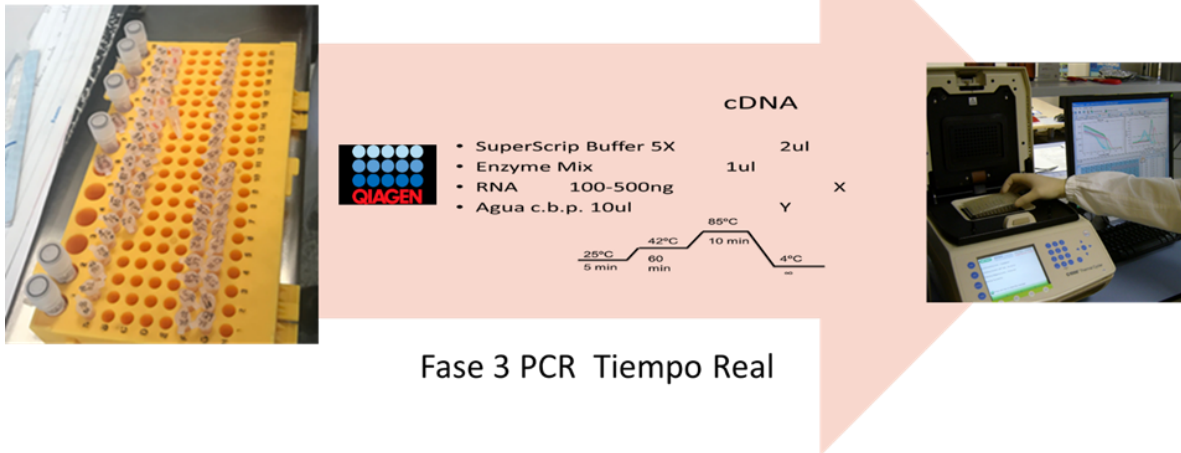


Figura 13. Aislamiento y cuantificación de mRNA de tejido y orina.

## Detección de RNAm específico de Riñón en Orina

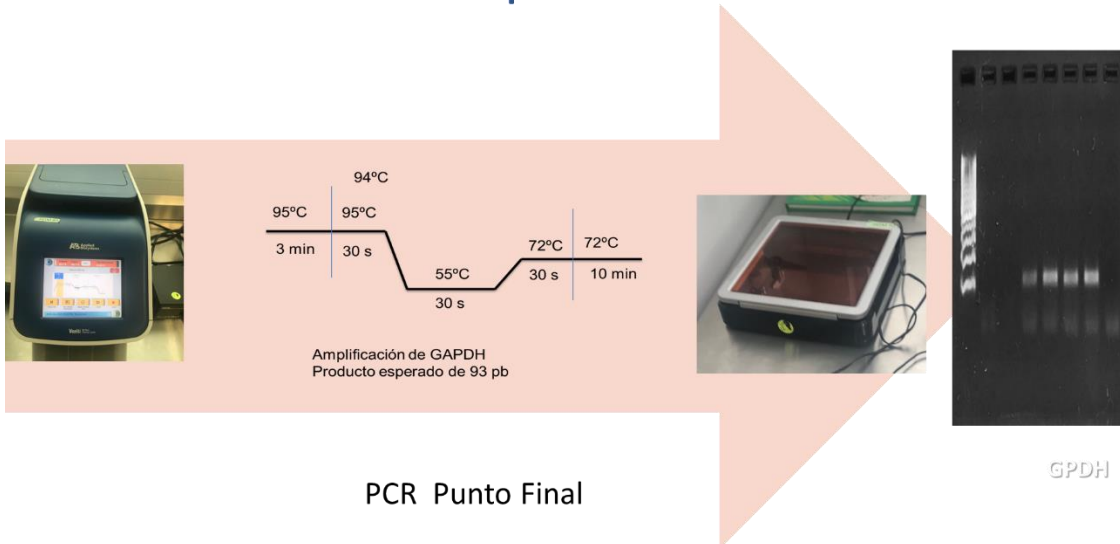


Figura 14. Detección de Gene específico renal

Las muestras de orina (50 ml) fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 min, y el mRNA se aisló de los pellets conforme al siguiente protocolo : 750 µl de Trizol fueron agregados

---

a los pellets, mezclados por inversión, y dejándose en incubación por 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente 150 µl de cloroformo fueron agregados, mezclados por inversión, y centrifugados a 11,500 rpm por 30 min a 4°C. La fase acuosa fue separada y se agregaron 375 µl de isopropanol, incubados toda una noche a -80°C, y centrifugados a 11,500 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado con 1 ml de etanol al 75%, y centrifugado a 7500 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado, y el pellet de mRNA pellet se dejó secar por 10 min. El mRNA fue suspendido nuevamente en 20 µ de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

La calidad y contaminación de las muestras fue evaluado de manera similar en el RNA obtenido de las biopsias. Las muestras de tejido fueron colectadas de las biopsias del injerto utilizando el Kit RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). La probable contaminación de DNA se evitó tratando el total de las muestras de RNA con DNA-free™ DNase (Qiagen Inc., Hilden, Germany).

#### D. Expresión de Interleucinas pro-inflamatorias y HSD11β2:

El DNA complementario (cDNA) se preparó utilizando el RT2 First Strand Kit (Qiagen, Inc.) conforme a las instrucciones del proveedor, la expresión de mRNA para IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, y IL-10; Factor de Necrosis Tumoral, interferón Gama y Factor transformador de Crecimiento β1, fueron cuantificados utilizando el método de reacción en cadena de la Polimerasa reversa (reverse transcription polymerase chain, rPCR) con el uso de primers

---

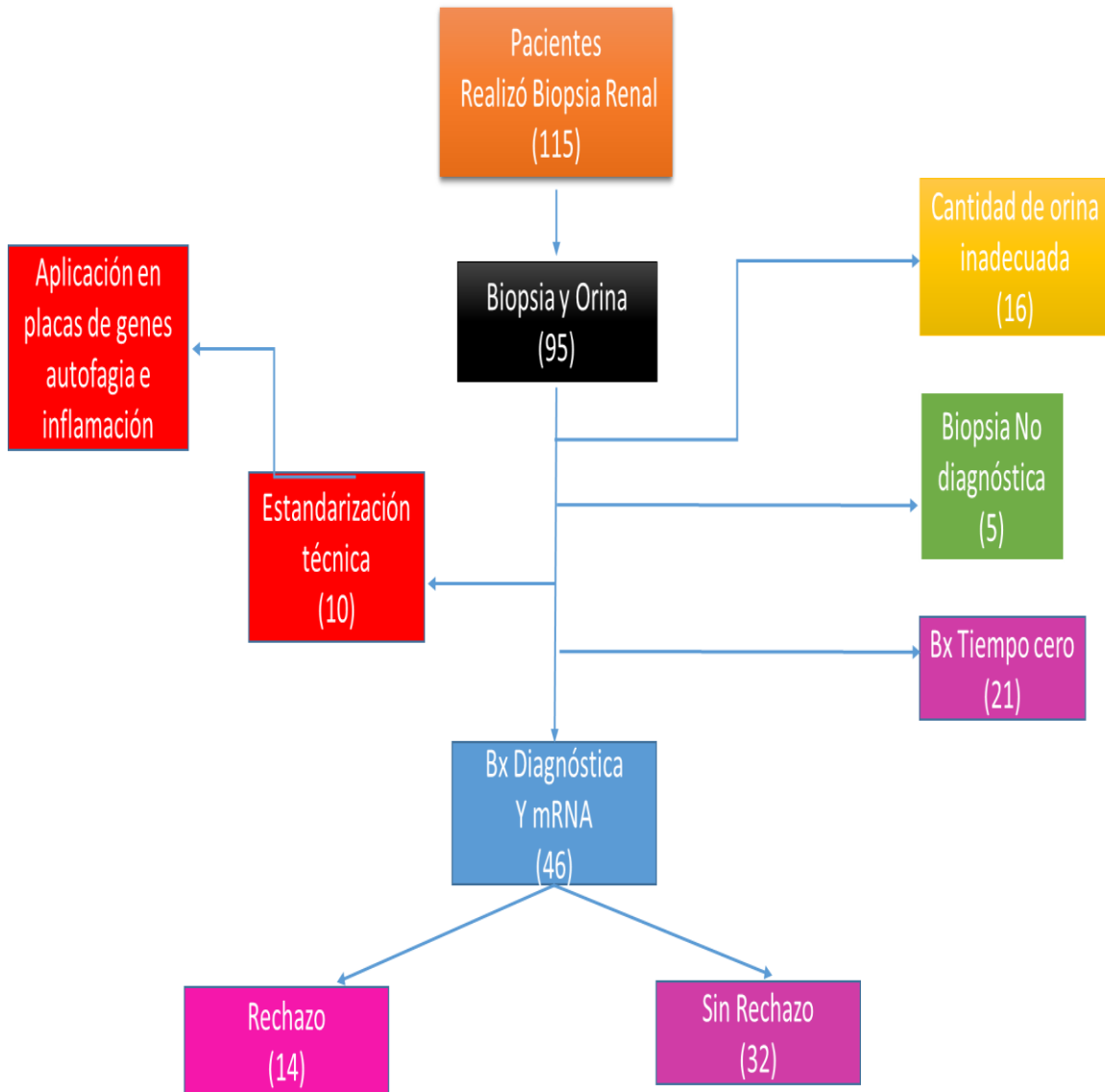
de oligonucleótidos y SYBR Green. Además, se diseñó una sonda para el gen HSD11b2, el cual tiene una expresión específica a nivel renal.

