



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE

“CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS DE CO-ESTIMULACIÓN EN LA CÉLULA  
T REGULADORA EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON  
TRASPLANTE RENAL CON RECHAZO CELULAR Y HUMORAL”

### **T E S I S**

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

### **PRESENTA:**

MARCO ANTONIO CARMONA ESCAMILLA

### **CO-TUTOR**

DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA  
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga

### **CO-TUTOR**

DRA. JOSEFINA ALBERÚ GÓMEZ  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad Universitaria, CD.MX, febrero 2023



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.

Hoja frontal.....	1
Índice.....	2
Abreviaturas.....	5
Dedicatoria.....	7
Agradecimientos.....	8
Resumen.....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
I.I. Insuficiencia renal en México y en el mundo	
I.II. Trasplante renal en México y en el mundo	
<b>II. MARCO TEORICO.....</b>	<b>17</b>
II.I Célula T Reguladora	
Modelo de activación de células T	
Vías de Co-estimulación o Moléculas accesorias	
II.II Células natural killer (nk)	
II.III. Inmunología del trasplante	
Sobrevida del injerto renal	
Causas de la pérdida del injerto renal	
II.IV Fisiopatología del rechazo renal	
Rechazo hiperagudo	
Rechazo mediado por anticuerpos	
Rechazo mediado por células t	
Rechazo crónico mediado por anticuerpos	

Rechazo clínico	
clasificación de banff	
Biomarcadores de rechazo renal	
Rechazo subclínico	
<b>III.SUJETOS Y METODOS.....</b>	<b>71</b>
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>74</b>
<b>V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>75</b>
<b>VI. HIPÓTESIS.....</b>	<b>75</b>
<b>VII. OBJETIVOS.....</b>	<b>76</b>
VII.I Objetivo general	
VII.II Objetivos particulares	
<b>VIII. MATERIAL Y METODO.....</b>	<b>77</b>
ESTANDARIZACION .....	78
TITULACION DE ANTICUERPOS .....	81
ETRATEGIA DE ANALISIS .....	84
MACHINE LEARNING .....	86
<b>IX.RESULTADOS.....</b>	<b>88</b>
IX.I Análisis de poblaciones de células t reguladoras.....	90
IX.II Análisis de fenotipos celulares de vías de Co-estimulación.....	94

IX.III. Análisis de células B reguladoras y células Natural Killer .....	100
IX.IV.MACHINE LEARNING INGENIERIA DE ARIBUTOS .....	105
<b>X. DISCUSIÓN .....</b>	<b>108</b>
<b>XI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>116</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>118</b>

## ABREVIATURAS

<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica
<b>AML1</b>	Gen Leucemia mieloide aguda
<b>ANZDATA</b>	Registro australiano en materia de trasplante renal
<b>BASP1</b>	Brain Abundant Membrane Attached Signal Protein 1
<b>Bregs</b>	Células B reguladoras
<b>CAN (del inglés chronic allograft nephropathy)</b>	Enfermedad crónica del injerto
<b>CBTR</b>	células B transicionales
<b>CD (del inglés cluster differentiation)</b>	Grupo de diferenciación
<b>CENATRA</b>	CENTRO NACIONAL DE TRASPLANTE
<b>CKD (del inglés chronic kidney disease)</b>	Enfermedad crónica del riñón
<b>CMN</b>	Células mononucleadas
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>CXCL10</b>	Ligando 10 de quimiocina con motivo C- X- C
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DSA</b>	anticuerpos donador-específicos
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>Foxp3</b>	Forkhead box P3
<b>GMN</b>	Glomerulonefritis
<b>GPT</b>	Glomerulopatía del trasplante
<b>HAS (del inglés hypertension arterial systemic)</b>	Hipertensión arterial sistémica
<b>HD</b>	Hemodiálisis
<b>ICOS (del inglés inducible costimulator)</b>	Co-estimulador inducible
<b>IMF MFI (del inglés mean fluorescence intensity)</b>	intensidad media de fluorescencia
<b>ITAM</b>	Inmunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

<b>KDIGO (del inglés Kidney Disease: Improving global outcomes)</b>	Resultado global de mejoramiento de la enfermedad renal
<b>KEEP</b>	Kidney Early Evaluation Program
<b>LFA-1</b>	Lymphocyte function associated antigen
<b>NFAT</b>	El factor nuclear de las células T activadas
<b>NK</b>	CÉLULAS NATURAL KILLER
<b>PD-1</b>	Programmed Death 1
<b>TCR (del inglés T cell receptor)</b>	Receptor de célula T
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformador
<b>TR</b>	Trasplante renal
<b>Treg</b>	célula T reguladora
<b>USRDS (del inglés United States Renal Data System)</b>	Sistema de Información renal de los Estados Unidos
<b>TRRX</b>	Trasplante renal con rechazo

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico PRINCIPALMENTE a mi madre, Virginia Escamilla, mis ENORMES hermanas Aidé y Bety, mis sobrinos: Melina, Carolina, David y Miranda. También muy especialmente a Nicky, ninguna mascota sabe más de ciencia que ella, que maravilla que coincidimos. A toda mi familia les mando un fuerte fuerte fuerte abrazo.

## AGRADECIMIENTOS

A mi maestro el **Dr. Ricardo Lascurain Ledesma** a quien le debo la oportunidad de comenzar mi carrera científica y de ver la medicina del trasplante desde sus bases moleculares. Muchas gracias por haber abierto las puertas de su laboratorio a mis proyectos de inmunología del trasplante y por creer en las hipótesis planteadas desde la clínica y desde la problemática de los pacientes con trasplante renal. Agradezco a la "Universidad de la Nación, del pueblo mexicano", a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y especialmente al área de posgrado, además de ser un lugar bellissimo es un lugar cálido donde uno siempre encuentra apoyo y gestión positiva.

Quiero agradecer a dos personas que hicieron posible el haber iniciado una carrera científica, así como haber podido continuar en ella. Mi primer jefe en mi carrera profesional como Nefrólogo, el Dr. Jesús Manolo Ramos Gordillo quien con su capacidad de gestión, experiencia científica y grado en ciencias médicas me supo guiar, apoyar y motivar a seguir adelante, Manolito, muchas gracias por tu apoyo y por tu comentarios finos y puntuales en mis seminarios de investigación. Por otra parte, dentro de mi vida profesional en los servicios de salud de petróleos mexicanos, en el Hospital Central Sur de Alta Especialidad, **PICACHO** le agradezco a mi jefe el Dr. Mario Alberto Sebastián Díaz por todo el apoyo brindado a mi persona, al proyecto de inmunología y especialmente al proyecto inmunogénica del trasplante. Quiero agradecer al Hospital General de México Eduardo Liceaga por abrir las puertas de su programa en Ciencias médicas para mí, muchas gracias.

Es para mí un gran honor estar aquí concluyendo un proyecto con un trabajo de frontera, en el que he creído y gracias a todos los expertos que la UNAM ha puesto en el programa de maestría y doctorado he podido desarrollar en el mejor camino, quiero agradecer a mi comité tutor, a mi revisores y tutores: Dra. Josefina Alberú Gómez, Dra. Gloria Queipo, Dr. Eduardo Morales Buenrostro, Dra. Mara Medeiros Domingo y al Dr. Yonathan Omar Garfias y Dr. Juan Carlos López-Alvarenga.

En mi lista de agradecimientos esta de forma principal, El Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, mis maestros el Dr. Héctor Pérez Grovas, el Dr. Francisco Rodríguez y la Dra. Martha Franco Guevara, Doctora Franco le agradezco todo su apoyo desde nefrología hasta el doctorado, muchas gracias.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos, compañeros, alumnos y colegas que de alguna manera han contribuido al desarrollo de este trabajo: Michael Wasung, Raúl López, Eduardo Lara, Esaú González, Ledu Lara, José de Jesús González, Abraham Leyva, Federico Ramírez etc etc etc. No quiero dejar de agradecer a los científicos que se han sumado al proyecto de futuras líneas de investigación.

MD PhD. Carmona-Escamilla MA

Médico Internista y Nefrólogo

## RESUMEN

El trasplante renal es la mejor terapia de sustitución de la función renal, en México la mayor parte de los trasplantes son de donador vivo y no se ha logrado una mejoría significativa en la sobrevida del injerto renal a largo plazo. Actualmente el seguimiento de los pacientes sigue siendo el nivel sérico de creatinina, siendo esta de naturaleza altamente específica sin embargo con poca sensibilidad para determinar la aparición de eventos inmunológicos en el injerto renal. El estudio de las diferentes vías de Co-estimulación de la célula T podría dar una pauta en el seguimiento de los pacientes con trasplante renal sobre todo aquellos con alto riesgo inmunológico. El objetivo Evaluar la población de células T colaboradoras (CD3+, CD4+, CD25+, FOXP3+, CD279+, CD278+, CD28+, ICOS+ y NK+) en sangre periférica de pacientes con trasplante renal con evento inmunológico sea rechazo celular o humoral (TRRX) contrastado con controles. En cuanto a material, pacientes y método se realizó venopunción a pacientes con trasplante renal tanto normo evolutivos como pacientes con rechazo agudo. El grupo de estudio fue integrado por 26 pacientes con trasplante renal normo evolutivo, sin rechazo y se estudiaron tres pacientes con rechazo agudo. El protocolo fue aceptado por el comité de investigación y ética de los diferentes hospitales. Todos los participantes aceptaron voluntariamente participar previo a firma del consentimiento. La parte experimental se realizó en el Citómetro de Flujo-Cell Sorter FACSAria de 3 lasers, Becton Dickinson con cell sorter, los resultados fueron analizados en el software infinicyt cytognos versión 2.0. Los Resultados: se obtuvieron las células mononucleares mediante separación por densidades. La proporción de las células

T reguladoras en el grupo con TRRX fue de 6.7%. En el análisis de las poblaciones de células T reguladoras se encontró en el grupo de rechazo una IMF de 1348 (IC 894-1545) VS 1547 (IC 713-1984) con una  $P= 0.31$  no significativa. El análisis multiparamétrico del inmunofenotipo CD3+ CD4+ ICOS+, mostró en el grupo de rechazo una IMF de 3153 (IC 1106-7426) vs 1434(IC 771-2590) en el grupo sin rechazo ( $P= 0.04$ ). El análisis del inmunofenotipo CTLA-4 no mostró diferencia entre los grupos con IMF para el grupo de rechazo de 2601 (IC 1672-6597) vs el grupo control 2072 (IC 1217-3543) ( $P= 0.31$ ). En el caso del inmunofenotipo de CD28+ se encontró en el grupo de rechazo una IMF de 1838 IC (1313-2528) vs 1599 con una ( $P= 0.68$ ). El estudio de la población de células NK (CD16+) mostró una IMF de 32274 IC 95 (20914-64738) en los pacientes con rechazo vs 66121 IC 95 (42169-82231) en el grupo de no rechazo,  $P=0.013$ . En cuanto a conclusiones podemos emplear la citometría de flujo en el seguimiento de pacientes con trasplante renal sobre todo en aquellos con alto riesgo inmunológico ya que esta es capaz de encontrar diferencias entre los pacientes con TRRX y TRN. Estos resultados alientan a seguir explorando este modelo biológico y poder definir el comportamiento de los datos, así como su distribución estadística en los pacientes con TR y realizar contrastes con los pacientes con TRRX para poder definir el nivel de corte de proporciones de población celular como de expresión de inmunofenotipo.

## ABSTRACT

Kidney transplant is the best replacement therapy for kidney function. In México, most transplants are from living kidney donors and no significant improvement has been achieved in long-term kidney graft survival. Currently, the follow-up of patients continues to be the serum creatinine level, this being of a highly specific nature, however, with little sensitivity to determine the appearance of immunological events in the renal graft. The study of the different co-stimulation pathways of the T cell could give a guideline in the follow-up of kidney transplant patients, especially those with a high immunological risk. The objective To evaluate the population of helper T cells (CD3+, CD4+, CD25+, FOXP3+, CD279+, CD278+, CD28+, ICOS+ and NK+) in peripheral blood of renal transplant patients with immunological event, whether cellular or humoral rejection (TRRX) contrasted with controls. . In terms of material, patients and method, venipuncture was performed in patients with kidney transplants, both normally progressing and patients with acute rejection. The study group was made up of 26 patients with a normally progressing kidney transplant, without rejection, and three patients with acute rejection were studied. The protocol was accepted by the research and ethics committee of the different hospitals. All participants voluntarily agreed to participate prior to signing the consent. The experimental part was performed in the FACSAria Flow Cytometer-Cell Sorter with 3 lasers, Becton Dickinson with cell sorter, the results were analyzed in the software infinicyt cytognos version 2.0. The Results: Mononuclear cells were obtained by density separation. The proportion of regulatory T cells in the TRRX group was 6.7%.

In the analysis of the populations of regulatory T cells, an IMF of 1348 (IC 894-1545) VS 1547 (IC 713-1984) was found in the rejection group with a non-significant P= 0.31. The multiparametric analysis of the CD3+ CD4+ ICOS+ immunophenotype showed an IMF of 3153 (IC 1106-7426) vs. 1434 (IC 771-2590) in the group without rejection (P= 0.04). The analysis of the CTLA-4 immunophenotype showed no difference between the groups with IMF for the rejection group of 2601 (CI 1672-6597) vs. the control group 2072 (CI 1217-3543) (P= 0.31). In the case of the CD28+ immunophenotype, an IMF of 1838 CI (1313-2528) vs 1599 with one (P= 0.68) was found in the rejection group. The study of the NK cell population (CD16+) showed an IMF of 32274 IC 95 (20914-64738) in patients with rejection vs 66121 IC 95 (42169-82231) in the non-rejection group, P=0.013. In terms of conclusions, we can use flow cytometry in the follow-up of kidney transplant patients, especially those with high immunological risk, since it is capable of finding differences between patients with RRT and NRT. These results encourage us to continue exploring and defining the behavior of the data, as well as its statistical distribution in patients with RT and to contrast it with patients with RRTX in order to define the cut-off level of proportions of both the cell population and the expression of the immunophenotype.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.I. Insuficiencia renal en México y en el mundo

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como la presencia de alteraciones en la estructura o función renal durante al menos tres meses (Of & Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, 2013). Las principales etiologías de la ERC incluyen a la diabetes mellitus, la hipertensión y la obesidad (Obrador et al., 2010). Una vez establecido el diagnóstico, el tratamiento consiste en un manejo estricto de los factores de riesgo que condicionan la progresión de la enfermedad renal con el objetivo de alargar el período de tiempo en que el paciente requerirá tratamiento sustitutivo de la función renal (Levey et al., 2012).

La ERC es un problema de salud pública global, no solo por el aumento continuo de esta enfermedad, también por el aumento en la prevalencia de enfermedades que la predisponen. En México la diabetes pasó de tener una prevalencia de 9.2% en el 2012 en la población general a 10.3 %, en 2018. Este aumento también se observó en la prevalencia de hipertensión, que fue del 16.6 % en el 2012 al 18.4% en el 2018 y finalmente en la obesidad y sobrepeso mostrados en la más reciente encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT 2018). Esta encuesta también muestra que la prevalencia combinada de diabetes e hipertensión es de 73 %. Más de dos tercios de la población mexicana adulta padece obesidad o sobrepeso comparado con el 60.7 % mostrado en 2012 (Shamah-Levy et al., 2020).

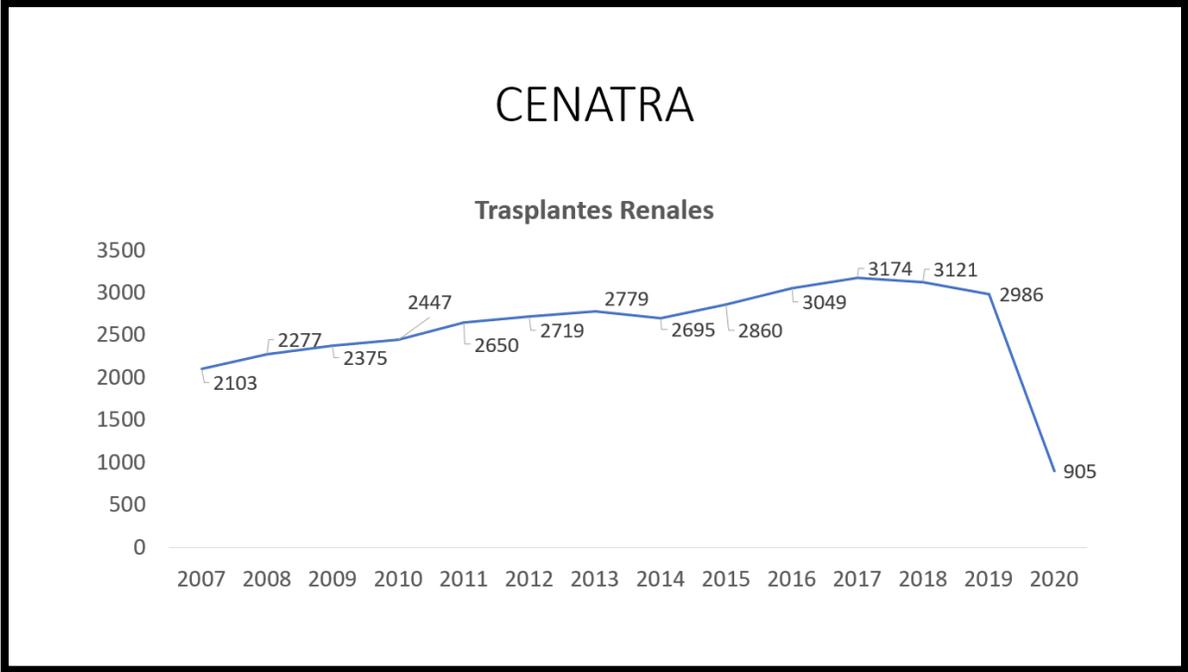
En México no hay suficientes datos sobre prevalencia e incidencia de la ERC, sin embargo, Obrador y cols., en el 2010 aplicó el *Kidney Early Evaluation Program (KEEP)* capítulo México. Los resultados mostraron una prevalencia de 22% en la

Ciudad de México y 33% en el estado de Jalisco (Obrador et al., 2010). En un panorama más global, según el registro latinoamericano de diálisis y trasplante, México se encuentra en segundo lugar de incidencia de ERC, secundario principalmente a diabetes mellitus con 420.9 casos por millón de habitantes (Maria Cusumano et al., 2016). Datos más recientes en la evolución de la ERC de acuerdo con el *Global Burden of Disease Study 2017*, demostraron que la ERC secundaria a diabetes mellitus aumentó el 49.9% en el periodo de 1990-2007 y del 29.6% en el periodo 2007-2017, la misma tendencia se mostró para la ERC secundaria a hipertensión de 47.7% y 28%, respectivamente (James et al., 2018). La prevalencia de ERC en México tuvo un aumento del 122%, con 421 casos por millón de habitantes (System, 2016).

## **I.II. Trasplante renal en México y en el mundo**

El trasplante renal (TR) es la primera opción terapéutica en la mayoría de los pacientes con insuficiencia renal crónica que llegan a requerir sustitución de la función renal (Nankivell & Kuypers, 2011). En México durante el 2019 se realizaron 2,939 trasplantes de riñón, en su mayoría de donador vivo relacionado y una proporción menor de donador cadavérico. De tal manera que durante el 2019 solo se realizó trasplante renal al 19% de los pacientes que se encontraban en la lista de espera de 16,882 (<http://cenatra.salud.gob.mx>). En la Figura 1 se observa que durante 2020 solo se realizaron 905 trasplantes renales, que representan el 5.3 % de los pacientes inscritos en la lista de espera en el mismo año, según datos del CENATRA.

**Grafica 1.** Trasplantes renales realizados por año en México, estos corresponden a la sumatoria de trasplantes de donador vivo y trasplante cadavérico. Centro Nacional de Trasplantes, 2021.



\*La caída de los trasplantes en el año 2020 está en relación con la pandemia por COVID y la suspensión de la mayoría de los programas de trasplante en México, tomado de <http://cenatra.salud.gob.mx>

## **II. MARCO TEORICO**

### **II.I Célula T Reguladora**

El fundamento de la inmunología es reconocer lo propio de lo no propio, esta capacidad ha permitido trascender a lo largo de los siglos como entes biológicos entre un sinfín de antígenos que retan nuestra supervivencia día a día. La inmunología del trasplante comienza en el mismo procedimiento quirúrgico, ya que durante la cirugía existe un daño en el endotelio del injerto renal que desencadena la exposición a antígenos de diferentes tipos, este fenómeno es propiciado por el proceso de isquemia y reperfusión

La historia de las células T reguladoras (Tregs) comienza en 1970 con Gershon and Kondo; ellos describieron que las células T no solo son capaces de aumentar la respuesta inmune, también podían amortiguarla, mediante una población diferente a las células T colaboradoras, esta población fue inicialmente llamada células T supresoras (Gershon & Kondo, 1970). La primera descripción publicada sobre las Tregs, fue a finales de los 90's (Takahashi et al., 1998; Thornton & Shevach, 1998). Se describió el inmunofenotipo CD25+ y con esto la caracterización de células T reguladoras naturales (nTregs), lo cual dio la pauta para aislar y caracterizar a esta población.

Las propiedades inmunoreguladoras de Tregs quedó demostrada por primera vez en un cultivo celular de Tregs con dos poblaciones más, CD4+ CD25- y CD8+ e inhibiendo la proliferación y activación de estas dos últimas (Takahashi et al., 1998). El siguiente descubrimiento clave en la caracterización de esta población celular fue la descripción de FoxP3 (Forkhead box P3), un factor de transcripción con función

de desarrollar la capacidad reguladora de las Tregs naturales. El gen de FoxP3 fue identificado en el 2001, su mutación es la causante de la enfermedad en el modelo murino "Scurfy mice", esto se caracteriza por el desarrollo espontaneo de manifestaciones de enfermedad autoinmune e inflamatoria como resultado de una mutación en el cromosoma X (p11.23) (Brunkow et al., 2001). Una vez hecha esta descripción, y teniendo en cuenta las similitudes del modelo "Scurfy mice" y la enfermedad en el humano caracterizada por desregulación inmune, poli endocrinopatía, enteropatía y enfermedad ligada al X (IPEX), se estableció la conexión entre la mutación de FoxP3 e IPEX, una enfermedad conocida desde 1982, descrita por Bacchetta (Bacchetta et al., 2016; Wildin R et al., 2001). El mecanismo de acción de FoxP3 es mediante la activación de un grupo de genes que directa o indirectamente forma un complejo con otros factores de transcripción como lo es NFAT y AML1/Runx1, logrando con esto la capacidad reguladora de la célula T, mediante producción de interleucinas inmunomoduladoras (Y. Wu et al., 2006).

El concepto tolerancia en inmunología es un proceso activo que tiene dos partes: la central dependiente del timo, su mecanismo es mediante la detección de clones de células T autorreactivas e inducción de apoptosis; la segunda es la tolerancia periférica, ésta tiene tres mecanismos: 1) delección clonal, 2) anergia y 3) supresión (Alessandrini & Turka, 2017). La supresión como mecanismo de tolerancia periférica ocurre en gran medida por las células Tregs, que pueden ser divididas en Tregs derivadas del timo (nTregs o tTregs) o Tregs inducidas o periféricas (iTregs o pTregs) (Shevach, 2006).

Es conocido que la participación de Tregs en trasplante es a través del desarrollo

de tolerancia, un mecanismo expuesto es el efecto supresor que tienen sobre las células T efectoras, lo que resulta en tolerancia en varios modelos murinos de trasplante de piel, páncreas, corazón, y riñones (Aluvihare & Betz, 2006). La presencia de Tregs en la biopsia del injerto ha sido asociada como predictor de buen pronóstico o como injerto estable y con adecuada inmunosupresión, especialmente en pacientes con rechazo subclínico (Bestard et al., 2008) Existe una estrecha interacción entre la respuesta celular y humoral en el escenario de rechazo. La respuesta celular en el rechazo al injerto depende de la actividad de los linfocitos T CD4+ efectores, y generalmente precede a la aparición de rechazo humoral. La población de linfocitos Tregs tiene mecanismos que han sido implicados directamente en el desarrollo de tolerancia al injerto renal y en la contención de la respuesta inmune o inmunomodulación en el rechazo. De allí la importancia de caracterizar, medir y dar seguimiento a detalle a esta subpoblación celular (Pascual, Pérez-Sáez, Mir, & Crespo, 2012). En humanos la célula Treg se caracteriza por expresar el marcador CD4+, por expresión de la unidad alfa del receptor de interleucina 2 (CD25+) y el factor de transcripción FOXP3 (Hu et al., 2016). Las células CD4+ inmaduras pueden desarrollarse a células Treg en el timo; así como en sangre periférica bajo ciertos estímulos en sus vías de co-estimulación. Independientemente del origen, las células Treg son claves en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. La evidencia en modelos animales y humanos involucran a las células Tregs en el desarrollo de tolerancia del trasplante renal, a través del reconocimiento de alo-antígenos; sin embargo, este mecanismo no está del todo dilucidado (Hall, 2015).

## **Células B reguladoras**

Las células B reguladoras (Bregs) tienen capacidad inmunosupresora que se relaciona directamente con la tolerancia inmunológica (Mauri & Bosma, 2012). Durante el proceso de inflamación, una vez que se resuelve mediante la eliminación del agente causal, comienza la reparación de los tejidos. Este control del proceso inflamatorio es mediado por una cascada de mediadores anti-inflamatorios y citoquinas, tal es el caso de la interleucina-10 (IL-10) producida por células llamadas reguladoras por su efecto inmunosupresor (Nathan & Ding, 2010). El caso contrario a lo anterior ocurre en los procesos inflamatorios crónicos, donde la activación del sistema inmune se encuentra permanentemente activada y se caracteriza por deficiencia en el número y función de células reguladoras en circulación o en el sitio de inflamación (Nathan & Ding, 2010). Las células Bregs expresan IL-10 y tiene el potencial de regular a la baja la respuesta inmune, disminuyendo las manifestaciones de enfermedades autoinmunes y el rechazo, al tiempo de limitar la inmunidad antitumoral e infecciosa. Las funciones reguladora e inmunosupresora en las células B han sido demostradas mediante modelos murinos genéticamente modificados, obteniendo fenotipos con pérdida de esta población (Wolf et al., 1996) y en otros modelos con pérdida de la función de IL-10, esto ha resultado en el desarrollo defectuoso de Bregs, así como estados de inflamación crónica (Fillatreau et al., 2002).

El fenotipo de las Bregs ha sido publicado en poblaciones celulares, aunque existe un consenso parcial, se establece que existen múltiples subpoblaciones de Bregs con diferentes funciones en similares fenotipos, **ver tabla 1**. En modelos murinos se han descritos múltiples fenotipos productores de IL-10; las Bregs de la zona

marginal (precursor) CD5+ CD1dhi B (B10), zona marginal células B Tim-1+, y células plasmáticas CD138+ (Rosser & Mauri, 2015). En humanos existen varios inmunofenotipos que definen las Bregs; CD19+ CD24hi+ CD38hi CD1dhi (P. A. Blair et al., 2010); otro fenotipo es; CD19+ CD24hi+ CD27+ (Iwata et al., 2011). En humanos las células B transicionales (CBTR) (CD19+ CD24hi+ CD38+) son una subpoblación de células B con capacidad reguladora. Esta subpoblación celular fue estudiada en sujetos sanos como controles, pacientes de trasplante renal con y sin rechazo, 88 pacientes trasplantados con 26-320 meses de haber sido trasplantados; 79% fueron tratados con basiliximab, en general no sensibilizados; 41 pacientes control y 47 con disfunción del injerto. Los resultados muestran que los pacientes sin rechazo tuvieron una disminución absoluta de CBTR comparados con los sujetos sanos, el índice IL-10/TNF-alfa sin diferencias significativas. En contraste, los pacientes con rechazo mostraron una disminución en el porcentaje de CBTR y una disminución de IL-10/TNF-alfa, ya que la expresión de TNF-alfa fue significativamente mayor en los pacientes con rechazo ( $13.4 \pm 1.3$  pacientes sin rechazo versus  $21.6 \pm 1.9$  para rechazo ( $p < 0.001$ )) (Cherukuri et al., 2014). La línea de células B y más específicamente las Bregs juegan un rol crucial en el desarrollo de tolerancia, en un trabajo publicado por Sagoo y cols., se comparan las proporciones de diferentes poblaciones celulares en pacientes con tolerancia contra pacientes que tiene función renal estable; los resultados expresados en intervalos de confianza 5-95%, células B 8–48 (28) 0–24 (12);  $p < 0.001$ , % NK cells 3–30 (19) 0–23 (12);  $p < 0.01$  (Sagoo et al., 2010). En otro estudio de la misma naturaleza, donde se busca la comparación de líneas celulares B, se estudió a 19 pacientes con tolerancia versus 30 pacientes sin tolerancia; los resultados (expresados en rangos

Inter cuartiles): % total de células B (cel/  $\mu$ L) 1–17 (9) vs 0–8 (4); células B totales cel/  $\mu$ L 287 vs 120 176  $p < 0.01$ ; % de células transicionales de CD19+ 0–4.5 (2) vs 0–0.2 (0.1);  $p < 0.01$ , % de células vírgenes de CD19+ 50–95 (70) Vs 10–85 (48);  $p < 0.01$  (Newell et al., 2010).

