



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ESTUDIO CLINICO PARA EVALUAR EL RECEPTOR
SOLUBLE DE INTERLEUCINA 2 (sIL-2R) COMO
MARCADOR DE RECHAZO EN NIÑOS CON
TRASPLANTE RENAL**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

NEFROLOGIA PEDIATRICA

PRESENTA:

Dr. Yuri Archivaldo Vargas Cuéllar

TUTOR DE TESIS

Dra. Mara Medeiros Domingo

COTUTORES

Dr. Benjamín Romero Navarro
M. en C. Maria Inés Del Pilar García Roca



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

MÉXICO D.F

AGOSTO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ESTUDIO CLINICO PARA EVALUAR EL RECEPTOR SOLUBLE DE
INTERLEUCINA 2 (sIL-2R) COMO MARCADOR DE RECHAZO EN
NIÑOS CON TRASPLANTE RENAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
NEFROLOGIA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DR. YURI ARCHIVALDO VARGAS CUELLAR

Asesor:

DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO

Co-Asesores:

**M. en C. María Inés del Pilar García Roca
Dr. Benjamín Romero Navarro**

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2007

DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO
Asesor de Tesis
Laboratorio de Investigación en Nefrología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

M. en C. MARIA INES DEL PILAR GARCIA ROCA
Cotutora de tesis
Laboratorio de Investigación en Nefrología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

DR. BENJAMIN ROMERO NAVARRO
Cotutor de tesis
Jefe del Departamento de Nefrología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

**“ESTUDIO CLINICO PARA EVALUAR EL RECEPTOR SOLUBLE DE
INTERLEUCINA 2 (sIL-2R) COMO MARCADOR DE RECHAZO EN
NIÑOS CON TRASPLANTE RENAL”**

por

Dr. Yuri Archivaldo Vargas Cuéllar

Tesis propuesta para obtener el título en

Nefrología Pediátrica

**Universidad Nacional
Autónoma de México**

2007

Resumen

“ESTUDIO CLINICO PARA EVALUAR EL RECEPTOR SOLUBLE DE INTERLEUCINA 2 (sIL-2R) COMO MARCADOR DE RECHAZO EN NIÑOS CON TRASPLANTE RENAL”

por el **Dr. Yuri Archivaldo Vargas Cuéllar**

Asesor:

Dra. Mara Medeiros Domingo
Laboratorio de Investigación en Nefrología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Co-Asesores:

M. en C. María Inés del Pilar García Roca
Laboratorio de Investigación en Nefrología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Benjamín Romero Navarro
Jefe del Departamento de Nefrología
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Morirá sin hacer su tarea quien está esperando a que se la señalen

Anónimo

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A Dios todopoderoso que me ha dado la vida, la oportunidad de estar aquí y darme todo lo que me rodea. Por todos los momentos que he pasado gracias por hacerse tu voluntad. Jesús gracias por caminar junto a mí.

A mis padres por su apoyo incondicional a lo largo de estos años. Gracias por creer en mí y estar siempre ahí. Dios los Bendiga, ah y gracias por aguantarme todos estos años.

A mis hermanos por ser simple y sencillamente increíbles, los quiero mucho. Mis amigos de toda la vida

A mis sobrinos Alec y Santiago por mi inspiración para ser mejor con mis pacientes.

En especial gracias a la Dra. Mara Medeiros Domingo, asesora de esta tesis con quien realmente ha sido un verdadero honor hacer esta tesis con alguien con su trayectoria y su capacidad.

También muchísimas gracias a la M. en C. María Inés del Pilar García Roca por toda su paciencia, comprensión y por su valioso tiempo que me dedicó para concluir esta tesis. En verdad muchas gracias. Que Dios la bendiga.

Gracias al Dr. Benjamín Romero Navarro por ser excelente maestro y sobretodo amigo que me ayudó en momentos difíciles.

A mis maestros que me han enseñado no solo conocimientos teóricos y prácticos sino que también me han dado ejemplo de vida y por su amistad que me han brindado. Gracias por todo al Dr. Luis Velásquez Jones, Dra. Rebeca Gomezchico, Dr. Saul Valverde.

Gracias a la Dra. Mercedes Luque Coqui por su valiosa ayuda en el momento más difícil de mi vida. Gracias por todo.

Gracias a mis compañeros de residencia Uriel, Isidro, por su ayuda y amistad. Es un placer trabajar con ustedes. También a mis ex R5 Verónica, Eunice y Martha por su amistad y enseñanzas.

A todos mis pacientes por ser el mejor libro para aprender. Gracias por su sonrisa, los voy a extrañar.

Y a ti, si a ti, gracias por darme los momentos más hermosos de mi vida, por ser la persona que amo y por ser inspiración y motivo para seguir adelante y luchar por lo que mas quiero en este mundo: A ti.

INDICE

	No. página
1.- Indice.....	1
2.- Antecedentes.....	2
3.- Planteamiento del problema.....	3
4.- Objetivos.....	17
5.- Justificación.....	18
6.- Hipótesis.....	19
7.- Diseño de estudio.....	20
8.- Lugar de estudio.....	20
9.- Población de estudio.....	21
10.- Variables.....	21
11.- Criterios de inclusión.....	22
12.- Metodología.....	23
13.- Consideraciones éticas.....	26
14.- Consideraciones de bioseguridad.....	27
15.- Cronograma de actividades.....	29
16.- Resultados.....	30
17.- Discusión.....	47
18.- Conclusiones.....	50
19.- Bibliografía.....	51

Introducción: El trasplante renal constituye el tratamiento de elección en el paciente pediátrico con Insuficiencia renal crónica terminal. El rechazo agudo del injerto es la complicación mas frecuente y produce disfunción del injerto. La biopsia renal es el estándar de oro para el diagnóstico de rechazo agudo sin embargo es un procedimiento invasivo y hace el diagnóstico cuando el rechazo ya está establecido.

Objetivos: Establecer al receptor soluble de interleucina 2 (sIL-2R) en suero como marcador biológico que permita la identificación de pacientes pediátricos con rechazo agudo en fases tempranas.

Material y métodos: Se incluyeron 51 pacientes los cuales se dividieron en tres grupos: El primero integrado por 19 pacientes con diagnóstico histopatológico de rechazo agudo celular. El segundo con ocho pacientes con disfunción de injerto pero con otro diagnóstico histopatológico. Un último grupo con 24 pacientes trasplantados con función del injerto estable. A todos los pacientes se les tomó muestra de suero basal en la primera semana del postrasplante. En el caso del grupo uno y dos, la segunda muestra se tomó al momento de la biopsia renal y una tercer muestra de control a los 6 meses posterior a la biopsia. El tercer grupo se tomó muestras a los seis y 12 meses postrasplante. A estas muestras se les determinó concentración sérica de sIL-2R.

Resultados: Se encontró diferencia significativa ($p=0.05$) en las concentraciones séricas de sIL-2R en la muestra al momento de la biopsia en los niños con rechazo agudo celular en comparación con los otros dos grupos. Sin embargo no todos los pacientes con rechazo agudo presentaron concentraciones séricas altas. Se realizo curva ROC encontrando que con un valor de corte de 1946.50 ng/mL se tiene una sensibilidad de 73% y especificidad de 53%. Además al comparar los rechazos diagnosticados más frecuentemente se observó que el sIL-2R se encuentra significativamente elevado en los pacientes con rechazo IA y IB. ($p=0.034$). No hubo relación con incompatibilidad al HLA. No hubo diferencia significativa entre las concentraciones basales de sIL-2R ($p=.888$) pero en la muestra de control el sIL-2R se encontró significativamente más elevado en pacientes con rechazo agudo celular en relación a los otros grupos.

Conclusiones: Las concentraciones séricas del sIL-2R se encuentra elevada en algunos pacientes durante un evento de rechazo agudo celular y es marcador de rechazo, sin embargo no es una prueba con alta sensibilidad y especificidad. Además tiene relación con el tipo de rechazo agudo celular.

ANTECEDENTES

Trasplante renal

El trasplante renal es en la actualidad el tratamiento terapéutico de elección en el paciente pediátrico con insuficiencia renal crónica (IRC), ya que mejora su calidad de vida, hace posible su rehabilitación, y en un trasplante renal exitoso genera un estado fisiológico que le permite al niño su crecimiento y desarrollo.⁽¹⁻⁴⁾

Se estima en unos 250,000 los trasplantes renales efectuados hasta ahora en el mundo, en nuestro país suman cerca de 1500. Se reporta en que en el HIMGF el 57% de los pacientes trasplantados entre 1967-1981 fallecieron por rechazo y sepsis, aunque se ha observado que la sobrevida del injerto se ha incrementado y que es mejor en los pacientes con riñón de donador vivo relacionado que en los pacientes con riñón cadavérico (80% contra un 68% respectivamente). Los niños tienen la mejor sobrevida del injerto de todos los grupos étnicos, sobrepasando la que tienen los adultos receptores de riñón con HLA idéntico, sin embargo los adolescentes tienen la menor sobrevida del injerto a largo plazo y se ha atribuido a una mala adherencia terapéutica. La mortalidad en el HIMFG ha mostrado una disminución drástica, siendo actualmente 4.3% similar a la que presenta el registro norteamericano de diálisis y trasplante renal en niños NAPRTCS de 4.8%, esta mejoría se atribuye a una mejor inmunosupresión y vigilancia en el periodo post-trasplante.⁽⁵⁾

Gracias a la selección rigurosa de los receptores, mayores avances tanto en las técnicas quirúrgicas como anestésicas, mejores cuidados postrasplante, mayores conocimientos inmunológicos, así como en la utilización de inmunosupresores y

antimicrobianos, se ha mejorado significativamente la sobrevida tanto del paciente como del injerto; ⁽⁶⁻⁷⁾ sin embargo, en el trasplante renal pediátrico existen factores técnicos, inmunológicos, metabólicos y psicológicos que implican diversos problemas y mayor riesgo que en el adulto. ⁽⁸⁻⁹⁾

A los tres años pos-trasplante casi 70% de nuestros pacientes han presentado un rechazo agudo comparado con 60% de NAPRTCS, cabe mencionar que si se analiza por año de trasplante cada vez tenemos menor incidencia de rechazo gracias a los nuevos esquemas de inmunosupresión que incluyen el uso de anti-CD25 (basiliximab o daclizumab), inhibidores de calcinurina, mofetil micofenolato y sirolimus. ⁽⁵⁾