La rPCR se realizó utilizando un programa de 2 ciclos con el StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States), conforme a las instrucciones del proveedor. El número de veces de expresión (The fold-change) entre los grupos se obtuvo por el método de cálculo  $2^{\Delta\Delta CT}$ .

**10**

## **RESULTADOS**

Se incluyeron un total de 46 pacientes en el estudio. 14 con diagnóstico de rechazo humoral y 32 con diagnóstico de biopsia normal (no datos histopatológicos de rechazo), tomándose además un grupo de 11 sujetos sanos (Examen general de orina normal) para su comparación posterior con los otros 2 grupos de pacientes. Todos los casos de pacientes fueron agrupados de acuerdo con la clasificación histológica de Banff 2013. (fig. 15)



**Figura 15. Categorización y obtención una n de pacientes conformada en los grupos**

Como era de esperarse, la única diferencia clínica observada entre los pacientes con y sin rechazo fue la relativa a la función del injerto; el resto de los parámetros fue homogéneo entre los grupos (Tabla 2).

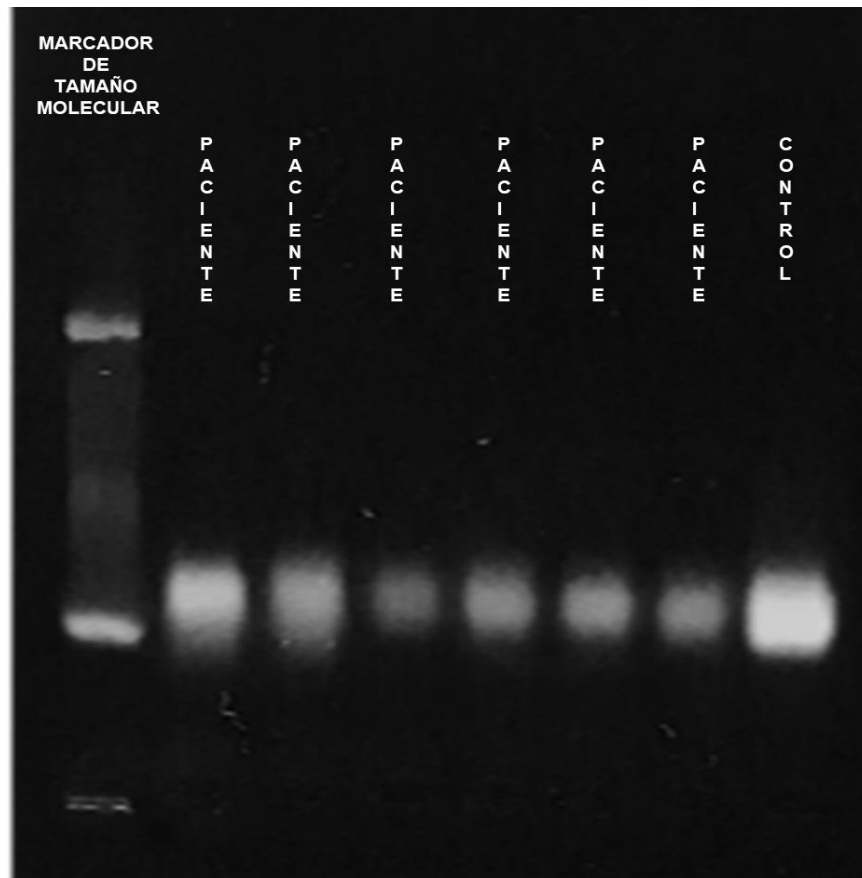


<b>Variables</b>	<b>NO RECHAZO</b>	<b>RECHAZO</b>	<b>p*</b>
<b>GÉNERO (n/%)</b>			
Masculino	18 (56.25)	5 (35.71)	
Femenino	14 (43.74)	9 (64.29)	0.200
<b>EDAD (m/RIQ)</b>	25 (22.5 – 36.00)	24.50 (23.00 -33.00)	0.549
<b>IMC (m/RIQ)</b>	23.57 (19.65-25.85)	21.94 (18.81-26.10)	0.559
<b>TIPO DONADOR (n/%)</b>			
Vivo	25 (78.13))	12 (85.71)	
Cadavérico	7 (21.88%)	2 (14.29)	0.550
Cr. Basal (m/RIQ)	1.20 (1.10 -1.45)	1.50 (1.20 -1.80)	0.156
MDRD Basal (m/RIQ)	65.80 (51.75-72.15)	48.00 (41.50 -72.70)	0.181
CKDEPI Basal (m/RIQ)	70.25 (52.40-77.50)	50.70 (42.50-76.90)	0.163
Cr Biopsia (m/RIQ)	1.40 (1.05-1.65)	1.80 (1.30-3.40)	<b>0.039</b>
MDRD Bx (m/RIQ)	60.65 (49.25 -73.20)	42.93 (35.60-49.53)	<b>0.015</b>
CKDEPI Bx (m/RIQ)	63.75 (49.50-78.40)	45.00 (37.60-52.80)	<b>0.021</b>
DBx (m/RIQ)	365.50 (217.00-395.00)	943.50 (406.00-828.00)	<b>0.001</b>
<b>TERAPIA DE INDUCCIÓN (n/%)</b>			
Basiliximab	17 (53.13)	9(64.29)	
Timoglobulina	15 (46.88)	5(35.71)	0..482
<b>INMUNOSUPRESION (n/%)</b>			
TMP	28 (87.5)	13 (92.86))	
CMP	0 (0)	1(7.14)	
TAP	1 (3.13)	0(0)	
SMP	1 (3.13)	0(0)	
TSP	2 (6.25)	0(0)	0.397
<b>NIVELES ICN (n/%)</b>			
Bajos	7 (21.88)	3 (21.43)	
Ideal	16 (50.0)	8 (57.14)	
Altos	9 (28.13)	3 (21.43)	0.877
<b>INDICACIÓN BIOPSIA (n/%)</b>			
Protocolo	25 (78.13)	3 (21.43)	
Disfunción	7 (21.88)	11(78.57)	<b>0.001</b>

**Tabla 2. Valores antropométricos, clínicos y bioquímicos de los grupos de estudio**

Datos fueron analizados usando la prueba de exacta de Fisher para variables cualitativas y la prueba Mann-Whitney U test para variables cuantitativas. Variables cuantitativas se expresan en número de pacientes (n) y porcentaje (%); las cualitativas se expresaron como medianas (m) y Rango Intercuartílico (RIQ). Valor de P significativo si  $\leq 0.05^*$ . Abreviaturas: IMC.- índice de Masa corporal; Cr basal. - Creatinina después de 3 meses de trasplante sin disfunción de aloinjerto; MDRD Basal.- Modificación de la dieta en la ecuación del estudio de la enfermedad renal (MDRD) después de 3 meses de trasplante sin disfunción de aloinjerto; CKD-EPI basal.- Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI ) ecuación después 3 meses del trasplante sin disfunción del injerto; Cr Biopsia.- Creatinina en el momento de la biopsia; MDRD Bx.- MDRD en el momento de la biopsia; CKDEPI Bx.- ecuación CKD-EPI en el momento de la biopsia; Días BX.- Días desde el trasplante hasta la biopsia; TMP.- Tacrolimus, Micofenolato y prednisona; CMP.- Ciclosporina, Micofenolato y Prednisona; TAP.-Tacrolimus, Azatioprina y Prednisona; SMP.- Sirolimus, Micofenolato y Prednisona; TSP.- Tacrolimus, Sirolimus y Prednisona. Los niveles de inhibidor de calcineurina se consideraron de esta manera: bajo < 5ng / dl, ideal de 5.1 a 10 ng / dl y alto > 10ng / dl.