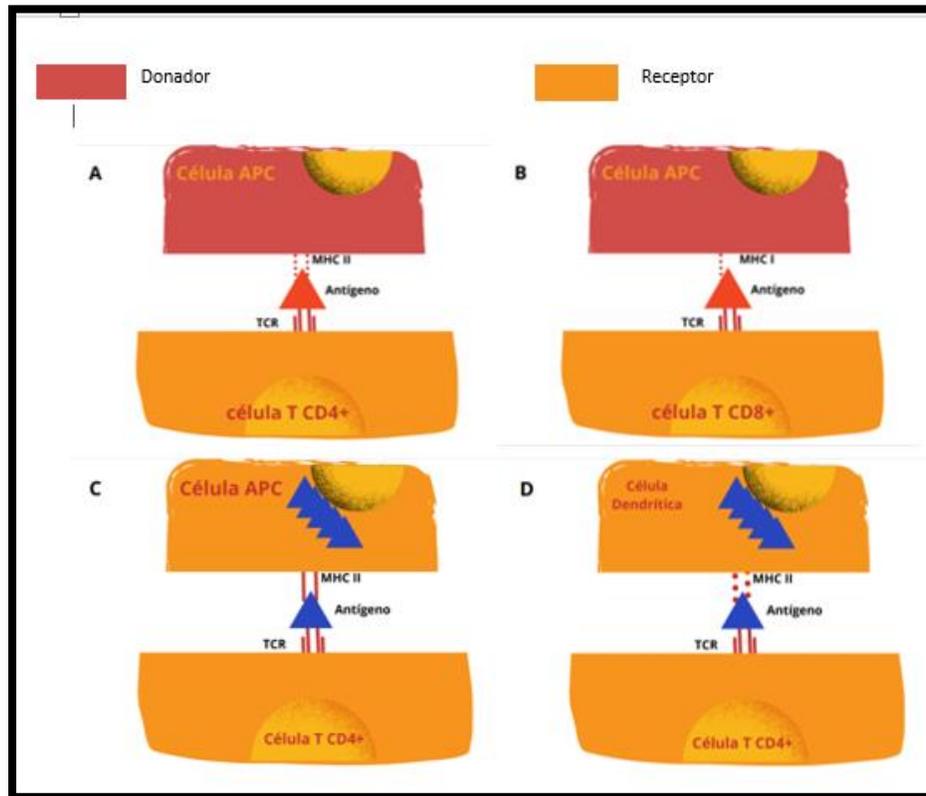
### **Modelo de activación de células T**

El sistema inmunológico reconoce lo propio y lo no propio a través de citocinas circulantes e inmunoglobulinas; así como, por macrófagos en los tractos digestivo y respiratorio. La activación celular del linfocito T en el rechazo está a cargo de la estimulación directa del receptor de célula T a través del complejo TCR-CD3 con el complejo MHC-péptido, esto último da lugar a expansión clonal siempre que exista una segunda señal mediada por las vías de Co-estimulación entre la célula T y la célula presentadora de antígeno (CPA). Naturalmente, la proporción de células T circulantes que son capaces de reaccionar ante un antígeno específico son pocas, por lo tanto, una respuesta inmune adecuada requiere de una expansión clonal y diferenciación de la célula T. Esto se logra mediante la producción de IL-2 la cual actúa de forma autócrina y parácrina en las células T no activadas (Harper et al., 2015).

Una vez detectado un antígeno no propio, éste es fagocitado y fragmentado por los macrófagos para ser presentado por su función de CPA a las células T naive y poder iniciar una respuesta inmune efectiva y específica, tanto celular como humoral. Esta activación requiere tres fases: la primera consiste en el reconocimiento del receptor de la célula T por la CPA efectuando la presentación del antígeno, la segunda es una adecuada co-estimulación por los diferentes receptores y ligando que coexisten

entre ambas células y finalmente el efecto de citocinas que se producen en la célula T, principalmente IL-2, con efecto de activación y expansión clonal. **Ver figura 1** (Morelli & Thomson, 2007).

**Figura 1. Vías de reconocimiento de la célula T**

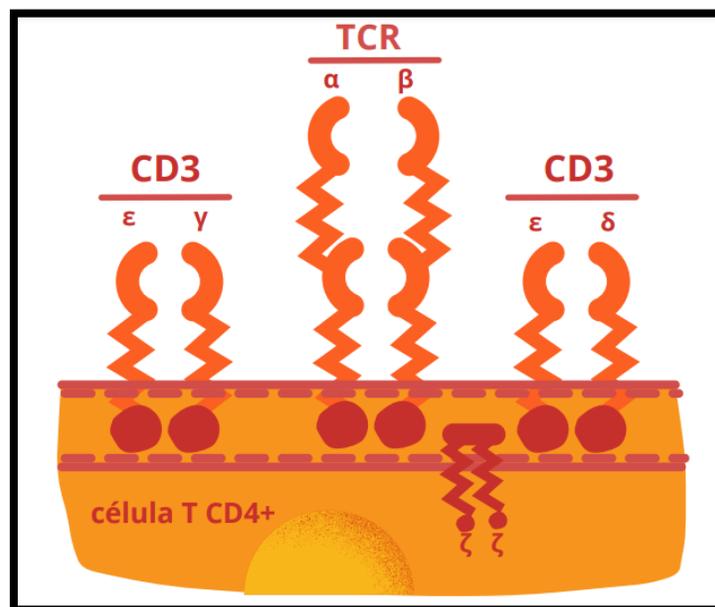


**En el panel A y B** se muestran el reconocimiento directo, los alo-antígenos de MHC clase II y clase I son reconocidos como proteínas intactas en la superficie de las CPA (APC en la Figura) del donador por las células T CD4 y CD8 respectivamente. **En el panel C Y D** se muestran el reconocimiento indirecto, los antígenos típicamente MHC del donador son procesados e internalizados por las CPA del receptor y presentados a las células T CD4 del receptor. Aunque en teoría ambas CD4 y CD8 pueden reconocer los aloantígenos presentados por la APC, la participación de CD8 es poco relevante en el escenario de rechazo. **En el panel D** se muestra el reconocimiento semidirecto, los antígenos del MHC son procesados por las CPA del receptor, y presentados de forma intacta a las células CD4 del receptor. (Abbas et al., 2017)

En la **primera fase** de activación o presentación del antígeno, un antígeno proteico es presentado por la CPA dentro del MHC de clase II al receptor de la célula T naive (TCR). Esta unión celular, llamada estimulación primaria, es estabilizada por diferentes proteínas de adhesión que se encuentran en la superficie de ambas células. El receptor de la célula T se compone de 2 cadenas polipeptídicas centrales, alfa y beta. Para formar el complejo receptor, el TCR se une a dos marcadores CD3, compuestos a su vez por las cadenas épsilon y gama o épsilon y delta **ver figura 2**. La señal es transducida por la cadena intracelular  $\zeta$  del CD3, la cual contiene los dominios ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), motivos con actividad dependiente de cinasa que se encargan de iniciar la señalización intracelular. Iniciado el reconocimiento del TCR con el MHC se activan otras proteínas en el citoplasma y en la membrana celular de ambas células, con el fin de formar un complejo estable que establezca la unión TCR/MHC para llevar a cabo las señales de transducción, que son enviadas al citoplasma por las ITAMS. Estas proteínas estabilizadoras de la familia de las integrinas, Talina y LFA-1 (*Lymphocyte function associated antigen*) presentes en la célula T se ensamblan con ICAM-1 en la APC. Esta unión permanece en la periferia de la sinapsis inmunitaria fijándola y formando el complejo de agrupamiento supramolecular de activación (p-SMAC). En el centro de la sinapsis la cola citoplásmica del TCR se adapta a PKC- $\theta$  mediante proteínas adaptadoras, formando el complejo de agrupamiento supramolecular de activación (c-SMAC) **ver figura 3** (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2017).

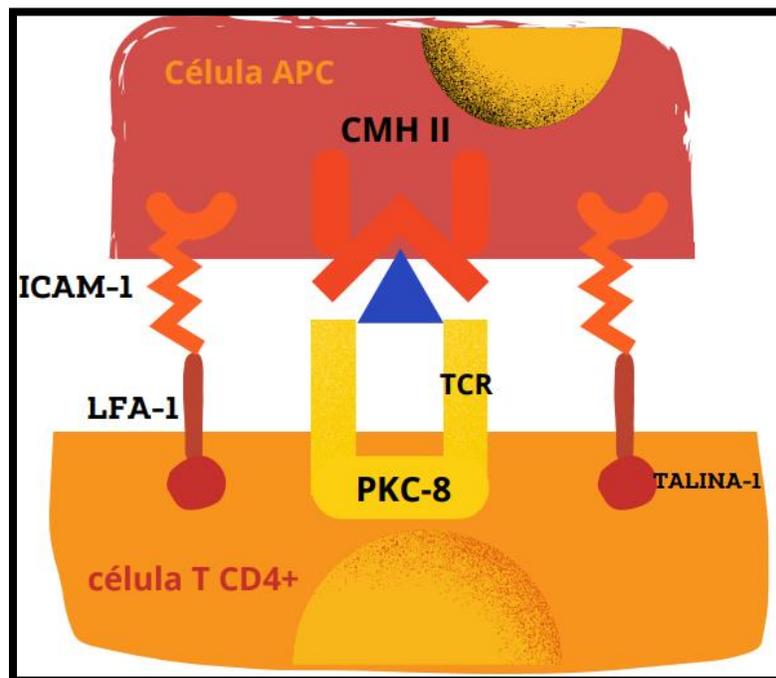
La **segunda fase** de activación de la célula T corresponde a la interacción de receptores y ligandos que se encuentran en las membranas de la célula T y la CPA, estas interacciones pueden tener como efecto un aumento en la intensidad de la respuesta inmune trayendo consigo una estimulación y expansión clonal de CD4+ más efectiva o en caso contrario una respuesta pobre o ineficaz, **ver figura 4**. La **tercera fase** o fase efectora involucra la producción de citocinas, principalmente de la interleucina 2 (IL-2). La IL-2 es secretada posterior al acoplamiento TCR/CPA, y sus máximos efectos se alcanzan en un lapso de 8-12 horas para posteriormente disminuir su concentración. Los receptores de IL-2 se concentran en la zona de la membrana donde se encuentra la sinapsis inmunológica, esta estimulación desencadena proliferación, diferenciación de linfocitos T efectores y de memoria (Boyman & Sprent, 2012).

Figura 2. Componentes del complejo de receptor de célula T



Complejo del receptor de célula T, restringido por MHC y dos cadenas alfa y beta, unido de forma no covalente a las proteínas de CD3. (Abbas et al., 2017)

**Figura 3. Sinapsis inmunitaria**



**Sinapsis inmunitaria A.** En esta imagen se muestra dos vistas de la sinapsis inmunológica en un modelo de CPA y una célula T (shown as a Nomarski image en el panel C). Talina es una proteína asociada con la cola citoplásmica de la integrina LFA-1; esta unión fue revelada mediante marcaje de un anticuerpo con fluoresceína verde y PKC- $\theta$ , asociado al complejo TCR y visualizado mediante otro anticuerpo. En los paneles a y b se observa una sección óptica del sitio de contacto de la sinapsis, se muestra la PKC- $\theta$  central y la Talina en la parte periférica de la célula T. en los paneles d-f, se muestra una vista tridimensional de la región de contacto célula T-APC. Tomado de (Abbas et al., 2017)

### **Vías de Co-estimulación o Moléculas accesorias**

Durante la activación del linfocito T, el reconocimiento del antígeno por el TCR constituye la primera señal en la respuesta inmune; además, son necesarias dos señales extracelulares distintas para inducir la proliferación y diferenciación de las células efectoras. Estas señales son llevadas a cabo por moléculas de superficie como son CD4+ y CD8+, que actúan como “correceptores”, participando en la adhesión a la célula CPA y amplificando la transducción de señales al interior celular de la célula T por ello se conocen como moléculas de Co-estimulación.

**CD4:** es una glucoproteína transmembrana de la superfamilia de inmunoglobulinas con unión al MHC -II con funciones de adhesión y señalización. Es un monómero presente en monocitos y macrófagos, tiene cuatro dominios globulares extracelulares, una región transmembrana hidrofóbica y un tallo citoplasmático.

**CD8:** glucoproteína transmembranal con unión a moléculas MHC-I. Es un heterodímero CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$ , unido por puentes disulfuro. Cada cadena posee un dominio globular extracelular, una región hidrofóbica transmembrana y una cola citoplasmática o intracelular de 25 residuos aminoácidos básicos principalmente.

Ambas moléculas facilitan la adhesión entre células T y APC, y cumplen funciones de transducción de señales a través de ICK una proteína accesoria con actividad de tirosina cinasa, que se une de forma no covalente a las colas citoplasmáticas de CD4+ y CD8+. ICK fosforila residuos de tirosina de los dominios los ITAM de CD3.

**CD28:** es un homodímero que se une a CD80 o B7-1 y CD86 o B7-2 de la CPA y

pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. El dominio citoplasmático de CD28, carece de actividad catalítica propia, pero al ser fosforilado en un residuo de tirosina por la proteína cinasa PI3K, se desencadena la producción de PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato) y PIP3 (fosfatidilinositol trifosfato) que se unen a proteínas como PDK-1 (proteína cinasa dependiente de fosfoinositol 1), que a su vez activa la proteína cinasa B (PKB/AKT). Ambas, PDK-1 y PKB, pueden fosforilar otras proteínas y regular múltiples vías ligadas a síntesis de proteínas, metabolismo celular, y supervivencia.

**CD45:** pertenece a una familia de glicoproteínas de alto peso molecular (180 - 220 kDa) con actividad tirosina cinasa, con participación importante en la regulación de la diferenciación celular. Es producido como múltiples isoformas que resultan del splicing alternativo de un mismo gen. La isoforma de bajo peso molecular, denominada CD45RO, constituye en los linfocitos T un marcador de memoria inmunológica, mientras que la forma de alto peso molecular (CD45RA) se presenta en la membrana de las células vírgenes.

**CTLA-4:** esta vía de co-estimulación mejor conocida por su acrónimo en inglés CTLA-4, es una molécula que fundamentalmente tiene el efecto de inhibir el mecanismo de acción de CD28, mediante la inmunoregulación negativa en la célula T CD4+. Este efecto también es llevado a cabo por PD-1 y BTLA, ambos miembros de la misma familia del CD28. El CTLA-4 es una glicoproteína transmembrana que se expresa como dímeros, este fenotipo se expresa en las células activadas y en las células Tregs (Abbas et al., 2017). Este receptor también se expresa

principalmente en el citoplasma, solo el 10 % se encuentra en la membrana celular. Sus ligandos naturales son las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), expresadas en las células especializadas en la presentación de antígenos como lo son linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y monocitos.

Ambas proteínas CD80 y CD86 son capaces de estimular CD28 y CTLA-4, sin embargo, el CD80 muestra una mayor afinidad por estos receptores. Lo anterior queda demostrado en los modelos murinos con mutaciones tipo pérdida de la función, donde la mutación de CD80 es bien tolerada y en el caso de CD86 se muestra significantes problemas en la respuesta inmune, como lo es la deficiencia de isotipos de anticuerpos, así como alteraciones en centro germinal. El CD86 está expresada moderadamente de forma constitutiva en las células, y rápidamente aumenta su regulación en casos de estímulos inflamatorios a diferencia de CD80 que su expresión presenta niveles más bajos y la sobreexpresión no es rápida ante procesos inflamatorios. El CD80, naturalmente coestimulador positivo en la célula T, también es directamente regulador para CTLA-4, el cual está expresado constitutivamente en las células Tregs. Los modelos murinos con mutaciones de CTLA-4 y por ende pérdida de capacidad reguladora negativa sobre el CD28, fenotípicamente son modelos con procesos de activación inmunitaria letales y una desregulación inmune sistémica con inflamación multiorgánica y muerte (Edner et al., 2020). El regulador natural de CD28, es el CTLA-4, de aquí que se han desarrollado proteínas de fusión (CTLA-4 inmunoglobulina) como herramientas terapéuticas, con la finalidad de semejar el mecanismo de acción de esta vía de inhibición.

El primer fármaco biológico fue Abatacept (Bluestone et al., 2006), usado como

tratamiento en psoriasis, posteriormente fue aprobado por la FDA para el uso de artritis reumatoide (Blair & Deeks, 2017). A partir de los resultados prometedores de este tipo de fármacos biológicos, se siguió con el desarrollo de Belatacept, éste difiere de Abatacept por dos aminoácidos en la región del receptor y con este cambio se aumenta su capacidad de fijar a CD86 cuatro veces más potente y el doble de potencia para fijar a CD80. Belatacept fue más efectivo que Abatacept para suprimir la inmunidad humoral y mejor para prevenir rechazo de injerto renal (Larsen et al., 2005). Un estudio de fase III demostró al comparar Belatacept versus Ciclosporina A, un mejor funcionamiento del injerto renal y una disminución en los efectos adversos cardiovasculares a doce meses de seguimiento; sin embargo, en el grupo de Belatacept hubo más eventos de rechazo durante el primer año de seguimiento (Vincenti et al., 2016).

Con estos trabajos queda al descubierto la importancia del conocimiento de las vías de co-estimulación y su relación con los desenlaces más importantes en el trasplante.

En este contexto, se ha demostrado que el desarrollo de tolerancia requiere la activación de vías de co-estimulación negativas como lo son CTLA-4 y PD-1, (Sharpe & Freeman, 2002). CTLA-4 fue descrito en 1987 en la superficie de linfocitos activados, pero no fue hasta 1991 que se descubrió que tanto CTLA-4 y CD28 comparten los mismos ligandos en la CPA. Finalmente, en 1995 se describe que el efecto de CTLA-4 es una regulación negativa en el proceso de activación de la célula T. Dentro de la misma familia se encuentra PD-1, molécula inhibidora inducida después de la activación de CD28 en la célula T, esta molécula induce la disminución en la proliferación celular, así como la disminución en la producción de

citoquinas por parte de la célula T. (Keir, Butte, Freeman, & Sharpe, 2008).

**SUPER FAMILIA DEL CD28:** entre las moléculas o vías de Co-estimulación más estudiadas en la célula T se encuentran la familia de CD28. Los miembros de esta familia son CD28, CTLA-4, PD-1, ICOS, BTLA y CD28H. El receptor CD28 es expresado constitutivamente en las células T y su activación disminuye significativamente el número de TCR's necesarios para que sea efectiva la activación de la célula T. Sus principales funciones son aumentar y sostener la respuesta de la señalización TCR, promover la supervivencia y la capacidad de producción de citoquinas para iniciar la expansión y diferenciación clonal de la célula T. Otra de las funciones de CD28 es aumentar la sensibilidad a IL-2 en células T previamente activadas (Abbas et al., 2017). El CD28 ha sido blanco terapéutico en varias ocasiones. El estudio TGN 1412 fue un protocolo en el que se dirigió un super agonista del CD28, con la finalidad de aumentar la proporción de las células Tregs (Attarwala, 2010). Los medicamentos biológicos, antagonistas del CD28 también han tenido su participación, en el 2014 fue publicado un trabajo donde se demostraba que, en los trasplantes renales de primates, este anticuerpo CD28 se asociaba con una disminución de la aloinmunización y con esto se lograba una reducción de la dosis de inhibidores de calcineurina (Poirier et al., 2015).

**ICOS:** la vía de Co-estimulación inducible (ICOS) fue originalmente reportada en el ser humano en células T activadas, pertenece a la familia de receptores del CD28 por su similitud estructural, el CD80 y CD86 tienen muy poca afinidad con ICOS, mientras su ligando natural se encuentra en la CPA, ICOS-L (Sharpe & Freeman, 2002). A diferencia de CD28, ICOS no se expresa constitutivamente, pero la

expresión es inducida rápidamente después del primer estímulo de TCR. ICOS está sobre expresado en las células Th2 y Th1 en fase iniciales de su diferenciación, esta sobre expresión permanece al final de la diferenciación, específicamente en Th2 (Abbas et al., 2017). También es importante señalar la asociación que tiene ICOS en la inmunidad humoral, en este sentido ICOS participa en el desarrollo de linfocitos Th foliculares, sobre expresándose en regular la reacción del centro germinal (Edner et al., 2020).

La sobre expresión de ICOS, ésta se ha sido asociado con eventos de rechazo de injerto renal, tanto agudo como crónico (Özkaynak et al., 2001). La expresión de **ICOS e ICOSL** en biopsias del injerto renal en humanos, identificó que los pacientes con rechazo crónico y glomerulopatía del trasplante (GPT) presentaban aumento de la expresión de ICOS+ intraglomerular. Lo que sugiere la participación de ICOS en el desarrollo de la nefropatía crónica del injerto, así como en la glomerulopatía del trasplante (Akalin et al., 2003). En modelos murinos la inhibición de ICOS ha mostrado sinergia con el efecto natural de CTLA-4 para inhibir la función de las células T de memoria reactivas contra el donador, logrando así aumento de la sobrevivencia de los injertos renales (Schenk et al., 2009).

En otros modelos animales también se ha demostrado una disminución en la respuesta inmune mediada por anticuerpos, en las enfermedades autoinmunes al bloquear la interacción de ICOS, esta acción se observa específicamente en las células Th foliculares (Hu et al., 2009). En el escenario clínico y ante la aparente urgencia de encontrar nuevos tratamientos en el campo de la inmunosupresión en trasplante, recientemente la inhibición de la vía de co-estimulación de ICOS-ICOS-L ha sido propuesta como posible terapéutica coadyuvante de Belatacept, en la

prevención de eventos de rechazo, sin embargo, aun con resultados inciertos, en el trasplante renal, **ver figura 5** (Lo et al., 2015).

**PD1:** la vía de Co-estimulación negativa Programmed Death 1 (PD-1), es dirigida por una proteína inducible expresada en células CD4+, CD8+, células B, células Natural Killers (asesinas naturales), monocitos, células dendríticas y células mieloides. Pertenece a la super familia de las inmunoglobulinas, tiene un dominio N-terminal IgV-like de 20 aminoácidos, separado del dominio transmembrana y del dominio citoplásmico, este último con un motivo inhibidor basado en Tirosina (ITIM) y un motivo inmunoreceptor basado en Tirosina (ITSM) (X. Zhang et al., 2004). Los ligandos naturales de PD-1 son B7-H1 (PD-L1) y B7-DC (PD-L2), el efecto de estos es inhibir la proliferación celular y la producción de citoquinas. El ligando de PD-1 es PD-L1, el cual es expresado de forma constitutiva en las células T y células B, CPA, macrófagos, células madre mesenquimales y mastocitos derivados de médula ósea. Adicionalmente PD-L1 se expresa en gran variedad de células no hematopoyéticas, incluidas, pulmón, endotelio vascular, hígado, células mesenquimales, islotes del páncreas y queratinocitos (Jin, Ahmed, & Okazaki, 2007).

En diferentes modelos con mutaciones inducidas en PD-1, se han reportado enfermedades autoinmunes, (Nishimura et al., 1999). Durante el desarrollo de las células T en timo, las poblaciones CD4- y CD8- comienzan a expresar PD-1 al tiempo de comenzar la expresión de TCR beta. PD-1 limita la fase inicial de activación y expansión de las células T auto reactivas además de restringir la función efectora y el daño a órgano o tejido de estas poblaciones celulares. La

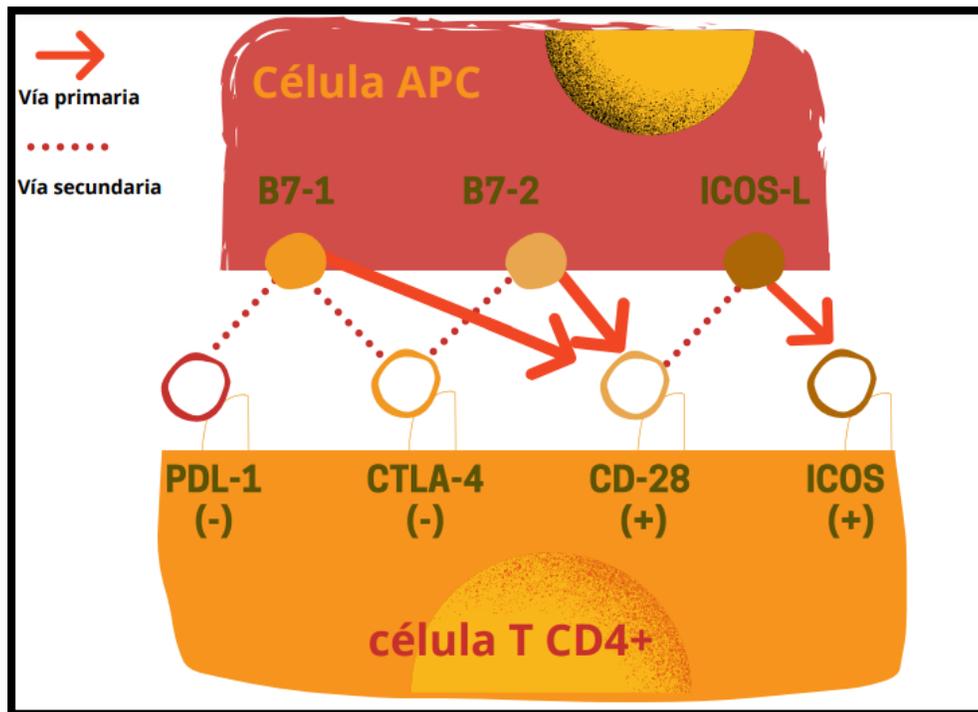
interacción de PD-1/PD-L1 también puede inhibir la expansión y diferenciación de las células T vírgenes a células efectoras. En modelos murinos con trasplante cardiaco y deficiencia del gen que codifica para PD-1 o modelos donde se bloquea PD-1 mediante el uso de anticuerpos, se mostró una sobrevida de injerto mayor en comparación con el grupo control. En otro estudio de pacientes trasplantados con rechazo renal crónico (24 pacientes) y pacientes control sin rechazo (18 pacientes), se midió mediante citometría de flujo la frecuencia de células Th foliculares (ThF) y diferentes fenotipos en la célula T, se encontró un aumento en la proporción de ThF en el grupo de rechazo ( $35.3 \pm 8.5\%$  vs.  $19.0 \pm 5.0$ ,  $P < 0.001$ ) y también se encontró una disminución en la expresión de PD-1 medida por MFI en el grupo de rechazo (Shi et al., 2015).

La importancia de la vía PD-1/PD-L1 para el desarrollo y permanencia de un estado de inmunotolerancia del injerto renal es clara y se pone de manifiesto en el escenario clínico de pacientes con trasplante renal que desarrollan una neoplasia sólida y que requieren como parte de su quimioterapia inhibidores de la vía PD-1 como parte de su tratamiento. En este sentido se publicó una serie de 22 casos con esta característica previamente señalada, donde la mayoría de los pacientes eran portadores de cáncer de pulmón y melanoma, de los 22 pacientes que recibieron algún agente biológico que bloqueaba PD-1, solo cuatro conservaron la función del injerto renal, el resto desarrollaron rechazo celular, humoral o mixto (Lai et al., 2019).