El objetivo de la terapia inmunosupresora después del trasplante renal es una eficaz medida para la prevención del rechazo agudo y crónico con aceptable tolerabilidad y seguridad. El estandar de oro en la terapia de inducción es prevenir la activación de las células T. ⁽¹⁰⁾

Inmunología del trasplante

La aceptación o el rechazo del riñón alogénico dependen principalmente de la respuesta inmune y su compleja regulación en la cual la red de citocinas y otros mediadores juegan un papel importante en el reconocimiento de proteínas como extrañas cuyo objetivo es su eliminación. Las proteínas que tienen mayor relevancia en el rechazo al injerto son las del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) que son moléculas HLA (antígeno leucocitario humano) Existen dos tipos de moléculas HLA; las de clase I que se encuentra en la superficie de la mayoría de las células del organismo (excepto eritrocitos) y las de clase II que se encuentra en la superficie de macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y algunos endotelios. ⁽¹¹⁾

Las proteínas del HLA del donador son presentadas al receptor a través de las células presentadoras de antígeno o APC las cuales al ser activadas producen mediadores solubles como son las citocinas y quimiocinas las cuales activan a su vez a linfocitos Th1, linfocitos T cooperadores o Th2, linfocitos T citotóxicos CD8+, linfocitos B aloantígeno específico (secretan inmunoglobulinas) y las células endoteliales, las cuales también producen son productoras de dichos mediadores solubles.

El reconocimiento de las moléculas de HLA del donador por el receptor, puede llevarse a cabo por diferentes vías:

1. Reconocimiento directo, en el que no se requiere procesamiento del antígeno.
2. Reconocimiento indirecto que requiere procesamiento del antígeno (las moléculas de HLA del donador son procesadas por APC del receptor)
3. Reconocimiento a través de receptores KIR (killer Inhibitory receptor) en la cual se inhibe la actividad citotóxica; estos receptores se encuentran en las células NK y CTL. ⁽¹²⁻¹³⁾

El tipo de mediadores solubles que se producirá depende de la respuesta inmune que se active en el momento de la presentación de las moléculas de HLA. Si la respuesta inmune activada es la de tipo innata las citocinas producidas son las siguientes interleucinas (IL): IL-1, IL-6, TNF, IL-10 e IL-18, además de factor de necrosis tumoral alfa (TNF). Estas citocinas se producen en forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en este tipo de respuesta y el antígeno. Los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas aunque también pueden ser producidas por linfocitos activados y otras células no pertenecientes al sistema inmune como células endoteliales y fibroblastos. ⁽¹⁴⁾

Por otro lado, si los antígenos HLA activan la respuesta inmune de tipo adaptativo las citocinas que se producen preferentemente son IL-2, INF, IL-4, IL-13, IL-16, interferón gamma (INF- γ), y factor transformador de crecimiento beta (TGF). En el caso de que exista en el medio hay IL-4, IL-10 e IL-13 los linfocitos T CD4+ cooperadoras se activan, proliferan y se diferencian hacia células efectoras específicas Th1 (secretan IL-2, INF- γ y TNF) o Th2 (producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13).⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ Lo anterior se observa en la figura 1.

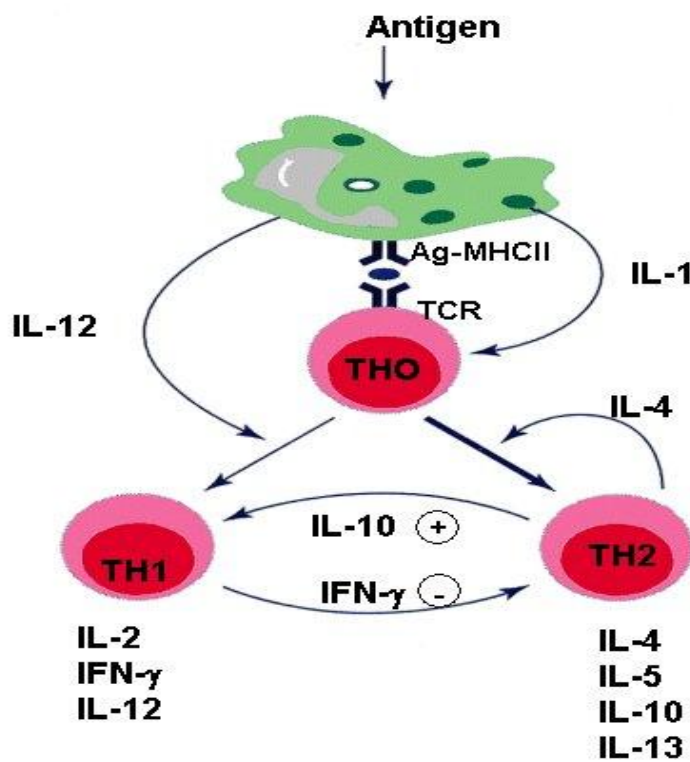


Figura 1. Activación de células Th1 y Th2

El rechazo es la complicación inmunológica más frecuente y produce disfunción del injerto. Se produce en general en todo trasplante renal alogénico por lo menos una vez y especialmente durante el primer año. Muchas veces es subclínico, pero en la mayoría de los casos da manifestaciones clínicas como insuficiencia renal aguda, proteinuria, hipertensión arterial, fiebre, dolor, oliguria, anuria, etc. Las

alteraciones sufridas, en el órgano trasplantado, son evaluados mediante biopsia renal y que es el estándar de oro para evaluar el rechazo al injerto.

La biopsia es una herramienta valiosa y permite evaluar las alteraciones vasculares y glomerulares, la atrofia tubular, la fibrosis intersticial y los infiltrados de células mononucleares o linfocitarios que caracterizan a la nefropatía crónica del aloinjerto (CAN). Desafortunadamente, la naturaleza invasiva del procedimiento es un inconveniente y acarrea el riesgo de complicaciones para el paciente por lo que no es una técnica que se utilice para el monitoreo con la frecuencia que se requiere en estos casos. Por otro lado, la biopsia detecta el daño ya ocurrido que es precedido por cambios iniciales en la regulación de la respuesta aloimmune por la red de citocinas y otros mediadores. ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾

En los últimos años muchos investigadores se han encargado de describir nuevas estrategias para el seguimiento de los pacientes con trasplante renal, entre las que se destacan la aplicación de técnicas de biología molecular, todo esto gracias al proyecto genómico que contó con el objetivo fundamental de revelar la totalidad de los genes que comprenden el genoma humano, identificándose 30 000. ⁽¹⁹⁻²⁰⁾

Rechazo, clasificación y diagnóstico de disfunción del injerto

El rechazo del injerto renal es responsable de la pérdida de 25% de los órganos de origen cadavérico y de 15% de los provenientes de donantes vivo durante el primer año postrasplante.

En la práctica clínica el rechazo del injerto puede ser clasificado de acuerdo al periodo del tiempo en el que ocurre después del trasplante.

- 1.-Rechazo hiperagudo: Es responsable del fracaso de un pequeño porcentaje de trasplantes, aproximadamente el 2.5%. Usualmente se manifiesta

inmediatamente después de la revascularización del órgano trasplantado, éste aumenta de volumen y se torna violáceo y pierde la consistencia con rapidez . Ocasiona una destrucción del injerto dentro de las primeras 24 horas.

Se produce rápidamente porque el receptor tiene anticuerpos citotóxicos previamente formados para los antígenos HLA del donante. Generalmente hay antecedente de transfusiones previas, embarazos múltiples o bien rechazos previos.

2.Rechazo agudo vascular: Generalmente ocurre en los primeros tres meses post-trasplante y se caracteriza clínicamente por un episodio de rechazo grave, con frecuencia resistente al tratamiento con esteroides. En el tejido renal se encuentra necrosis fibrinoide de la media y trombos de fibrina y plaquetas en los lúmenes del lecho arterial. Esta forma de rechazo es ocasionada por anticuerpos específicos contra el donador en un nivel inferior al detectable por las técnicas de pruebas cruzadas convencionales.

3.-Rechazo agudo celular: Este tipo de rechazo es el más frecuente y ocurre comúnmente en los primeros 6 meses post-trasplante, pero puede ser visto en cualquier momento de la vida del injerto.

La incidencia esta relacionada a diversos factores, como la fuente del donador (aumenta la incidencia en los donadores cadavéricos), inmunosupresión empleada (menos frecuente en pacientes en los cuales se utiliza terapia de inducción) y el número de trasplantes (la incidencia aumenta en los re-trasplantados). Se debe fundamentalmente a la activación de las células T que a continuación desencadenan varios mecanismos efectores.

4.- Rechazo crónico: El rechazo crónico es la principal causa de pérdida del injerto después del primer año post-trasplante. Clínicamente se caracteriza por el deterioro progresivo e irreversible de la función renal que ocurre después de tres meses del trasplante, acompañado de hipertensión y proteinuria. En la etiología se han implicado factores inmunológicos, hemodinámicos y de adherencia terapéutica. Los factores de riesgo incluyen donador cadavérico, hipertensión, proteinuria, rechazos agudos previos, tiempo de isquemia, hiperlipidemia, tabaquismo, edad extrema del donador e incompatibilidad HLA, entre otras.

La presencia de rechazo agudo debe ser sospechada en un paciente trasplantado con elevación de creatinina sérica. Los signos clínicos incluyen disminución del gasto urinario e incremento de la presión arterial sistémica. Antes de la introducción de la ciclosporina como fármaco inmunosupresor era frecuente encontrar fiebre y dolor del injerto. Se debe hacer diagnóstico diferencial con otras causas de disfunción del injerto que incluyen: necrosis tubular aguda, nefrotoxicidad por ciclosporina y obstrucción del tracto urinario entre otras.

Clasificación Histopatológica del rechazo

La estandarización de los criterios histopatológicos de rechazo, ha permitido valorar la eficacia de las diferentes terapias. ⁽²¹⁾ La clasificación más aceptada para tejido de injerto renal es la de Banff, formulada en 1997⁽²²⁾ y modificada en el 2003⁽²³⁾ incluye las siguientes categorías:

1. Normal – Biopsia histológicamente normal.

2. Rechazo agudo mediado por anticuerpos- rechazo que es consecuencia de anticuerpos anti- antígenos del donante y C4d positivo dentro del cual se incluye:

- Tipo I: Muy similar a la lesión observada en la necrosis tubular aguda.
- Tipo II: glomerulitis capilar con marginación o trombosis.
- Tipo III: Cambios fibrinoides en la arterial transmural.