Para explorar el patrón de expresión de Interleucinas en las células renales presentes en la orina, se aisló el mRNA de muestras de 50ml de orina. Para confirmar que las muestras de orina tenían células del parénquima renal, amplificamos en la orina el DNA complementario del gen HSD11b2 ; Este gen tiene una fuerte expresión renal. Todas las muestras fueron positivas para el HSD11b2 (Fig.16).



**Figura 16. Expresión del Gen HSD1182 en Células Renales de muestras de orina.** Electroforésis en gel de Agarosa al 1%. según pares de bases. El Control representan 100 Pares de Bases.

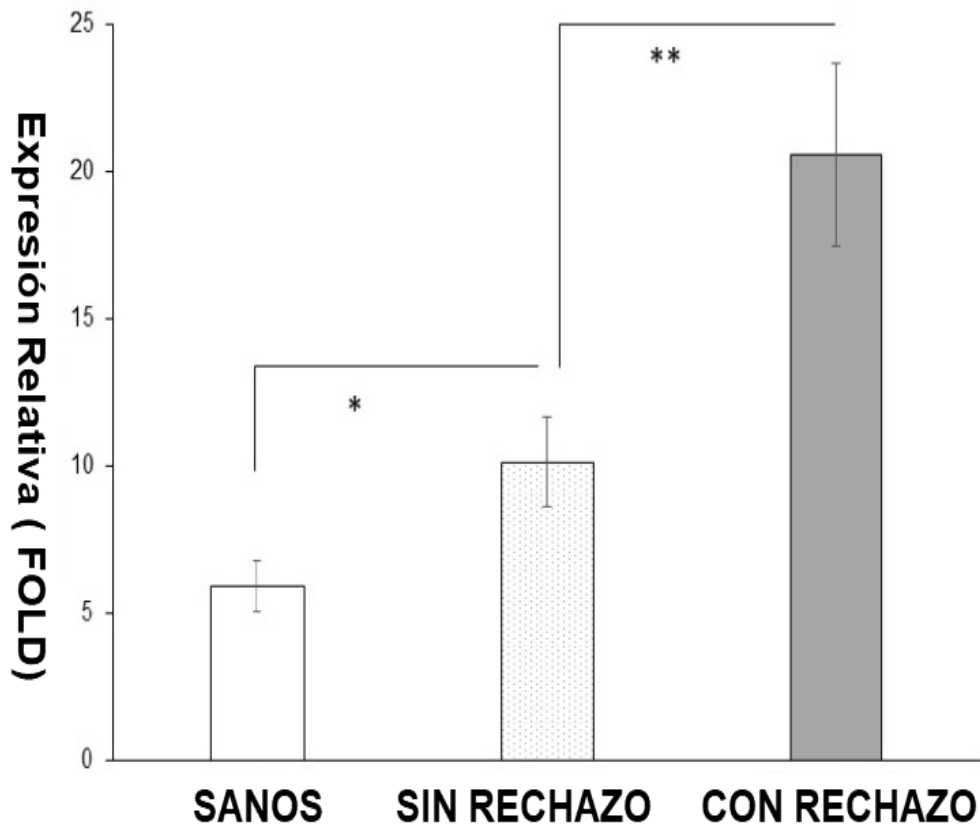
El patrón de expresión proinflamatorio de Interleucinas en las muestras de orina mostró una sobreexpresión de IL-8 ( $P < 0.0001$ ; Tabla 3) en los pacientes con rechazo vs los que no lo presentaron. No se observaron diferencias en el resto de las interleucinas analizadas.

	TOTAL		RECHAZO		NO RECHAZO		P*
	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	Mediana	RIQ	
FOLD IL2	0.07	(0.04 - 1.96)	0.08	(0.04 - 0.91)	0.06	(0.03 - 2.96)	0.984
FOLD IL4	2.14	(0.37 - 34.63)	2.89	(0.08 - 46.75)	2.08	(0.40 - 32.59)	0.887
FOLD IL6	0.12	(0.05 - 18.46)	0.42	(0.05 - 29.20)	0.11	(0.04 - 10.28)	0.611
FOLD IL8	0.38	(0.02 - 10.24)	2.57	(0.52 - 85.87)	0.06	(0.00 - 1.49)	<b>0.003</b>
FOLD IL10	3.26	(0.69 - 23.04)	6.81	(0.93 - 20.58)	1.84	(0.64 - 34.82)	0.528
FOLD INF- $\gamma$	0.63	(0.18 - 31.52)	0.63	(0.17 - 34.08)	0.56	(0.23 - 23.55)	0.919
FOLD TGF- $\beta$	0.47	(-2.36 - 3.36)	1.84	(-0.61 - 2.33)	-0.68	(-5.08 - 3.64)	0.451
FOLD TNF- $\alpha$	1.52	(0.44 - 3.70)	1.52	(0.29 - 4.37)	1.34	(0.44 - 3.70)	0.707

**Tabla 3. Patrón de expresión proinflamatorio de Interleucinas en las muestras de orina.** Se muestra la mediana y su rango intercuartil (RIQ) para cada una de las interleucinas medidas en este estudio. Se aplicó la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes. Se consideraron significativos los resultados con  $p < 0.05$ .

Posteriormente cuando comparamos los resultados en los pacientes trasplantados con rechazo versus contra el grupo de los pacientes trasplantados que no presentaban versus un grupo de sujetos aparentemente sanos, la diferencia sigue siendo consistente, lo que indica que IL-8 está sobre expresada en el grupo de rechazo de aloinjerto (Fig. 17).

Además, se observó una diferencia entre los pacientes sanos y no rechazados, lo que sugiere que IL-8 se expresa en pacientes trasplantados (Fig. 17).

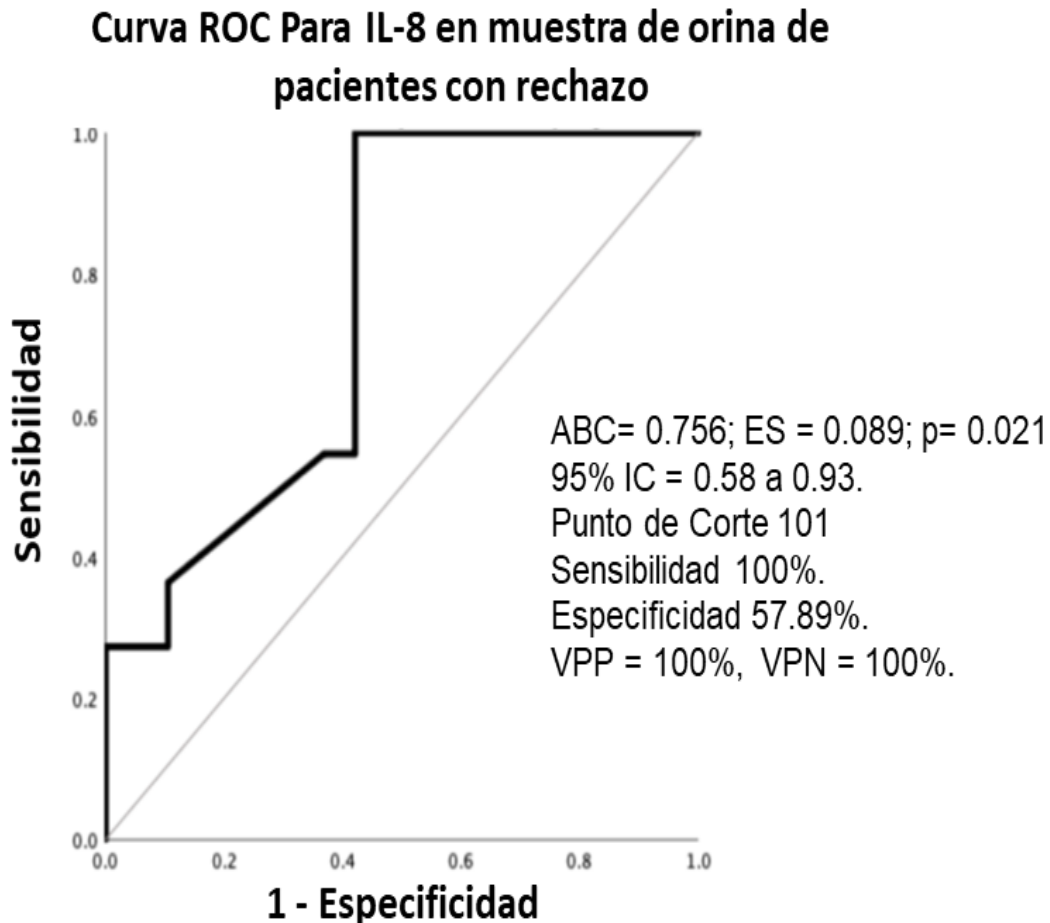


**Figura 17. Patrones de Expresión relativa de IL 8 en grupo de sanos y de pacientes trasplantados con y sin rechazo en muestras de orina.** La figura muestra la diferencia en los valores de expresión relativa de Interleucina 8 (IL 8) valorados por PCR tiempo Real; en sujetos sanos (blanco), sin rechazo (con puntos) y rechazo renal (gris). No se observaron diferencias en el resto de las interleucinas analizadas. \* P significativa < 0.05.