## CÉLULAS NATURAL KILLER (NK)

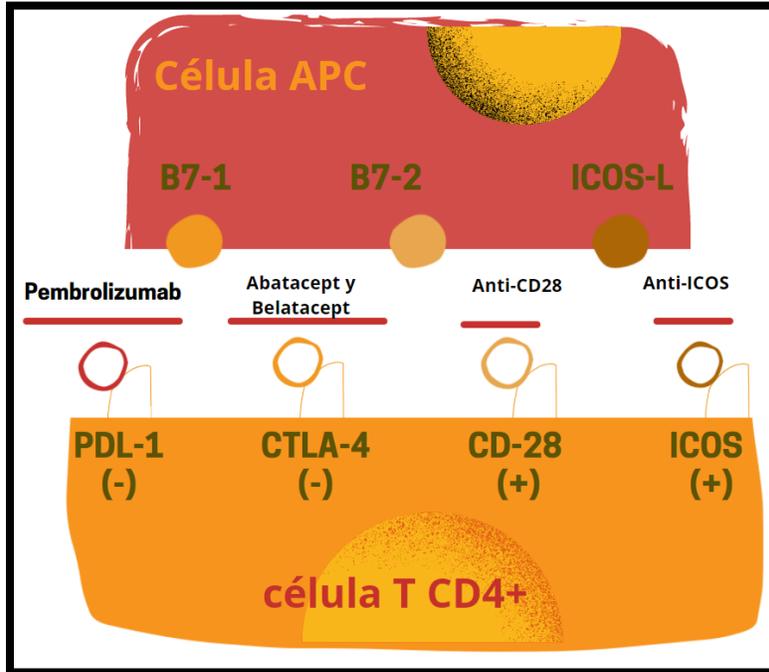
Las células Natural Killer (NK) son una población de linfocitos efectores especializados en la respuesta inmune innata que desempeñan principalmente sus efectos en mecanismos antivirales, defensa contra tumores y regula varios aspectos sobre la respuesta aloinmune en el trasplante renal, representan 5% de los linfocitos circulantes (Abbas et al., 2017). Las células NK difieren en la expresión de CD56<sup>bright</sup> y NK<sup>dim</sup>. La NK<sup>bright</sup> caracteriza a una célula NK con capacidad de secretar citoquinas inflamatorias como lo es interferón gamma y las células NK<sup>dim</sup> además de expresar altos niveles de CD16+ tienen capacidad citotóxica como parte de la inmunidad innata. Las NK tienen diferentes participaciones en el rechazo de injerto renal, sea celular o mediado por anticuerpos. El rechazo es inducido cuando la NK se encuentra en presencia de anticuerpos anti-donador específicos (DSA), mientras que la sola presencia de estos anticuerpos no es capaz de desencadenar los procesos fisiopatológicos del rechazo (Pontrelli et al., 2020) (Beilke & Gill, 2007). El fenotipo más importante de las NK en la patogénesis de rechazo mediado por anticuerpos y su citotoxicidad, es CD56<sup>dim</sup>/CD16+ (Crespo et al., 2015). Su función se demostró en un modelo murino de injerto de piel, donde se demostró que las células NK promueven tolerancia al injerto al presentar citotoxicidad dirigida contra CPA aloreactivas (Yu et al., 2006).

figura 4. Interacción de las vías de co-estimulación de la superfamilia del CD28



Reconocimiento de moléculas de Co-estimulación entre linfocitos T y CPA. Se observa CD28 y la interacción con CD80, CD86 e ICOS-L, expresados en la célula presentadora de antígenos (APC) y su contraparte en la célula T. El CTLA-4 con función primordial de co-inhibidor y compite con CD28 para coaccionar con CD80 y CD86. CD80 también puede unir a PD-L1 y finalmente ICOS compete con CD28 para ligar a ICOS-L.

**Figura 5. Inhibidores de las vías de Co-estimulación.**



Se observan los receptores en la célula T cooperadora y sus respectivos ligandos en la célula presentadora de antígenos, así como sus respectivos fármacos que bloquean cada una de las vías de co-estimulación.

## II.I. INMUNOLOGIA DEL TRASPLANTE

La importancia respecto de la inmunología se observó desde el primer trasplante realizado de forma exitosa en gemelos univitelinos sin compromiso inmunológico (Merrill et al., 1956). Actualmente los retos en materia de inmunología del trasplante han aumentado por muchas razones, ahora los pacientes a trasplantar están altamente sensibilizados, son más longevos, han sido transfundido en una o varias ocasiones y tienen acceso a segundos y terceros trasplantes (Lonze, 2017).

Las células T CD4+ y CD8+ tienen diferentes participaciones durante el rechazo. Las CD4+ tienen un rol efector y regulador. Las células CD4+ después de una adecuada estimulación y co-estimulación produce varias citocinas en grupo con acciones que pueden ser proinflamatorias o antiinflamatorias. La diferenciación a Th1 (helper 1) produce IL-2, interferón gama y linfoxina, mientras que las diferenciadas a Th2 IL-4, IL-5 e IL-10 (Wynn, 2005). Los eventos de rechazo en el injerto renal típicamente expresan RNA mensajero de ambas subpoblaciones, así como de ambos grupos de citocinas, por lo tanto, no puede separarse completamente los tipos de respuestas en los escenarios clínicos de rechazo. Las citocinas que provienen de Th1 funcionan como factores de crecimiento y diferenciación para linfocitos T citotóxicos (especialmente IL-2) y macrófagos (IFN- $\gamma$ ); por otra parte, las citocinas derivadas de Th2 tienen efectos parecidos a los que tienen las células B; además, las células Th2 interfieren en fases de maduración de las células B para la producción de anticuerpos IgG (Liston & Gray, 2014)

Las células Th17 son una subpoblación de células CD4+ que se diferenciaron

mediante el estímulo de TGF y citocinas que no provienen de Th1 ni Th2. Esta clona produce IL-17, IL-21 e IL-22, aunque este grupo de células juega un papel destacable en eventos de autoinmunidad, su papel aún se encuentra en estudio en el escenario de trasplante renal. (Ouyang et al., 2008) (Burrell & Bishop, 2010).

La función efectora del sistema inmune una vez que se ha llevado a cabo la expansión y diferenciación es la parte final de una cascada de eventos inmunológicos que concluyen en proceso inflamatorio y destrucción del tejido renal (Xian Chang.2015). La fisiopatología del rechazo es compleja de separar, ya que están ocurriendo, en un mismo tiempo, varios mecanismos efectores; sin embargo, para propósito descriptivo y académico, podríamos decir que la parte efectora se compone por: función de las células citotóxicas, respuesta inmune humoral, activación de macrófagos y activación de las células T NK (Johnson, Feehally, & Floege, 2015).

La citotoxicidad mediada por linfocitos se produce prácticamente en su totalidad por los linfocitos CD8+, sus mecanismos efectores están restringidos al CMH de clase I de tal manera que requieren contigüidad para eliminar las células. La citotoxicidad medida por CD8+ tiene dos mecanismos: el primero es la liberación de gránulos líticos a través de la perforina y la granzima B. Estas dos proteínas contenidas en estos gránulos de los linfocitos CD8+ y las células NKT. La perforina tiene la habilidad de inducir poros en la membrana celular. El complejo granzima-B/Perforina entra a la célula a través del receptor para la manosa-6 fosfato y una vez internalizado la liberación de la granzima-B induce apoptosis. Una tercera proteína es la granulosa, capaz de inducir también apoptosis en las células blanco (Barry & Bleackley, 2002). El segundo mecanismo por el cual ocurre citólisis directa

por el CD8+ es la interacción de Fas/FasL (Al-lamki et al., 2001). El Fas (CD95) miembro de la familia de receptores de TNF (factor de necrosis tumoral) es una proteína de superficie con un dominio citoplásmico capaz de activar caspasas e inducir apoptosis. (Danial & Korsmeyer, 2004).

Los macrófagos son los fagocitos más abundantes del riñón, y son una población heterogénea que no solo tiene efectos deletéreos en el tejido renal dentro del escenario de rechazo; también participan en los mecanismos proinflamatorios que regulan la respuesta inmune y no inmune en los modelos de isquemia y reperfusión post-trasplante (Li, Li, 2010). Las primeras descripciones de la participación de macrófagos y células T en el aloinjerto fue en el modelo experimental de Brent, en 1958, pocos años después del primer trasplante renal. Brent señaló la acumulación de macrófagos y células T en el rechazo del aloinjerto, una respuesta ya descrita en la hipersensibilidad de tipo retardado (L. BRENT, JEAN BROWN, 1957).

El mecanismo de lisis de los macrófagos es la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, ambos con propiedades proinflamatorias activados por IFN- $\gamma$  (Interferón gamma) (Chadban et al., 2010). Los macrófagos se acumulan en el injerto renal durante el rechazo, a través de migración y proliferación local. La acumulación es secundaria a los efectos quimiotácticos del sistema mononuclear-1 (MCP-1 y CCL2), proteína inflamatoria 1-alfa y el factor de inhibición de la migración (Grandaliano & Gesualdo, 1997) (Lan, Hui Y, Yang, Niansheng Brown, 1998).

Las células Natural Killer (NK) son linfocitos T periféricos que comparten muchas características funcionales con la célula T CD8+ (Young, 2004). Las células NK

reconocen la pérdida de moléculas HLA en las células diana susceptibles. Las células NK periféricas no requieren estimulación a diferencia de las células B y T, de tal manera que liberan gránulos citotóxicos y citocinas pro-inflamatorias como lo son TNF-alfa e IFN- $\gamma$  (Abbas et al., 2017). Los mecanismos para iniciar la actividad citolítica de las NK son a través de citocinas, unión a anticuerpos o unión con receptores Fc y ligandos. El NKG2D es uno de los receptores activadores expresado en todas las células NK y las células T CD8+. Este receptor reconoce diferentes ligandos, como MICA, MICB y ULBPs, todos estos inducidos por estrés celular e infección. El estudio mediante citometría de las células NK se definen mediante el inmunofenotipo de células mononucleadas CD3- / CD56 + / CD335 (NKp46) +. Las poblaciones de células NK se categorizan dependiendo de los niveles de expresión de CD56+ (molécula de adhesión celular neurales) en baja (CD56<sup>dim</sup>) y alta densidad (CD56<sup>bright</sup>). Esta diferencia tiene implicaciones funcionales. En caso de que se expresen niveles elevados de CD16+ corresponde a un receptor de baja afinidad de IgG, Fc $\gamma$ RIII y es la población celular efectora citotóxica (Angelo et al., 2015). Con la activación de las células CD56<sup>dim</sup> se producen gránulos citotóxicos cargados de perforina/granulosina que al ser liberados crean poros en las membranas celulares en las células objetivo e induce apoptosis (Jacobs et al., 2001). Un estudio realizado en biopsias renales donde se analizaron las diferentes poblaciones de células T en el injerto renal, se encontró que las células NK CD56<sup>bright</sup> estaban significativamente elevadas en el rechazo celular a diferencia de las células CD56<sup>dim</sup> que se encontraron elevadas significativamente en las biopsias con rechazo humoral. Además, se asoció en las biopsias con diagnóstico de rechazo humoral la presencia de niveles elevados de moléculas citotóxicas

efectoras de perforina, granzima A y granzosina (Kildey et al., 2019)

Se correlaciona la presencia de anticuerpos anti-MICA y anti-MICB con la incidencia de rechazo agudo y crónico, aumentando con esto la activación de las NK (Baltar & Ortega, 2009). Las células NK están cobrando importancia como potenciales marcadores de eventos inmunológicos asociados a rechazo de injerto renal (Zhang et al., 2015). En el campo de NK, los trabajos se enfocaron inicialmente en células de sangre periférica de pacientes con trasplante renal y estudios de transcriptómica en biopsias renales, demostraron la participación de NK en daño del injerto (Hidalgo et al., 2010). Mediante la técnica de inmunohistoquímica, se pudo establecer la asociación de las células NK con rechazo celular y rechazo humoral (Yazdani et al., 2019) (Dos Santos et al., 2017). En la década pasada se comenzó a explorar la participación de las NKT en los rechazos mediados por anticuerpos, utilizando diferentes metodologías, una de estas fue la biología molecular, al tratar de identificar los transcritos expresados en las biopsias de injerto renal de pacientes con anticuerpos anti-donador específicos (DSA) y contrastarlos con aquellas biopsias de trasplante renal sin DSA. Los resultados más sobresalientes de este trabajo fueron que los transcritos encontrados se asociaron en los casos de rechazo con la presencia de C4d, células NKT y macrófagos (Hidalgo et al., 2010).

## **II.II. SOBREVIDA DEL INJERTO RENAL**

Uno de los conceptos más importantes en trasplante renal es la sobrevida, esto hace referencia a la sobrevida del injerto renal como a la sobrevida de los pacientes portadores de trasplante, y se reporta como desenlaces a corto y a largo plazo. El registro científico de receptores de trasplante en USA capítulo trasplante renal (OPTN/SRTR) es uno de los registros más completos respecto a la sobrevida en trasplante. De los desenlaces más importantes que se encuentran en la literatura es la falla de injerto renal al año de trasplante por todas las causas que disminuyó de 7.1% en el 2006 al 4.3% en el 2016, otro desenlace fue la muerte por cualquier causa en receptores de trasplante renal que cambió del 4.1% en el 2006 al 2.4% en el 2016 y la tasa de falla de injerto a 10 años por cualquier causa que disminuyó de 57.6 % en el año 2000 a 49% en el 2007. La sobrevida a 5 años del injerto renal está relacionada con la patología de base en el receptor, por ejemplo, la diabetes tiene la sobrevida más baja alrededor del 75% a cinco años de seguimiento comparado con la enfermedad poliquística renal arriba del 85% en el mismo tiempo de seguimiento. De tal manera que un injerto renal se encuentra funcional en el 75-85% de los pacientes después de cinco años postrasplante independientemente de la etiología de la ERC (Hart et al., 2020). El registro australiano en materia de trasplante renal (ANZDATA) analizó el impacto del rechazo agudo en el injerto y en la sobrevida de los pacientes a lo largo 20 años. Incluyeron a los pacientes trasplantados en el periodo de 1997 al 2017 que tuvieran al menos 6 meses de disfunción del injerto renal. El 21.4 % de los eventos de rechazo agudo en los primeros 6 meses de trasplante se asoció con la pérdida del injerto secundario a nefropatía crónica (HR 1.39; 95% intervalo de confianza, 1.23 a 1.56) y a recurrencia

de rechazo a más de 6 meses (HR en 1.85; 95% intervalo de confianza, 1.39-2.46). Otros desenlaces asociados con rechazo agudo fueron muerte con injerto funcional, muerte por causa cardiovascular y cáncer (Clayton, McDonald, Russ, & Chadban, 2019).

En México la sobrevida del injerto renal de donador vivo al año es del 83.6% y la sobrevida del paciente al mismo tiempo es de 85%. En cuanto a la sobrevida del injerto y del paciente en la donación cadavérica es del 74.4 y 79 % respectivamente, lo anterior en pacientes trasplantados en el 2018. (CENATRA Centro Nacional de Trasplantes, 2019)

### **III. CAUSAS DE LA PERDIDA DEL INJERTO RENAL**

La principal causa de pérdida del injerto renal es la muerte con injerto funcionante y esta causa ha permanecido sin cambios a lo largo del tiempo, ya que la mortalidad depende de factores ajenos al injerto renal, principalmente obedece a factores de riesgo cardiovascular acumulados a lo largo de toda su evolución (Briggs, 2001). En cuanto a las causas prevenibles y tratables de la pérdida del injerto tenemos en primer lugar al rechazo mediado por anticuerpos (ABMR), aun con los avances en la inmunosupresión y las herramientas diagnósticas el ABMR sigue siendo la principal causa directa de la pérdida del injerto, ya que existe la probabilidad que el paciente desarrolle posteriormente rechazo humoral crónico y que finalmente presente pérdida del injerto (Arias, Serón, Moreso, Bestard, & Praga, 2011) (Sellarés et al., 2012)

#### **IV. FISIOPATOLOGIA DEL RECHAZO RENAL**

El rechazo renal es un evento inmunológico complejo que puede iniciar incluso antes de recibir el órgano trasplantado, el proceso de rechazo conlleva tres fases, 1) reconocimiento de aloantígenos, 2) generación de respuesta autoinmune y 3) destrucción del órgano trasplantado (Becker et al., 2016). La aparición del rechazo está en función de la rapidez con que se generen anticuerpos, incluso si son anticuerpos preformados por exposición a antígenos HLA antes del trasplante, como ocurre en el embarazo y en la transfusión sanguínea, donde el rechazo ocurre en los primeros minutos postrasplante (Gary, 1979). En el caso que los anticuerpos anti-donador específicos se formen posterior al trasplante, serán anticuerpos de *novo* y podrán desencadenar rechazo humoral agudo o más frecuentemente rechazo humoral crónico (Pascual et al., 2012). Por lo general, los rechazos se describen por sus características histopatológicas y por su tiempo de evolución (Baldwin et al., 2016). Los tipos de rechazo del injerto renal más conocidos se dividen en hiperagudo, agudo y crónico. Desde el punto de vista de mecanismos inmunopatogénicos son rechazo celular, humoral y con patrón mixto (Haas et al., 2018).

##### **IV.I. RECHAZO HIPERAGUDO**

Actualmente este tipo de rechazo es raro, se explica como consecuencia de un alto título de anticuerpos donador-específicos (DSA) activadores de complemento justo al tiempo de trasplante renal. También ocurren en el escenario de anticuerpos preformados en riñones incompatibles en el sistema ABO. Generalmente estos eventos de sensibilización previa son vistos y diagnosticados mediante las pruebas

mínimas necesarias para el trasplante, como son pruebas cruzadas de linfotoxicidad, entre donador y receptor (Mulley & Kanellis, 2011). El Rechazo hiperagudo también puede ocurrir en los casos de desensibilización mediante tratamiento de inmunosupresión y plasmaféresis que presentan un aumento o repunte de anticuerpos rápidamente después del trasplante renal, y cuando esta sobreproducción se trata de anticuerpo de *novo*, se relaciona con ABMR; en estos casos de alto riesgo inmunológico la sobrevida es muy superior comparada con aquellas poblaciones que se encuentran en una lista de espera o en alguna forma de sustitución de la función renal, de aquí el concepto de “trasplantar lo no trasplantable” aun con riesgo inmunológico (Holscher et al., 2020). El mecanismo inmuno patológico consiste en la fijación de aloanticuerpos al endotelio vascular del injerto renal y con ello la activación de la cascada del complemento desencadenando una respuesta inflamatoria masiva con infiltración de granulocitos, trombosis macrovascular y mesangiólisis. La trombosis puede causar pérdida de la perfusión del injerto, isquemia y destrucción tisular en los primeros minutos o en las primeras horas post trasplante (Xian Chang, 2015). En la histopatología se encuentra trombosis, y depósito de IgG dirigida contra HLA o antígenos ABO y en la minoría de los casos, otros antígenos menos caracterizados (Klein et al., 2013). El termino de **rechazo acelerado** corresponde a los mismos factores de riesgo del rechazo hiperagudo, incluso la misma inmuno patología, clínicamente se caracteriza por tener inicialmente una adecuada función del injerto, por 24-48 horas y posteriormente iniciar con la evolución del rechazo hiperagudo (Becker et al., 2016).

## IV.II RECHAZO MEDIADO POR ANTICUERPOS

El ABMR es la complicación inmunológica más frecuente, y deletérea en el trasplante renal, siendo una de las principales causas de pérdida del injerto. Esta entidad fue descrita por primera vez en 1997 en la clasificación internacional de Banff (Racusen, et al., 1999). Actualmente los criterios diagnósticos se encuentran bien establecidos y se basan en la presencia DSA o anticuerpos anti HLA. Según la reunión Banff 2017 se requieren tres criterios para identificar que un paciente está presentando un rechazo mediado por anticuerpos. El primero es evidencia histológica compatible como lo son: arteritis, microangiopatía trombótica o daño tubular agudo. El segundo criterio diagnóstico es la evidencia de anticuerpos y daño vascular, esto se refiere al depósito de C4d en los capilares peritubulares como marcador de daño. El tercero es la presencia de anticuerpos contra el HLA del receptor (Haas et al., 2017). La inmunopatología del rechazo humoral depende de la activación de DSA, estos anticuerpos son el mecanismo primario en pacientes receptores altamente sensibilizados. El complemento produce daño directamente a través de una lesión celular o por los complejos de ataque de membrana (Stegall, Chedid, & Cornell, 2012). Existe una presentación temprana de ABMR que ocurre durante los primeros 10-14 días. Este evento no es exclusivo de pacientes previamente sensibilizados con aloantígenos. Histopatológicamente no hay diferencias con el daño inmunológico mediado por anticuerpos; la capilarítis peritubular e inflamación glomerular son los hallazgos más importantes, ocasionalmente acompañado por depósito de productos de complemento C4d dentro de los capilares peritubulares (Süsal et al., 2009). La presencia de DSA preexistentes o de *novo* se consideran como un biomarcador que predice pobre

pronóstico en ABMR, disfunción y sobrevida del injerto renal (Susal et al., 2015). El desarrollo de DSA de novo ocurre entre el 13-30% en pacientes no sensibilizados previamente (Malheiro et al., 2017). Los riesgos para el desarrollo de DSA de novo, incluyen: incompatibilidad en gran número de antígenos de HLA, especialmente en DQ, inadecuada inmunosupresión o poca adherencia e inflamación del injerto por cualquier causa, infección viral o isquemia (Guidicelli et al., 2016). Los DSA de novo generalmente aparecen durante el primer año y están dirigidos contra HLA de clase 2 (Wiebe et al., 2012). La fijación de DSA a los antígenos expresados en el endotelio del injerto puede activar la cascada del complemento por la vía clásica, dato característico del fenotipo de ABMR (Ramon et al., 2017). La fijación de DSA al endotelio, puede causar lesión tisular incluso en ausencia de fijación del complemento, a través de citotoxicidad dependiente de anticuerpos. La respuesta inmune innata, neutrófilos, macrófagos y células NKT pueden fijarse a fragmentos FC de DSA, iniciando desgranulación o liberación de enzimas líticas, causando lesión y muerte tisular. Este mecanismo es importante en la patogénesis del desarrollo del rechazo crónico o subclínico (Hirohashi et al., 2012). Estos anticuerpos también pueden causar daño no inmunológico, a través de proliferación endotelial por incremento del factor de crecimiento endotelial, aumentando la producción de fibroblastos y el reclutamiento de otras células (Haarberg & Tambur, 2014).

#### IV.III. RECHAZO MEDIADO POR CÉLULAS T

La invasión del epitelio tubular por células T y otras células inflamatorias es la característica de este rechazo celular. El deterioro de la función renal se relaciona con la presencia de tubulítis y menos frecuentemente inflamación arterial (Johnson et al. 2015). Estos cambios inmuno patogénicos han sido analizados y corroborados por la presencia de sobreexpresión de mensajeros de granzima-B, perforina y FasL así como de los factores de transcripción como es T-bet, un factor de transcripción efector de los CD4+ Th1 (Halloran et al., 2018). Después del trasplante, las células T CD8+ tienen un papel importante en el desarrollo del rechazo celular, no solamente por la infiltración directa de las células al tejido del injerto, también por reclutamiento y activación de otras líneas celulares (Calvo-Turrubiartes et al., 2009). Los mecanismos de activación de las células CD8+ y sus marcadores de diferenciación y sus cambios fenotípicos pueden ser detectados en sangre periférica, previendo el rechazo del injerto (Yap et al., 2014). La célula CD8+ también juega un papel en inmunomodulación para desarrollar tolerancia del injerto, se encontró que las células CD8+, CCR7+ en sangre periférica tienen efectos supresores en la activación de otras células CD8+ efectoras. Se observa una relación de concentraciones en las proporciones de esta subpoblación en pacientes con rechazo del injerto (K. W. Kim et al., 2018). En cuanto a la clasificación de los rechazos humorales Banff, considera que la participación de la inflamación del intersticio, tubulítis y arterítis ya sea de la íntima o transmural son los elementos más importantes para clasificar el grado de rechazo celular en el paciente trasplantado (Haas et al., 2018). Los escenarios clínicos contemplados en la clasificación de Banff del 2017 son rechazo celular agudo, *bordeline* y crónico, todos

ellos comparten los tres componentes previamente descritos.

#### **IV.IV. RECHAZO CRÓNICO MEDIADO POR ANTICUERPOS**

Durante fases tardías del trasplante renal, después de un año, factores como inmunosupresión deficiente, estimulación de células B y T de memoria secundario a procesos inflamatorios en el injerto renal, pueden desencadenar aparición de DSA. Estos anticuerpos tienen la capacidad de fijarse a diversas estructuras del injerto renal (microvasculatura, mesangio, componentes de membrana basal) y resultar en disfunción aguda o en crónica (Arias et al., 2011). La fibrosis intersticial es la principal característica de rechazo crónico del injerto, es el mejor predictor de sobrevida del injerto renal y puede desarrollarse por factores inmunológicos y no inmunológicos (Boor & Floege, 2015). Además de los DSA en el rechazo crónico otros anticuerpos participan, como lo son HLA de clase-I relacionados con cadena A (MICA) y anticuerpos dirigidos contra el receptor de angiotensina II tipo 1 (Zou et al., 2007).

#### **V. RECHAZO CLINICO**

Uno de los primeros reportes que hace referencia al rechazo del injerto renal es una serie de seis casos que recibieron trasplante de donador vivo no relacionado y radiación para aumentar las probabilidades de éxito (J Hamburger et al., 1959). Se describen tres casos llamados "fenómeno de rechazo temprano" donde, después de las primeras horas de adecuada función del injerto, ésta se detenía con la posterior pérdida definitiva del injerto y muerte de los pacientes. Uno de los aspectos valiosos en la publicación son los datos histopatológicos, los hallazgos fueron infarto

hemorrágico de corteza, necrosis tubular y necrosis fibrinoide de la microvasculatura. En otro caso se identificó infiltración celular en parches y áreas libres de infiltrado, todos ellos datos compatibles con rechazos hiperagudos.

En términos generales la incidencia de rechazo del injerto renal ha disminuido dentro de los programas de trasplante, en 1996 era aproximadamente 50% al primer año postrasplante, actualmente ha disminuido a menos de 10%. Este cambio está en relación con la aparición y uso de medicamentos inmunosupresores y al perfeccionamiento de pruebas diagnósticas que evalúan compatibilidad entre el donador y el receptor, así como las pruebas de abordar los eventos de rechazo (Hart et al., 2020).

## **V.II. CLASIFICACION DE BANFF**

Con la finalidad de unificar los criterios diagnósticos que definen lesiones en el injerto en 1993 se conformó un grupo de trabajo principalmente de patólogos, en un primer objetivo definieron las características del rechazo mediado por células, posteriormente en 2007 el grupo de expertos comenzaron a separar el rechazo en dos grupos, mediado por células y el mediado por anticuerpos (humoral). La más reciente reunión en 2017 se centró en la revisión de criterios para rechazo crónico mediado por células, rechazo mediado por anticuerpos y en los desenlaces clínicos de trasplante en el futuro de los ensayos clínicos.

El estándar de oro para diagnóstico de rechazo se realiza mediante biopsia del injerto renal. Para considerar una biopsia de buena calidad deberá de tener las siguientes características: por lo menos 10 glomérulos, y dos pequeños vasos arteriales, la muestra deberá de ser teñida con hematoxilina y eosina, ácido

periférico de Schiff o tinción de plata más alguna tinción tricrómica. En el caso de que el fragmento de estudio contenga de 6-9 glomérulos se considera marginal y su interpretación deberá ser tomada con reserva (Racusen, et al., 1999). El análisis histopatológico clasifica en 5 categorías: 1) biopsia normal o cambios no específicos, 2) cambios mediados por anticuerpos, este rubro se puede subdividir en 3 escenarios, rechazo agudo mediado por anticuerpos activo, rechazo crónico mediado por anticuerpos activo y C4d positivo sin evidencia de rechazo, 3) cambios histopatológicos limítrofes o Borderline 4) rechazo celular mediado por células T (el cual puede dividirse en grados I A, B, II A, B Y III) y 5) rechazo celular mediado por células T crónico activo (Haas et al., 2018a)

El rechazo renal agudo se refiere al deterioro rápido de la función del injerto, está asociado con cambios histopatológicos en el injerto y existen dos tipos, el celular y el mediado por anticuerpos. En la biopsia frecuentemente ambos tipos de rechazo pueden coexistir. El rechazo mediado por células T, es caracterizado por infiltración de linfocitos en la pared de los túbulos, intersticio renal y en algunos casos infiltración a la íntima de las arterias. El mediado por anticuerpos requiere evidencia morfológica de daño agudo tisular, además de mostrar evidencia de anticuerpos antidonador específicos y de interacción anticuerpo-endotelio mediante el depósito de C4d en el injerto (Loupy, A., and Lefaucheur, 2018). El rechazo subclínico se define como la presencia de evidencia histológica de rechazo agudo sin elevación de la concentración de creatinina sérica (Shapiro R et al., 2000) **ver tabla 1.**

**Tabla 1.** Clasificación revisada Banff 2017 de rechazo mediado por anticuerpos (RMA) y rechazo mediado por células T (RMCT) en aloinjertos renales.