3. Cambios limítrofes: caracterizada por la presencia de tubulitis focal leve (1-4 células mononucleares), y de 10 a 25 % del intersticio involucrado.

4. Rechazo agudo celular: con los siguientes subtipos:

- Tipo IA-Inflamación intersticial significativa (>25% del parénquima afectado) y moderada tubulitis (> 4 células mononucleares).
- Tipo IB- Inflamación intersticial significantiva (>25% del parénquima afectado) y tubulitis grave (>10 células mononucleares).
- Tipo IIA- Arteritis leve a moderada.
- Tipo IIB – Arteritis grave con oclusión de > 25% de la luz del vaso.
- Tipo III- Arteritis transmural, alteraciones fibrinoides y necrosis del músculo liso.

5.- Nefropatía crónica del trasplante

- Grado I – Fibrosis leve intersticial y atrofia tubular con o sin cambios específicos que sugieran rechazo crónico.
- Grado II- Fibrosis intersticial moderada y atrofia tubular

- Grado III- Fibrosis grave intersticial y atrofia tubular y pérdida tubular.

6.- Otros cambios no considerados debidos a rechazo; puede coincidir con la categorías mencionadas

El rechazo agudo continúa siendo una causa importante de falla del injerto y predispona a su vez al desarrollo de rechazo crónico, por esto es importante detectarlo a tiempo. ⁽²⁴⁾ Para que la creatinina sérica se eleve dos décimas es necesario haber perdido el 50% de la función renal, de modo que se considera una forma muy burda de evaluar la función renal. Hasta el momento el estándar de oro para el diagnostico de rechazo agudo es la biopsia renal percutánea, muchos grupos de trasplante han propuesto realizar biopsias del injerto periódicas con el fin de detectar rechazos subclínicos y tratarlos a tiempo, ⁽²⁵⁾ incluso antes de que se eleve la creatinina sérica. Seikku y col. de Finlandia, reportan una incidencia de rechazo agudo subclínico en 13% de sus pacientes a los 18 meses post-trasplante renal, y refieren que el tratamiento oportuno de esta condición ofrece mejor sobrevida del injerto. ⁽²⁶⁾

El rechazo agudo esta mediado inmunológicamente por la reacción de las células T del receptor frente a los antígenos alogénicos los cuales ponen en marcha la liberación de IL-1 y de IL-2, con la consiguiente activación y proliferación de células CD4 y CD8. Hay presencia de monocitos, linfoides, linfoblastos, macrófagos, muy pocas células plasmocitoides y algunos granulocitos y eosinófilos en el espacio intersticial. El otro componente es humoral y desencadena un rechazo agudo vascular y glomerular causada por la citotoxicidad celular directa y el daño mediado por complemento, hay predominio

de citocinas de tipo Th1; intervienen además en este tipo de rechazo, aunque en menor proporción la presencia de infecciones, la toxicidad por drogas u obstrucciones. ⁽²¹⁻²⁵⁾

El rechazo crónico se produce después de tres meses o de años de realizado el trasplante, se caracteriza por escasos infiltrados celulares entre los que se encuentran linfocitos y células plasmáticas maduras, monocitos, macrófagos, fibroblastos y fibrositos con extensa fibrosis. Estos pacientes presentan disminución progresiva de la función renal, proteinuria, a veces síndrome nefrótico e hipertensión arterial. ⁽³²⁾

Interleucina 2

La IL-2 es secretada por linfocitos T CD4+ y CD8+ activados en respuesta a un estímulo antigénico. Inicialmente se describió como factor de crecimiento de células T, ya que es el principal agente que controla su proliferación. Ejerce otros muchos efectos sobre el sistema inmune teniendo un papel esencial en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas, tanto humorales como celulares. Es un factor estimulador del crecimiento de linfocitos T B y NK. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK. Tras unirse a su receptor en linfocitos T, activa la secreción de IFN-alfa, linfoxina, IL4, IL3, IL5 y GM-CSF. Sobre los linfocitos B estimula su crecimiento y diferenciación e incrementa la expresión de moléculas de MHC clase II. ⁽³³⁾

Panigrahi y cols⁽³⁴⁾ analizaron la relevancia clínica de los parámetros inmunológicos tales como anticuerpos contra antígeno leucocitario antidonador antihumano (anti-HLA), monitorización de citocinas y sus receptores sobre el resultado del trasplante. Se utilizó método de ELISA para detectar anti-HLA clase I y II y niveles cuantitativos séricos de receptor soluble de IL-2 (sIL-2R). Se

encontró que el sIL-2R estaba significativamente incrementado en episodios de rechazo agudo durante el primer mes de trasplante en comparación con pacientes con injerto funcional ($p=0.01$) y controles sanos($p=0.001$). Concluyendo que el análisis cuantitativo de sIL-2R ofrece herramientas adicionales diagnósticas y pronósticas para el seguimiento de pacientes trasplantados.

Humar y cols⁽³⁵⁾ en un estudio retrospectivo investigaron los niveles séricos de citocinas (sIL-2, sIL2R y sTNF-alfa) como predictores del resultado del injerto renal. Se determinaron niveles séricos de citocinas pre y posttrasplante en 57 receptores de trasplante renal. Se encontraron altas concentraciones de sIL-2R en el posttrasplante de 63% de receptores de trasplante cadavérico. La incidencia de rechazo agudo fue de 77% en el grupo de concentraciones séricas altas de sIL-2R comparado con el grupo control sin concentraciones altas (23%) ($p=0.0056$) demostrando que los pacientes con altas concentraciones séricas de sIL-2R y TNF-alfa en el posttrasplante pueden tener una influencia sobre el rechazo agudo en receptores de trasplante renal.

En 2001 Oliveira y cols⁽³⁶⁾ demostraron que los receptores solubles de factor de necrosis tumoral (TNF) (sTNFR I y sTNFR II) presentaban niveles elevados encontraron una asociación con el rechazo agudo indicando que son buenos predictores del rechazo agudo. A su vez la concentración de ARNm de IL-2,IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, CD40L, FasL, bcl-xL, INF-gamma, perforina y granzima B se han asociado con el rechazo agudo. ⁽³⁶⁾

Existe un creciente interés por el desarrollo de marcadores no-invasivos que permitan diagnosticar rechazo agudo. La determinación en células de sangre periférica del RNA que codifica para las moléculas citotóxicas granzima B, perforina y ligando de Fas correlaciona con el rechazo agudo tanto en trasplante

hepático como renal. ⁽³⁷⁻⁴⁰⁾ El estudio de la expresión génica en células urinarias de perforina y granzima B correlaciona con rechazo, perforina con sensibilidad de 88% y especificidad de 79%, CD103 participa en la ubicación de los LT CD8+ en el espacio intratubular por su interacción con la E-caderina, y el grado de infiltración tubular en la biopsia correlaciona con la cantidad de CD103 en células urinarias. ⁽⁴¹⁻⁴²⁾ La determinación de FOXP3, que caracteriza a los linfocitos T reguladores, permite predecir la evolución del rechazo agudo y distinguir a los pacientes que van a responder al tratamiento con esteroides. ⁽⁴³⁾

Diversos métodos no invasivos han sido propuestos como una herramienta, alternativa a la biopsia, para la detección temprana del rechazo al injerto. La detección de citocinas y quimiocinas en sangre y en orina han dado indicios de que la presencia de estas moléculas pueden ser utilizadas como marcadores en la detección del rechazo al injerto, ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾ entre estos podemos mencionar la evaluación de la expresión de citocinas tanto pro como antiinflamatorias, ARNm, microarreglos de ADN, etc tanto en orina como en sangre; a su vez se han utilizado diversos métodos de evaluación entre los que encontramos ELISA, ELISPOT, PCR y PCR en tiempo real. El problema con algunos de estos métodos es el costo por lo que su aplicación en nuestro medio se hace complicado.

Método ELISA

La técnica inmunoenzimática ELISA forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. El ELISA, se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-

anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro.

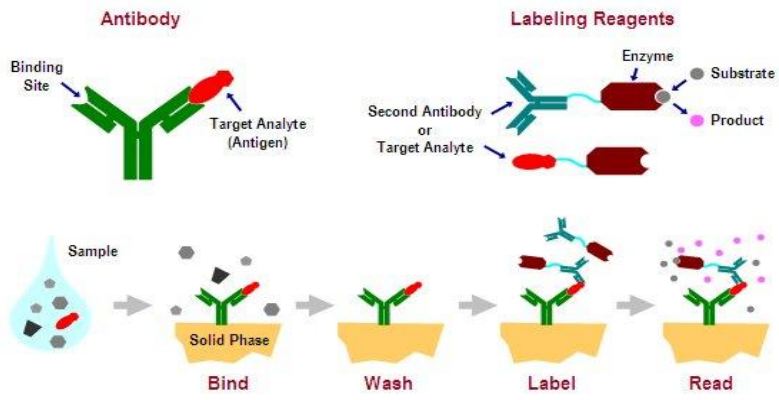
La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de antígenos es el modelo ELISA "Sandwich". En esta forma, la placa suele ya venir con un anticuerpo fijado (monoclonal ó policlonal) frente al antígeno problema, sobre el que se añadirá el macerado del órgano sospechoso, que en caso de reaccionar con el anticuerpo de la placa, será puesto en evidencia tras la adición del segundo anticuerpo marcado con la enzima. Por último, se añade el sustrato para revelar la reacción.

ELISA por competición

En este sistema también es muy utilizado para la detección de anticuerpos específicos. Se parte de un anticuerpo (monoclonal o policlonal), frente a un antígeno conocido, que previamente ha sido inmovilizado en la placa. Se denomina de competición ya que el suero problema es incubado previamente con el antígeno, antes de incubarlo con el antisuero fijado en la placa, y por tanto compite con él.

Los pasos siguientes es la adición e incubación del conjugado, lavado y finalización con el sustrato y lectura.