Los resultados hasta el momento muestran que la orina es un buen modelo biológico para identificar interleucinas inflamatorias en células de origen renal. Con los datos obtenidos y con el objetivo de identificar en un primer abordaje la sensibilidad y especificidad de la IL-8 en orina como una herramienta diagnóstica en pacientes con y sin rechazo del injerto, se realizó una curva ROC (receiver operating characteristic curve). Se identificó un área bajo la curva = 0.756 (P = 0.21), con un punto de corte para IL8 en las muestras de orina mayor a 100 cambio de veces ( 100 FOLD CHANGE) para el diagnóstico de rechazo renal , con

---

una sensibilidad del 100% y especificidad del 57.89%. El valor predictivo positivo fue de 57.89%; y el valor predictivo negativo del 100%. (Fig. 18)



**Figura 18. Curva ROC de mRNA de IL8 en muestras de orina.**  
La figura muestra la ABC= Área Bajo la Curva; ES= Error Estándar; IC= intervalo de Confianza; VPP= Valor Predictivo Positivo; VPN= Valor Predictivo Negativo

Los resultados sugieren por lo tanto que la determinación de IL 8 de por lo menos 100 veces la expresión en relación al normalizador, logra detectar el 100% de los pacientes con rechazo con una baja especificidad en lo respecta a la detección de falsos positivos. (fig. 18).

La siguiente pregunta que respondimos fue si lo observado en orina se reproducía en el tejido del injerto. Por lo tanto, en las biopsias de todos los pacientes se realizó la medición en tejido y en más de la mitad de estos también en orina; aplicando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para datos pareados, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la interleucina 6 ( $P = 0.0003$ ) donde tanto la media como la mediana de esta interleucina en tejido es menor que en orina; en INF  $\gamma$  ( $p = 0.0113$ ), la media y la mediana en tejido fue menor que en orina; y en TNF $\alpha$  se observó que la media y la mediana en tejido es mayor que en orina ( $p = 0.0090$ ) (Tabla 4).

Interleucina en Tejido.	Tejido	Orina	p*
	N=46 P(DE)	N=31 P(DE)	
IL2	2.40 (7.10)	1.27 (2.10)	0.720
IL4	15.27(29.30)	59.58(209.10)	0.149
IL6	1.34(4.93)	177.88(848.96)	<b>0.003</b>
IL8	4.32(16.06)	13.47(31.13)	0.281
IL10	99.17(421.41)	16.15(23.88)	0.720
INF- $\gamma$	2.53(14.62)	11.89(18.96)	0.330
TGF- $\beta$	19.63(43.25)	-0.53(7.93)	0.149
TNF- $\alpha$	69 (247.60)	8.97 (25.18)	0.024

**Tabla 4. Comparación de los Patrones de Expresión de interleucinas inflamatorias en mRNA. Mediciones de interleucinas en tejido y orina de acuerdo con la presencia rechazo o no.** Se aplicó la prueba de signos de rangos de Wilcoxon para datos pareados. Promedio (P) y Desviación Estándar (DE). P significativa < 0.05.

## DISCUSIÓN

El rechazo activo humoral o mixto continúa siendo una de las principales barreras para la supervivencia del injerto a mediano y largo plazo. El seguimiento de los pacientes trasplantados en la actualidad se realiza con parámetros bioquímicos que indican cuando el daño ya está instalado.<sup>17</sup> El estándar de oro para el diagnóstico sigue siendo la biopsia renal, que no está exenta de complicaciones o errores de muestreo.<sup>145,146</sup> La principal indicación para la realización de la Biopsia renal es la disfunción del aloinjerto con sospecha de rechazo, así como también está indicada como parte del protocolo de seguimiento.<sup>105,112</sup>

Para el presente trabajo de investigación resolvimos la siguiente pregunta de investigación: ¿Habrá una mayor expresión en orina de mRNAa que codifica para IL 2, IL 4, IL 6, IL8, IL 10, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y TGF- $\beta$  en presencia In inflamación y por ende de rechazo en pacientes trasplantados renales?

EL análisis de las moléculas inflamatorias en orina mostró ser una herramienta útil confiable y reproducible para hacer determinaciones semicuantitativas de moléculas que participan en el rechazo del injerto.<sup>124,140,141</sup>

Los patrones de expresión en orina de mRNA de IL-8 ( $p=0.0001$ ), mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que tuvieron rechazo del injerto diagnosticado por biopsia con los que no tuvieron. Esta observación había sido sugerida en estudios previos donde se ha demostrado que la IL-8 desempeña un papel importante en las vías inflamatorias que conducen al rechazo de aloinjertos renales.<sup>160</sup>

---

Después de iniciada la respuesta inmune contra el injerto renal es esencial un control estricto de la misma. Equipado con estrategias de defensa oxidativas y no oxidativas, los neutrófilos granulocitos juegan un papel muy importante en los eventos precoces inmunes.<sup>148</sup> Su capacidad de liberar reactantes oxidativos, trampas neutrofílicas extracelulares, enzimas degradantes, y su habilidad fagocítica, implican que el reclutamiento y activación de estos leucocitos innatos requieren de una regulación estricta; siete citoquinas neutrófilo atrayentes se han identificado como orquestadores directos de la migración y activación de neutrófilos tiempo y lugar dependientes.<sup>148,149</sup> Estas siete proteínas de bajo peso molecular quimiotácticas y angiogénicas son CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 Y CXCL8 ó IL-8, siendo esta el prototipo de la quimiocina atrayente y activadora de neutrófilos más potente en humanos.<sup>149,150,151</sup>

La IL-8, principal quimiocina de los neutrófilos, es producida por el endotelio dañado después de que la inflamación se extiende gracias a las células T y de los macrófagos a las células epiteliales del túbulo renal,<sup>48,49</sup> induciendo esta citoquina a los neutrófilos a liberar enzimas lisosomales y a aumentar las moléculas de adhesión endotelial.<sup>49,50</sup> Esto significa que una mayor cantidad de IL-8 provoca un mayor daño al parénquima renal, incluidos los túbulos renales, lo que conduce a un proceso de regeneración más prolongado.<sup>49,50</sup>

Kwon et al, examinaron el contenido de IL-8 en la orina de pacientes inmediatamente después de realizarse el trasplante renal y observaron una concentración elevada de IL-8 en aquellos pacientes que presentaron un cuadro insuficiencia renal aguda postrasplante secundaria a una necrosis tubular aguda por el daño de isquemia y reperusión del injerto,<sup>56</sup> lo que apoya el hecho de que la IL-8 es una quimiocina que se presenta típicamente en la lesión renal aguda, y que también ya había sido asociada previamente con la disfunción del



---

injerto renal.<sup>33,34</sup> Además, junto con la IL 2, estas 2 citocinas han podido predecir daño del injerto, como lo reporto Budde y Tefiki.<sup>34,35</sup>

La principal causa de la disfunción del sistema inmune después del trasplante se presenta gracias a la incompatibilidad de cualquier antígeno HLA y el rechazo del injerto.<sup>61</sup>

El trasplante ocasiona reacciones inmunes que envuelven el reconocimiento y daño activo del órgano trasplantado, que involucra a respuestas específicas por parte de células inmunocompetentes. La cuantificación de interleucinas mediadoras y de sus receptores son de utilidad al investigar los mecanismos que ocasionan el rechazo del injerto.<sup>147</sup>

Es posible que cambios a nivel molecular puedan prever algún tipo de daño histológico, y por lo tanto, demostrar el rechazo agudo y otras formas de lesión temprana de manera más precoz que las pruebas invasivas.<sup>62</sup>

Más aún, la activación de los genes para IL 2 e IL 4 se presenta antes que cualquier signo clínico de rechazo, por lo que la medición de niveles de interleucinas en receptores de trasplante renal como manera precoz de detección de rechazo puede ser una herramienta diagnóstica de utilidad.<sup>164</sup>

La medición de interleucinas, principalmente a nivel urinario, parece ser una herramienta diagnóstica de rechazo, así como un mecanismo de monitoreo indirecto del estado de la terapia inmunosupresora en el seguimiento postrasplante.<sup>148</sup>

Bude y cols. fueron de los primeros en realizar determinaciones en sangre y en orina de pacientes trasplantados renales de IL-8, mostrando niveles elevados de esta en orina, no así en sangre, de los pacientes con rechazo por biopsia y necrosis tubular aguda, demostrando su probable utilidad diagnóstica para el rechazo agudo.<sup>50</sup>