<b>Categoría 1: Biopsia normal o cambios inespecíficos</b>
<b>Categoría 2: cambios mediados por anticuerpos</b>
<b>Activo:</b> los 3 criterios deben estar presentes
1. Evidencia histológica de lesión tisular aguda, incluyendo 1 o más de los siguientes:
Inflamación microvascular ( $g > 0$ y/o $ptc > 0$ ), en la ausencia de glomerulonefritis de <i>novo</i> o recurrente, aunque en la presencia de RMCT agudo, infiltrado borderline, o infección, $ptc \geq 1$ solo no es suficiente y $g$ debe ser $\geq 1$
Arteritis transmural o de la íntima ( $v > 0$ ) <sup>1</sup>
Microangiopatía trombótica aguda, en la ausencia de cualquier otra causa
Lesión tubular aguda, en la ausencia de cualquier otra causa aparente
2. Evidencia de interacción actual/reciente de anticuerpos con el endotelio vascular, incluyendo 1 o más de los siguientes:
Tinción linear C4d en capilares peritubulares (C4d2 o C4d3 por IF en cortes congelados, o C4d > 0 por IHQ en bloques de parafina)
Al menos inflamación microvascular moderada ( $[g + ptc] \geq 2$ ) en la ausencia de glomerulonefritis de <i>novo</i> o recurrente, aunque en la presencia de RMCT agudo, infiltrado "borderline" o infección, $ptc \geq 2$ solo no es suficiente y $g$ debe ser $\geq 1$
Aumento de la expresión de transcripciones / clasificadores de genes en el tejido de la biopsia, que estén fuertemente asociados con RMA, si se valida adecuadamente
3. Evidencia serológica de anticuerpos donador específico (DSA contra HLA u otros antígenos). Tinción C4d o la expresión de transcripciones / clasificadores validados como se explicó en el criterio 2, pueden sustituir a los ADE; sin embargo, se recomienda encarecidamente realizar pruebas de ADE exhaustivas, incluidas las pruebas de anticuerpos no HLA, si la prueba de anticuerpos HLA es negativa, siempre que se cumplan los criterios 1 y 2
<b>Activo crónico:</b> los 3 criterios deben estar presentes
1. Evidencia morfológica de lesión tisular crónica, incluyendo 1 o más de los siguientes:
Glomerulopatía del trasplante ( $cg > 0$ ) si no hay evidencia de MAT crónica o glomerulonefritis crónica recurrente / de <i>novo</i> ; incluye solo cambios evidentes por microscopía electrónica (EM) (cg1a)
Membrana basal capilar peritubular multicapa severa (requiere ME)
Fibrosis de la íntima arterial de nueva aparición, excluyendo otras causas; los leucocitos dentro de la íntima esclerótica favorecen RMA crónico si no hay antecedentes de RMCT, pero no son obligatorios
2. idénticos al criterio 2 para RMA activo, antes mencionados
3. idénticos al criterio 3 para RMA activo, antes mencionados, incluyendo recomendación fuerte para hacer pruebas para ADE cuando los criterios 1 y 2 se cumplan
Tinción C4d sin evidencia de rechazo; las 4 características deben estar presentes para el diagnóstico
1. Tinción linear C4d en capilares peritubulares (C4d2 o C4d3 por IF en bloques congelados, o C4d > 0 por IHQ en bloques de parafina)
2. No hay evidencia para el Criterio 1 para RMA activo, crónico o activo
3. No hay evidencia molecular para RMA como en el criterio 2 para RMA activo, crónico y activo

4. No hay RMCT activo crónico o activo, o cambios borderline	
<b>Categoría 3; Cambios borderline</b>	
Sospechosa (Borderline) para RMCT agudo	
Focos de tubulitis (t> 0) con inflamación intersticial menor (i0 o i1), o inflamación intersticial moderada-grave (i2 o i3) con tubulitis leve (t1); Se permite retener el umbral i1 para el borderline con t > 0, aunque esto debe ser transparente en los informes y publicaciones.	
<b>Categoría 4: rechazo Mediado por Células T</b>	
RMCT Agudo	
<b>Grado IA</b>	<b>Inflamación intersticial que afecta &gt; 25% de la corteza total (puntuación ti 2 o 3) y &gt; 25% del parénquima cortical esclerótico (puntuación de i-IFTA 2 o 3) con tubulitis moderada (t2) que afecta a 1 o más túbulos, sin incluir túbulos severamente atróficos<sup>5</sup>; otras causas conocidas de i-IFTA deben ser descartadas</b>
<b>Grado IB</b>	<b>Inflamación intersticial que afecta &gt; 25% de la corteza total (puntuación ti 2 o 3) y &gt; 25% del parénquima cortical esclerótico (puntuación de i-IFTA 2 o 3) con tubulitis grave (t3) que afecta a 1 o más túbulos, sin incluir túbulos severamente atróficos<sup>5</sup>; otras causas conocidas de i-IFTA deben ser descartadas</b>
<b>Grado II<sup>1</sup></b>	<b>Arteriopatía crónica del injerto (fibrosis de la íntima arterial con inflamación de células mononucleares en fibrosis y formación de neoíntima)</b>
Las actualizaciones de Banff 2015 <sup>1</sup> se indican en negrita.	
1 cabe señalar que estas lesiones arteriales pueden ser indicativas de RMA, RMCT o mixtos RMCT/RMA. Las lesiones en "V" y la arteriopatía crónica del injerto solo se califican en arterias que deban tener una media continua con $\geq 2$ capas de músculo liso.	
2 lesiones de RMA crónico activo pueden variar desde lesiones principalmente activas con glomerulopatía de trasplante temprano (GT) evidente solo por EM (cg1a) hasta aquellas con GT avanzados y otros cambios crónicos además de la inflamación microvascular activa. Para muestras de biopsia que muestren GT y / o Membrana basal capilar multicapa peritubular en ausencia de evidencia de interacción actual / reciente de anticuerpos con el endotelio (criterio 2) pero con un diagnóstico previo documentado de RMA activo crónico o o activo con evidencia previa documentada de DSA, el término "ABMR crónico" debe ser aplicado.	
3 indica $\geq 7$ capas en 1 capilar peritubular cortical y $\geq 5$ en 2 capilares adicionales, evitando porciones cortadas tangencialmente.	
4 La significancia clínica de estos hallazgos puede ser bastante diferente en los injertos expuestos a anticuerpos anti-grupo sanguíneo (aloinjertos ABO-incompatible), donde no parecen ser perjudiciales para el injerto y pueden representar acomodación. Sin embargo, con anticuerpos anti-HLA, tales lesiones pueden progresar a RMA crónico, y se necesitan más datos de resultados.	
5 Un túbulo gravemente atrófico se define como uno con cada una de las siguientes 3 características: un diámetro <25% del de los túbulos no afectados o mínimamente afectados en la biopsia, un aspecto indiferenciado, epitelio cuboidal o aplanado y arrugas pronunciadas y / o engrosamiento de la membrana basal tubular.	

### **V.III. BIOMARCADORES DE RECHAZO RENAL**

El diagnóstico de rechazo renal se sospecha cuando el paciente presenta disfunción del injerto renal considerado con elevación de creatinina o aparición/aumento del nivel basal de albuminuria. Estos hallazgos bioquímicos requieren ser confirmados mediante biopsia renal. Sin embargo, estos parámetros como la elevación de Crs y proteinuria no son las mejores herramientas para dar seguimiento a la función del riñón trasplantado y no cumplen con los criterios para ser considerados como pruebas diagnósticas. Los aspectos negativos que tiene la biopsia renal son: un procedimiento invasivo con riesgo de presentar complicaciones, costoso, sujeto a error de muestreo por la naturaleza del rechazo con daño focal y complejo es su interpretación (Singh et al., 2019). Aunque ha habido mejorías sutiles en cuanto a resultados en la sobrevida del trasplante renal a largo plazo se siguen perdiendo injertos por eventos inmunológicos y estos resultados no han tenido la mejoría observada en los desenlaces encontrados en la sobrevida a corto plazo. Actualmente la terapia inmunosupresora en el seguimiento de los pacientes se ajusta empíricamente, para estos ajustes se considera el tiempo de evolución del trasplante, sospecha de disfunción de injerto, riesgo elevado de rechazo o evidencia histológica de daños de injerto por evento inmunológico, ya sea celular o humoral. Esta forma de manejar la inmunosupresión no ofrece los resultados esperados ya que en algunos casos a pesar de tener los cuidados y el seguimiento del paciente el daño inmunológico ocurre (Menon et al., 2017). Desde hace algunos años se ha intentado el desarrollo de un biomarcador que, al contar con alta sensibilidad, especificidad, alto valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y buen rendimiento en las curvas ROC de verosimilitud pueda ser utilizado como una

prueba diagnóstica (Lo et al., 2014).

El desenlace más temido en el trasplante renal sigue siendo el ABMR y para el diagnóstico tiene que haber existencia de DSA y confirmación mediante biopsia renal (Haas et al., 2014).

La aparición o aumento de los DSA son el primer potencial biomarcador que exige ser estudiado, por la importancia para el diagnóstico de ABMR. Las limitaciones que tiene DSA para considerarse como biomarcador es que no todos los tipos de DSA son patogénicos ya que depende del isotipo, IgM o IgG, también depende de clase de HLA contra la cual están dirigidos, especificidad antigénica, intensidad del DSA, capacidad de ligar complemento y finalmente la subclase de IgG. Los DSA de clase I y clase II son considerados igualmente patógenos, sin embargo, hay diferencias notables. Cuando ambos están presentes en el pretrasplante son capaces de mediar ABMR y en el postrasplante los DSA clase II de novo se asocian con ABMR crónico y aparición de glomerulopatía del trasplante (Filippone & Farber, 2016).

Como ya se mencionó anteriormente, el mecanismo inmunopatogénico en el ABMR se lleva a cabo a través del complemento, para esto se requiere concentraciones altas y una gran capacidad de DSA para activar o desencadenar la cascada del complemento con la potencial pérdida del injerto (Lefaucheur et al., 2016). Los diferentes subtipos de DSA se unen con diferente intensidad al complemento y por ende tienen diferentes patrones de daño mediado por anticuerpos. IgG1 e IgG3 son anticuerpos que se unen fuertemente complemento mientras que IgG2 e IgG4 se unen débilmente. IgG1 es el isotipo predominante en los DSA circulantes y su asociación con otros isotipos determina desenlaces específicos en el injerto; por ejemplo, los pacientes que a lo largo del tiempo se mantienen sin eventos de

rechazo se asocian con IgG1 sin otras subclases (R. Zhang, 2017). El monitoreo y seguimiento de los niveles de DSA podría permitir el diagnóstico temprano de ABMR, así como seguimiento subsecuente, lo que permite realizar ajustes de la inmunosupresión, especialmente en pacientes con alto riesgo inmunológico (Viglietti et al., 2017). Las guías publicadas por la International Society Transplantation recomienda el monitoreo de DSA en pacientes con alto riesgo inmunológico dentro de los primeros tres meses post trasplante acompañado de biopsia renal (Tait et al., 2013).

Desde el punto de vista biomarcador la inmunogénica específicamente la expresión es un concepto que recientemente se ha abordado. El grupo de Khatri y colaboradores fue uno de los primeros que estudió patrones de expresión génica en el rechazo. Un metaanálisis de 8 bases de datos independientes de 236 biopsias de diferentes órganos (riñón, hígado, corazón y pulmón). El objetivo fue identificar un grupo de genes que se expresaran preferencialmente en eventos de rechazo, que denominaron modulo común de rechazo (CRM) integrado por 11 genes.

**Los genes identificados en el CRM son: CD6** (Clúster de diferenciación 6)

Desempeña una función como molécula co-estimulador para la activación de los linfocitos T maduros y en la adhesión celular, se une a CD 166; **BASP1** (Brain Abundant Membrane Attached Signal Protein 1), este interactúa con el gen de tumor de Wilms con lo que tiene un rol en nefro génesis y hematopoyesis; **CXCL10** (Ligando 10 de quimiocina con motivo C- X- C) genera quimio atracción en respuesta a INF- gamma, hacia monocitos, células dendríticas, NK, células T y fibroblastos; **CXCL9** (Ligando 9 de quimiocina con motivo C- X- C) tiene un rol en

quimiotaxis, promoción de diferenciación y multiplicación de leucocitos con extravasación tisular, algunos reportes sugieren que permite la polarización hacia una respuesta Th1; **INPP5D** (Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase D) es expresado por células hematopoyéticas y afecta múltiples vías de señalización, la deficiencia está asociada con enfermedad inflamatoria intestinal; **ISG20** (Interferon Stimulated Exonuclease Gene 20) codifica una exonucleasa con actividad antiviral amplia en particular contra hepatitis C; **LCK Gen HGNC LCK** (Tirosin cinasa específica) de leucocitos, fosforila CD3 y cadenas del receptor de células T en linfocitos T; **NKG7** (Natural Killer Cell Granule Protein 7) regula la exocitosis de gránulos citotóxicos. **PSMB9** (Subunidad proteasómica beta tipo 9) Reemplaza la subunidad 1 en respuesta a IFN-gamma, el procesamiento proteolítico es requerido para formar una subunidad madura; **RUNX3** Runt related transcription factor 3) se asocia al desarrollo de CD8 citotóxicos y se expresa en NK y **TAP1** (Transportador asociado con el procesamiento de antígenos 1) se une a TAP 2, y forma un complejo que mueve los antígenos al retículo endoplásmico para unirlos al CHM.

Esta publicación sugiere que el modelo de CRM podría predecir daño histológico en biopsias de 6 meses postrasplante, con área bajo la curva AUC=0.882 (Khatri et al., 2013). Sigdel y cols, exploraron un score de expresión génica con capacidad predictora de daño histológico, utilizando el CRM de Khatri y cols. El modelo se construyó con base en la expresión génica de los 11 genes en 146 injertos renales de 122 pacientes, con rechazo (n=54) y sin rechazo (n=92). Encontraron que el CRM score estaba incrementado en el grupo de rechazo con ( $5.68 \pm 0.91$ ) versus el grupo de no rechazo ( $1.29 \pm 0.28$ ;  $p < 0.001$ ), así como la fibrosis intersticial y

atrofia tubular ( $7.94 \pm 2.278$  versus  $2.28 \pm 0.66$ ;  $p = 0.04$ ). Estos resultados muestran la capacidad predictora de rechazo y daño histológico secundario a rechazo (Sigdel et al., 2015). Uno de los trabajos más apegados al concepto de biomarcador es el de Zhang y cols, en el que realizaron una cohorte de trasplantes y examinaron casos de rechazo mediante biopsia de injerto a los tres meses pos trasplante; se anidó un grupo de 88 pacientes con rechazo subclínico y rechazo limítrofe a los que se evaluó expresión genética a partir de RNA de sangre periférica, como resultado se logró identificar un grupo de 17 genes que diagnostican los rechazos de forma no invasiva (W. Zhang et al., 2019). **Ver tabla 2**

**Tabla 2.** Los 17 genes del modelo utilizados para diagnóstico de rechazo celular y las significancias estadísticas

<b>Tabla 2. Los diecisiete genes del modelo utilizados para diagnóstico de rechazo celular</b>				
Símbolo	RefSeq	Nombre	Valor P	razón Log2
ZMAT1	NM_001011657	Dedo de Zinc, tipo matriona 1	0.01	0.744899
ETAA1	NM_019002	Tumor de Ewing asociado al antígeno 1	0.04	0.703351
ZNF493	NM_001076678	Dedo de Zinc proteína 493	0.002	0.663139
CCDC82	NM_024725	Dominio moneda enrollada conteniendo 82	0.02	0.622008
NFYB	NM_006166	Factor nuclear de transcripción Y,B	0.03	0.589039
SENP7	NM_001077203	Peptidasa específica de setrina 7/SUMO 1	<0.001	0.581319
CLK1	NM_001162407	CDC-similar a quinasa 1	0.01	0.567156
SENP6	NM_001100409	Peptidasa específica de setrina 6/SUMO 1	0.01	0.510019
C1GALT1C1	NM_001011551	Chaperon 1 específico-C1GALT1	0.01	0.292181
SPCS3	NM_021928	Homólogo de subunidad 3 del complejo de señal peptidasa (S. cerevisiae)	0.03	0.221611
MAP1A	NM_002373	Proteína asociada a microtúbulos 1A	0.01	-0.27124
EFTUD2	NM_001142605	Factor de elongación termo inestable que contiene 2 dominio de unión a GTP	0.001	-0.33174
AP1M1	NM_001130524	Complejo proteico relacionado con el adaptador 1, sub-1	<0.001	-0.33596
ANXA5	NM_001154	Anexina A5	<0.001	-0.36446
TSC22D1	NM_001243797	Dominio de familia TSC22, miembro 1	0.01	-0.44781
F13A1	NM_000129	Factor de coagulación XIII, polipéptido A1	0.02	-0.5544
TUBB1	NM_030773	Tubulina, B 1 clase VI	0.03	-0.55441

*Patrones de expresión de genes identificados en linfocitos de sangre periférica, resultados estadísticos en el contraste de los eventos de rechazo y controles, así como los nombres de los genes.*

#### **V.IV Rechazo subclínico**

Como ya se ha descrito antes, el rechazo de injerto renal se manifiesta por disfunción del injerto y es diagnosticado mediante biopsia. La necesidad de realizar biopsias renales en pacientes con alto riesgo inmunológico ha quedado expuesta desde hace casi 30 años, en el trabajo de Rush et al, se realizaron 70 biopsias renales en 31 pacientes, a los tiempos 1,2 y 3 meses, así como aquellos que presentaron alguna indicación médica; se encontró que 30% de las biopsias mostraban algún grado de rechazo y que este no había sido predicho por exámenes clínicos de seguimientos o pruebas pre-trasplante (David N. Rush et al., 1994). En otro trabajo se realizó seguimiento a 220 pacientes mediante DSA y protocolo de biopsia de injerto renal según la integración de los grupos de los anticuerpos; al diagnóstico de la biopsia se clasificaron de la siguiente forma, ABMR (n=118), ABMR subclínico (n=25) y no rechazo (n=77). Ambos grupos ABMR y rechazo subclínico recibieron el mismo tratamiento y tuvieron un seguimiento de  $29.5 \pm 16.8$  meses. La falla de injerto renal se presentó en 3%, 8% y 46% en los grupos control, subclínico y ABMR ( $p < 0.001$ ). Estos datos muestran una prevalencia de 11.3 % de rechazo subclínico en pacientes de riesgo inmunológico alto e intermedio, el rechazo subclínico se observó hasta en 8% de la población (Parajuli et al., 2019). Uno de los trabajos que abordó el concepto de daño renal microestructural subclínico es el publicado por Nankivell y cols, en el que evaluaron de forma prospectiva a 120 receptores de trasplante renal con diabetes tipo 1, en total se realizaron 961 biopsias en 10 años. Los resultados mostraron que el 45.7% de las biopsias mostraban rechazo subclínico a los tres meses postrasplante,

Nefrotoxicidad por diversas causas fue diagnosticada prácticamente en todas las biopsias renal a los 10 años de evolución y nefropatía crónica del trasplante avanzada estuvo presente en 58.4 % de los pacientes al termino de 10 años (Nankivell et al., 2003). Otro trabajo analizó la hipótesis que el rechazo subclínico causa nefropatía crónica del injerto y por consiguiente pérdida de injerto renal, en un estudio prospectivo de 88 pacientes que recibieron trasplante renal, 29 recibieron también trasplante de páncreas combinado, solo 1 paciente recibió su segundo trasplante renal. Los pacientes fueron evaluados durante los meses 1 y 3 mediante biopsias renal, todos con inhibidores de calcineurina, micofenolato de mofetilo y esteroides. El rechazo subclínico fue diagnosticado en el 46 % de los pacientes, con un total de 279 biopsias de trasplante la prevalencia de rechazo subclínico fue 25% (Kee et al., 2006)

## V. TRATAMIENTO

El tratamiento del ABMR es una estrategia de seguimiento y diagnóstico temprano sobre todo en pacientes de alto riesgo inmunológico o DSA circulantes pre trasplante. Esto consiste en iniciar tratamiento específico para inhibir mecanismos inmunopatogénicos y ajuste de inmunosupresión de forma temprana. Los regímenes más frecuentemente usados están asociados a plasmaféresis o inmunoadsorción seguido de inmunoglobulina intravenosa (IVIG), con la finalidad de remover y neutralizar los anticuerpos respectivamente. También se usan fármacos sobre todo biológicos dirigidos contra: las células B (rituximab y alemtuzumab), células plasmáticas (bortezomib) y contra el sistema del complemento (eculizumab) han sido usados exitosamente. En algunos escenarios estos tratamientos biológicos pueden verse limitados por cuestiones de costo y la falta de indicaciones precisas en la literatura asociada a los pocos estudios prospectivos en este tema. El tratamiento suele estar acompañado de esteroides (Montgomery et al., 2018) (M. Kim et al., 2014). La plasmaféresis e inmunoadsorción funcionan removiendo directamente IgG del suero, esta efectividad es bastante conocida y se ve su efecto a las 48 horas, en este fenómeno es esperada la recuperación de las inmunoglobulinas provenientes desde el intersticio. El fenómeno de rebote o "refiling" posterior a las plasmaféresis puede ser manejado mediante el uso de la IVIG (Montgomery et al., 2000). Existen pocos ensayos que demuestren el uso de la plasmaféresis en el ABMR, uno de ellos es un estudio controlado aleatorizado en el que se probaba el uso de inmunoadsorción en pacientes con ABMR severo con Cd4+, se incluyeron 10 pacientes de una cohorte

de 756 trasplantes, estos fueron asignados aleatoriamente al uso de proteína inmunoabsorbente o al grupo control con tratamiento estándar, los pacientes de ambos grupos fueron convertidos a tacrolimus; En el grupo de tratamiento todos los pacientes recobraron la función del injerto a diferencia del grupo control donde 4/5 de los pacientes siguieron siendo dependientes de diálisis y un paciente desarrollo necrosis del injerto. (Böhmgig et al., 2007). En otro estudio para evaluar la efectividad del intercambio plasmático, se analizaron 27 pacientes con trasplante renal y evidencia histológica de rechazo vascular, todos ellos en esquemas estándares de inmunosupresión. Seis pacientes recibieron plasmaféresis a razón de 6 días consecutivos con la media de remplazo de 40.6 ml/kg del peso corporal usando un separador celular intermitente. El análisis a corto plazo evidenció que el uso de plasmaféresis no mostró mejoría en la concentración de creatinina ni en la sobrevida del injerto, (Allen N.H et al., 1983).

La IVIg es parte fundamental del tratamiento de ABMR, su uso es acompañada de la plasmaféresis en días alternos, esto se puede dar desde 3 hasta 10 días dependiendo el esquema usado.

El mecanismo de acción es mediante un efecto de neutralización de anticuerpos circulantes, bloqueo de componentes activos del complemento, modulación en la producciones de anticuerpos y de citoquinas proinflamatorias; un efecto dependiente de la fracción FC de la IVIG es el aumentos de la población de Tregs (Matucci et al., 2015). Se ha demostrado que la IVIG también actúa en contra de los anticuerpos anti HLA, a dosis altas presenta efectos inmunomodulador en las células B y T, así como puede inducir apoptosis a las células B, así como modificar la señalización de esta última subpoblación (Kazatchkine et al., 1994).

Con base en la reducción reportada de niveles anticuerpos anti-HLA y mejoría en la proporción de trasplantes con el uso de IVIg, se realizó un ensayo controlado entre 1997-2000 con un total de 101 pacientes altamente sensibilizados al HLA con un PRA >del 50%. Estos pacientes recibieron IVIg o placebo. Los pacientes recibieron IVIG a razón de 2 gr/kg de forma mensual por 4 meses o el equivalente volumen como placebo, en caso de ser trasplantados los pacientes recibieron cuatro dosis extras de IVIG, al inicio del estudio los niveles de PRA fueron similares, al final del estudio se trasplantaron 35% en el grupo de IVIg y 17% en el grupo placebo. Se presentaron 9/17 eventos de rechazo en el grupo de IVIG y 1/10 en el grupo placebo, hubo siete pérdidas del injerto renal, 4 en el grupo de IVIg (Jordan et al., 2004). Otro estudio con 27 pacientes en lista de espera para trasplante renal y con PRA de 100%; recibieron IVIg, los resultados muestran que fueron trasplantados 41% de los pacientes, a diferencia de un grupo control histórico del 12 % (Alachkar et al., 2012). El uso de IVIG no solo se ha combinado con plasmaféresis, entre 2005 y 2007 en el Cedars-Sinai Medical Center un total de 20 pacientes altamente sensibilizados con PRA de 77% o anticuerpos anti-donador específicos fueron enrolados a recibir tratamiento con IVIg más rituximab. Los desenlaces estudiados fueron PRA, pruebas cruzadas, sobrevida del paciente y del injerto renal, episodios de rechazo y función renal mediante creatinina. La media del PRA fue de 44% después de la segunda dosis de infusión de IVIg  $p < 0.001$  contrastado con los niveles pretratamiento, la media de tiempo en lista de espera en los pacientes de diálisis fue de 133 meses vs 5 meses en el grupo de tratamiento, el 80% de los pacientes que recibieron el tratamiento recibió un trasplante renal. La media de creatinina del grupo tratado con IVIg + rituximab fue de 1.5 mg% y la sobrevida de pacientes e

injertos al año de seguimiento fue de 100% y 94% respectivamente (Ashley A Vo et al., 2008).

## **Biofármacos en rechazo**

El **rituximab** es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el CD20 que se expresa sobre la superficie de las células Pre-B y B maduras, el resultado es lisis de estas subpoblaciones celulares a través de la citotoxicidad dependiente de complemento y lisis dependiente de anticuerpo (M. Kim et al., 2014). En un metaanálisis se abordó el uso de rituximab en el ABMR en pacientes con trasplante renal, un total de 114 estudios fueron identificados de los cuales 94 se excluyeron desde el análisis inicial, finalmente se analizaron 10 estudios que contenían 249 pacientes que mostraron un OR de 3.16 (95% CI: 1.75–5.70) para respuesta favorable de rituximab; en cuanto a los efectos adversos reportados fueron nefropatía por virus BK, citomegalovirus, neumonía por herpes zoster y choque séptico (Hychko et al., 2011). En una revisión sistemática de 21 estudios, 2 ensayos clínicos aleatorizados y 19 cohortes retrospectivas, 10 estudiaban el uso de rituximab en trasplante con incompatibilidad de ABO, en este caso la mayoría de los estudios no encontraban diferencia entre el grupo control (esplenectomía) y los tratados con rituximab en los desenlaces relacionados con la evolución de los pacientes, sin embargo, si con los desenlaces del injerto renal. Nueve trabajos se realizaron en pacientes altamente sensibilizados (pruebas cruzadas positivas, anticuerpos anti-donador específicos y PRA elevado) y mostraron en general beneficios con el uso de rituximab en los desenlaces de sobrevida del injerto renal,

rechazo agudo y crónico de injerto renal, así como una menor sensibilización post trasplante. El resto de los estudios abordaban pacientes con incompatibilidad ABO además de altamente sensibilizados y no se encontraron diferencias significativas en los eventos de infección. Una de las conclusiones de los autores es que el rituximab es igual de efectivo que la esplenectomía, siendo esta última un procedimiento costoso y con morbi-mortalidad que puede ser evitada (Macklin et al., 2014).