ELISA



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La biopsia renal a pesar de ser una herramienta invasiva es en la actualidad la de mayor utilidad en el control del rechazo al trasplante y el diagnóstico de las nefropatías asociadas. Es bien sabido que, la biopsia detecta el daño ya ocurrido en el órgano trasplantado y el cual es precedido por cambios iniciales en la regulación de la respuesta aloinmune por la red de citocinas y otros mediadores. Después del trasplante de órganos se requiere de un monitoreo constante y no agresivo; por ello, es de gran interés para el clínico contar con métodos alternativos para la detección de daño en el órgano trasplantado en la fase inicial. La evaluación de citocinas reguladoras de la respuesta inmune puede ser una alternativa, debido a que es un método no invasivo, que puede ser evaluado en fluidos orgánicos, además es un procedimiento sencillo que podría ser de utilidad para incrementar la sensibilidad de la detección de alteraciones que conduzcan al rechazo precoz del injerto.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Establecer a el receptor soluble de interleucina 2 (sIL-2R) en suero como marcador biológicos en pacientes pediátricos con trasplante renal, que permita la identificación de pacientes pediátricos con rechazo agudo en fase temprana.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la concentración de sIL-2R en muestras de sangre de pacientes con trasplante renal.

2. Comparación de las concentraciones de sIL-2R en muestras sangre de pacientes con trasplante renal con y sin rechazo agudo y en pacientes con disfunción del injerto sin evidencia de rechazo agudo en biopsia renal.

JUSTIFICACION

El rechazo agudo es la principal complicación del trasplante renal. Su detección oportuna mediante un método no invasivo ofrece la ventaja de evitar las complicaciones ocasionadas por la biopsia renal, la cual se considera actualmente como el estándar de oro para el diagnóstico de rechazo agudo

HIPOTESIS

Existe amplia variación en las concentraciones de sIL-2R en muestras de suero de niños con trasplante renal

Los pacientes con rechazo agudo del injerto tienen mayor cantidad de sIL-2R en suero que pacientes con función renal estable y en aquellos con disfunción del injerto por causas diferentes al rechazo agudo.

DISEÑO DE ESTUDIO

Es un estudio abierto, prospectivo, en pacientes que han recibido trasplante renal de enero 2004 a marzo 2007

Se dividieron en tres grupos:

- 1.- Pacientes con rechazo agudo celular (confirmado con biopsia renal)
- 2.- Pacientes con otras alteraciones histopatológicas (biopsia renal sin rechazo)
- 3.- Pacientes con función estable del injerto en los últimos 3 meses y sin historia de rechazo agudo previo.

LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) que es un instituto nacional de salud, que atiende a población abierta referida de todas las instituciones de salud, área metropolitana e interior de la república mexicana con una cobertura de 24 horas al día los 365 días del año.

El área en donde se llevará a cabo el estudio es del servicio de Nefrología Pediátrica, en donde se realizan alrededor de 30 trasplantes renales por año, y que cuenta con 13 camas censables.

POBLACION DE ESTUDIO

Pacientes con trasplante renal que cuenten con toma trimestral de muestra de suero y cuando tienen disfunción renal.

VARIABLES

- **Variable independiente**
 - Muestras de suero provenientes de niños con trasplante renal.
- **Variables dependientes**
 - Expresión de sIL-2R en muestras de suero.
- **Variables confusoras**
 - Tipo de tratamiento inmunosupresor
 - Tipo de donador
 - Variabilidad en la respuesta del receptor
 - Procesos inflamatorios

Descripción de variables

Edad: Variable cuantitativa continua expresada en meses.

Sexo: Variable cualitativa, dicotómica (masculino y femenino).

Tipo de trasplante renal: Variable cualitativa dicotómica (donador vivo relacionado y donador cadavérico).

Concentración sérica de sIL-2R: Variable cuantitativa expresada en picogramos por mililitro

Tipo de rechazo: Variable cualitativa

Niveles de creatinina, concentración de ciclosporina, tacrolimus, dosis de inmunosupresores, Incompatibilidad al HLA (HLA mismatch), incompatibilidad al HLA DR (HLA DR mismatch), haplotipos: Variable cuantitativa

Riesgo CMV, EBV y VBK: Variables cualitativas

CRITERIOS DE INCLUSION

Casos:

- Niños con trasplante renal.
- Edad entre 2 a 18 años.
- Con episodios de rechazo agudo.
- Consentimiento informado firmado
- Con diagnóstico de rechazo por biopsia renal

CRITERIOS DE EXCLUSION

Pacientes con muestras incompletas

Pacientes con rechazo humoral. Se excluirán a estos pacientes ya que el rechazo es mediado por anticuerpos y no esperamos encontrar elevación de sIL2R en ellos.

CRITERIOS DE ELIMINACION

Disfunción del injerto en los primeros tres meses post-trasplante

METODOLOGIA

Las muestras de suero de los pacientes pediátricos con trasplante renal, fueron tomadas en el Laboratorio de Nefrología. La concentración de creatinina y examen general de orina se realizó en el laboratorio de Nefrología. La expresión del marcador biológico fue evaluada en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Nefrología, y las biopsias fueron evaluadas en el área de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG).

Recolección, procesamiento y almacenamiento de muestras de sangre.

Los pacientes fueron divididos en tres grupos

Grupo 1: Pacientes en quienes se haya documentado rechazo agudo celular por biopsia renal.

Grupo 2: Pacientes con disfunción de injerto pero sin evidencia de rechazo agudo celular por biopsia renal.

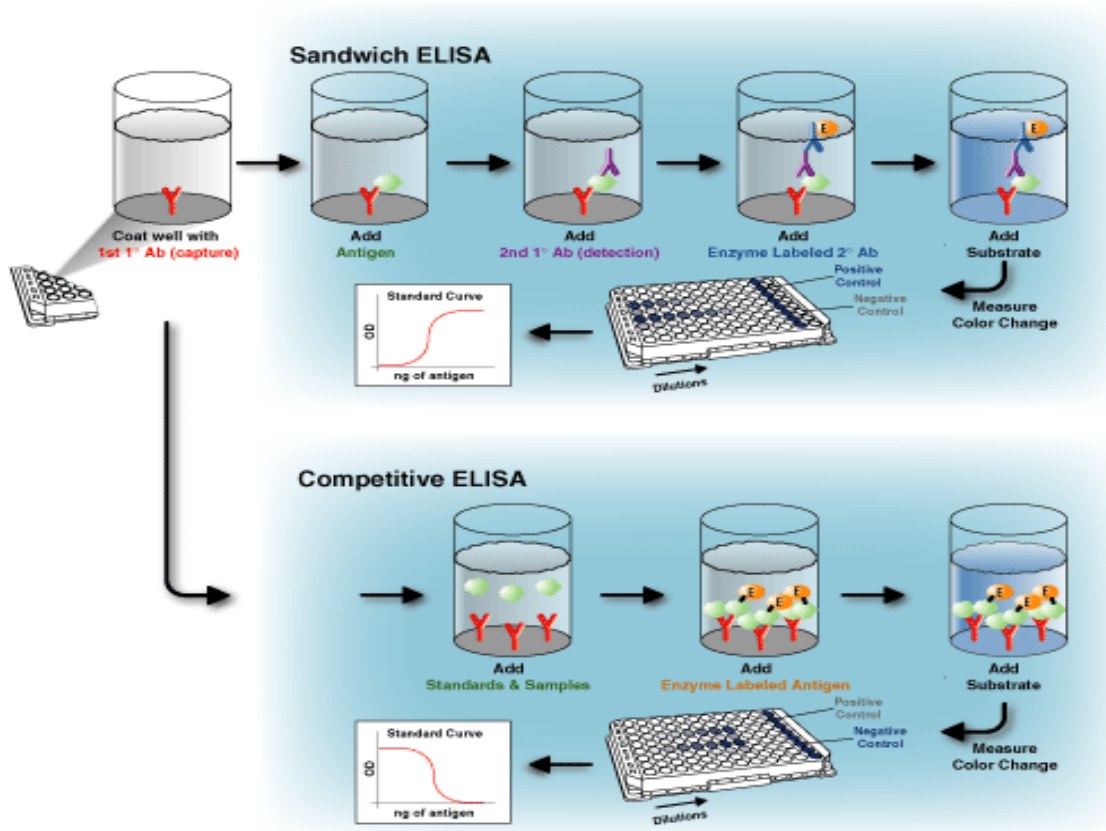
Grupo 3: Pacientes con función renal estable del injerto

Para el grupo 1 y 2, las muestras fueron recolectadas cuando el paciente presentó incremento en su creatinina de por lo menos 0.2 unidades por arriba de su creatinina basal con signos histopatológicos de rechazo celular (para el caso del grupo 1) o si se descartó rechazo agudo celular (grupo 2). Cada paciente con estas alteraciones fueron seguidos por un lapso de 6 meses, solicitándoseles

muestras en el momento de cumplir con los criterios de inclusión y a los 6 meses posterior a la presentación del rechazo.

En el caso del grupo 2 se tomaron la misma cantidad de muestras, el inicio del muestreo se hizo desde el momento que el individuo cumplió con los criterios de inclusión y se obtuvo firmado el consentimiento informado.

Se le tomaron 10 ml de sangre sin anticoagulante. De esta muestra se dejó a 4°C por 15 minutos hasta el momento en que se retraiga el coagulo, posteriormente se centrifugara a 2000 rpm y se obtuvo el suero. Para hacer la determinación de creatinina parte del suero se analizó en el Laboratorio de Nefrología para determinación de creatinina sérica por el método e Jaffe utilizando un aparato Synchron X de Beckman. Otra parte del suero se almacenó a -70°C hasta el momento medir las concentraciones de sIL2R por ELISA mediante un kit comercial de ELISA comercial (Quantikine R&D Systems No.), las lecturas se realizaron en un lector de ELISA marca Thermo-Labsystems. Las concentracion del marcador se determinó mediante la extrapolación, en una curva estándar, de las absorbancias obtenidas en cada muestra. Cada muestra fue evaluada por duplicado y la variación entre cada determinación no debía ser mayor al 5%.