---

Rysk y cols. a su vez demostraron niveles constantes de IL 2, 6, 8 en el seguimiento de receptores de trasplante a 18 meses, relacionándolo con un nivel adecuado de inmunosupresión y adecuada tolerancia del injerto.<sup>53</sup>

Tefik y cols. Encontraron en un estudio que las concentraciones de IL2 y IL8 fueron predictores de rechazo (p 0.046 y 0.015 respectivamente), mencionado además en su estudio que los niveles de IL 8 fueron más altos al día 7 y día 28 postrasplante en los pacientes que tuvieron un rechazo, permaneciendo en promedio 11 días elevados en estos pacientes comparado con los pacientes sin rechazo ( p 0.002), correlacionando además esta interleucina con los niveles de creatinina ( r 0.621, p 0.001) lo que no se corroboró en nuestro estudio, así como la correlación con la TFGe con los niveles de IL2 e IL 8 en el grupo de los pacientes con rechazo al tercer mes pos trasplante.<sup>36</sup>

La biopsia del injerto es el estándar de oro para el diagnóstico de rechazo agudo y una guía apropiada de la terapia inmunosupresora. Sin embargo, muchos centros no la realizan de rutina durante las fases iniciales de la disfunción del injerto, por lo que una prueba no invasiva facilitaría el diagnóstico precoz de rechazo.<sup>112,68</sup> La biopsia realizada justo antes del iniciar el trasplante (o biopsia cero) permite evaluar el estado basal del injerto renal donado sin el aporte sanguíneo del receptor; la biopsia a 1hr. es la que se realiza inmediatamente después de realizar el trasplante e iniciar la reperfusión del injerto y que permite observar a la reacción inmunológica inicial así como la lesión por reperfusión. Estas 2 biopsias son importantes para evaluar el pronóstico renal tanto para receptores como donadores. La valoración histológica es basada en la clasificación de Banff.<sup>151,152</sup>

---

También es realizada por muchos centros la biopsia de protocolo a los 3 meses de manera rutinaria, utilizándola como la primera evaluación de las condiciones iniciales del injerto bajo el régimen actual de inmunosupresión. Dentro de este periodo de tiempo puede ya observarse el rechazo subclínico o clínico, y de no encontrarse estos, puede disminuirse la dosis actual de inmunosupresión.<sup>105</sup> Sin embargo la más utilizada dentro de las biopsias de protocolo es la biopsia al año de seguimiento pos trasplante, que permite buscar datos de rechazo, toxicidad por inhibidores de calcineurinas (ICN), nefropatía por virus BK, inflamación crónica o intersticial y recurrencia de la glomerulonefritis,<sup>145</sup> permitiendo además predecir la sobrevida a largo plazo del injerto al cuantificar el grado de esclerosis.

146,147

Así las biopsias de protocolo deben de ser consideradas para verificar el estado de inmunosupresión. Subsecuentemente las biopsias a 3, 5 7 y hasta 10 años deben de realizarse para evaluar la presencia de rechazo crónico mediado por anticuerpos (CABMR), que es la principal causa de pérdida del injerto.<sup>146,155</sup> De manera rutinaria en nuestro centro se realiza la biopsia tiempo cero y la biopsia de protocolo al año, por lo que en algunos pacientes el diagnóstico de rechazo fue realizado por la biopsia, antes de que se presentara la disfunción del injerto, por lo que no fue tan grande la diferencia en creatinina sérica ni en al tasa de filtrado glomerular estimada (TFGe) por formulas entre los pacientes con y sin rechazo.

Con respecto a la asociación de la IL-8 con la función renal, se encontró que concentraciones séricas elevadas de esta interleucina al primer día pos trasplante se correlacionaron de manera negativa con la creatinina y la TFGe, sugiriéndose la determinación de esta como herramienta diagnóstica de rechazo temprano.<sup>55,56</sup> En nuestro

---

estudio los niveles de IL 8 no correlacionaron con la TFG, lo que puede ser explicado por la naturaleza de la inflamación del injerto, la cual cambia con el paso del tiempo ya que va cambiando la proporción de leucocitos, macrófagos y células T conforme cambia el proceso inflamatorio o rechazo.<sup>35,36</sup>

Por lo que el uso de esta interleucina en el seguimiento postrasplante puede ser una herramienta al encontrarse elevada previamente a la disfunción del injerto a nivel sérico en los pacientes con rechazo.<sup>36</sup>

Se ha evidenciado que la IL-8, producida por el endotelio dañado, ya instalada la inflamación producida también por los macrófagos, linfocitos T y células del epitelio tubular renal,<sup>78,157,158</sup> causa daño al injerto renal al liberar enzimas lisosomales, regular al alza las moléculas de adhesión<sup>159,160</sup> y potencia la liberación de la metaloproteinasa 9 (MMP-9) la cual activa y permite la migración de los granulocitos, contribuyendo con digerir la membrana basal y por lo tanto destruyendo la barrera la barrera fisiológica que hace imposible a las células el migrar de la luz vascular al espacio extravascular,<sup>37,38,39</sup> como lo ha demostrado varios estudios que asocian la presencia de cantidades elevadas (a nivel plasmático y urinario) de MMP-9 e IL 8 con varias enfermedades renales.<sup>38, 140,158</sup>

Nuestros resultados pueden ser explicados por el extenso proceso inflamatorio que ocurre en los pacientes trasplantados con rechazo que presentan niveles más elevados de expresión de IL 8, lo que significa un mayor daño al parénquima renal, incluyendo los túbulos renales y un mayor tiempo de regeneración. Lo anterior fue demostrado por primera

---

vez en modelos animales, donde la aplicación de anticuerpos contra IL 8 prevenían la infiltración de neutrófilos y la destrucción de tejido pulmonar,<sup>160</sup> corroborado después en seres humanos por Mulligran y cols.<sup>161</sup> Posteriormente se vio a nivel renal que al disminuir el número de neutrófilos induciendo neutropenia, se disminuía el daño renal en modelos de isquemia-reperfusión.<sup>162,163</sup>

Por lo que la IL 8 es considerada no directamente responsable del daño crónico como fibrosis intersticial y atrofia tubular, como también se ha evidenciado en niveles elevados de transcriptos de IL 8 en biopsias de injerto renal se han encontrado significativamente más elevados en una hora posterior a la reperfusión en pacientes trasplantados.<sup>164</sup>

Como último punto, la pregunta que tratamos de responder fue si lo observado en orina se reproducía en el tejido del injerto, lo cual no se corrobora, dado que la afección en el rechazo no es homogénea de inicio en el injerto, dependiendo del grado de afección del sitio donde se realizó la biopsia, no así en orina, como lo demuestran autores que han conceptualizado que el injerto renal funcionaría como un citómetro de flujo in vivo; la inflamación intersticial y la tubulitis son marcas histológicas por ejemplo del rechazo celular agudo, en el cual hay infiltrados de linfocitos de linfocitos T y otras células inflamatorias destructoras del parénquima al espacio tubular y de ahí al espacio urinario, por lo que a nivel de orina habría una mayor concentración de las interleucinas producidas por esta mayor concentración local de células inflamatorias, reflejando el daño en el interior del injerto independientemente del sitio donde se haya realizado la biopsia.<sup>166</sup>

## CONCLUSIONES

Como se ha demostrado en otros estudios, que el mRNA de IL-8 podría funcionar como una herramienta de diagnóstico en casos de daño crónico secundario a fibrosis.

Se puede concluir además que a inicio de la vía de inflamación hay una sobre expresión de IL 8 activadora de neutrófilos que culmina al final con el daño renal por fibrosis intersticial y atrofia tubular, por lo que la severidad de la inflamación y rechazo que ocurre depende de la cantidad de IL 8 y puede afectar la función renal crónica.

Nuestro estudio muestra que la determinación de los niveles de interleucinas en el periodo temprano postrasplante puede ser de utilidad en el ajuste de los esquemas de inmunosupresión principalmente en pacientes con mayor riesgo de presentar rechazo.

Por lo que en un futuro tal vez se podría sospechar el diagnóstico de rechazo en muestras de orina mucho antes de que se presentase el daño en el injerto, así como disminuir el error de muestreo de la biopsia ( el daño es dependiente del sitio donde se realizó la misma ) y adecuar la inmunosupresión en cada paciente basados en el estado inmunológico reflejado por las interleucinas en orina, y no por el grado de toxicidad de medicamentos como se realiza en la actualidad en todo el mundo.