El primer ensayo controlado de rituximab, el cual tenía problemas de diseño, mostró que agregando rituximab a plasmaféresis y dosis bajas IVIg mejoraba los desenlaces sobre los casos donde solo se usaba IVIg. El grupo control (12 pacientes) fue tratado con dosis altas de IVIg y el grupo de tratamiento fue manejado con plasmaféresis, IVIg dosis bajas y rituximab; la supervivencia a 36 meses del injerto renal 91.7% en el grupo de rituximab mientras que en el control 50% ( $p=0.02$ ), en cuanto a los niveles de DSA (Luminex SA) en el grupo de rituximab fueron más bajos que en el control ( $p=0.02$ ), DSA MFI máxima ( $p=0.009$ ) y DSA MFI media ( $p=0.0004$ ). Incluso el beneficio del rituximab podría estar subrogado al beneficio de la plasmaféresis. (Lefaucheur et al., 2009).

En un ensayo clínico doble ciego multicéntrico de fase III evaluando rituximab y plasmaféresis se incluyeron 38 pacientes; el grupo de tratamiento recibió rituximab a razón de 375 mg/m<sup>2</sup> vs el grupo control que recibió placebo, todos los pacientes recibieron plasmaféresis, IVIg y esteroides, el desenlace primario fue compuesto con pérdida del injerto o no mejoría de la función del injerto renal al día 12. Al cabo de un año ningún paciente había muerto, se presentó una pérdida del injerto en cada grupo, el desenlace primario se presentó en el 52.6% y 57.9% el grupo de

rituximab y grupo placebo respectivamente ( $p=0.744$ ). la función renal mejoró en ambos grupos, mejoró también el nivel de proteinuria a los meses 1,3,6 y 12, sin diferencias estadísticas (Sautenet et al., 2016).

**Bortezomib** es un inhibidor de proteasomas que altera el proceso de degradación de proteínas intracelular, este medicamento fue aprobado en el uso de mieloma múltiple y linfoma de células del manto, por la alta sensibilidad de las células plasmáticas a este fármaco (Kane et al., 2003). Las células plasmáticas son sensibles a la inhibición del proteasoma por la continua producción de inmunoglobulinas y se ha reportado que bortezomib es capaz de inducir apoptosis de las células plasmáticas y selectivamente inhibe la producción de anticuerpos anti-HLA (Perry et al., 2009). En la literatura existen serie de casos donde los pacientes con ABMR se han beneficiado del uso de bortezomib, un ejemplos es Everly y cols que publican 8 eventos de ABMR probado mediante biopsia, de los cuales 6 fueron tratados con bortezomib, en cada uno de los 6 casos manejados se presentó rápida recuperación del rechazo, rápida y sostenida reducción de niveles de DSA, mejoría de la función del injerto renal, y un periodo libre de nuevo evento de rechazo a 5 meses de seguimiento (Everly et al., 2008).

Además de los fármacos comentados previamente, existen en estudio el anticuerpo monoclonal contra IL-6R (**tocilizumab**) que ha sido probado en estudios de fase I/II en pacientes con rechazo crónico activo de ABMR (Choi et al., 2017). Otro fármaco es el **Eculizumab**, anticuerpo monoclonal humanizado IgG que liga al complemento específicamente C5 y C5b, bloqueando la generación del complejo C5b-C9 (Locke et al., 2009).

## **SUJETOS Y MÉTODOS**

### **Tipo de estudio**

Se realizó un estudio observacional, transversal y descriptivo en dos grupos de estudio, pacientes con trasplante renal con rechazo y un grupo de pacientes con trasplante renal sin rechazo del injerto.

### **Universo de estudio**

Pacientes receptores de trasplante renal sometidos a trasplante renal a partir de enero 2018 en el Hospital General de México "Eduardo Liceaga"

### **Criterios de inclusión**

#### Pacientes con trasplante renal:

- + Pacientes que son trasplantados en consecutivo.
- + Pacientes mayores de 18 años
- + Pacientes que deseen participar en el estudio.
- + Pacientes que no tengan proceso infeccioso concurrente

#### Grupo con Trasplante renal y rechazo:

- + Pacientes con TR y rechazo celular diagnosticado mediante biopsia renal y clasificados con criterios Banff.

+ Pacientes con TR y rechazo humoral o mediado por anticuerpos clasificados con criterios Banff

+ Pacientes con Rechazo confirmado y sin proceso infecciosos concurrente

### **Criterios de exclusión**

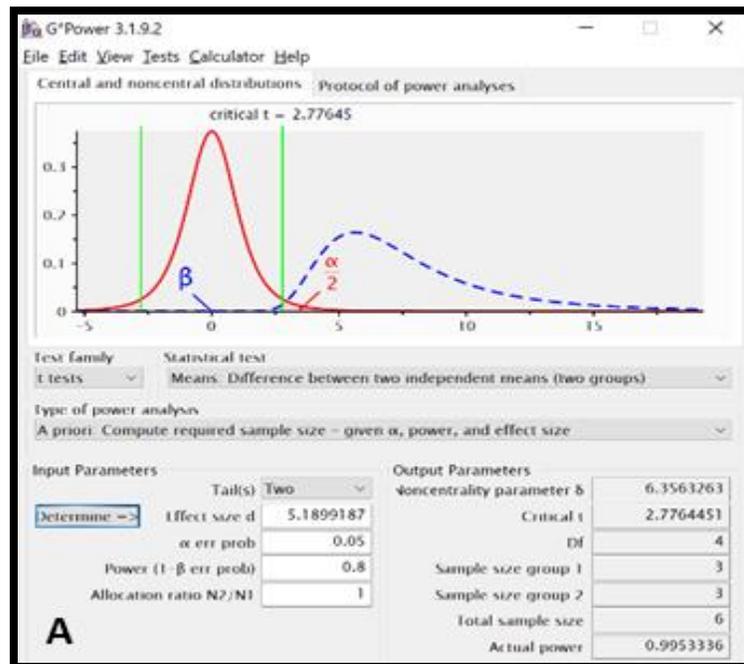
+ Pacientes que no acudan a su toma de muestra

+ Pacientes que por alguna razón técnica no se obtenga el experimento de citometría de flujo

### **Cálculo de tamaño de muestra**

Para el cálculo de muestra del **grupo con rechazo y grupo control** se usó el trabajo de Carmona y Cols, artículo donde se midió la proporción de células T regs mediante citometría de flujo en sujetos sanos, pacientes en hemodiálisis y pacientes con trasplante renal. Las medias de proporción de las células T regs encontradas en el estudio fueron 50.3 IC 95% (39.9-60.6), 66.2 IC 95% (61.7-70.6) y 32.0 IC 95% (28.1-35.9) respectivamente. Calculamos un error alfa del 0.05 y un poder estadístico de 80% con un análisis bidireccional (a dos colas) usando el software GPower 3.1 (Faul, Erdfelder, Lang, & Buchner, 2007). El cálculo matemático arrojado fue de 3 pacientes por cada grupo con poder del 80%, logrando alcanzar un poder estadístico del 95 % con 5 pacientes. Por la experiencia previa en proyectos de citometría se decidió incluir 7 pacientes por grupo considerando posibles pérdidas.

**Tabla 3. Cálculo de muestra con el programa de G.Power 3.**



Se muestra el cálculo del tamaño de la muestra para el contraste de medias a priori, dado el valor de alfa y beta. Los grupos de trasplante con rechazo y trasplante sin rechazo.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el año 2019 en México se realizó TR solo al 17 % de los pacientes que se encontraban en la lista de espera (registro nacional de trasplante). Este déficit de trasplantes renales ha sido la hegemonía desde que se lleva registro en el país. Durante los tres primeros años postrasplante se pierden el 27 % de los injertos renales en México, siendo la principal causa (después de la muerte con injerto funcionando) la asociada con eventos de rechazo agudo que no se diagnostican oportunamente y tampoco reciben un adecuado seguimiento. Esto debido a que el seguimiento del trasplante es en base a la medición de creatinina sérica, sin embargo, cuando esta aumenta, es porque el daño microestructural secundario a rechazo es grave e irreversible. La pérdida del injerto también está asociada a rechazo humoral crónico, ya que una vez tratado el rechazo primario se puede observar un daño crónico sin repercusión inicial en los valores de creatinina sérica, pero con rechazos subclínicos que conllevan a pérdida del injerto renal. El mejor seguimiento del trasplante es con biopsia del injerto ya que puede identificar rechazos subclínicos, recibiendo tratamiento oportuno y evitando la progresión del daño microestructural, aunque la biopsia no se realiza en todos los centros, conlleva costos elevados además de ser un procedimiento invasivo con alta morbi-mortalidad.

## **JUSTIFICACIÓN**

Necesitamos evidencia contundente que permita conocer la participación y asociación de las células que colaboran en la inmunidad como son las células Treg, B reg y NK en el rechazo al injerto. Este conocimiento permitirá hacer estudios con

diseños metodológicos adecuados para poder conocer si esta información se asocia directamente a la detección de eventos de pérdida al injerto y de esta forma ofrecer alternativas de seguimiento a los pacientes. Ya que aún hoy, no se ha logrado desarrollar herramientas diagnósticas y de seguimiento novedosas, sensibles y específicas para identificar los rechazos de manera temprana que permita hacer intervenciones oportunas que preserven la función renal.

### **PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Cuáles son los patrones de expresión de los inmunofenotipos de las células Tregs, Bregs, vías de Co-estimulación y células NK en sangre periférica en los pacientes con trasplante renal con rechazo y sin rechazo al injerto?

### **HIPÓTESIS**

**SI** el rechazo en el trasplante renal se caracteriza por presentar cambios en la expresión de inmunofenotipos en las células T, B y NK, **ENTONCES** podremos identificar mediante citometría de flujo los patrones en la expresión de los inmunofenotipos de las diferentes subpoblaciones celulares entre pacientes con trasplante renal con rechazo y sin rechazo al injerto.

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Caracterizar los inmunofenotipos de las células T, B y NK en pacientes con trasplante renal con y sin rechazo del injerto, mediante citometría de flujo

### **Particulares**

- Identificar mediante citometría de flujo las poblaciones de linfocitos T reg caracterizados por CD3+ CD4+ CD25+ FOXP3+ (T reg)
- Caracterizar los inmunofenotipos CD28+, PD-1+, CTLA-4 e ICOS+ En los linfocitos T reg en los pacientes trasplantados con y sin rechazo
- Identificar mediante citometría de flujo las poblaciones de linfocitos B reguladores (CD19+CD38+CD24+) en sangre periférica de pacientes con trasplante renal con y sin rechazo al injerto
- Identificar mediante citometría de flujo las poblaciones de linfocitos Natural Killer (NK) caracterizados por (CD3- CD16+ CD56+)

## **Aprobación del comité de investigación**

Clave de reg. DI/16/304-B/03/142

## **Material y método**

### **Citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica relativamente nueva, es posible analizar millones de células en pocos minutos y de este análisis celular es posible medir más de veinte parámetros de cada una de las células al mismo tiempo; con lo que podemos responder a hipótesis que se puedan formular alrededor de los fenómenos biológicos tanto celulares como subcelulares que tenga un impacto clínico en los pacientes de trasplante renal. En este escenario es importante el estudio de los inmunofenotipos celulares desde el punto de vista diagnóstico, es decir, la capacidad exploratoria de fenómenos biológicos presentes en el rechazo de trasplante renal presentes en las células T, B y NK circulantes. También nos da la oportunidad de predecir la evolución de la enfermedad, así como sus recaídas mediante la monitorización. Mediante la citometría de flujo se trata de responder y caracterizar las preguntas y los escenarios que los clínicos necesitan identificar para tomar las decisiones sobre el paciente.

El análisis de las subpoblaciones de células T reguladores, así como las diferentes vías de Co-estimulación se determinarán mediante citometría de flujo de sangre periférica con el citómetro FACSAria II BD con tres láser y capacidad de 12 canales (fluorocromos). Los paneles de anticuerpos monoclonales seleccionados en base a las evidencias publicadas se han definido en base a no distinción de clona y a los 12 fluorocromos disponibles en el mercado comercial, que pueden identificarse en los tres láser azul, rojo y violeta respectivamente.

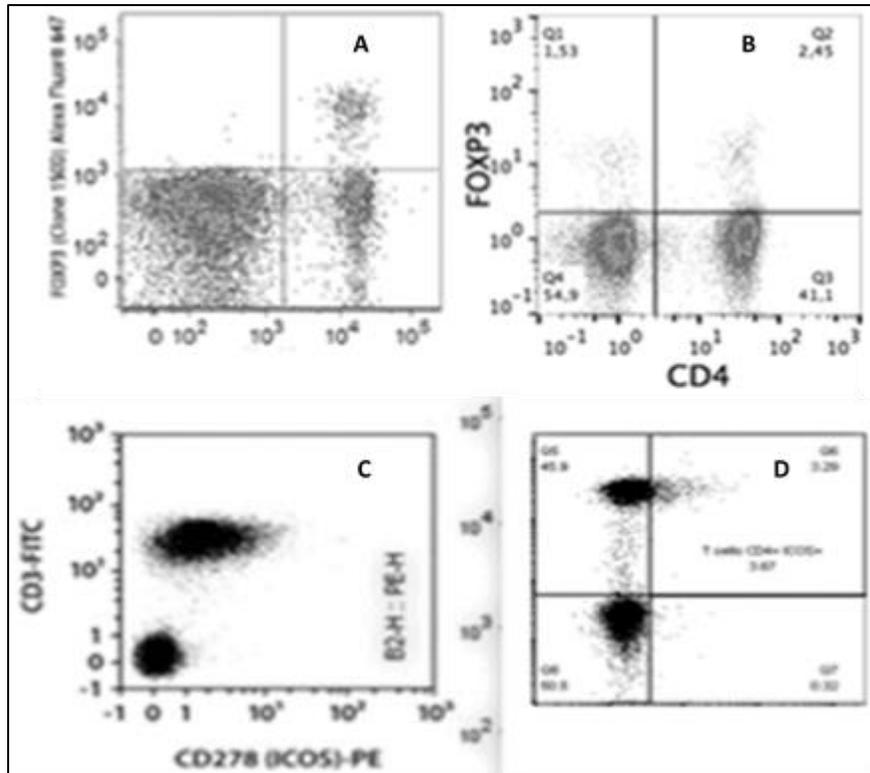
## **Estandarización**

Con el objetivo de establecer las condiciones ideales de trabajo y obtener el máximo rendimiento de las propiedades fluorescentes de cada uno de los anticuerpos y en conjunto formando plantillas, se llevó a cabo la estandarización de la citometría de flujo y se diseñó la estrategia del análisis multiparamétrica.

Una vez obtenida la muestra en los pacientes, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre completa heparinizada usando centrifugación en gradiente de densidad Lymphoprep™ (Stem cell Technologies, Vancouver, Canadá) a 500 g durante 30 min a 16 ° C según las instrucciones del fabricante. Después de la centrifugación, las células de la interfaz se recolectaron, se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un pH de 7,2 y se contaron en un hemo citómetro, midiendo la viabilidad celular mediante el método de exclusión del colorante azul tripán. Se utilizaron muestras con al menos un 75% de viabilidad para la inmuno tipificación. Brevemente, se incubaron o no alícuotas de  $1 \times 10^6$  células suspendidas en PBS (autofluorescencia y fluorescencia menos controles de uno -FMO-) durante 15 min con anti-CD3 FITC (Clon HIT3a, BioLegend, CA, EE. UU.), Anti-CD4 PECy7 (Clon OKT4, BioLegend, CA, EE. UU.), Anti-CD25 PECy5 (clon BC96, BioLegend, CA, EE. UU.), anti-PD1 APC (clon PD1.3.1.3, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y así con todos los anticuerpos (dependiendo la plantilla estudiada) a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron en PBS y para la subpoblación de Tregs se trataron con tampones del kit Human FOXP3 Buffer Set (BD Biosciences, CA, EE. UU.), para la identificación intracelular de FOXP3 con anti-FOXP3 PE (Clon PCH101, eBioscience, MS, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Después del último paso de lavado, las células se re-suspendieron en PBS y se analizaron usando un citómetro de flujo FACS Aria IIu (BD Biosciences, CA, EE. UU.). Se capturaron al menos 30.000 eventos de T helper (Th) CD3 + CD4 +, linfocitos correspondientes a eventos no agregados (área de dispersión hacia adelante FSC-A vs. diagrama de puntos de altura de dispersión hacia adelante FSC-H). El análisis multiparamétrico se realizó mediante el software Infinicyt v1.8 (Cytognos SL, Salamanca, España). Una vez identificadas como células Th (FSClowSSClowCD3 + CD4 +), las células que expresan CD25 y FOXP3 se identificaron como T regs usando un control FOXP3 FMO como referencia. La expresión relativa de todos los inmuno marcadores en linfocitos Th y T regs se informó como intensidad de fluorescencia media (MFI).

Grafica 2. Estandarización, ejemplos de células Tregs y células T helper con ICOS.



Ejemplo de estandarización para determinar proporción de células T regs en los plots A y B, en el primer caso (A) se observa la imagen proveniente del inserto anti-FOXP3 PE (Clon PCH101, eBioscience, MS, EE. UU.) y en plot B se observa la imagen obtenida de los experimentos de este proyecto, las diferencias encontradas entre ambos plots en las poblaciones negativas para CD4+ obedecen a poblaciones celulares diferentes, en caso del inserto a células provenientes de Bazo y en nuestros experimentos células de sangre periférica. En los plots C y D se encuentra las imágenes relacionadas a la estandarización de CD 278+( ICOS) plot C proveniente del inserto (BD BV711 Mouse Anti-Human CD278) y el D corresponde al plot de las células T helper ICOS+.

## Titulación

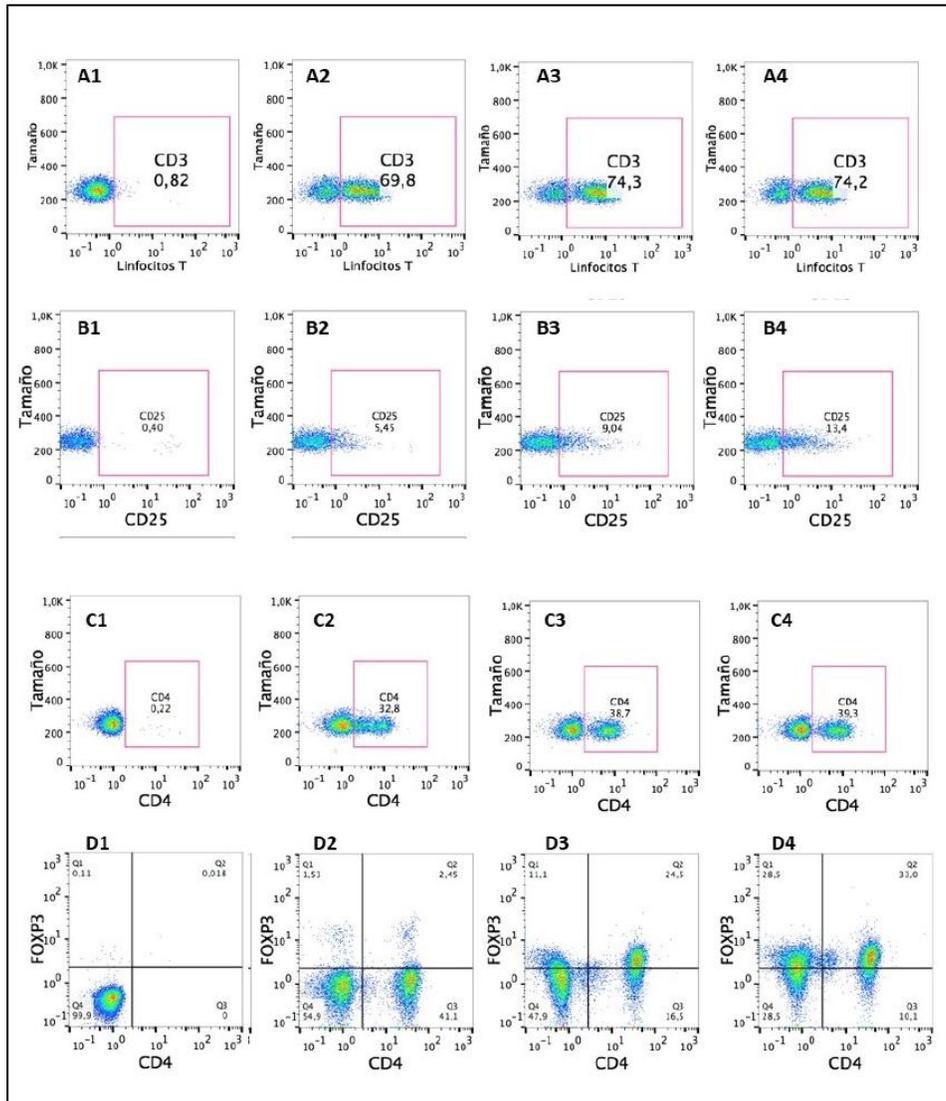
La titulación de anticuerpos es un procedimiento diseñado para determinar las concentraciones de anticuerpos apropiada para emplear en técnicas de citometría. Se ha descrito que la mejor concentración de anticuerpos (Abs) es aquella que permite discriminar mejor entre una célula positiva y una célula negativa, lo que hace importante determinar la intensidad media de fluorescencia de la tinción y el ruido o uniones inespecíficas; para esto, se debe obtener la intensidad media lineal del canal de fluorescencia para las células positivas y para las negativas o ruido. Para identificar la concentración óptima de anticuerpo se procedió a titular los anticuerpos utilizados en el presente proyecto como es el caso de las células Tregs: CD3, CD4, CD25 y FOXP3, así como los anticuerpos de la vía de Co-estimulación (ICOS) mostrado en la **gráfica 2**. Se realizaron curvas de titulación con las siguientes concentraciones Las dosis estandarizadas más comunes de anticuerpos son: 0.5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 3  $\mu$ l, y 5  $\mu$ l. La tabla 4 muestra las concentraciones utilizadas y los valores reportados de cada concentración.

**Tabla 4: titulación de la plantilla para células Tregs**

Anticuerpo	Volumen (μl)	Concentración (mg/ml)	Porcentaje % Células positivas
CD3+	0.5	0.25	69.8
	1	0.5	74.3
	2	1.0	74.2
	3	1.5	74.4
CD4+	0.5	0.25	31.8
	1	0.5	38.7
	2	1.0	39.1
	3	1.5	39.3
CD25+	0.5	0.25	5.45
	1	0.5	9.04
	2	1.0	13.4
	3	1.5	14.2
FOXP3+	0.5	0.25	2.45
	1	0.5	24.5
	2	1.0	33
	3	1.5	34.2

En esta serie de dosis para titulación se definió el volumen y concentración de los anticuerpos en la plantilla de células T regs, se puede observar en el caso del anti-CD3+ su comportamiento fue muy estable y congruente en cuanto a la capacidad de discriminar las poblaciones celulares positivas/negativas de tal manera que se decidió por la dosis/volumen de anticuerpo más baja, este ejercicio nos permite además de conocer la distribución de proporciones celular, así como optimizar recurso. Así el caso para el resto de los anticuerpos.

**Grafica 3. Titulación de anticuerpos en células Tregs: CD3, CD25, CD4 y FOXP3.**

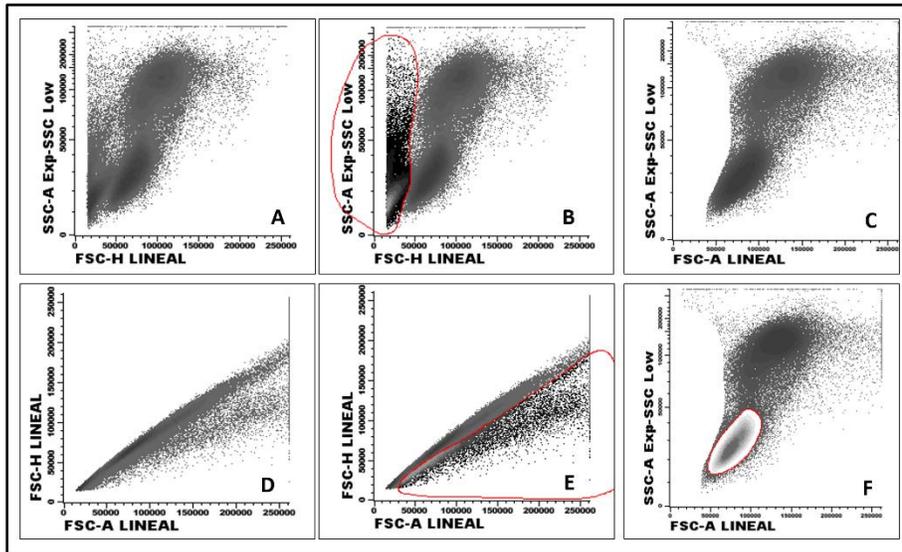


La figura muestra los resultados de citometría para cada una de las condiciones analizadas. Panel A, Células marcadas con anticuerpo anti-CD3. A1) Control negativo, A2) 0.5 µl, A3) 1.5µl, A4) 2 µl. Panel B, Células marcadas con anticuerpo anti-CD25. B1) Control negativo, B2) 0.5µl , B3) 1.5 µl, B4) 2 µl. Panel C, Células marcadas con anticuerpo anti-CD3. C1) Control negativo, C2) 0.5 µl, C3) 1.5 µl, C4) 2 µl. Panel D, Células marcadas con anticuerpo anti-FOXP3. D1) Control negativo, D2) 1 µl, D3) 1.5 µl, D4) 2µl.

## **Estrategia de análisis**

Para el análisis de las células inmuno marcadas, se leyeron 30,000 eventos de célula T helper (CD3+, CD4+), las células mononucleares para estudio fueron seleccionadas inicialmente de acuerdo con sus propiedades físicas como son tamaño y complejidad interna. Una segunda selección se creó en función de las características de la inmunofluorescencia de las células aisladas, evaluando las poblaciones celulares mediante gráficas de cuadrantes en una escala logarítmica ver Figura 4.

Grafica 4. Estandarización y estrategia de análisis de la población celular de estudio



**A** muestra la cantidad total de eventos analizados. **B** "Gating strategy" el cual permite hacer subselección de poblaciones celulares e ir depurando la subpoblación de estudio. Se retira el debris o detritos celulares que fueron registrados como eventos. **E** En esta grafica de puntos se muestra la eliminación de los eventos conocidos como dobletes, con la finalidad de seguir depurando la población de análisis. **F** Se identifican las células mononucleares por sus propiedades físicas (tamaño FSC y complejidad SSC).

## **Machine Learning (Python)**

### **Introducción**

Machine learning se ha convertido en una herramienta estadística para explorar la capacidad predictiva que tienen las variables por sí mismas, así como la capacidad predictiva que tienen cada una de las variables con la interacción del resto. Ante la dificultad de realizar grandes estudios de pacientes con rechazo, la poca reproducibilidad de los diagnósticos categorizados asociados al rechazo del injerto renal y las dificultades que acompaña la realización de la biopsia de injerto, estamos obligados a explorar todas las herramientas posibles para tratar de predecir los eventos inmunológicos asociados al trasplante renal, ya sean rechazos celulares o humorales. Lo anterior tomando como bases marcadores inmunológicos de superficie y citoplásmicos en la célula mononuclear de sangre periférica y la expresión de genes que codifican para algunos de estos marcadores, así como genes de inflamación, fibrosis y apoptosis.

### **Desarrollo del proyecto**

Se obtienen datos de experimentos en sangre periférica, midiendo los inmunofenotipos de las células T CD4+, células Tregs, Bregs, y moléculas de Co-estimulación, todo esto mediante citometría de flujo. Datos complementarios fueron obtenidos midiendo la expresión de un grupo de genes relacionados con inflamación, fibrosis, inmunofenotipos y apoptosis. Todos los resultados fueron obtenidos de pacientes con eventos inmunológicos de rechazo y de pacientes control sin eventos de rechazo, corroborado por biopsia.