Método Estadístico

La captura de datos se realizó en hoja del programa Microsoft Excel en donde se recolectaron los datos provenientes del expediente de cada paciente. Posteriormente esta hoja de cálculo se extrapólo para poder ser utilizada en el programa de análisis estadístico SPSS versión 13.0

Se realizó un análisis divariado para la comparación de medias y además se hizo un análisis de regresión logística para determinar valor predictivo. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Financiamiento

Los pacientes y las muestras forman parte del estudio aprobado por la comisión de investigación y ética de Hospital Infantil de México Federico Gómez “Estudio de infección por virus BK en pacientes con trasplante renal mediante seguimiento de la expresión de ARN mensajero de la región VP1 en orina” que recibe financiamiento del fondo sectorial Salud proyecto 2004 C01-193.

CONSIDERACIONES ETICAS

El estudio se apega a las normas internacionales e institucionales de investigación clínica. Se solicitó consentimiento informado en todos los participantes y el asentimiento del paciente cuando fue mayor de 7 años.

Se considera de riesgo mínimo ya que solo incluyó la toma de muestras de sangre para el estudio de biomarcador.

Para su aprobación, el protocolo fue evaluado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

El personal que participó en este proyecto cuenta con el adiestramiento necesario para el manejo de muestras biológicas además de aditamentos personales de bioseguridad como son: Bata, guantes, cubre bocas, etc

La toma de muestra se realizó en el Laboratorio de Nefrología o de Investigación en Nefrología, el material que estuvo en contacto con las muestras biológicas fueron mantenidas en recipientes y después de ser empleados se colocaron una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por un lapso mínimo de 1 h. Posteriormente el material fue esterilizado en las instalaciones del Laboratorio de Inmunquímica y Biología celular. Finalmente se colocó en contenedores asignados para este fin, al llenarse dichos contenedores fueron trasladados de acuerdo a las normas establecidas y serán entregados al personal de RPBI.

En el caso de sangre o sus residuos después de ser esterilizados se colocaron en recipientes de plástico autorizados por el HIMFG, para que posteriormente sean entregados al personal autorizado de RPBI y ellos los conduzcan a su tratamiento final. Las agujas, algodones o cualquier otro material que estuvo en contacto con la sangre fue depositado en los recipientes autorizados y otorgados por el personal de RPBI.

Todo el material desechable fue depositado en bolsas especiales de residuos peligrosos sólido-biológico-infeccioso. El cual fue depositado en un contenedor especial para este propósito, el cual se transportó a un almacén temporal posteriormente el personal de RPBI se encargó de su tratamiento para ser conducido a su destino final.

El material que se reutilizo se lavó eficazmente con agua y jabón después de ser esterilizado por autoclave.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

1.- Enero- febrero 2007: Solicitud de material y reactivos. Realización de marco teórico, recolección de bibliografía

2.- Marzo-julio 2007: Revisión de expedientes para captura de datos

3.- Julio 2007: Procesamiento de muestras. Análisis de datos. Resultados y redacción de conclusiones.

4.- Agosto 2007: Presentación de tesis final

Año 2007	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago
Solicitud de material y reactivos	xxx							
Recolección de muestras	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
Marco teorico y bibliografía	xxx	xxx						
Revisión de expedientes				xxx	xxxx	xxx	xxx	
Procesamiento de muestras						xxx	xxx	
Analisis de datos							xxx	
Resultados y presentación de tesis								xxx

RESULTADOS

Características de la población

Se recolectaron muestras de 55 pacientes. Sin embargo se excluyeron dos pacientes debido a que presentaron rechazo agudo humoral y dos pacientes por disfunción del injerto dentro de los primeros tres meses en el postrasplante. La muestra final fue de 51 pacientes en el estudio de los cuales 28 (54.9%) son varones y 23 (45.1%) mujeres (Figura 4). La edad promedio fue de 13.3 años; de estos pacientes 10 (19.6%) recibieron trasplante de donador cadavérico y 41 (80.4%) pacientes fueron de donador vivo relacionado. (Figura 5) La etiología de la insuficiencia renal fue desconocida en 37 pacientes (72.5%), uropatía en cinco pacientes (9.8%), glomerulopatías en cuatro pacientes (7.8%) y otras causas, principalmente alteraciones anatómicas en 5 pacientes (9.8%). (Tabla 1) En los pacientes que recibieron trasplante de donador vivo relacionado, 38 pacientes (74.5%) lo recibieron alguno de sus padres, dos pacientes (3.9%) lo recibieron de sus hermanos, un paciente (2.0%) de su abuelo y un paciente (2.0%) de otro familiar (tía materna). nueve pacientes (19.6%) recibieron trasplante de donador no relacionado que corresponden a los trasplantes de donador cadavérico. (Tabla 2)

Figura 4. Género de la población

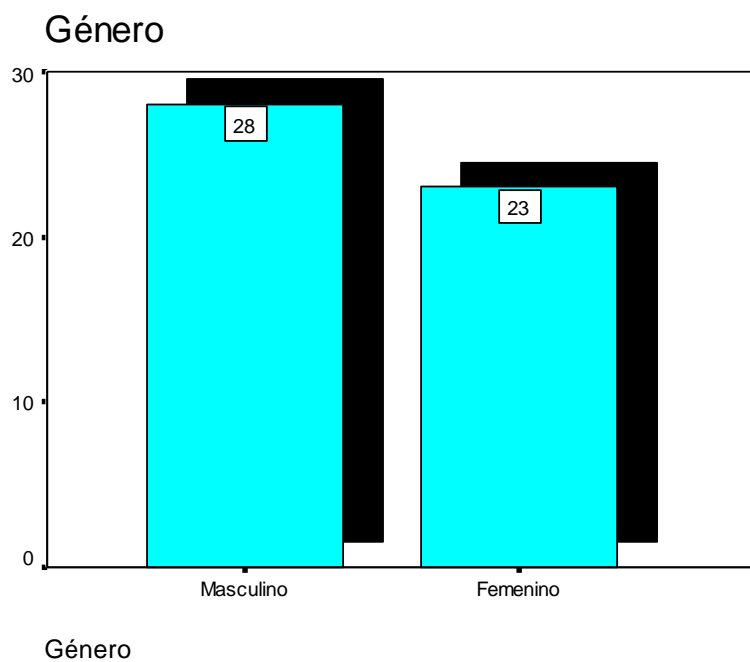


Figura 5. Tipo de trasplante

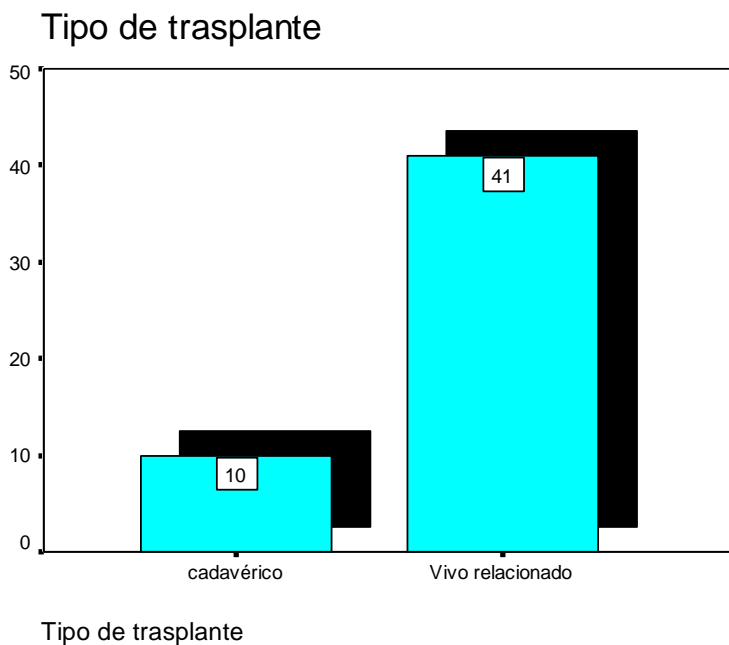


Tabla 1. Etiología de la insuficiencia renal crónica terminal

	Frecuencia	Porcentaje
Desconocida	37	72.5
Uropatía	5	9.8
Glomerulopatías	4	7.8
Otros	5	9.8
Total	51	100.0

Tabla 2. Parentesco del donador

	Frecuencia	Porcentaje
Padres	38	74.5
Hermanos	2	3.9
Abuelos	1	2.0
Otros	1	2.0
No relacionado	9	17.6
Total	51	100.0

Se dividieron a los pacientes en tres grupos: El primer grupo integrado por 19 pacientes fueron niños que ingresaron por elevación de creatinina 0.2 décimas por arriba de su basal y que fueron sometidos a biopsia renal y en los que se documentó rechazo agudo celular. En el segundo grupo se incluyeron ocho pacientes que también ingresaron por elevación de creatinina y se les realizó biopsia renal pero no se encontró evidencia de rechazo en la biopsia sino que se documentó otro diagnóstico. El tercer grupo fue de 24 pacientes integrado por pacientes trasplantados con función estable de injerto renal (Tabla 3). Las características demográficas de cada grupo por separado se muestran en la tabla 5.