Dentro de las debilidades de este estudio se encuentran el hecho de ser realizado en un solo centro con un pequeño grupo de pacientes y de manera transversal, por lo que las conclusiones deberían de ser replicadas en un estudio prospectivo (seguimiento de

---

interleucinas a lo largo de un periodo de tiempo) con una cohorte más grande representativa de la población general de receptores de trasplante renal en nuestro país.

La medición de IL 8 a nivel urinario puede ser un marcador subrogado del estatus de inmunosupresión en los receptores de trasplante renal.

## 13

### 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 de la 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.



**REFERENCIAS**

1. Agudelo-Botero M, Valdez-Ortiz R, Giraldo-Rodríguez L, et al. Overview of the burden of chronic kidney disease in Mexico: secondary data analysis based on the Global Burden of Disease Study 2017. *BMJ Open*. 2020;10(3):e035285. Published 2020 Mar 25.
2. Crews DC , Bello AK , Saadi G , et al . Burden, access, and disparities in kidney disease. *Kidney Int* 2019;95:242–8.
3. IHME. GBD compare visualization tool, 2019. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>.
4. Foreman KJ , Marquez N , Dolgert A , et al . Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet* 2018;392:2052–90.
5. INSP. Encuesta Nacional de Salud Y Nutrición 2018 Informe de Resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018; 2020. [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut\\_2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf)
6. Carrero JJ , Hecking M , Chesnaye NC , et al . Sex and gender disparities in the epidemiology and outcomes of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:151–64.
7. ANMM. La enfermedad renal crónica en México. Hacia Una política nacional para enfrentarla, 2016. [https://www.anmm.org.mx/publicaciones/ultimas\\_publicaciones/ENF-RENAL.pdf](https://www.anmm.org.mx/publicaciones/ultimas_publicaciones/ENF-RENAL.pdf) .

- 
8. Valdez-Ortiz R , Navarro-Reynoso F , Olvera-Soto MG , et al . Mortality in patients with chronic renal disease without health insurance in Mexico: opportunities for a national renal health policy. *Kidney Int Rep* 2018;3:1171–82.
  9. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000;342:605-12.
  10. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Port FK, et al. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends over time for transplant recipients and wait-listed patients. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1293-6.
  11. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 2013;382:260-72.
  12. Garcia GG, Harden P, Chapman J, World Kidney Day Steering Committee 2012. The global role of kidney transplantation. *Lancet* 2012;379:e36e8.
  13. [http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante\\_estadisticas.html](http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html). Acceso Marzo 19, 2013.
  14. Garcia-Garcia G, Renoirte-Lopez K, Marquez-Magaña I. Disparities in renal care in Jalisco, Mexico. *Semin Nephrol* 2010;30:3e7.
  15. Rossano A, Valdez-Ortiz R, Garcia L, et al. Reproducible model to perform kidney transplantation in a low-resource population. *Transplant Proc.* 2014;46(9):3032-3038.
  16. *Reporte Anual CENATRA 2019 Donación y Trasplantes. Sistema informático del Centro Nacional de Trasplantes. México, Diciembre 2019.*
  17. Naik RH, Shawar SH. Renal Transplantation Rejection. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 30, 2020.
  18. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N. Engl. J. Med.* 2010 Oct 07;363(15):1451-62.

- 
19. Stepkowski SM. Therapeutic potential for adhesion antagonists in organ transplantati  
Mackay CR. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol*  
1993;5:423–7.
  20. Mackay CR. Immunological memory. *Adv Immunol* 1993;53:217– 65.on. *Curr Opin*  
*Organ Transplant* 2002;7:366–72.
  21. Lakkis FG. Where is the alloimmune response initiated? *Am J Transplant.*  
2003;3(3):241–2.
  22. Balin SJ, Platt JL, Cascalho M. New insights into the functions of B cells. *Pediatr*  
*Transplant.* 2008 Aug;12(5):510-5.
  23. Zhou P, et al. Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required  
for allograft responses. *Am J Transplant* 2003;3(3):259–66.
  24. Butcher EC. The regulation of lymphocyte traffic. *Curr Top Microbiol Immunol*  
1986;128:85–122.
  25. Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte  
homing. *Annu Rev Immunol* 1992;10:561–91.
  26. Santamaria-Babi LF, et al. Migration od skin-homing T cells across cytokine-  
activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-  
associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4) and the lymphocyte function-  
associated antigen-1 (LFA-1). *J Immunol* 1995;154:1543–50.
  27. Marelli-Berg FM, et al. Antigen recognition influences transendothelial migration of  
CD4+ T cells. *J Immunol* 1999;162:696–703.
  28. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, et al. Interleukin-8 is activated in patients  
with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human  
liver fibrosis. *PLoS One.* 2011;6(6): e21381.

- 
29. Jundi K, Greene CM. Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. *Biomolecules*. 2015;5(3):1386-1398.
  30. Tapia-Canelas C, Zometa R, Lopez-Oliva MO, Jimenez C, Rivas B, Escuin F, et al. Complications associated with renal graft biopsy in transplant patients. *Nefrologia*. 2014;34(1):115-9.
  31. Furness, PN.; Taub, N. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTRAP project; *Kidney Int*. 2001. p. 1998.
  32. Sakai K, Oguchi H, Muramatsu M, Shishido S. Protocol graft biopsy in kidney transplantation. *Nephrology (Carlton)*. 2018;23 Suppl 2:38-44.
  33. Stasikowska O, Wałgrowaska-Danilewicz M. Chemokines and chemokine receptors in glomerulonephritis and renal allograft rejection. *Med Sci Monit*. 2007;13: RA31–RA36.
  34. Budde K, Waiser J, Ceska M, et al. Interleukin-8 expression in patients after renal transplantation. *Am J Kidney Dis*. 1997;29:871–880.
  35. Araki M, Fahmy N, Zhou L, et al. Expression of IL-8 during reperfusion of renal allografts is dependent on ischemic time. *Transplantation*. 2006;81(5):783-788.
  36. Tefik T, Ciftci HS, Karadeniz MS, Yazici H, Oktar T, Kocak T, et al. Predictive Value of Interleukin 2 and Interleukin 8 on Early Rejection in Living Related Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc*. 2019;51(4):1078-81.
  37. Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science*. 1989; 243:1467–1469.
  38. Wu ZF, Lin WL, Lee MS, Hung NK, Huang YS, Chen TW, Lu CH. Propofol vs desflurane on the cytokine, matrix metalloproteinase-9, and heme oxygenase-1 response during living donor liver transplantation: A pilot study. *Medicine (Baltimore)*. 2019

- 
39. Kuyvenhoven JP, Verspaget HW, Gao Q, Ringers J, Smit VT, Lamers CB, van Hoek B. Assessment of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 after human liver transplantation: increased serum MMP-9 level in acute rejection. *Transplantation*. 2004 Jun 15;77(11):1646-52
  40. Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 2001;411(6836):489–94.
  41. Sarwal M, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003;349(2):125–38.
  42. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2006;6(5):394–403.
  43. Claes N, et al. B cells are multifunctional players in multiple sclerosis pathogenesis: insights from therapeutic interventions. *Front Immunol* 2015;6:642.
  44. Hinman RM, Smith MJ, Cambier JC. B cells and type 1 diabetes ...in mice and men. *Immunol Lett* 2014;160(2):128–32.
  45. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol* 2015;15(7):441–51.
  46. Kopf M, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;368(6469):339–42.
  47. Barr TA, et al. TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to *Salmonella enterica*. *J Immunol* 2010;185(5):2783–9.
  48. Rysz J, Kocur E, Blaszczak R, Bartnicki P, Stolarek RA, Piechota M. IL-2, IL-6 and IL-8 levels remain unaltered in the course of immunosuppressive therapy after renal transplantation. *Central European Journal of Medicine*. 2008;3(2):199-202.

- 
49. Kutukculer N, Clark K, Rigg KM, Forsythe JL, Proud G, Taylor RM, et al. The value of posttransplant monitoring of interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, and soluble CD23 in the plasma of renal allograft recipients. *Transplantation*. 1995;59(3):333-40.
50. Wolf M., Delgado M.B., Jones S.A., Dewald B., Clark-Lewis I., Baggiolini M. Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur. J. Immunol.* 1998;28:164–170.
51. Waiser J, Budde K, Katalinic A, Kuerzdörfer M, Riess R, Neumayer HH. Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(4):753-9.
52. Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(6):775-786.
53. Rysz J, Kocur E, Błaszczak R, Stolarek R. Integrin CD11a/CD18, CD11b/CD18 and CD69 expression in patients after renal transplantation. *Open Medicine*. 2007;2(2):154.
54. Khan A. Detection and quantitation of forty eight cytokines, chemokines, growth factors and nine acute phase proteins in healthy human plasma, saliva and urine. *J Proteomics*. 2012;75(15):4802-19.
55. Kwiatkowska E, Domański L, Bober J, Safranow K, Szymańska-Pasternak J, Sulecka A, et al. Urinary IL-8 is a marker of early and long-term graft function after renal transplantation. *Ren Fail*. 2017;39(1):484-90.
56. Kwon O, Molitoris BA, Pescovitz M, Kelly KJ. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(5):1074-87.
57. Prencipe G, Minnone G, Strippoli R, De Pasquale L, Petrini S, Caiello I, et al. Nerve growth factor downregulates inflammatory response in human monocytes through TrkA. *J Immunol*. 2014;192(7):3345-54.