## **Modelos para explorar**

Se exploraron los siguientes modelos: regresión logística, vecinos cercanos, árboles de decisión, AdaBoost, Gradient Boosting y Stochastic Gradient Boosting

## **Análisis exploratorio de datos**

**Modelo 1** (Toda citometría de flujo, T regulación, B regulación y Co-estimulación)

['%CD4'], 'ICOSCD4', 'CTLA-4CD4', 'CD28CD4', 'CD279CD4', '%TREGS', 'ICOSTREGS', 'CTLA-4TREGS', 'CD28TREGS', 'CD279TREGS', '%LINF', '%BREGS', '%BCD5', 'CD3-', 'CD16+', 'CD16-', '%NKT', '%CD3', '%CD8' todas las variables divididas en quintiles

**Modelo 2** (Tregs)

['%CD4'], 'ICOSCD4', 'CTLA-4CD4', 'CD28CD4', 'CD279CD4', '%TREGS', 'ICOSTREGS', 'CTLA-4TREGS', 'CD28TREGS', 'CD279TREGS' todas divididas en quintiles

**Modelo 3 (Bregs)**

['%LINF'], '%BREGS', '%BCD5', 'CD3-', 'CD16+', 'CD16-', '%NKT', '%CD3', '%CD8'

Todas las variables divididas en quintiles

# Resultados

## Demográficos

Durante el periodo de reclutamiento se logró un total de 42 pacientes de los cuales 34 reunieron los criterios de inclusión y fueron realizados todos los experimentos de citometría de flujo y biología molecular, específicamente RT-PCR; de estos pacientes, 18 pacientes del género masculino, solo el 8% de todos los pacientes fueron de donador cadavérico, el 41 % recibió inducción con timoglobulina, y esta diferencia en la proporción no mostro diferencias estadísticamente significativas tanto en el grupo control ni de rechazo, en total 13 pacientes fueron asignados al grupo de rechazo de injerto y 21 al grupo control sin rechazo, en ambos casos corroborados por biopsia. En el 35% de los casos se realizó la biopsia renal por indicación médica, específicamente por disfunción del injerto con una  $p=0.001$ , ver tabla 5.

Con esta n al realizar el contraste de datos se alcanzó el poder estadístico de 0.95 con una D de cohen de 1.4. Los datos demográficos y valores basales de pruebas de función renal se observan en la tabla 2, como es de esperarse los únicos valores diferentes entre ambas poblaciones fueron los relacionados con la función del injerto al momento de la biopsia renal, el resto no mostro diferencias.

**Tabla 5. Datos basales y demográficos**

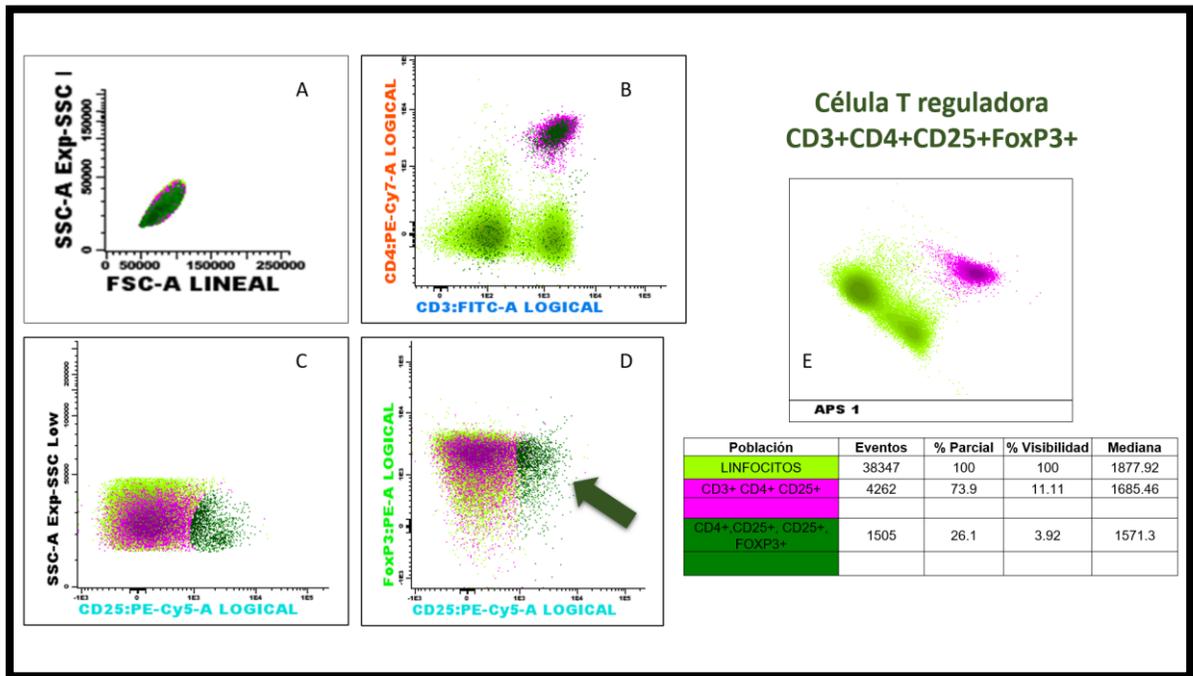
<b>Variable</b>	<b>Control</b>	<b>Rechazo</b>	<b>p*</b>
	<b>21</b>	<b>13</b>	
<b>Masculino</b>	13	5	
<b>Femenino</b>	8	8	<b>0.2</b>
<b>EDAD</b>	25 (22.5 – 36.00)	24.50 (23.00 -33.00)	<b>0.549</b>
<b>IMC</b>	23.57 (19.65-25.85)	21.94 (18.81-26.10)	<b>0.559</b>
<b>Tipo de Donador</b>			
<b>Vivo</b>	15	11	
<b>Cadavérico</b>	6	2	<b>0.55</b>
<b>Cr. Basal mg/dl</b>	1.20 (1.10 -1.45)	1.50 (1.20 -1.80)	<b>0.156</b>
<b>CKD-EPI Basal ml/min</b>	70.25 (52.40-77.50)	50.70 (42.50-76.90)	<b>0.163</b>
<b>Cr Biopsia mg/dl</b>	1.40 (1.05-1.65)	1.80 (1.30-3.40)	<b>0.039</b>
<b>CKD-EPI Bx ml/min</b>	63.75 (49.50-78.40)	45.00 (37.60-52.80)	<b>0.021</b>
<b>DBx (m/RIQ)</b>	365.50 (217.00-395.00)	943.50 (406.00-828.00)	<b>0.001</b>
<b>Terapia de Inducción (n/%)</b>			
<b>Basiliximab</b>	12	8	
<b>Timoglobulina</b>	9	5	<b>0.482</b>
<b>INMUNOSUPRESIO N (n/%)</b>			
<b>TMP</b>	23 (90.5)	12 (92.86)	
<b>CMP</b>	0 (0)	1(7.69)	
<b>TAP</b>	1 (3.13)	0(0)	
<b>SMP</b>	1 (3.13)	0(0)	
<b>TSP</b>	1 (3.13)	0(0)	<b>0.397</b>
<b>INDICACIÓN BIOPSIA (n/%)</b>			
<b>Protocolo</b>	13	3	
<b>Disfunción</b>	2	10	<b>0.001</b>

Los valores totales de sujetos se expresan como (n) y porcentaje (%); las variables cualitativas se expresaron como medianas (m) y Rango Intercuartílico (RIQ). Valor de P significativo si  $p \leq 0.05^*$ . Abreviaturas: IMC (índice de Masa corporal); Creatinina (Cr), CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI), Cr Biopsia (Creatinina en el momento de la biopsia), CKD-EPI 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.

## **Resultado de poblaciones de células Tregs**

El primer objetivo fue identificar a las células Tregs y si existían diferencias entre el grupo de rechazo y el grupo control sin rechazo. En la figura 6 se observa la estrategia de análisis donde el 11.1 % de la población celular fue CD3+, CD4+, CD25+ y una sub-selección de esta población mostró el 3.2% de esta población tiene con el fenotipo de CD3+, CD4+, CD25+, FoxP3+, inmunofenotipo más aceptado y característico de la célula Tregs (color verde doble positivo panel D)

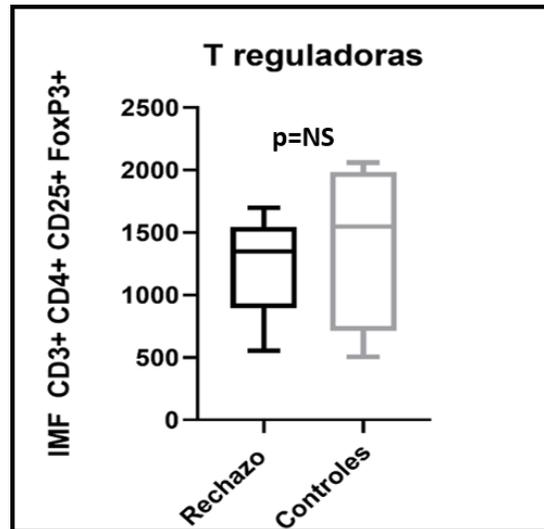
Grafica 5. Análisis del inmunofenotipo T regulador CD3+CD4+CD25+FoxP3+



A) Estrategia de análisis y obtención de subpoblación para células Tregs a partir de células mononucleares identificadas mediante FSC y SSC. B) población de T helper, dobles positivas para CD3+ CD4+, C) población doble positivo para CD3+ y CD4+ (rosa), D) separación de población Treg mediante el marcaje de FoxP3 flecha.

El abordaje estadístico entre las poblaciones celulares a lo largo del estudio fue realizado mediante estadística no paramétrica con análisis a priori bidireccional (a dos colas) con la prueba de U Mann Whitney. En el análisis de las poblaciones de células Tregs encontró en el grupo de rechazo una IMF de 1348 (IC 894-1545) VS 1547 (IC 713-1984) con una  $P= 0.31$  no significativa. Tanto el número de células Tregs como la IMF no parecen tener una participación que sugiera participación directa en el rechazo al injerto renal.

Grafica 6. Linfocitos T reguladores en rechazo y controles

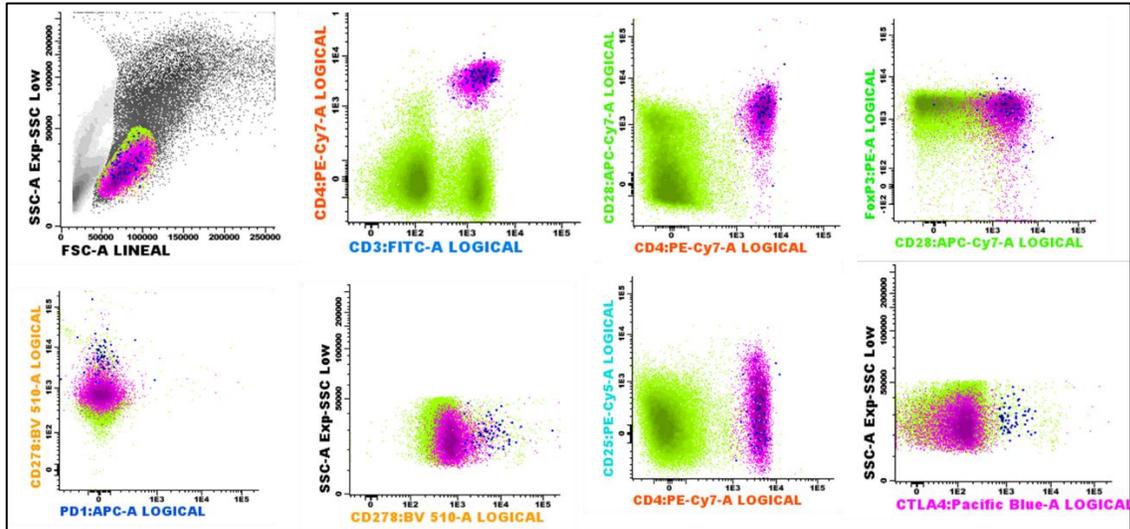


Pacientes trasplantados con y sin rechazo renal, Intensidad mediana de la inmunofluorescencia (IMF) de las poblaciones de células Tregs entre el grupo de rechazo y el grupo control de pacientes con trasplante renal sin rechazo (P= 0.52)

## **Análisis de células T: CTLA4+, CD28+, ICOS+ Y PD1+**

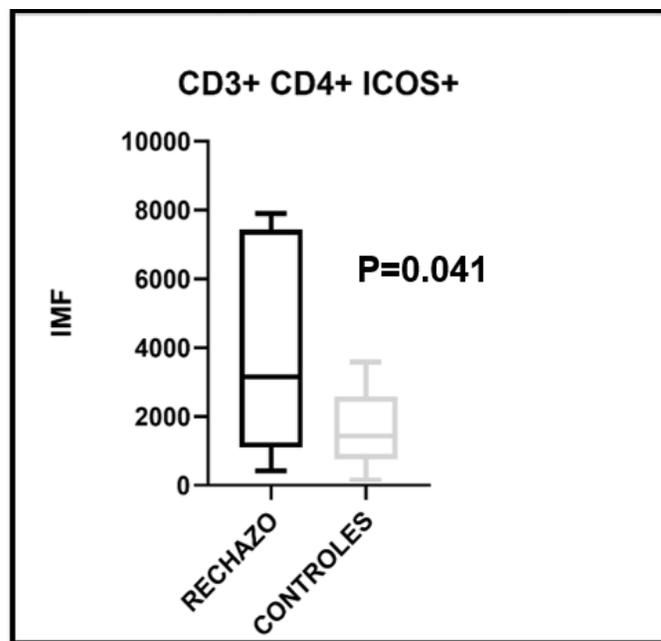
El segundo objetivo tuvo la finalidad de identificar si, los linfocitos que participan en las vías de Co-estimulación son diferentes entre los grupos de estudio. Se realizó análisis de los inmunofenotipos en los linfocitos T que expresan las moléculas que participan en vías de co-estimulación que definimos mediante el estudio de los marcadores CTLA4+, CD28+, ICOS+ e incluimos PD-1+. El análisis multiparamétrico del inmunofenotipo CD3+ CD4+ ICOS+, mostró en el grupo de rechazo una IMF de 3153 (IC 1106-7426) vs 1434(IC 771-2590) en el grupo sin rechazo (P= 0.04) (Figura 8). El resultado sugiere una participación de ICOS en la patogénesis del rechazo al injerto. El resto de los marcadores analizados no mostraron diferencias

Grafica 7. Caracterización y estrategia de análisis de vías de Co-estimulación en la célula T CD4+



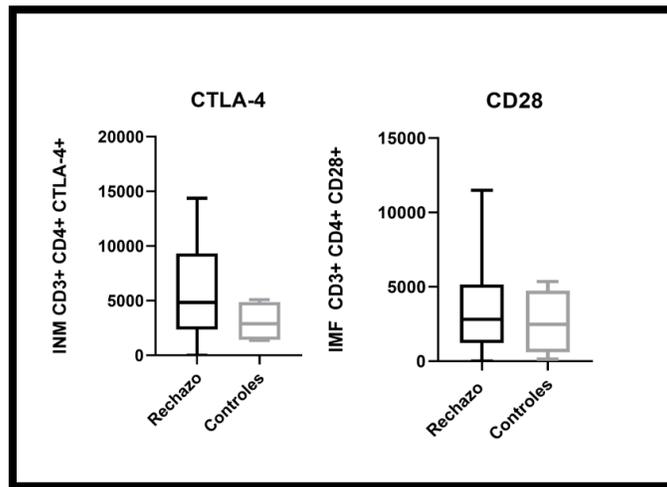
Estrategia de análisis en y caracterización de CD, 28, ICOS, PD-1, Tregs y CTLA-4.

**Grafica 8.** IMF para ICOS expresada en Linfocitos T



Intensidad mediana de la inmunofluorescencia (IMF) de las poblaciones de células que expresan ICOS entre el grupo de rechazo y el grupo control  $P=0.0413$

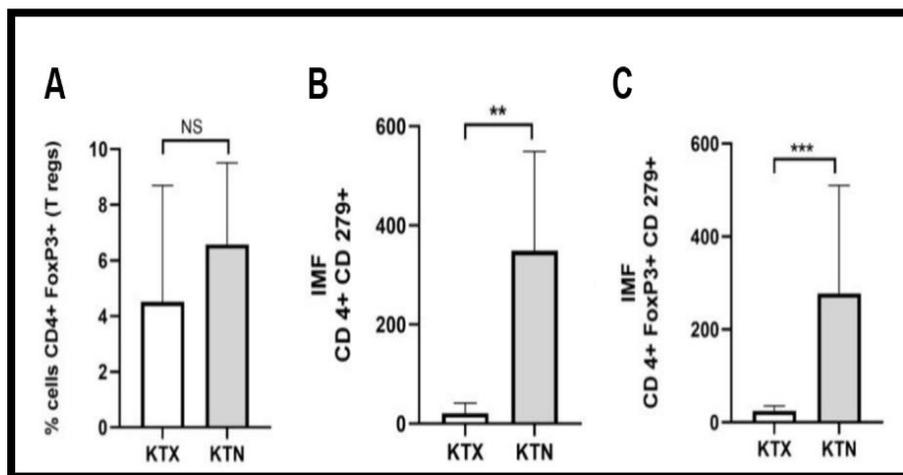
**Grafica 9. Análisis de Linfocitos T que expresan CTLA-4+ y CD 28+**



Intensidad mediana de la inmunofluorescencia (IMF) de las poblaciones de células que expresan CTLA-4+ y CD28+ entre el grupo de rechazo y el grupo control  $P=0.31$  y  $P=0.68$  respectivamente, sin diferencia significativa.

El análisis del inmunofenotipo CTLA-4 no mostró diferencia entre los grupos con IMF para el grupo de rechazo de 2601 (IC 1672-6597) vs el grupo control 2072 (IC 1217-3543) (P= 0.31). En el caso del inmunofenotipo de CD28+ se encontró en el grupo de rechazo una IMF de 1838 IC (1313-2528) vs 1599 con una (P= 0.68). figura 9. En artículos recientes se ha propuesto que uno de los mecanismos por lo que las células Tregs participan en la inmunomodulación, es inducir apoptosis a través de la vía de co-inhibición de PD-1. Por lo que se estudió el comportamiento de este marcador (CD279+) en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+CD279+. Los resultados fueron valores de IMF de 17.74 IC del 95 %, 3.0-43.28 vs 189 IC del 95%, 103-697 en el grupo de rechazo y control respectivamente. El estadístico mostró una P=0.005. Para corroborar que la observación fuera específica de la subpoblación de células Tregs se analizaron las células CD4+ FOXP3+ CD279+ obteniendo el mismo resultado. Lo que nos lleva a apoyar que la vía de PD-1+ participa en la génesis del rechazo al injerto renal a través de apoptosis

Grafica 10. Análisis de las poblaciones celulares que expresan PD-1

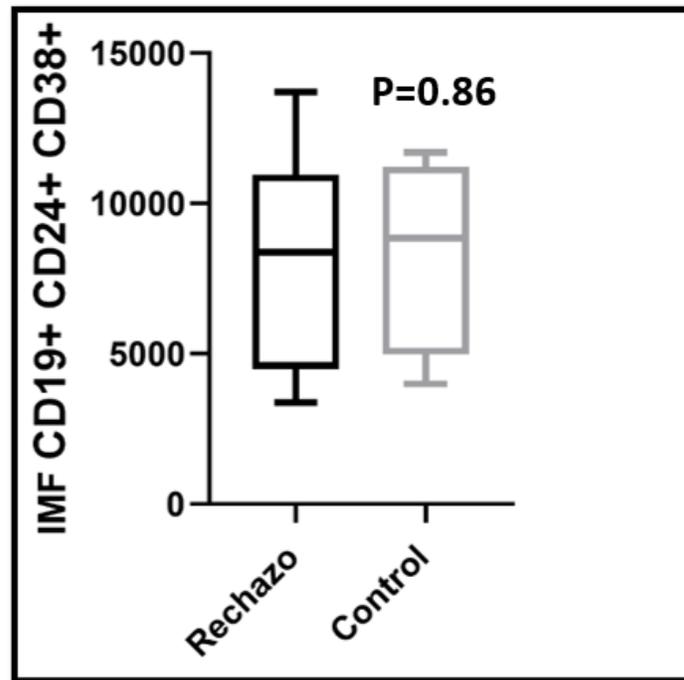


**A.** Células T reguladoras, **B y C** diferencia estadística en la expresión de PD-1 independientemente de la estrategia de análisis, directamente del linfocito T cooperador (**B**), Co-expresión de T cooperador y T regulador (**C**) *M A Carmona-Escamilla, Miguel Ángel Fonseca-Sánchez, Jessica-L Prieto Chávez et al Transplant Proc. 2020;52(4):1132-1135*

## **Análisis de células B reguladoras y NK**

La estrategia de análisis de las poblaciones de B reguladoras y NK se observan en la figura 12. Al analizar las diferencias en las subpoblaciones de la línea de células B reguladoras caracterizadas por los marcadores CD19+, CD24+ y CD38+ de identificó una IMF de 8386 IC 95% (3377-13706) vs 8845 IC95% (3991-11697)  $P=0.86$ , no se identificaron cambios significativos entre los grupos de rechazo y control.

Grafica 11. Análisis estadístico de la población de células B reguladoras

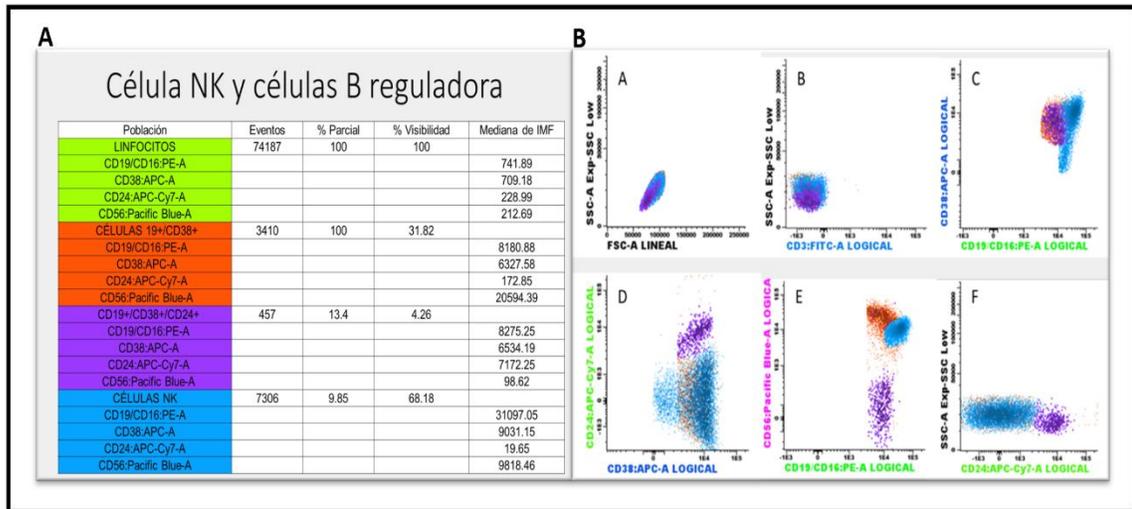


Intensidad mediana de la inmunofluorescencia (IMF) de las poblaciones de células que expresan la población de células B reguladoras, contraste entre el grupo de rechazo y el grupo control  $P=0.86$  sin diferencia significativa.

El estudio de la población de células NK (CD16+) mostró una IMF de 32274 IC 95 (20914-64738) en los pacientes con rechazo vs 66121 IC 95 (42169-82231) en el grupo de no rechazo,  $P=0.013$  (Fig. 13-A). En el análisis de IMF CD56+ encontramos en el grupo de rechazo una IMF de 5469 IC 95 (966-9818) en los pacientes con rechazo vs 9158 IC 95 (5059-12126) en el grupo de no rechazo ( $P=0.058$ ) (fig. 13-B). Al contrastar el inmunofenotipo completo de la NK (CD3-CD16+, CD56+) con la sumatoria de las IMF de ambos marcadores, el resultado en el grupo de rechazo fue de 39687 IC (25912-72748) vs 72829 IC95% (52128-94357) en el grupo control,  $P=0.007$  (Fig 13-C).

Aunque la participación de las células NK en la etiología del rechazo al injerto no ha sido totalmente definida, este trabajo apoya los hallazgos en la literatura donde esta subpoblación parece participar de manera directa en la génesis del rechazo y tiene la propiedad de ser diferentes entre ambos grupos.

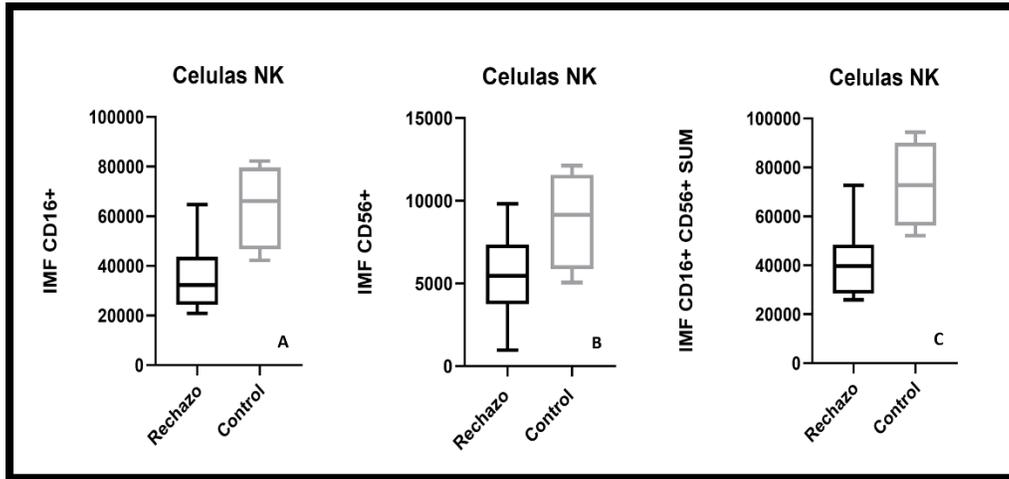
**Figura 6. Estrategia de análisis de células B reguladoras y NK**



**A)** proporción y números absolutos de células obtenidas en el análisis de un caso sin rechazo

**B)** A. FSC y SSC de células mononucleares, B. Identificación de CD3- , C, D, F inmunofenotipo de la célula B reguladora. E. Las células NK se obtienen a partir de la población de estudio (A) y marcando los anticuerpos CD16+ y CD56+ (E).

**Grafica 12:** análisis de la subpoblación de Natural Killer

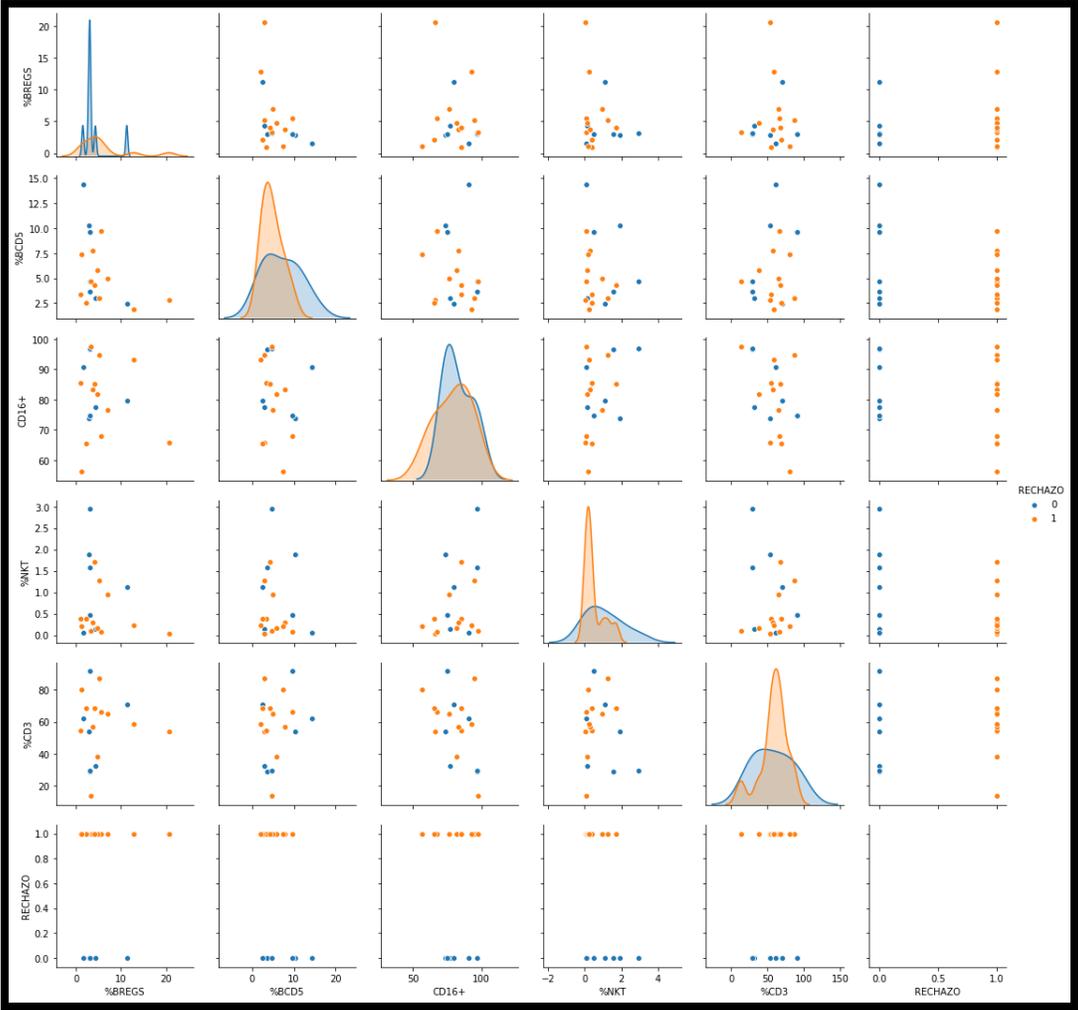


**Graficas A y B)** muestra la diferencia significativamente estadística en la expresión del IMF para CD16+ y CD56+ marcadores de NK, **C)**. La suma de ambos inmunofenotipos incrementa la diferencia estadística **P=007**.