Tabla 3. Grupos de pacientes

	Número	Porcentaje
Niños con rechazo	21	38.2
Niños con biopsia sin rechazo	10	18.2
Niños con injerto estable	24	43.6
Total	55	100.0

A todos los pacientes se les tomo muestra basal de suero en la primera semana del postrasplante. La media de realización de biopsia posterior al trasplante en el grupo uno fue de 6.7 ± 4.8 meses mientras que en el grupo dos fue de 9.7 ± 7.2 meses, el cual fue el tiempo en que se presentó elevación de creatinina para ingresar al paciente para biopsia. En el caso del grupo tres, no requirieron biopsia renal por lo que el tiempo en que se recolectó muestra fue a los 6.1 meses. (Tabla 5)

La creatinina basal para el grupo uno fue de 1.02 ± 0.47 mg/dL , para el grupo dos de 1.03 ± 0.29 mg/dL y para el tercer grupo 0.79 ± 0.20 mg/dL. Los grupos uno y dos presentaron elevación de creatinina por arriba de su basal a su ingreso siendo 1.7 ± 1.2 mg/dL y 1.62 ± 0.42 mg/dL respectivamente. El tercer grupo conservó su creatinina con respecto a la basal a los seis meses en 0.81 ± 0.19 mg/dL. El seguimiento de los pacientes fue en el grupo uno de 21.0 ± 10.4 meses, en el grupo dos 20.62 ± 9.9 meses y para el grupo tres de 15.7 ± 5.5

meses, En este ultimo seguimiento se encontró que los niños de los grupos 1 y 2 tuvieron disminución de la creatinina a 1.2 ± 0.38 mg/dL y 1.23 ± 0.25 mg/dL respectivamente en comparación a la del ingreso pero sin lograr alcanzar su creatinina basal. Para el grupo tres se observó que su creatinina actual fue de 0.84 ± 0.18 mg/dL. (tabla 5)

Inmunosupresión

Actualmente el esquema inmunosupresor utilizado en nuestra población de pacientes trasplantados es a base de inducción con basiliximab y triple terapia con prednisona, tacrolimus y micofenolato de mofetilo. En los pacientes del grupo uno, 15 pacientes recibiendo tacrolimus con una dosis promedio de 0.13 mg/kg/día, 16 pacientes recibieron micofenolato con una dosis de 861.9mg/m²sc/día, cuatro pacientes ciclosporina con una dosis de 5.8 mg/kg/día, dos pacientes recibieron azatioprina a una dosis de 1.3 mg/kg/día y un paciente tenía esquema con sirolimus a 0.03mg/kg/día. Los niveles de medicamento en sangre en promedio de inmunosupresión en este grupo para tacrolimus fue de 5.564 ng/mL mientras que los niveles de ciclosporina fueron de 319.37 ng/mL. La inmunosupresión de los niños del grupo dos se distribuyó de la siguiente manera: Siete pacientes recibieron tacrolimus con una dosis promedio de 0.09 mg/kg/día, seis pacientes recibieron micofenolato con una dosis promedio de 733.33 mg/m²sc/día, un paciente recibió ciclosporina con dosis de 2.2 mg/kg/día, un paciente con sirolimus a dosis de 0.05 mg/kg/día y un paciente recibió azatioprina con dosis de 1.7 mg/kg/día. Los niveles de tacrolimus y ciclosporina en este grupo fue de 7.32 ng/mL y 160.60 ng/mL respectivamente. Finalmente los 24 pacientes del tercer grupo que corresponde a los niños con función de injerto estable, recibieron esquema habitual con tacrolimus a dosis de 0.10mg/kg/día, prednisona

con dosis promedio de 0.14mg/kg/día y micofenolato a dosis de 896 mg/m²sc/día. Los niveles promedio de tacrolimus fueron de 5.64 ng/mL (Tabla 5).

Riesgo para citomegalovirus, Virus Epstein Barr y Virus BK

De los 51 pacientes, 20 pacientes (39.3%) eran de alto riesgo para citomegalovirus (CMV) mientras que los 31 pacientes restantes (60.7%) fueron de riesgo intermedio. En cuanto al riesgo para virus Epstein Barr ocho pacientes (15.7%) fueron negativos y 43 pacientes (84.3%) presentaban seroconversión pasada. 48 pacientes tuvieron evidencia de replicación de VBK en los primeros seis meses postrasplante (94.1%) en mientras que tres fueron negativos (5.9%) (Tabla 4). Los riesgos por separado para cada grupo de edad se muestran en la tabla 5.

Tabla 4. Riesgo CMV, EBV y VBK en general

	Número	Porcentaje
CMV		
Alto riesgo	22	40
Riesgo intermedio	33	60
Total	55	100
EBV		
Negativo	10	18.2
Seroconversion pasada	45	81.2
Total	55	100
VBK en los primeros 6 meses postrasplante		
Negativo	3	3.1
Positivo	52	96.8
Total	55	100

Histocompatibilidad

En cuanto al número de haplotipos que se compartían entre donador y receptor en el grupo uno, 12 pacientes (63.2%) compartían al menos un haplotipo mientras que los siete pacientes restantes (36.8%) no compartían ningún haplotipo. En el segundo grupo todos los pacientes compartían un haplotipo. En el tercer grupo se identificó un paciente que compartía dos haplotipos con su donador (hermano). La mayoría solo compartían un haplotipo (79%) tabla 8. En cuanto a el número de incompatibilidades al HLA (HLA mismatch), en los niños del grupo uno se observó que tener cinco incompatibilidades fue lo más frecuente (26.3%), mientras que en el grupo dos el 62.5% de los pacientes tuvieron tres incompatibilidades. En cambio los pacientes del grupo tres, se observó que el 25% tenían tres o cuatro incompatibilidades, e incluso hasta cinco incompatibilidades (20%), pese a esto, estos pacientes mantuvieron estable la función de su injerto. Así mismo en los tres grupos fue más común tener una incompatibilidad al HLA DR. (Tabla 5).

Tabla 5. Características demográficas de la población

	niños con rechazo	niños con biopsia sin rechazo	Controles
Edad promedio (años)	12.8±3.2	14.38±2.2	12.7+/-2.9
Genero			
Masculinos	13 (68.4%)	6 (75%)	9 (37.5%)
Femeninos	6 (31.6%)	2 (25%)	15 (62.5%)
Total pacientes	19 (100%)	8 (100%)	24 (100%)
Donador cadaverico	7 (36.8%)	0 (0%)	3 (12.5%)
Donador vivo relaciondo	12 (63.2%)	8(100%)	21 (87.5%)
Tiempo postrasplante (meses)	6.7±14.8	9.7±7.2	6.12±0.74
Creatinina basal (mg/dL)	1.02±0.47	1.03±0.29	0.79±0.20
Creatinina al ingreso (mg/dL)	1.75±1.2	1.62+/-0.42	0.81±0.19
Creatinina actual (mg/dL)	1.20±0.38	1.23±0.25	0.84±0.18
Tiempo de seguimiento (meses)	21.0±10.4	20.62±9.92	15.7±5.5
Niveles de ciclosporina (ng/mL)	319.3±322.7	160.6±0	0±0
Niveles de tacrolimus (ng/mL)	5.64±2.22	7.32±2.40	5.64±0.55
Dosis de tacrolimus (mg/kg/d)	0.13±0.11	0.9±0.45	0.1±0.05
Dosis de micofenolato (mg/m2/d)	861.25±283.8	773.33±62.66	896.54±148.0
Dosis de prednisona	0.25±0.24	0.12±0.29	0.14±0.033
Dosis de ciclosporina (mg/kg/d)	5.8±4.18	2.2±0	0±0
Dosis de sirolimus (mg/kg/d)	0.03±0	0.05±0	0±0
Dosis de azatioprina (mg/kg/d)	1.35±0.21	1.7±0	0±0
sIL-2R basal (pg/mL)	10882±6772	9970±2997	9527±5057
sIL-2R problema (pg/mL)	6538±7855	2217±726	2128±1390
sIL-2R control (pg/mL)	2184±807	2288±908	2073±1856
Riesgo CMV			
Alto riesgo	7 (36.8%)	4 (50%)	9 (37.5%)
Riesgo intermedio	12 (63.2%)	4 (50%)	15 (62.5%)
Status EBV			
Negativo	3 (15.8%)	2 (25%)	3 (12.5%)
Seroconversión pasada	16 (84.2%)	6 (75%)	21 (87.5%)
Status VBK			
Negativo	1 (4.7%)	0 (0%)	1 (4.2%)
Positivo	17 (94.4%)	8 (100%)	23 (95.8%)
Incompatibilidad HLA			
0	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
1	1 (5.3%)	2 (25%)	1 (4.2%)
2	4 (21.1%)	1 (12.5%)	4 (16.7%)
3	4 (21.1%)	5 (62.5%)	6 (25%)
4	4 (21.1%)	0 (0%)	6 (25%)
5	5 (28.6%)	0 (0%)	5 (20.8%)
6	1 (5.3%)	0 (0%)	1 (4.2%)
Incompatibilidad HLA-DR			
0	4 (21.1%)	1 (12.5%)	1 (4.2%)
1	15 (78.9%)	8 (87.5%)	23 (95.8%)
Haplotipos			
0	7 (36.8%)	0 (0%)	4 (7.1%)
1	12 (63.2%)	8 (100%)	19 (79.2%)
2	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)

Grupo sanguíneo

De los 51 pacientes, el grupo sanguíneo O Rh positivo fue el principal grupo sanguíneo ya que se tipificó en 35 pacientes (68.6%) mientras que el segundo grupo sanguíneo más frecuente fue el A Rh positivo, tipificándose en siete pacientes (13.7%) otros grupos sanguíneos fueron: B Rh positivo en seis pacientes (11.8%), mientras que se tipificó un paciente de cada uno de los siguientes grupos: O Rh negativo, A Rh negativo y AB Rh positivo, constituyendo cada uno el 2.0%. (tabla 6)

Tabla 6. Frecuencias de grupo sanguíneo en general

Grupo sanguíneo	Número	Porcentaje
O positivo	38	69.1
A positivo	8	14.5
B positivo	6	10.9
O negativo	1	1.8
A negativo	1	1.8
AB positivo	1	1.8
Total	55	100.0

Diagnóstico Histopatológico

En nuestro estudio se realizó biopsia renal a un total de 27 pacientes. En 19 de ellos se documentó alguna forma de rechazo agudo celular de acuerdo a la clasificación de Banff mientras que en a los 10 pacientes restantes se encontró otros diagnósticos. Como se mencionó previamente, la media de disfunción del injerto y realización de biopsia renal para el grupo uno fue de 6.71 meses en

cambio para el grupo dos fue de 9.75 meses. El principal diagnóstico fue rechazo agudo IA el cual se reportó en 13 pacientes (48.1%). Tres niños tuvieron biopsias renales normales y en cuatro niños más se diagnosticó rechazo agudo IB (14.8%). Dos pacientes (7.4%) presentaron datos de nefrotoxicidad. Otros diagnósticos documentados fue nefritis tubulo-intersticial secundario a virus BK, observándose en dos pacientes (7.4%). (Tabla 7)

Tabla 7. Diagnóstico Histopatológico

	Número	Porcentaje
Normal	3	11.1
IA	13	48.1
IB	4	14.8
IIA	1	3.7
IIB	1	3.7
Rechazo crónico	1	3.7
Nefritis por VBK	2	7.4
Otros	2	7.4
Total	27	100.0

Detección del receptor soluble de interleucina 2 (sIL-2R)