- 
58. Karczewski M, Karczewski J, Poniedzialek B, Wiktorowicz K, Glyda M. Cytometric analysis of TH1/TH2 cytokines in the urine of patients undergoing kidney transplantation. *Ann Transplant.* 2009;14(3):25-8.
59. Stuart J. Knechtle, Lorna P. Marson and Peter J. Morris. (2020) *Kidney Transplantation: Principles and Practice*, (eighth edition) Philadelphia. Elsevier, Inc. pp:9-35.
60. Pallardó Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L, Franco Esteve A. Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004 Jun;19 Suppl 3: iii38-42.
61. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N. Engl. J. Med.* 2010 Oct 07;363(15):1451-62.
62. Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 2005 Jul;68(1):1-13.
63. Pallardó Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L, Franco Esteve A. Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004 Jun;19 Suppl 3:iii38-42.
64. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am. J. Transplant.* 2004 Mar;4(3):438-43.
65. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, Wainright JL, Kucheryavaya A, Woodbury M, Snyder JJ, Kasiske BL, Israni AK. OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Kidney. *Am. J. Transplant.* 2017 Jan;17 Suppl 1:21-116.
66. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:665-73.
67. Scornik JC, Guerra G, Schold JD, Srinivas TR, Dragun D, Meier-Kriesche HU. Value of posttransplant antibody tests in the evaluation of patients with renal graft dysfunction. *Am J Transplant* 2007;7:1808- 14.

- 
68. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1046-56.
69. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 1990;171:307-14.
70. Hagerty DT, Allen PM. Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. *J Immunol* 1992;148:2324-30.
71. Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, et al. Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol* 2002;169:6154-61.
72. Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, Li Q, Ruddle NH, Lakkis FG. Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am J Transplant* 2005;5:510-6.
73. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, Carter S, Cavallo T, Haas M, Lindblad A, Manivel JC, Nast CC, Salomon D, Weaver C, Weiss M. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997 Dec;8(12):1930-41.
74. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, Lopsy A, Mengel M, Perkowska-Ptasińska A, Rabant M, Racusen LC, Solez K, Becker JU. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. 2018 Nov;102(11):1795-1814.
75. Grandaliano G, et al. Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 1997;63(3):414-20.
76. Gao JW, et al. Polymorphisms in cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 influence the rate of acute rejection after renal transplantation in 167 Chinese recipients. *Transpl Immunol* 2012;26(4): 207-11.



- 
77. Smith RN, Colvin RB. Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin Immunol* 2012;24(2):115–21.
78. Sis B, et al. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009;9(10):2312–23.
79. Haas M. Pathology of C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant* 2013;18(3):319–26.
80. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15(1):42–8. 392.
81. Halloran PF, et al. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *Am J Transplant* 2013;13(11):2865–74.
82. Webster AC, Wu S, Tallapragada K, Park MY, Chapman JR, Carr SJ. Polyclonal and monoclonal antibodies for treating acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Jul 20;7:CD004756.
83. Sharif A, Shabir S, Chand S, Cockwell P, Ball S, Borrows R. Meta-analysis of calcineurin-inhibitor-sparing regimens in kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011 Nov;22(11):2107-18.
84. El Ters M, Grande JP, Keddiss MT, Rodrigo E, Chopra B, Dean PG, Stegall MD, Cosio FG. Kidney allograft survival after acute rejection, the value of follow-up biopsies. *Am. J. Transplant.* 2013 Sep;13(9):2334-41.
85. Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. *Kidney Int.* 2002 Jul;62(1):311-8.

- 
86. Tsai SF, Chen CH, Shu KH, et al. Current Safety of Renal Allograft Biopsy With Indication in Adult Recipients: An Observational Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(6):e2816.
  87. Donovan KL, Thomas DM, Wheeler DC, et al. Experience with a new method for percutaneous renal biopsy. *Nephrol Dial Transplant*. 1991;6:731–733.
  88. Yoshimoto M, Fujisawa S, Sudo M. Percutaneous renal biopsy well visualized by orthogonal ultrasound application using linear scanning. *Clin Nephrol* Aug. 1988;30:106–110.
  89. Wilczek HE. Percutaneous needle biopsy of the renal allograft. A clinical safety evaluation of 1129 biopsies. *Transplantation*. 1990;50:790–797.
  90. Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation*. 2003;76:969–973.
  91. Franke M, Kramarczyk A, Taylan C, et al. Ultrasound-guided percutaneous renal biopsy in 295 children and adolescents: role of ultrasound and analysis of complications. *PLoS One*. 2014;9:e114737.
  92. Ferreira LC, Karras A, Martinez F, et al. Complications of protocol renal biopsy. *Transplantation*. 2004;77:1475–1476.
  93. Nicholson ML, Wheatley TJ, Doughman TM, et al. A prospective randomized trial of three different sizes of core-cutting needle for renal transplant biopsy. *Kidney Int*. 2000;58:390–395.
  94. Zeigler ZR, Megaludis A, Fraley DS. Desmopressin (d-DAVP) effects on platelet rheology and von Willebrand factor activities in uremia. *Am J Hematol*. 1992;39:90–95.

- 
95. Manno C, Bonifati C, Torres DD, et al. Desmopressin acetate in percutaneous ultrasound-guided kidney biopsy: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 2011;57:850–855.
  96. Beckingham IJ, Nicholson ML, Bell PR. Analysis of factors associated with complications following renal transplant needle core biopsy. *Br J Urol.* 1994;73:13–15.
  97. Hancock WW. Chemokines and transplant immunobiology. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(3):821–4. 286.
  98. Hancock WW, et al. Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr Opin Immunol* 2003;15(5):479–86. 287.
  99. Merani S, et al. Chemokines and their receptors in islet allograft rejection and as targets for tolerance induction. *Cell Transplant* 2006;15(4):295–309.
  100. Oppenheim JJ, et al. The role of chemokines in transplantation. In: Tilney NL, Strom TB, Paul LC, editors. *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 187–200. 289.
  101. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217–42.
  102. Nauseef W.M., Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* 2014;15:602–611
  103. Lentsch AB, et al. Chemokine involvement in hepatic ischemia/ reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and KC. *Hepatology* 1998;27:1172–7.
  104. Thelen M., Stein J.V. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat. Immunol.* 2008;9:953–959
  105. Masutani K, Kitada H, Tsuchimoto A, Yamada S, Noguchi H, Tsuruya K, Tanaka M, Iida M. Usefulness of 3-month protocol biopsy of kidney allograft to detect subclinical

---

rejection under triple immunosuppression with basiliximab: a single center experience. *Clin Exp Nephrol*. 2011 Apr;15(2):264-8.

106. 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.

107. Halloran PF1. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351(26):2715-29.

108. 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.

109. Millán O, Valdivia R, Segundo S, et al. 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. *Clin Immunol* 2014 Oct;154(2):141-5

1110. Lee DW1, Faubel S, Edelstein CL. 4. Cytokines in acute kidney injury (AKI). *Clin Nephrol* 2011; 76(3):165-73.

111. 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.

112. Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, et al. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am J Transpl*. 2005;5:1992–1996.

113. Zlotnik A., Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012;36:705–716.

114. Trostel J, Garcia GE. Endogenous Inhibitors of Kidney Inflammation. *J Nephrol Res* 2015; 1(2):61-8.

115. 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-.

- 
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. 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.
- 122.
123. 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.
124. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med*. 2013;369(1):20-31.
125. 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.

- 
126. 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.
  127. Buchmann TN, Wolff T, Bachmann A, et al. Repeat true surveillance biopsies in kidney transplantation. *Transplant* 2012; 93:908–13.
  128. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006; 6(9):2006–12.
  129. 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.
  130. Gomez-Alamillo C, Benito-Hernandez A, Ramos-Barron MA, et al. Analysis of urinary gene expression of epithelial-mesenchymal transition markers in kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2010;42(8):2886-2888.
  131. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant.* 2005;5(6):1367-1374.
  132. Mas VR, Mas LA, Archer KJ, et al. Evaluation of gene panel mRNAs in urine samples of kidney transplant recipients as a non-invasive tool of graft function. *Mol Med.* 2007;13(5-6):315-324.
  133. Yannaraki M, Rebibou JM, Ducloux D, et al. Urinary cytotoxic molecular markers for a noninvasive diagnosis in acute renal transplant rejection. *Transpl Int.* 2006;19(9):759-768.
  134. Djamali A, Samaniego M. Fibrogenesis in kidney transplantation: potential targets for prevention and therapy. *Transplantation.* 2009;88(10):1149-1156.
  135. Halloran P.F., Venner J.M., Madill-Thomsen K.S. Review: the transcripts associated with organ allograft rejection. *Am J Transplant.* 2018;18(4):785–795.