## Ingeniería de atributos

Se realizó ingeniería de atributos en regresión logística (valor de C y penalización), vecinos cercanos (número de vecinos), árboles de decisión (criterio y profundidad máxima). Para evaluar hiper parámetros en modelos de *Boosting*. Para el modelo de *Stochastic Gradient Boosting*, se buscó el mejor modelo con los pocos datos obtenidos no penalizados y solo en una fase ya que no se agregaron más datos para desarrollar el autoaprendizaje. Se eligieron los mejores modelos, regresión logística y vecinos cercanos por presentar los mayores valores en general de F1Score y de *weighted average*. En el modelo para vías de co-estimulación, Bregs y Tregs, *weighted average* mostro 0.75 como predictivo y F1Score 0.77, ambos resultados con buena capacidad predictora, Ver tabla 5.

**Grafica 13. Distribución de eventos de rechazo y controles, Python**



Se muestran las gráficas de distribución de datos de cada una de las variables que conforman los modelos, así como su contraste directamente con la variable homónima del grupo de control y rechazo.

**Tabla 5. Resultados de salida individual de los modelos Python**

<b>Modelo 1</b>					
<b>Modelo de citometría completo</b>					
<b>Regresión logística</b>			<b>Vecinos cercanos</b>		
	Preci sion	Recall	F1-Score	Support	
	0	0	0	0	1
	1	0.75	1	0.86	3
<b>Accuracy</b>			0.75		4
<b>Macro avg</b>		0.38	0.5	0.43	4
<b>Accuracy</b>			0.75		4
<b>Macro avg</b>		0.75	0.83	0.73	4
<b>Weighted avg</b>		0.88	0.75	0.77	4

<b>Modelo 2</b>					
<b>Células T reguladoras</b>					
<b>Regresión logística</b>			<b>Vecinos cercanos</b>		
	Precision	Recall	F1-Score	Support	
	0	1	0.2	0.33	5
	1	0.43	1	0.6	3
<b>Accuracy</b>			0.5		8
<b>Macro avg</b>	0.71	0.6	0.47	8	0.71
<b>Weighted avg</b>	0.79	0.5	0.43	8	0.79
<b>Accuracy</b>			0.5		8
<b>Macro avg</b>	0.29	0.4	0.33	8	0.29
<b>Weighted avg</b>	0.36	0.5	0.42	8	0.36

<b>Modelo 3</b>					
<b>Células B reguladoras</b>					
<b>Regresión logística</b>			<b>Vecinos cercanos</b>		
	Precision	Recall	F1-Score	Support	
	0	0.57	0.5	0.67	2
	1	0	1	0.8	2
<b>Accuracy</b>			0.75		4
<b>Macro avg</b>	0.83	0.75	0.73	4	0.83
<b>Weighted avg</b>	0.83	0.75	0.72	4	0.83
<b>Accuracy</b>			0.75		4
<b>Macro avg</b>	0.83	0.75	0.73	4	0.83
<b>Weighted avg</b>	0.83	0.75	0.72	4	0.83

Se muestran los datos de salida del modelo básico de análisis de autoaprendizaje. Los resultados son regresión de tres modelos, Citometría de flujo completa de Co-estimulación, Bregs y Tregs.

## Discusión

El trasplante renal es la primera opción terapéutica en la mayoría de los pacientes con falla renal crónica que requieren reemplazo de la función renal. La principal complicación asociada con la pérdida del injerto es el rechazo inmunológico y continúa siendo el factor aislado más importante en la sobrevida del injerto (Sellarés et al., 2012). El rechazo agudo del injerto renal es el principal factor asociado al desarrollo de nefropatía del injerto o rechazo crónico. La inmunotolerancia es indispensable para la sobrevida de trasplante y se describe que las vías de Co-estimulación en las células Tregs juegan un papel crítico en este proceso (Wood et al., 2012). La alteración en el balance de estas vías incide de manera directa en el daño al injerto o la inmuno tolerancia de este. En el presente trabajo de doctorado nos planteamos el objetivo de analizar mediante citometría de flujo el comportamiento de las células Tregs, moléculas co-estimuladoras , Bregs y NK en un grupo de pacientes trasplantados con y sin rechazo inmunológico, diagnosticado por biopsia y criterios de BANFF(Haas et al., 2018). Para esto usamos la citometría de flujo, ya que ha mostrado ser una herramienta útil con la posibilidad de analizar millones de células y sus inmunofenotipos en pocos minutos, además de medir más de veinte parámetros de cada una de las células al mismo tiempo.

Las células T juegan un papel preponderante en la inmunología del trasplante (Huang et al., 2007), con la célula T CD4+ como principal orquestadora de la respuesta. El análisis realizado hasta el momento identificó que no hay diferencias en el número de **células Tregs** entre los grupos con y sin rechazo. Algunos autores han sugerido una relación entre el número de células Tregs antes y después del

trasplante, así como asociación con la incidencia de rechazo. Sin embargo, ninguno de los trabajos hasta el momento ha demostrado un valor predictivo significativo con el número de Tregs circulantes. Los resultados obtenidos y los reportes en la literatura nos llevan a sugerir que el papel relevante de las células T reg en la inmunotolerancia está relacionada más directamente con la función de la célula que con el número, por lo que analizar la expresión genética de estas moléculas sería un abordaje para poder responder esta pregunta, este trabajo ya se está llevando a cabo por nuestro grupo de trabajo como una extensión de este proyecto, analizado arreglos de expresión para vías de Tregs entre otras.

Se ha demostrado que la población de Tregs tiene un tráfico constante de la sangre a los tejidos, el efecto puntual de esta población es inmuno modulación a la baja, con efectos anti-inflamatorios con la finalidad de desarrollar inmunotolerancia, tanto en modelos de isquemia y reperfusión (Gandolfo et al., 2009) como en modelos de trasplante y rechazo (Alessandrini & Turka, 2017). El efecto de las células Tregs ha sido estudiado en sangre periférica, muestras de orina e intra tejido (injerto renal).

El modelo y efecto inmune biológico de las células Tregs fue abordado en la orina, donde se encontró un aumento de la expresión de mRNA en aquellos pacientes con rechazo agudo y este aumento de mRNA fue asociado a un mejor pronóstico (Thangamani Muthukumar et al., 2005). En sangre periférica los datos sobre el comportamiento de Tregs son consistentes en la literatura. Se ha demostrado que los pacientes con rechazo crónico tienen niveles más bajos de Tregs comparado con los trasplantados clínicamente tolerantes al injerto renal e incluso tienen menos Tregs que sujetos sanos (Louis et al., 2006). En otro trabajo se mostró la variación

del fenotipo T regulador, donde los pacientes con rechazo crónico tienen niveles más bajos de Tregs incluso de transcritos de FoxP3 comparados con trasplantados sin rechazo (Braudeau et al., 2007). En nuestra población no encontramos diferencias significativas en la población de Tregs entre los grupos de estudio. Esto podría deberse a una falta de muestra determinada mediante el cálculo de muestra para establecer el contraste entre ambos grupos, ya que el artículo en el que se tomaron los datos no incluía a pacientes de trasplante con rechazo renal. Sin embargo, también se ha demostrado que los cambios en las proporciones de células Tregs tanto en sangre como intra tejido, en un modelo de trasplante y rechazo es tiempo dependiente, es decir que se encuentra directamente relacionado tanto con el tiempo de aparición o evolución del rechazo como con la magnitud del proceso inflamatorio independiente de otras causas de inflamación (Bunnag et al., 2008). Esto último podría explicar por qué en nuestra población no encontramos diferencias significativas ya que los sujetos con rechazo generalmente se diagnosticaban mediante biopsias de control o protocolo, es decir algunos de ellos sin disfunción del injerto propiamente a diferencias de los pacientes que suelen aparecer en los trabajos aquí citados, con las biopsias realizadas en el marco de disfunción aguda de injerto renal. Otra razón por la cual no pudimos encontrar diferencias en nuestros grupos podría ser que la célula Treg es la encargada de realizar el mecanismo de tolerancia periférica e intra tejido de tal manera que más allá del número de células y que tan activas se encuentran, lo importante podría estar en las vías de Co-estimulación activadas o inhibidas más allá de cambios en las proporciones en sangre periférica. Finalmente hay trabajos que muestran diferencias en los

desenlaces en poblaciones con Tregs que difieren en sus polimorfismos en FoxP3, restando importancia el número total o proporción de las mismas (Park et al., 2017).

El receptor de muerte programada 1 es uno de los pilares de este proyecto de investigación. Sobre todo, porque se logró establecer un contraste significativo entre los grupos de trasplante con rechazo y sin él. En este trabajo se encontró que una disminución en la expresión de este receptor o vía de Co-estimulación en las células Tregs se asocia con rechazo. Este mismo resultado ha sido demostrado en modelos murinos con trasplante cardíaco donde exploran la inhibición de PD-1/PD-L1 mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Los resultados en estos bloqueos mostraron una supresión de respuesta aloinmune en los trasplantes con menos datos de rechazo crónico ( enfermedad arterial del injerto) (Koga et al., 2004).

En otro estudio de pacientes trasplantados con rechazo renal crónico (24 pacientes) y pacientes control sin rechazo (18 pacientes), se midió mediante citometría de flujo la frecuencia de células Th foliculares (ThF) y diferentes fenotipos en la célula T, se encontró un aumento en la proporción de ThF en el grupo de rechazo ( $35.3 \pm 8.5\%$  vs.  $19.0 \pm 5.0$ ,  $P < 0.001$ ) y también se encontró una disminución en la expresión de PD-1 medida por MFI en el grupo de rechazo (Shi et al., 2015).

La importancia de la vía PD-1/PD-L1 para el desarrollo y permanencia de un estado de inmunotolerancia del injerto renal es clara y se pone de manifiesto en el escenario clínico de pacientes con trasplante renal que desarrollan una neoplasia sólida y que requieren como parte de su quimioterapia inhibidores de la vía PD-1 como parte de su tratamiento. En este sentido se publicó una serie de 22 casos con esta característica previamente señalada, donde la mayoría de los pacientes eran

portadores de cáncer de pulmón y melanoma, de los 22 pacientes que recibieron algún agente biológico que bloqueaba PD-1, solo cuatro conservaron la función del injerto renal, el resto desarrollaron rechazo celular, humoral o mixto (Lai et al., 2019). La asociación de una disminución en la expresión de esta vía de Co-estimulación y un rechazo o un aumento de alo inmunidad parcialmente está en relación al efecto que tiene PD-1 en la regulación y desarrollo de la población de Tregs (Fanelli et al., 2021).

El injerto o trasplante de piel es otro modelo donde se demuestra la importancia de la integridad de las vías co-inhibitorias para mantener tolerancia. En un modelo murino se realizaron trasplante de piel donde mediante anticuerpos monoclonales se bloquearon CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2 más un grupo control sin ningún tratamiento. Este último grupo fue el que mostró mejor supervivencia de todos los demás (Sandner et al., 2005). Buscar en un futuro la sobre expresión de PD-1 podría ser una herramienta terapéutica ya que tiene como efecto el desarrollo de inmunotolerancia y se asocia con protección contra rechazo crónico al injerto renal. Esto fue demostrado recientemente en un modelo murino de trasplante cardiaco bloqueando PD-L1 mediante ausencia de esta vía genéticamente modificada (Borges et al., 2021). Los resultados de esta tesis además de ser congruentes con la literatura publicada en estudios traslacionales se relacionan directamente con la capacidad de encontrar mediante citometría de flujo en un escenario clínico diferencias significativas en grupos de pacientes, tendiendo así el puente hacia lo clínico. La expresión de PD-1 está prácticamente abolida en los pacientes con rechazo de injerto, perdiendo el trasplante la capacidad de desarrollar o mantener la inmunotolerancia.

La vía **ICOS** (inducible T-cell co-stimulator), promueve la activación y la supervivencia de células T citotóxicas y células T de memoria. Esta vía de ICOS es uno de los resultados más contradictorios y difíciles de interpretar de este trabajo. Por una parte, esta vía es requerida para reacciones proinflamatorias, así como antiinflamatorias. Tal es el caso la relación central que guarda la expresión de ICOS en las células Tregs para generación de IL-10 y sus mecanismos asociados de antiinflamación y tolerancia inmunológica (Ito et al., 2008). Estos datos sugieren que en los pacientes con rechazo renal se sobreexpresa la vía ICOS para promover la activación y proliferación de células T (Maazi et al., 2015)(Yamada et al., 2002). En esta tesis los resultados son congruentes con los trabajos previos, la sobreexpresión de la vía ICOS como característica de los pacientes con rechazo de injerto. La vía ICOS es una vía bidimensional o bimodal, tiene que estar intacta al inicio del trasplante renal ya que es indispensable para desencadenar inmunotolerancia. Los experimentos que se han realizado y que prueban esto son modelos murinos de trasplante cardíaco en los que han bloqueado la vía ICOS de forma temprana (día 0 de trasplante) y de forma tardía (día 2-6 de trasplante), los resultados muestran que el bloqueo temprano es el que peor supervivencia tiene y el bloqueo tardío de ICOS es el que tiene la mejor supervivencia del trasplante cardíaco respecto al control que no recibió ningún bloque de ICOS (Harada et al., 2003).

Los resultados de esta vía en esta tesis se pueden definir de forma clara, un aumento en la expresión de ICOS está relacionado con rechazo clínico, lo cual se podría interpretar de dos formas. La primera, como la necesidad de activar ICOS después de CD 28, con la finalidad de diferenciar células T a Th1 y Th2 y posteriormente los mecanismos efectores de la respuesta inmune (Rottman et al.,

2001). La segunda forma de poder explicar o dar sentido clínico a estos resultados es la relación que existe en de ICOS con la generación de Tregs, generación y mantenimiento de tolerancia periférica, mecanismo que se da como respuesta del proceso inmuno patogénico del rechazo y la siguiente disminución de las células Trgs que conlleva un rechazo. Es probable que lo que estemos viendo sea la respuesta secundaria o refleja del sistema inmune más que el mecanismo efector. En este último dato, podríamos investigar al mismo tiempo los marcadores en sangre periférica y las expresiones en biopsia renal en un futuro, con la finalidad de definir tiempo y espacio de una vía de Co-estimulación como lo es ICOS.

Por último, los resultados en las células NK. La significancia y los cambios en estas poblaciones celulares sugieren que la disminución en la expresión de CD16+, CD56+ o la sumatoria de ambos marcadores, se relacionan directamente con la pérdida de la capacidad de generar tolerancia del injerto renal, de tal manera que se correlaciona con rechazo al injerto renal. En el panel de anticuerpos diseñado en este trabajo solo exploraba con estos dos marcadores (CD56 y CD16) las proporciones de NK circulantes y nos daba la oportunidad de inferir las subpoblaciones de estas células, aunque para realizar las mejores inferencias fuera necesario haber incluido en marcador KIR+ entre otros receptores. Los resultados encontrados con la literatura inicia en el trabajo publicado por (Trojan et al., 2017) donde se asocia una mayor población de la células NK circulantes y Tregs con una adecuada función a largo plazo del injerto renal así como con una mejor tasa estimada de filtración glomerular. Una de las debilidades de los resultados mostrados en esta tesis es no poder demostrar la direccionalidad en espejo de los marcadores de NK en tejido de las biopsias con la sangre periférica. Esto es

importante porque una hipótesis propuesta en varios trabajos publicados es que la disminución de las células NK circulantes en sangre periférica en los pacientes con eventos de rechazo es secundario al aumento de la infiltración de NK en la biopsia de injerto con rechazo celular y humoral (Parkes et al., 2017) (Dos Santos et al., 2017)(Kildey et al., 2019)(Ashraf et al., 2019)(Yazdani et al., 2019).

## Conclusiones

- La proporción de células Tregs no mostraron cambios entre los dos grupos de estudio lo cual nos hace pensar que lo que participa en la inmunotolerancia o rechazo es la actividad transcripcional y de regulación en estas células a través del factor de transcripción FOXP3 y no el número de células Tregs
- La proporción de células ICOS+ mostró un incremento significativo en el grupo de rechazo renal. Lo que sugiere que un incremento en esta población celular está relacionado con el daño crónico al injerto a través de un incremento en las interleucinas proinflamatorias como IL-2 e IL4.
- Los linfocitos Tregs PD-1+ mostraron una disminución significativa en los pacientes con rechazo al injerto. Esta observación preliminar en humanos apoya las descripciones en modelos murinos donde ratones deficientes de esta vía presentan rechazo al injerto cardiaco.
- La subpoblación de células NK también mostró una disminución significativa en el grupo de rechazo, esto apoya trabajos en modelos murinos donde la participación de las NK promueve y aumentan la inflamación, escenario clave en la fisiopatología del rechazo mediado por anticuerpos de trasplante renal.
- Los resultados de este protocolo nos permiten plantear continuidad al diseñar un proyecto con un diseño metodológico que pueda abordar el uso de estas moléculas desde un punto de vista clínico, en el diagnóstico temprano, predecir la evolución de la enfermedad, así como recaídas mediante la monitorización continua por el clínico.

- Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, muestran ser una potencial herramienta de seguimiento en la práctica clínica en el trasplante renal, ya que, analizados desde varios niveles de predicción estadística, como los es regresión logística y "Machine learning" (programación multiplataforma con auto aprendizaje), se encuentran datos de asociación o correlación con los eventos de rechazo.

## Bibliografía

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2017). *Cellular and molecular immunology* (A. Abul K., Ed.; 8th ed.). 2017.
- Alachkar, N., Lonze, B. E., Zachary, A. A., Holechek, M. J., Schillinger, K., Cameron, A. M., Desai, N. M., Dagher, N. N., Segev, D. L., Montgomery, R. A., & Singer, A. L. (2012). Infusion of high-dose intravenous immunoglobulin fails to lower the strength of human leukocyte antigen antibodies in highly sensitized patients. *Transplantation*, *94*(2), 165–171. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318253f7b6>
- Alessandrini, A., & Turka, L. A. (2017). FOXP3-Positive Regulatory T Cells and Kidney Allograft Tolerance. *American Journal of Kidney Diseases*, *69*(5), 667–674. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.10.027>
- Al-lamki, R. S., Wang, J., Skepper, J. N., Thiru, S., Pober, J. S., & Bradley, J. R. (2001). *Expression of Tumor Necrosis Factor Receptors in Normal Kidney and Rejecting Renal Transplants*. *81*(11), 1503–1515.
- Allen N.H, Dyer T, & Slapak M. (1983). Transplantation. *Transplantation*, *5*(5), 425–428.
- Aluvihare, V. R., & Betz, A. G. (2006). The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. *Immunol Rev.*, *212*, 330–343.
- Alvarez, C. M., Opelz, G., Garcia, L. F., & Süsal, C. (2009). Expression of regulatory t $\epsilon$ "cell-related molecule genes and clinical outcome in kidney transplant recipients. *Transplantation*, *87*(6), 857–863. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318199fa57>
- Amore, A. (2015). Antibody-mediated rejection. *Current Opinion in Organ Transplantation*, *20*(5), 536–542. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000230>
- Angelo, L. S., Banerjee, P. P., Monaco-Shawver, L., Rosen, J. B., Makedonas, G., Forbes, L. R., Mace, E. M., & Orange, J. S. (2015). Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. *Immunologic Research*, *62*(3), 341–356. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8664-y>
- Arias, M., Serón, D., Moreso, F., Bestard, O., & Praga, M. (2011). Chronic renal allograft damage: Existing challenges. *Transplantation*, *91*(9 SUPPL.), 4–25. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31821792fd>
- Ashley A Vo, Marina Lukovsky, Mieko Toyoda, & Stanley C Jordan. (2008). *N Engl J Med*. *N Engl J Med*, *359*(3), 242–521.
- Bacchetta, R., Barzaghi, F., & Roncarolo, M. G. (2016). From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: A lesson on immune dysregulation. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1417, Issue 1, pp. 5–22). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/nyas.13011>
- Baldwin, W. M., Valujskikh, A., & Fairchild, R. L. (2016). Mechanisms of antibody-mediated acute and chronic rejection of kidney allografts. *Curr Opin Organ Transplant*, 7–14. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000262>
- Baltar, J. M., & Ortega, F. (2009). Potential Role of NKG2D and Its Ligands in Organ Transplantation : New Target for Immunointervention. *American Journal of Transplantation*, 251–257. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02526.x>
- Barry, M., & Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: All roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*, *2*(6), 401–409. <https://doi.org/10.1038/nri819>
- Becker, L. E., Morath, C., & Suesal, C. (2016). Immune mechanisms of acute and chronic rejection. *Clinical Biochemistry*, *49*(4–5), 320–323. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.02.001>

- Beilke, J. N., & Gill, R. G. (2007). Frontiers in nephrology: The varied faces of natural killer cells in transplantation - Contributions to both allograft immunity and tolerance. *Journal of the American Society of Nephrology*, *18*(8), 2262–2267. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007040423>
- Blair, H. A., & Deeks, E. D. (2017). Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*, *77*(11), 1221–1233. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0775-4>
- Bluestone, J. A., St. Clair, E. W., & Turka, L. A. (2006). CTLA4lg: Bridging the basic immunology with clinical application. *Immunity*, *24*(3), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.03.001>
- Böhmig, G. A., Wahrmann, M., Regele, H., Exner, M., Robl, B., Derfler, K., Soliman, T., Bauer, P., Müllner, M., & Druml, W. (2007). Immunoabsorption in severe C4d-positive acute kidney allograft rejection: A randomized controlled trial. *American Journal of Transplantation*, *7*(1), 117–121. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01613.x>
- Boor, P., & Floege, J. (2015). Renal allograft fibrosis: Biology and therapeutic targets. *American Journal of Transplantation*, *15*(4), 863–886. <https://doi.org/10.1111/ajt.13180>
- Braudeau, C., Racape, M., Giral, M., Louis, S., Moreau, A., Berthelot, L., Heslan, M., Ashton-Chess, J., Souillou, J. P., & Brouard, S. (2007). Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transplant International*, *20*(10), 845–855. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2007.00537.x>
- Briggs, J. D. (2001). Causes of death after renal transplantation. In *Nephrol Dial Transplant* (Vol. 16). <https://academic.oup.com/ndt/article/16/8/1545/1826530>
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., & Ramsdell, F. (2001). *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. <http://genetics>.
- Burrell, B. E., & Bishop, D. K. (2010). Th17 cells and transplant acceptance. *Transplantation*, *90*(9), 945–948. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181f5c3de>
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, *243*(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Calvo-Turrubiarres, M., Romano-Moreno, S., García-Hernández, M., Chevaile-Ramos, J. A., Layseca-Espinosa, E., González-Amaro, R., & Portales-Pérez, D. (2009). Quantitative analysis of regulatory T cells in kidney graft recipients: A relationship with calcineurin inhibitor level. *Transplant Immunology*, *21*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2009.02.002>
- Chadban, S. J., Hons, B., & Wu, H. (2010). FUNCTIONAL DIVERSITY OF. *YSNEP*, *30*(3), 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.03.009>
- Choi, J., Aubert, O., Vo, A., Loupy, A., Haas, M., Puliyaanda, D., Kim, I., Louie, S., Kang, A., Peng, A., Kahwaji, J., Reinsmoen, N., Toyoda, M., & Jordan, S. C. (2017). Assessment of Tocilizumab (Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal) as a Potential Treatment for Chronic Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy in HLA-Sensitized Renal Allograft Recipients. *American Journal of Transplantation*, *17*(9), 2381–2389. <https://doi.org/10.1111/ajt.14228>
- Cohen Freue, G. v., Sasaki, M., Meredith, A., Günther, O. P., Bergman, A., Takhar, M., Mui, A., Balshaw, R. F., Ng, R. T., Opushneva, N., Hollander, Z., Li, G., Borchers, C. H., Wilson-McManus, J., McManus, B. M., Keown, P. A., & McMastera, W. R. (2010). Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection. *Molecular and Cellular Proteomics*, *9*(9), 1954–1967. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000554>

- Crespo, M., Yelamos, J., Redondo, D., Muntasell, A., Perez-Saéz, M. J., López-Montañés, M., García, C., Torio, A., Mir, M., Hernández, J. J., López-Botet, M., & Pascual, J. (2015). Circulating NK-cell subsets in renal allograft recipients with anti-HLA donor-specific antibodies. *American Journal of Transplantation*, *15*(3), 806–814. <https://doi.org/10.1111/ajt.13010>
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). *Cell Death : Critical Control Points Review*. *116*, 205–219.
- David N. Rush, Stephen F. Henry, John R Jeffery, Timothy J. Schroeder, & James Gough. (1994). HISTOLOGICAL FINDINGS IN EARLY ROUTINE BIOPSIES OF STABLE RENAL ALLOGRAFT RECIPIENTS. *Transplantation*, *57*(2), 208–211.
- Dos Santos, D. C., Saraiva Camara, N. O., David, D. S. R., & Malheiros, D. M. A. C. (2017). Expression patterns of CD56+ and CD16+ cells in renal transplant biopsies with acute rejection: Associations with microcirculation injuries and graft survival. *Nephrology*, *22*(12), 993–1001. <https://doi.org/10.1111/nep.12897>
- Edner, N. M., Rush, J. S., & Walker, L. S. K. (2020). Targeting co-stimulatory molecules in autoimmune disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, *80*. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0081-9>
- Everly, M. J., Everly, J. J., Susskind, B., Brailey, P., Arend, L. J., Alloway, R. R., Roy-Chaudhury, P., Govil, A., Mogilishetty, G., Rike, A. H., Cardi, M., Wadih, G., Tevar, A., & Woodle, E. S. (2008). Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation*, *86*(12), 1754–1761. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318190af83>
- FDA-NIH Biomarker Working Group. (n.d.). *BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) Resource*.
- Filippone, E. J., & Farber, J. L. (2016). The humoral theory of transplantation: Epitope analysis and the pathogenicity of HLA antibodies. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/5197396>
- Gary, P. H. ; J. B. M. ; S. C. T. et al. (1979). Accelerated rejection of a renal allograft associated with pretransplantation antibodies directed against donor antigens on endothelium and monocytes. *The New Engl Journal of Medicine Journal of Medicine*, *323*(16), 1120–1123.
- Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell Interactions in the Induction of Tolerance: The Role of Thymic Lymphocytes. In *Immunology* (Vol. 18).
- Grandaliano, G., & Gesualdo, L. (1997). *MONOCYTE CHEMOTACTIC PEPTIDE-1 EXPRESSION AND MONOCYTE INFILTRATION IN ACUTE RENAL TRANSPLANT REJECTION*.
- Guidicelli, G., Guerville, F., Lepreux, S., Wiebe, C., Thauinat, O., Dubois, V., Visentin, J., Bachelet, T., Morelon, E., Nickerson, P., Merville, P., Taupin, J. L., & Couzi, L. (2016). Non-complement-binding de novo donor-specific anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. *Journal of the American Society of Nephrology*, *27*(2), 615–625. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014040326>
- Haarberg, K. M. K., & Tambur, A. R. (2014). Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation. *British Medical Bulletin*, *110*(1), 23–34. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldu005>
- Haas, M., Loupy, A., Lefaucheur, C., Roufosse, C., Glotz, D., Seron, D., Nankivell, B. J., Halloran, P. F., Colvin, R. B., Akalin, E., Alachkar, N., Bagnasco, S., Bouatou, Y., Becker, J. U., Cornell, L. D., van Huyen, J. P. D., Gibson, I. W., Kraus, E. S., Mannon, R. B., ... Mengel, M. (2018a). The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *American Journal of Transplantation*, *18*(2), 293–307. <https://doi.org/10.1111/ajt.14625>
- Haas, M., Loupy, A., Lefaucheur, C., Roufosse, C., Glotz, D., Seron, D., Nankivell, B. J., Halloran, P. F., Colvin, R. B., Akalin, E., Alachkar, N., Bagnasco, S., Bouatou, Y., Becker, J. U., Cornell, L. D., van Huyen, J. P. D., Gibson, I.