A todos los niños se les tomó muestra basal de suero dentro de la primera semana del postrasplante. Posteriormente a los pacientes del grupo uno y dos se tomó muestra cuando éstos ingresaban para realización de biopsia renal por disfunción de injerto (a los 6.71 y 9.7 meses respectivamente) manifestado por la elevación de creatinina al menos dos decimales por arriba de su basal. La muestra de control para estos grupos se tomó a los seis meses posterior al evento de rechazo. Para el grupo de pacientes con función del injerto estable se tomaron las muestras a los seis meses posterior al trasplante y la muestra final se tomo al año

posterior al trasplante. De los 51 pacientes, solo 42 pacientes contaron con muestra final. Cuatro pacientes del grupo uno y tres pacientes del grupo dos no se tiene muestra de suero final debido a que se les realizó biopsia renal recientemente y han cumplido seis meses de seguimiento después de la biopsia. En dos pacientes del grupo tres tampoco se obtuvo muestra por tener menos de un año de trasplantados. La mediana de la concentración basal del sIL-2R fue mayor en el grupo uno (10308.72 pg/mL) con respecto a la del grupo dos (9748.56 pg/mL) y a la del grupo tres (9955.76 pg/mL) pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.888$) (tabla 8) Sin embargo cuando se comparó las concentraciones de sIL-2R al momento de presentar disfunción del injerto, los pacientes del grupo uno contra las concentraciones del grupo dos y las del grupo tres a los seis meses de seguimiento, se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.05$). Cuando se comparó las concentraciones de sIL-2R en la muestra de control se encontró significativamente elevada para el grupo uno de 2137.08 pg/mL, en el grupo dos de 1951.76 pg/mL y en el grupo tres de 1604.20 pg/mL. ($p=0.047$).

Tabla 8. Concentración sérica de sIL-2R (pg/mL)

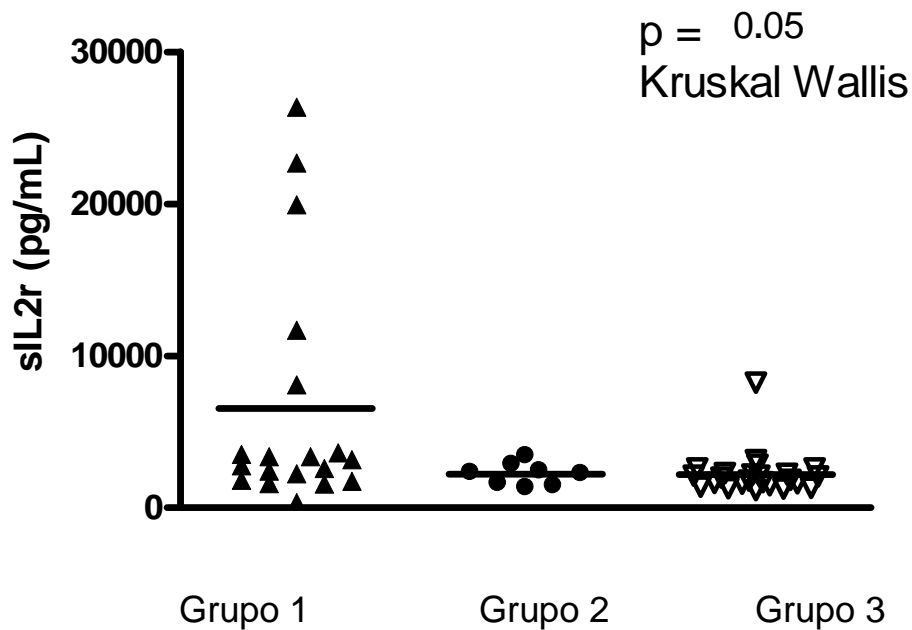
	Grupo 1 Mediana (min-max)	Grupo 2 Mediana (min-max)	Grupo 3 Mediana (min-max)
sIL2R basal	10308.72 (371.27-29583.88)	9748.56 (5525.64-14425.28)	9955.76 (1863.04-19982.04)
sIL2R problema	3226.00 (413.88-26447.76)	1340.88 (1340.88-3439.92)	1913.90 (1170.32-8237.04)
sIL2R control	2137.08 (108.44-3198.40)	1951.76 (1536.36-3857.72)	1604.20 (824.40-10011.80)

Prueba de Kruskal Wallis

	sIL2R problema	sIL2R basal	sIL2R control
Chi-Cuadrada	10.624	.474	6.158
df	2	2	2
Asymp. Sig.	.005	.789	.046

p= 0.05 Kruskal Wallis

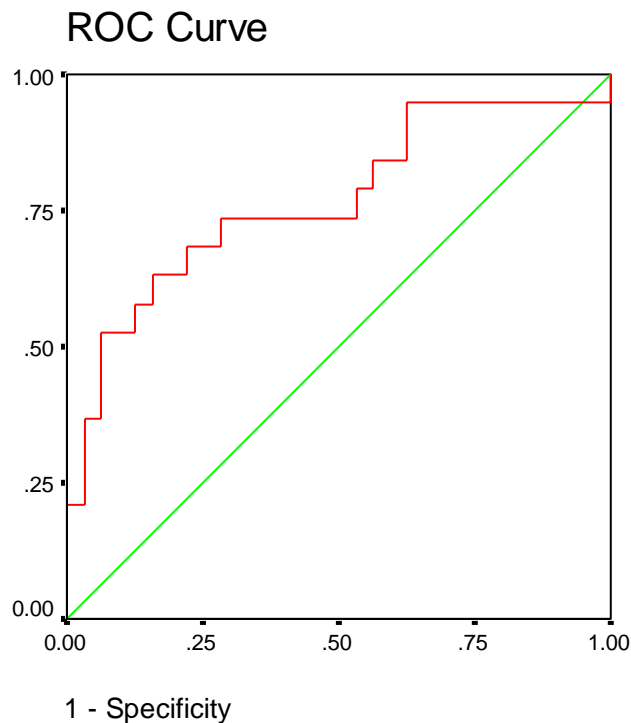
Figura 6. Concentración sérica de sIL-2R al momento de biopsia renal para los grupos 1 - 2 y a los 6 meses de seguimiento para el grupo 3



Encontramos diferencia en la concentración sérica de sIL-2R estadísticamente significativa en el grupo 1. Sin embargo la mayoría de los pacientes de este grupo tienen concentraciones séricas de sIL-2R por debajo de la mediana. Solo cinco pacientes elevaron sus concentraciones al momento del rechazo agudo incluso a

niveles tan altos como 26444.76 pg/mL lo cual influye para que la diferencia sea estadísticamente significativa. Para eliminar esta incertidumbre y dar mayor peso a la relación, realizamos una curva ROC. El área calculada bajo la curva para las concentraciones séricas de sIL-2R en el momento del rechazo agudo fue de $.768 \pm 0.074$ ($p=0.01$) con un intervalo de confianza 95% de 0.624 a 0.912 . Un valor de 1.0 refleja una prueba diagnóstica perfecta mientras que un valor de 0.5 no es mejor que lo esperado por casualidad. (Figura 7)

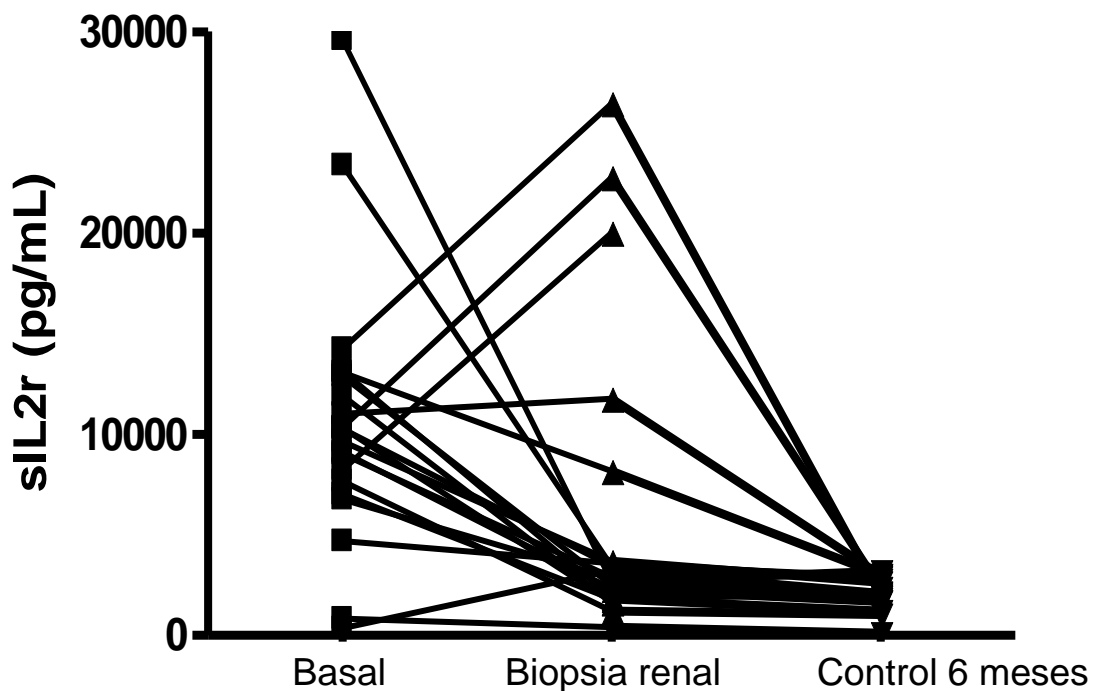
Figura 7. Curva ROC de concentraciones de sIL-2R. Se muestra la fracción de los resultados falsos positivos (sensibilidad) y resultados falsos positivos (1-especificidad)



Llama la atención dos pacientes del grupo uno que en su muestra basal presentaron concentraciones altas de sIL-2R hasta de 29583 pg/mL,, y disminuyeron al momento de la biopsia renal. Existen 5 pacientes que

presentaron una elevación de su concentración del sIL-2R con respecto a los demás al momento de la biopsia renal. En el seguimiento temporal de la concentración de sIL-2R se encontró que estos cinco pacientes presentaron elevación de sus concentraciones con respecto a la basal, mientras que la tendencia de los demás fue de disminuir sus concentraciones basales. Al final del seguimiento tanto los pacientes con concentraciones altas como bajas de sIL-2R disminuyeron sus valores hasta alcanzar concentraciones promedio de sIL-2R de 2739 pg/mL. (figura 8)