- 
136. Yazdani S., Callemeyn J., Gazut S. Natural killer cell infiltration is discriminative for antibody-mediated rejection and predicts outcome after kidney transplantation. *Kidney Int.* 2019;95(1):188–198.
137. Van Loon E, Gazut S, Yazdani S, et al. Development and validation of a peripheral blood mRNA assay for the assessment of antibody-mediated kidney allograft rejection: A multicentre, prospective study. *EBioMedicine.* 2019; 46:463-472.
138. Ong S, Mannon RB. Genomic and proteomic fingerprints of acute rejection in peripheral blood and urine. *Transplant Rev.* 2015;29(2):60-67.
139. Alachkar N. Serum and urinary biomarkers in acute kidney transplant rejection. *Nephrol Ther.* 2012;8(1):13-19.
140. Matz M, Lorkowski C, Fabritius K, et al. The selective biomarker IL-8 identifies IFTA after kidney transplantation in blood cells. *Transpl Immunol.* 2016; 39:18-24.
141. Sibbring JS, Sharma A, McDicken IW, Sells RA, Christmas SE. Localization of C-X-C and C-C chemokines to renal tubular epithelial cells in human kidney transplants is not confined to acute cellular rejection. *Transpl Immunol.* 1998;6(4):203-208.
142. Langhans B, Krämer B, Louis M, Nischalke HD, Hüneburg R, Staratschek-Jox A, Odenthal M, Manekeller S, Schepke M, Kalff J, Fischer HP, Schultze JL, Spengler U. Intrahepatic IL-8 producing Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2013 Aug;59(2):229-35.
143. Jundi K, Greene CM. Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. *Biomolecules.* 2015;5(3):1386-1398.
144. Tapia-Canelas C, Zometa R, Lopez-Oliva MO, Jimenez C, Rivas B, Escuin F, et al. Complications associated with renal graft biopsy in transplant patients. *Nefrologia.* 2014;34(1):115-9.

- 
145. Williams WW, Taheri D, Tolloff-Rubin N, Colvin RB. Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nat Rev Nephrol.* 2012 Jan 10;8(2):110-21.
146. Sakai K, Oguchi H, Muramatsu M, Shishido S. Protocol graft biopsy in kidney transplantation. *Nephrology (Carlton).* 2018;23 Suppl 2:38-44.
147. Naesens M, Khatri P, Li L, et al. Progressive histological damage in renal allografts is associated with expression of innate and adaptive immunity genes. *Kidney Int* 2011; 80:1364–1376.
148. García-Covarrubias L, Ventura E, Soto V, et al. Lack of Association Between Elevated Urinary Levels of Interleukin-10 and Interferon Gamma With the Presence of Inflammation in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2016;48(2):583-587.
149. Russo R.C., Garcia C.C., Teixeira M.M., Amaral F.A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2014;10:593–619.
150. Luster A.D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 1998;338:436–445.
151. Baggiolini M. CXCL8—The First Chemokine. *Front. Immunol.* 2015;6:285
152. Haas M, Sis B, Racusen C, Solez K et al. Banff 2013 meeting report: Inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am. J. Transplant.* 2014; 14: 272–83.
153. Fahmy LM, Massie AB, Muzaale AD et al. Long-term renal function in living kidney donors who had histological abnormalities at donation. *Transplantation* 2016; 100: 1294–8.
154. Muramatsu M, Miyagi M, Ishikawa Y et al. Baseline glomerular sclerosis influences morphological changes, but not level of serum creatinine. *Transplant. Proc.* 2005; 37: 709–11.



- 
155. Cosio FG, Ei Ters M, Cornell LD, Schinstock CA, Stegall MD. Changing kidney allograft histology early posttransplant: Prognostic implication of 1-year protocol biopsies. *Am. J. Transplant.* 2016; 16: 194–203.
156. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD et al. Rates and determinants of progression to graft failure in kidney allograft recipients with de novo donor-specific antibody. *Am. J. Transplant.* 2015; 15: 2921–30.
157. Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, et al. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol.* 1990;144:2609–2613.
158. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med.* 1990;171(4):1155-62.
159. Baggiolini M, Imboden P, Detmers P. Neutrophil activation and the effects of interleukin-8/neutrophil-activating peptide 1 (IL-8/NAP-1). *Cytokines.* 1992;4:1-1.
160. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* 1994;56(5):559-64.
161. Mulligan MS, Jones ML, Bolanowski MA, Baganoff MP, Deppeler CL, Meyers DM, et al. Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. *J Immunol.* 1993;150(12):5585-95.
162. Hellberg PO, Källskog OT, Ojteg G, Wolgast M. Peritubular capillary permeability and intravascular RBC aggregation after ischemia: effects of neutrophils. *Am J Physiol.* 1990;258(4 Pt 2):F1018-25.
163. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Rodzen C, Lawrence R, et al. Postischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am J Physiol.* 1989;256(5 Pt 2):F794-802.

164. Liu KD, Altmann C, Smits G, Krawczeski CD, Edelstein CL, Devarajan P, et al. Serum interleukin-6 and interleukin-8 are early biomarkers of acute kidney injury and predict prolonged mechanical ventilation in children undergoing cardiac surgery: a case-control study. Crit Care. 2009;13(4):R104.

165. Nissaisorakarn V, Lee JR, Lubetzky M, Suthanthiran M. Urine biomarkers informative of human kidney allograft rejection and tolerance. Hum Immunol. 2018 May;79(5):343-355.

## ANEXO 1

### PLAN DE TRABAJO

	ACTIVIDAD	FECHA	LUGAR
1	SESIONES ACADEMICAS	12 de Abril al 1 Julio 2016	HMG
2	PRESENTACION PROTOCOLO	12 de Junio y 28 de Julio 2016	HGM UME UNAM
3	REVISIÓN POR EL COMITÉ	20 de Junio y 28 Julio 2016, 14	HGM
4	SELECCIÓN DE PACIENTES	1 de Septiembre 2016 al 1 de Julio 2018	HGM
5	CAPTURA DE DATOS	1 de Agosto 2016 al 31 Julio 2018	HGM depto. Trasplantes
6	ESTANDARIZACION DE LA TECNICA	1 Septiembre 2016 al 31 julio 2017	Laboratorio depto. de Genética HGM
7	TOMA DE MUESTRAS EN ORINA Y ALMACENAMIENTO	1 de Agosto 2017 al 31 de Julio 2018	HGM depto. Trasplantes
8	BIOPSIAS DE LOS INJERTOS	1 de Noviembre 2016 al 31 Julio 2018	HGM depto. Trasplantes
9	DETERMINACIÓN DE RNAm	1 de Enero 2016 al 31 de Agosto 2018	Laboratorio depto. de Genética HGM
10	CLASIFICACIÓN DE BIOPSIAS BANFF	1 de Febrero 2016 al 31 de Agosto 2018	HGM depto. De anatomía patológica
11	ANÁLISIS DE RESULTADOS	1 de Septiembre 2018 al 1 de Noviembre 2018	HGM depto. de trasplantes

---

## ANEXO 2

### HOJA 1 DE 2

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL  
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**  
**Título del protocolo: ANALISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESION DE  
CITOCINAS INFLAMATORIAS (mRNA) ASOCIADAS CON  
RECHAZO RENAL ACTIVO EN PACIENTES TRANSPLANTADOS**

Investigador principal: Dr. Luis García Covarrubias

Sede donde se realizará el estudio: Servicio de Trasplantes Unidad 310

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 denominadas en general como de RNAm de interleucinas, 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 tomarán 2 muestras de orina, una muestra (5 ml) al momento del trasplante y la otra 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: ANALISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESION DE  
CITOCINAS INFLAMATORIAS (mRNA) ASOCIADAS CON  
RECHAZO RENAL ACTIVO EN PACIENTES TRANSPLANTADOS**

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:  
Dr. Luis García Covarrubias. Celular: 044 5511245716.

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 Dirección	Lugar y Fecha Parentesco
Nombre y firma del 1er Testigo Dirección	Lugar y Fecha Parentesco

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 apegó a ella.

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