- W., Kraus, E. S., Mannon, R. B., ... Mengel, M. (2018b). The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *American Journal of Transplantation*, *18*(2), 293–307. <https://doi.org/10.1111/ajt.14625>
- Haas, M., Sis, B., Racusen, L. C., Solez, K., Paolo, S., & Paolo, S. (2014). *Banff 2013 Meeting Report : Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions*. 272–283. <https://doi.org/10.1111/ajt.12590>
- Halloran, P. F., Venner, J. M., Madill-Thomsen, K. S., Einecke, G., Parkes, M. D., Hidalgo, L. G., & Famulski, K. S. (2018). Review: The transcripts associated with organ allograft rejection. *American Journal of Transplantation*, *18*(4), 785–795. <https://doi.org/10.1111/ajt.14600>
- Hamburger, J., Vaysse, J., Crosnier, J., Auvert, J., Lalanne, M., Hopper, J., & Paris, F. T. (n.d.). *Renal Homo transplantation in Man After Radiation of the Recipient\* Experience with Six Patients Since 1959*.
- Harper, S. J. F., Ali, J. M., Wlodek, E., Negus, M. C., Harper, I. G., Chhabra, M., Qureshi, M. S., Mallik, M., Bolton, E., Bradley, J. A., & Pettigrew, G. J. (2015). CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(41), 12788–12793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513533112>
- Hart, A., Smith, J. M., Skeans, M. A., Gustafson, S. K., Wilk, A. R., Castro, S., Foutz, J., Wainright, J. L., Snyder, J. J., Kasiske, B. L., & Israni, A. K. (2020). OPTN/SRTR 2018 Annual Data Report: Kidney. *American Journal of Transplantation*, *20*(s1), 20–130. <https://doi.org/10.1111/ajt.15672>
- Hidalgo, L. G., Sis, B., Sellares, J., Campbell, P. M., Mengel, M., Einecke, G., Chang, J., & Halloran, P. F. (2010). NK Cell Transcripts and NK Cells in Kidney Biopsies from Patients with Donor-Specific Antibodies: Evidence for NK Cell Involvement in Antibody-Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation*, *10*(8), 1812–1822. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03201.x>
- Hirohashi, T., Chase, C. M., Della Pelle, P., Sebastian, D., Alessandrini, A., Madsen, J. C., Russell, P. S., & Colvin, R. B. (2012). A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *American Journal of Transplantation*, *12*(2), 313–321. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03836.x>
- Holscher, C. M., Jackson, K. R., & Segev, D. L. (2020). Transplanting the Untransplantable. *American Journal of Kidney Diseases*, *75*(1), 114–123. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.04.025>
- Hu, Y.-L., Metz, D. P., Chung, J., Siu, G., & Zhang, M. (2009). B7RP-1 Blockade Ameliorates Autoimmunity through Regulation of Follicular Helper T Cells. *The Journal of Immunology*, *182*(3), 1421–1428. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1421>
- Huang, Y., Rabb, H., & Womer, K. L. (2007). Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cellular Immunology*, *248*(1), 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.03.009>
- Hychko, G., Mirhosseini, A., Parhizgar, A., & Ghahramani, N. (2011). A Systematic Review and Meta-Analysis of Rituximab in Antibody-mediated Renal Allograft Rejection. In *International Journal of Organ Transplantation Medicine*. [www.ijotm.com](http://www.ijotm.com)
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO Journal*, *11*(11), 3887–3895. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x>
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K. W., & Schmidt, R. E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European*

*Journal of Immunology*, 31(10), 3121–3126. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2001010\)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4)

- James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, Z., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Accrombessi, M. M. K., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)
- Jin, H., Ahmed, R., & Okazaki, T. (n.d.). *Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity*. September 2010, 3–18. <https://doi.org/10.1007/82>
- Johnson, R. J. (Richard J., Feehally, J., & Floege, J. (n.d.). *Comprehensive clinical nephrology*.
- Jordan, S. C., Tyan, D., Stablein, D., McIntosh, M., Rose, S., Vo, A., Toyoda, M., Davis, C., Shapiro, R., Adey, D., Milliner, D., Graff, R., Steiner, R., Ciancio, G., Sahney, S., & Light, J. (2004). Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: Report of the NIH IG02 trial. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(12), 3256–3262. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000145878.92906.9F>
- Kane, R. C., Bross, P. F., Farrell, A. T., & Pazdur, R. (2003). Velcade<sup>®</sup> : U.S. FDA Approval for the Treatment of Multiple Myeloma Progressing on Prior Therapy Oncologist<sup>®</sup> FDA Commentary LEARNING OBJECTIVES. In *The Oncologist* (Vol. 8). [www.TheOncologist.com](http://www.TheOncologist.com)
- Kazatchkine, M. D., Dietrich, G., Hurez, V., Ronda, N., Bellon, B., Rossi, F., & Kaveri, S. v. (1994). Immunological Reviews V Region-Mediated Selection of Autoreactive Repertoires by Intravenous Immunoglobulin (i.v.Ig). *Immunological Reviews*, 139.
- Khatiri, P., Roedder, S., Kimura, N., de Vusser, K., Morgan, A. A., Gong, Y., Fischbein, M. P., Robbins, R. C., Naesens, M., Butte, A. J., & Sarwal, M. M. (2013). A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation. *Journal of Experimental Medicine*, 210(11), 2205–2221. <https://doi.org/10.1084/jem.20122709>
- Kilkey, K., Francis, R. S., Hultin, S., Harfield, M., Giuliani, K., Law, B. M. P., Wang, X., See, E. J., John, G., Ungerer, J., Wilkinson, R., Kassianos, A. J., & Healy, H. (2019). Specialized roles of human natural killer cell subsets in kidney transplant rejection. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01877>
- Kim, K. W., Kim, B. M., Doh, K. C., Cho, M. I., Yang, C. W., & Chung, B. H. (2018). Clinical significance of CCR7+CD8+ T cells in kidney transplant recipients with allograft rejection. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27141-6>
- Kim, M., Martin, S. T., Townsend, K. R., & Gabardi, S. (2014). Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacotherapy*, 34(7), 733–744. <https://doi.org/10.1002/phar.1426>
- Klein, K., Süsal, C., Schäfer, S. M., Becker, L. E., Beimler, J., Schwenger, V., Zeier, M., Schemmer, P., Macher-Goeppinger, S., Scherer, S., Opelz, G., & Morath, C. (2013). Living donor kidney transplantation in patients with donor-specific HLA antibodies enabled by anti-CD20 therapy and peritransplant apheresis. *Atherosclerosis Supplements*, 14(1), 199–202. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2012.10.030>
- L. BRENT, JEAN BROWN, P. B. M. (1957). Skin transplantation immunity in relation to hypersensitivity. *The Lancet*, 1952, 561–564.

- Lai, H. C., Lin, J. F., Hwang, T. I. S., Liu, Y. F., Yang, A. H., & Wu, C. K. (2019). Programmed cell death 1 (PD-1) inhibitors in renal transplant patients with advanced cancer: A double-edged sword? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms20092194>
- Lan, Hui Y.3, 4; Yang, Niansheng3; Brown, F. G. (1998). *MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR EXPRESSION IN HUMAN RENAL ALLOGRAFT REJECTION*.
- Larsen, C. P., Pearson, T. C., Adams, A. B., Tso, P., Shirasugi, N., Strobert, E., Anderson, D., Cowan, S., Price, K., Naemura, J., Emswiler, J., Greene, J. A., Turk, L. A., Bajorath, J., Townsend, R., Hagerty, D., Linsley, P. S., & Peach, R. J. (2005). Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *American Journal of Transplantation*, 5(3), 443–453. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00749.x>
- Lefaucheur, C., Nochy, D., Andrade, J., Verine, J., Gautreau, C., Charron, D., Hill, G. S., Glotz, D., & Suberbielle-Boissel, C. (2009). Comparison of combination plasmapheresis/IVIg/Anti-CD20 versus high-dose ivig in the treatment of antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation*, 9(5), 1099–1107. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02591.x>
- Lefaucheur, C., Viglietti, D., Bentelejewski, C., van Huyen, J. P. D., Vernerey, D., Aubert, O., Verine, J., Jouven, X., Legendre, C., Glotz, D., Loupy, A., & Zeevi, A. (2016). IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(1), 293–304. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111120>
- Levey, A. S., Coresh, J., Hillege, H., Investigators, for the P. of R. and V. E. D. I. T. (PREVEND I., al., et, & Investigators, for the C. and R. E. (CARE) T. (2012). Chronic kidney disease. *The Lancet*, 379(9811), 165–180. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60178-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60178-5)
- Li, Li, M. D. O. (2010). Macrophages, Dendritic Cells, and Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. *Seminars in Nephrology*, 30(3), 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.03.005>
- Liston, A., & Gray, D. H. D. (2014). Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 154–165. <https://doi.org/10.1038/nri3605>
- Lo, D. J., Kaplan, B., & Kirk, A. D. (2014). Biomarkers for kidney transplant rejection. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 10, Issue 4, pp. 215–225). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.281>
- Locke, J. E., Magro, C. M., Singer, A. L., Segev, D. L., Haas, M., Hillel, A. T., King, K. E., Kraus, E., Lees, L. M., Melancon, J. K., Stewart, Z. A., Warren, D. S., Zachary, A. A., & Montgomery, R. A. (2009). The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation*, 9(1), 231–235. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02451.x>
- Lonze, B. E. (2017). Histocompatibility and management of the highly sensitized kidney transplant candidate. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 22(4), 415–420. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000449>
- Loupy, A., and Lefaucheur, C. (2018). Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *New England Journal of Medicine*, 379(12), 1150–1160. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1802677>
- Macklin, P. S., Morris, P. J., & Knight, S. R. (2014). A systematic review of the use of rituximab for desensitization in renal transplantation. In *Transplantation* (Vol. 98, Issue 8, pp. 794–805). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000362>
- Malheiro, J., Tafalo, S., Dias, L., Martins, L. S., Fonseca, I., Beirão, I., Castro-Henriques, A., & Cabrita, A. (2017). Determining donor-specific antibody C1q-binding ability improves the prediction of antibody-mediated

rejection in human leucocyte antigen-incompatible kidney transplantation. *Transplant International*, 30(4), 347–359. <https://doi.org/10.1111/tri.12873>

- Maria Cusumano, A., Javier Rosa-Diez, G., Carlota Gonzalez-Bedat Ana Maria Cusumano, M., Carlota Gonzalez-Bedat, M., to, C., & Latin, G.-B. M. (2016). Latin American Dialysis and Transplant Registry: Experience and contributions to end-stage renal disease epidemiology. *World J Nephrol*, 5(55), 389–397. <https://doi.org/10.5527/wjn.v5.i5.389>
- Matsumoto, K., Inoue, H., Nakano, T., Tsuda, M., Yoshiura, Y., Fukuyama, S., Tsushima, F., Hoshino, T., Aizawa, H., Akiba, H., Pardoll, D., Hara, N., Yagita, H., Azuma, M., & Nakanishi, Y. (2004). B7-DC Regulates Asthmatic Response by an IFN- $\gamma$ -Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 172(4), 2530–2541. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2530>
- Menon, M. C., Murphy, B., & Heeger, P. S. (2017). Moving biomarkers toward clinical implementation in kidney transplantation. In *Journal of the American Society of Nephrology* (Vol. 28, Issue 3, pp. 735–747). American Society of Nephrology. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016080858>
- Merrill, J. P., Murray, J. E., Harrison, J. H., & Warren, R. (1956). *SUCCESSFUL HOMOTRANSPLANTATION OF THE HUMAN KIDNEY BETWEEN IDENTICAL TWINS*.
- Montgomery, R. A., Loupy, A., & Segev, D. L. (2018). Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *American Journal of Transplantation*, 18, 3–17. <https://doi.org/10.1111/ajt.14584>
- Montgomery, R. A., Zachary, A. A., Racusen, L. C., Leffell, M. S., King, K. E., Burdick, J., Maley, W. R., & Ratner, L. E. (2000). PLASMAPHERESIS AND INTRAVENOUS IMMUNE GLOBULIN PROVIDES EFFECTIVE RESCUE THERAPY FOR REFRACTORY HUMORAL REJECTION AND ALLOWS KIDNEYS TO BE SUCCESSFULLY TRANSPLANTED INTO CROSS-MATCH-POSITIVE RECIPIENTS. In *TRANSPLANTATION* (Vol. 70, Issue 6).
- Morelli, A. E., & Thomson, A. W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 7(8), 610–621. <https://doi.org/10.1038/nri2132>
- Mulley, W. R., & Kanellis, J. (2011). Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology*, 16(2), 125–133. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01414.x>
- Nankivell, B. J., Borrows, R. J., L-S Fung, C., O, P. J., Allen, R. D., & Chapman, J. R. (2003). *The natural history of chronic allograft nephropathy*. 24, 349. [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
- Newell, K. A., Asare, A., Kirk, A. D., Gisler, T. D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W. J., Marks, W. H., Sanz, I., Lechler, R. I., Hernandez-Fuentes, M. P., Turka, L. A., & Seyfert-Margolis, V. L. (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1836–1847. <https://doi.org/10.1172/JCI39933>
- Nishimura, H., Honjo, T., & Minato, N. (2000). Facilitation of  $\beta$  selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 191(5), 891–897. <https://doi.org/10.1084/jem.191.5.891>
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., & Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2), 141–151. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8)
- Obrador, G. T., García-García, G., Villa, A. R., Rubilar, X., Olvera, N., Ferreira, E., Virgen, M., Gutiérrez-Padilla, J. A., Plascencia-Alonso, M., Mendoza-García, M., & Plascencia-Pérez, S. (2010). Prevalence of chronic kidney disease in the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) México and comparison with KEEP US. *Kidney International*, 77, S2–S8. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.540>

- Of, O. J. O. S., & Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. (2013). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*, 3(1), 4–4. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.76>
- Okazaki, T., & Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. *International Immunology*, 19(7), 813–824. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm057>
- Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y. (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity*, 28(4), 454–467. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.004>
- Özkaynak, E., Özkaynak, E., Gao, W., Gao, W., Shemmeri, N., Shemmeri, N., Wang, C., Wang, C., Gutierrez-Ramos, J.-C., Gutierrez-Ramos, J.-C., Amaral, J., Amaral, J., Qin, S., Qin, S., Rottman, J. B., Rottman, J. B., Coyle, A. J., Coyle, A. J., Hancock, W. W., & Hancock, W. W. (2001). Importance of ICOS–B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection - Nature Immunology. *Nature Immunology*, 2(7), 591–596.
- Parajuli, S., Joachim, E., Alagusundaramoorthy, S., Blazel, J., Aziz, F., Garg, N., Muth, B., Mohamed, M., Mandelbrot, D., Zhong, W., & Djamali, A. (2019). Subclinical Antibody-mediated Rejection after Kidney Transplantation: Treatment Outcomes. *Transplantation*, 103(8), 1722–1729. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002566>
- Pascual, J., Pérez-Sáez, M. J., Mir, M., & Crespo, M. (2012). Chronic renal allograft injury: Early detection, accurate diagnosis and management. *Transplantation Reviews*, 26(4), 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2012.07.002>
- Perry, D. K., Burns, J. M., Pollinger, H. S., Amiot, B. P., Gloor, J. M., Gores, G. J., & Stegall, M. D. (2009). Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *American Journal of Transplantation*, 9(1), 201–209. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02461.x>
- Pontrelli, P., Rascio, F., Castellano, G., Grandaliano, G., Gesualdo, L., & Stallone, G. (2020). The Role of Natural Killer Cells in the Immune Response in Kidney Transplantation. *Frontiers in Immunology*, 11(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01454>
- Probst, H. C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., & Van Den Broek, M. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature Immunology*, 6(3), 280–286. <https://doi.org/10.1038/ni1165>
- Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T., Croker, B. P., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Fogo, A. B., Furness, P., Gaber, L. W., Gibson, I. W., Glotz, D., Goldberg, J. C., Grande, J., Halloran, P. F., Hansen, H. E., Hartley, B., ... Yamaguchi, Y. (1999). The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney International*, 55(2), 713–723. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00299.x>
- Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T., Croker, B. P., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Fogo, A. B., Furness, P., Gaber, L. W., Gibson, I. W., Glotz, D., Goldberg, J. C., Grande, J., Halloran, P. F., Hansen, H. E., Hartley, B., ... Yamaguchi, Y. (1999). The Banff 97 working classification of renal allograft pathology Standardization of renal allograft biopsy interpretation and reporting is necessary to guide therapy in trans. In *Kidney International* (Vol. 55).
- Rajakariar, R., Jivanji, N., Varagunam, M., Rafiq, M., Gupta, A., Sheaff, M., Sinnott, P., & Yaqoob, M. M. (2005). High pre-transplant soluble CD30 levels are predictive of the grade of rejection. *American Journal of Transplantation*, 5(8), 1922–1925. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00966.x>
- Ramon, D. S., Huang, Y., Zhao, L., Rendulic, T. A., Park, J. M., Sung, R. S., & Samaniego, M. (2017). Use of complement binding assays to assess the efficacy of antibody mediated rejection therapy and prediction of

graft survival in kidney transplantation. *Human Immunology*, 78(2), 57–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.11.009>

Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., Rovis, F., Jimenez, E., Ballou, A., Giral, M., Rebollo-Mesa, I., le Moine, A., Braudeau, C., Hilton, R., Gerstmayer, B., ... Lechler, R. I. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1848–1861.  
<https://doi.org/10.1172/JCI39922>

Salvadori, M., & Tsalouchos, A. (2017). Biomarkers in renal transplantation: An updated review. *World Journal of Transplantation*, 7(3), 161. <https://doi.org/10.5500/wjt.v7.i3.161>

Sautenet, B., Blanco, G., Büchler, M., Morelon, E., Touponce, O., Barrou, B., Ducloux, D., Chatelet, V., Moulin, B., Freguin, C., Hazzan, M., Lang, P., Legendre, C., Merville, P., Mourad, G., Mousson, C., Pouteil-Noble, C., Purgus, R., Rerolle, J. P., ... Lebranchu, Y. (2016). One-year Results of the Effects of Rituximab on Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Double-blind Randomized Placebo-controlled Trial. *Transplantation*, 100(2), 391–399.  
<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000958>

Schenk, A. D., Gorbacheva, V., Rabant, M., Fairchild, R. L., & Valujskikh, A. (2009). Effector functions of donor-reactive CD8 memory T cells are dependent on ICOS induced during division in cardiac grafts. *American Journal of Transplantation*, 9(1), 64–73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02460.x>

Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J. A., & Rivera-Dommarco, J. Á. (2020). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19 Resultados nacionales. In *Instituto Nacional de Salud Pública* (Vol. 53, Issue 9).

Shapiro R, Jordan ML, Scantlebury VP, Vivas CA, Jain McCauley J, Egidi MF, Randhawa P, Chakrabarti P, & Corry R. (2000). RENAL\_ALLOGRAFT\_REJECTION\_WITH\_NORMAL\_RENAL (3). *Transplantation*, 440-undefined.

Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. (2002). the B7–Cd28 Superfamily. *Nature Reviews Immunology*, 2(2), 116–126.  
<https://doi.org/10.1038/nri727>

Shevach, E. M. (2006). From Vanilla to 28 Flavors: Multiple Varieties of T Regulatory Cells. In *Immunity* (Vol. 25, Issue 2, pp. 195–201). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.003>

Shi, J., Luo, F., Shi, Q., Xu, X., He, X., & Xia, Y. (2015). Increased circulating follicular helper T cells with decreased programmed death-1 in chronic renal allograft rejection. *BMC Nephrology*, 16(1), 1–6.  
<https://doi.org/10.1186/s12882-015-0172-8>

Sigdel, T. K., Bestard, O., Tran, T. Q., Hsieh, S. C., Roedder, S., Damm, I., Vincenti, F., & Sarwal, M. M. (2015). A computational gene expression score for predicting immune injury in renal allografts. *PLoS ONE*, 10(9).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138133>

Singh, N., Samant, H., Hawxby, A., & Samaniego, M. D. (2019). Biomarkers of rejection in kidney transplantation. In *Current Opinion in Organ Transplantation* (Vol. 24, Issue 1, pp. 103–110). Lippincott Williams and Wilkins.  
<https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000606>

Süsal, C., Döhler, B., Sadeghi, M., Ovens, J., & Opelz, G. (2009). HLA antibodies and the occurrence of early adverse events in the modern era of transplantation: A collaborative transplant study report. *Transplantation*, 87(9), 1367–1371. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a24073>

Susal, C., Wettstein, D., Dohler, B., Morath, C., Ruhlenstroth, A., Scherer, S., Tran, T. H., Gombos, P., Schemmer, P., Wagner, E., Fehr, T., Živčić-Cosic, S., Balen, S., Weimer, R., Slavcev, A., Bosmuller, C., Norman, D. J., Zeier, M., & Opelz, G. (2015). Association of Kidney Graft Loss with de Novo Produced Donor-Specific and Non-Donor-

- Specific HLA Antibodies Detected by Single Antigen Testing. *Transplantation*, 99(9), 1976–1980.  
<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000672>
- System, U. S. R. D. (2016). 2016 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. *National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*, Bethesda, MD. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.02.024>
- Tait, B. D., Süsal, C., Gebel, H. M., Nickerson, P. W., Zachary, A. A., Claas, F. H. J., Reed, E. F., Bray, R. A., Campbell, P., Chapman, J. R., Coates, P. T., Colvin, R. B., Cozzi, E., Doxiadis, I. I. N., Fuggle, S. v., Gill, J., Glotz, D., Lachmann, N., Mohanakumar, T., ... Opelz, G. (2013). Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and Non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*, 95(1), 19–47. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31827a19cc>
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., & Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25 CD4 naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. In *International Immunology* (Vol. 10, Issue 12).
- Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (1998). CD4 CD25 Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. In *The Journal of Experimental Medicine* • (Vol. 188, Issue 2). <http://www.jem.org>
- Vaconcellos, L., Asher, F., Schachter D, & Strom, T. (1998). CYTOTOXIC LYMPHOCYTE GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL. *Transplantation*, 66(5), 562–566.
- Viglietti, D., Loupy, A., Vernerey, D., Bentelejewski, C., Gosset, C., Aubert, O., van Huyen, J. P. D., Jouven, X., Legendre, C., Glotz, D., Zeevi, A., & Lefaucheur, C. (2017). Value of donor-specific anti-HLA antibody monitoring and characterization for risk stratification of kidney allograft loss. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(2), 702–715. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016030368>
- Vincenti, F., Rostaing, L., Grinyo, J., Rice, K., Steinberg, S., Gaitte, L., Moal, M.-C., Mondragon-Ramirez, G. A., Kothari, J., Polinsky, M. S., Meier-Kriesche, H.-U., Munier, S., & Larsen, C. P. (2016). Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 374(4). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506027>
- Wang, L., Han, R., & Hancock, W. W. (2007). *Programmed cell death 1 ( PD-1 ) and its ligand PD-L1 are required for allograft tolerance. 1*, 2983–2990. <https://doi.org/10.1002/eji.200737583>
- Weimer, R., Zipperle, S., Daniel, V., & Carl Stefan. (1996). PRETRANSPLANT\_CD4\_HELPER\_FUNCTION\_AND\_INTERLEUKIN. *Transplantation* , 62(11), 1606–1614.
- Wiebe, C., Gibson, I. W., Blydt-Hansen, T. D., Karpinski, M., Ho, J., Storsley, L. J., Goldberg, A., Birk, P. E., Rush, D. N., & Nickerson, P. W. (2012). Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *American Journal of Transplantation*, 12(5), 1157–1167. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04013.x>
- Wildin R, Ramsdell F, & Peake J. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*, 27, 20–21.
- Wu, D., Zhu, D., Xu, M., Rong, R., Tang, Q., Wang, X., & Zhu, T. (2011). Analysis of transcriptional factors and regulation networks in patients with acute renal allograft rejection. *Journal of Proteome Research*, 10(1), 175–181. <https://doi.org/10.1021/pr100473w>

- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L., & Rao, A. (2006). FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell*, *126*(2), 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.042>
- Wynn, T. A. (2005). TH-17: A giant step from TH1 and TH2. *Nature Immunology*, *6*(11), 1069–1070. <https://doi.org/10.1038/ni1105-1069>
- Xian Chang. (2015a). *Transplant immunology*. [https://doi.org/10.5005/jp/books/12547\\_21](https://doi.org/10.5005/jp/books/12547_21)
- Xian Chang. (2015b). *Transplant immunology*. [https://doi.org/10.5005/jp/books/12547\\_21](https://doi.org/10.5005/jp/books/12547_21)
- Yap, M., Boeffard, F., Clave, E., Pallier, A., Danger, R., Giral, M., Dantal, J., Foucher, Y., Guillot-Gueguen, C., Toubert, A., Souillou, J. P., Brouard, S., & Degauque, N. (2014). Expansion of highly differentiated cytotoxic terminally differentiated effector memory CD8+ T cells in a subset of clinically stable kidney transplant recipients: A potential marker for late graft dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, *25*(8), 1856–1868. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080848>
- Yazdani, S., Callemeyn, J., Gazut, S., Lerut, E., de Loor, H., Wevers, M., Heylen, L., Saison, C., Koenig, A., Thauinat, O., Thorrez, L., Kuypers, D., Sprangers, B., Noël, L. H., Van Lommel, L., Schuit, F., Essig, M., Gwinner, W., Anglicheau, D., ... Naesens, M. (2019). Natural killer cell infiltration is discriminative for antibody-mediated rejection and predicts outcome after kidney transplantation. *Kidney International*, *95*(1), 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.08.027>
- Young, N. T. (2004). Immunobiology of Natural Killer Lymphocytes in Transplantation. *Transplantation*, *78*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000123764.10461.4C>
- Yu, G., Xu, X., Minh, D. V., Kilpatrick, E. D., & Xian, C. L. (2006). NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(8), 1851–1858. <https://doi.org/10.1084/jem.20060603>
- Zhang, R. (2017). Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *CJN.00700117*. <https://doi.org/10.2215/CJN.00700117>
- Zhang, W., Yi, Z., Keung, K. L., Shang, H., Wei, C., Cravedi, P., Sun, Z., Xi, C., Woytovich, C., Farouk, S., Huang, W., Banu, K., Gallon, L., Magee, C. N., Najafian, N., Samaniego, M., Djamali, A., Alexander, S. I., Rosales, I. A., ... Murphy, B. (2019). A peripheral blood gene expression signature to diagnose subclinical acute rejection. *Journal of the American Society of Nephrology*, *30*(8), 1481–1494. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018111098>
- Zhang, X., Schwartz, J. C. D., Guo, X., Bhatia, S., Cao, E., Lorenz, M., Cammer, M., Chen, L., Zhang, Z. Y., Edidin, M. A., Nathenson, S. G., & Almo, S. C. (2004). Erratum: Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1 (Immunity (March 2004) 20 (337-347)). *Immunity*, *20*(5), 651. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00114-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00114-1)
- Zhang, Z.-X., Huang, X., Jiang, J., Lau, A., Yin, Z., Liu, W., Haig, A., & Jevnikar, A. M. (2015). Natural Killer Cells Mediate Long-term Kidney Allograft Injury. *Transplantation*, *99*(5), 916–924. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000665>
- Zou, Y., Stastny, P., Süsal, C., Döhler, B., & Opelz, G. (2007). Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *New England Journal of Medicine*, *357*(13), 1293–1300. <https://doi.org/10.1056/nejmoa067160>