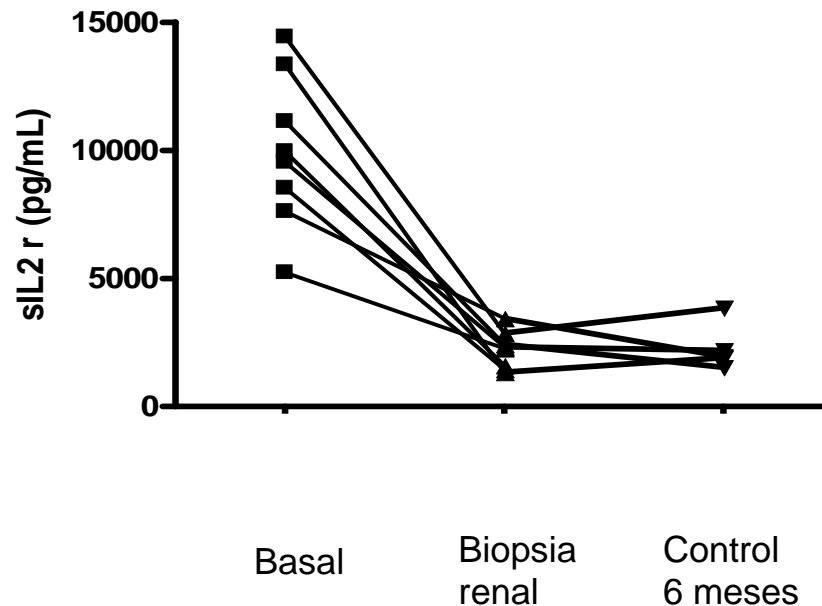
Figura 13. Evolución temporal de la concentración sérica de sIL-2R para niños con rechazo agudo (grupo 1)



Cuando se evaluó la curva temporal de la concentración de sIL-2R para los pacientes del grupo dos se observó que los ocho pacientes (100%) tuvieron disminución de su concentración basal de sIL-2R al momento de realización de biopsia renal. En el control a los seis meses posterior a la biopsia renal las

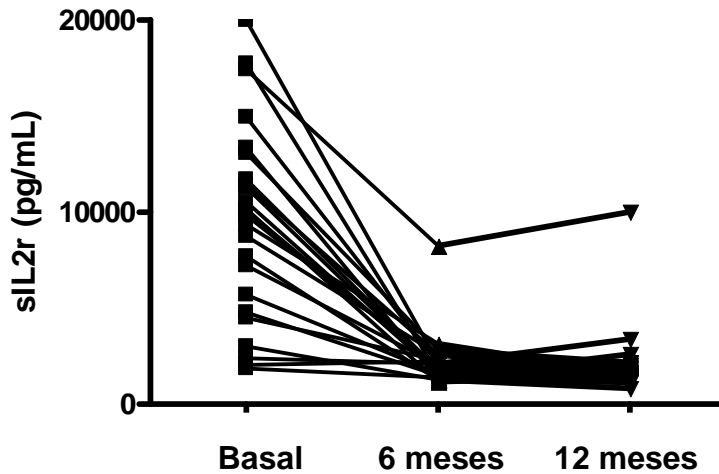
concentraciones séricas de sIL-2R de todos los pacientes bajaron a niveles por debajo de la basal con una concentración promedio de 2410pg/mL. (Figura 15)

Figura 15. Evolución temporal de la concentración de sIL-2R en pacientes con biopsia renal sin evidencia de rechazo agudo.



En cuanto al tercer grupo, se observó un comportamiento similar al grupo dos en donde se observó que las concentraciones séricas basales de sIL-2R disminuyeron a los seis meses y posteriormente al control al año. Solo llama la atención que un paciente muestra niveles de 10011.80 pg/mL al año postrasplante, cabe mencionar que este paciente se encuentra con creatinina actual estable y sin datos de infección. Es necesario vigilarlo estrechamente (figura 16).

Figura 16. Evolución temporal de la concentración sérica de sIL-2R en pacientes con función del injerto estable.



Debido a que cinco pacientes del grupo de niños con rechazo agudo que presentaban elevación de sus concentraciones de sIL- 2R con respecto a sus concentraciones basales y en comparación a los demás pacientes con rechazo agudo, se buscó asociación de estas concentraciones altas con el tipo de diagnóstico histopatológico. Se tomaron en cuenta los tipos de rechazo IA y IB los cuales fueron los más frecuentes. Se descartaron los otros tipos de rechazo ya que por el número reducido de pacientes la prueba estadística no tendría validez (mínimo tres pacientes). Se realizaron pruebas no paramétricas para correlación de variables y se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de sIL-2R al momento del rechazo y los tipos de rechazo IA y IB. (p=0.034)

Tabla 12. Correlacion de variables sIL2R vs rechazo IA y IB

	sIL2R basal	sIL2R problema	sIL2R control
Chi-Cuadrada	2.604	.034	.668
Df	2	2	2
Asymp. Sig.	.272	.983	.716

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Diagnóstico Histopatológico

También se realizó correlación de variables por medio de Chi-cuadrada entre la concentración sérica de sIL-2R y el número de incompatibilidades HLA (HLA mismatch), incompatibilidades HLA DR (HLA DR mismatch) y número de haplotipos que comparten donador-receptor. Ninguna de estas variables tuvieron relación estadísticamente significativa. Para el número de incompatibilidades al HLA se obtuvo $p=.404$, mientras que para el la incompatibilidad HLA DR se registro $p=.137$, finalmente en el número de haplotipos se obtuvo $p=.152$.

DISCUSION

El trasplante renal constituye actualmente el tratamiento de elección en el paciente pediátrico con insuficiencia renal crónica.⁽¹⁻⁴⁾ Sin embargo el rechazo agudo del injerto es la complicación mas frecuente y produce disfunción del injerto.⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ La biopsia renal es el estándar de oro para el diagnóstico de rechazo agudo, sin embargo por tratarse de un procedimiento invasivo acarrea riesgo de complicaciones pero sobretodo hace el diagnóstico de rechazo agudo cuando éste ya está establecido. Debido a que el rechazo agudo predispone al desarrollo de rechazo crónico es importante detectarlo a tiempo⁽²⁴⁾. En la práctica se ingresa a un paciente para realización de biopsia renal cuando la creatinina sérica se eleva al menos dos décimas por arriba de su creatinina basal. Para que lo anterior suceda, es necesario haber perdido el 50% de la función renal. Fundamentado en todo lo anterior es necesario identificar un marcador biológico que pueda hacer el diagnóstico temprano de rechazo agudo. Panigrahi y cols⁽³⁴⁾ encontró que el receptor soluble de interleucina 2 (sIL-2R) se encontraba significativamente elevado en episodios de rechazo agudo durante el primer mes de trasplante en comparación con pacientes con injerto funcional ($p=0.01$) y controles sanos ($p=0.001$). En nuestro estudio encontramos que niños con rechazo agudo tenían una concentración de sIL-2R basa mas alta que los demás grupos, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.888$). Al comparar el valor de sIL2R en pacientes con rechazo agudo contra pacientes con otros diagnósticos histopatológicos y niños con seis meses de postrasplante renal y función estable, encontramos que estaba significativamente elevada en el grupo de rechazo agudo celular ($p=0.05$). Esto nos indica que el receptor soluble de interleucina 2 es marcador de rechazo agudo. Es de señalar que tan solo cinco pacientes del grupo

de rechazo agudo mostraron concentración mayor de sIL-2R (Figura 13), es decir, no todos los pacientes con rechazo celular muestran elevación sérica de este marcador. Los pacientes con concentraciones elevadas influyeron para que la prueba resultara estadísticamente significativa. Para eso realizamos una curva ROC la cual nos indica que no es una prueba con alta sensibilidad y especificidad. Para un valor de corte de 1946.50 pg/mL la prueba tiene una sensibilidad de 73% y especificidad de 53%. Tratamos de identificar una posible explicación para los pacientes del grupo uno con concentraciones altas de sIL-2R sin embargo no encontramos asociación con otras variables tales como incompatibilidad al HLA que se ha descrito asociada al riesgo de disfunción de injerto. Además tratamos de buscar una relación con el diagnóstico histopatológico que en nuestra población el hallazgo mas frecuente fue rechazo agudo IA de acuerdo a la clasificación de Banff. Este tipo de rechazo lo encontramos en 13 de nuestros pacientes (48.1%) seguido por el tipo IB demostrado en cuatro pacientes (14.8%). Al momento del análisis estadístico solo tomamos en cuenta estos dos tipos de diagnósticos para que la prueba tuviera validez estadística ya que se requieren al menos tres pacientes por cada diagnóstico y solo estos dos diagnósticos cumplían con el mínimo de pacientes. Al relacionar estos dos diagnósticos con los cinco pacientes que presentaban concentraciones mas elevadas de sIL-2R encontramos correlación estadísticamente significativa entre ambas variables ($p=0.034$). La mediana de la concentración sérica de sIL-2R para los pacientes con rechazo IA fue de 2671 ng/mL (mínimo 413 ng/mL, máximo 22764 ng/mL), mientras que para los pacientes con rechazo IB la mediana fue de 3027 ng/mL (mínimo 1651 ng/mL, máximo 3682 ng/mL), por lo que se requiere muestrear a mas pacientes para poder establecer mejor esta relación, sobretodo comparando

los otros tipos de rechazo. En cuanto a las muestras de control existieron diferencias significativas en las concentraciones de sIL-2R en el grupo uno con relación a los otros dos grupos ($p=0.047$), aunque en la evolución temporal de las concentraciones de sIL-2R se observó en todos los grupos que las concentraciones disminuyeron al año de seguimiento con respecto a su basal.

CONCLUSIONES

De nuestro estudio podemos concluir que las concentraciones séricas del receptor soluble de interleucina 2 (sIL-2R) se eleva en algunos pacientes durante un evento de rechazo agudo celular y es marcador para rechazo sin embargo no es una prueba con alta sensibilidad (73%) y especificidad (53%). Además la elevación de este marcador tiene relación con el tipo de rechazo de acuerdo con la clasificación de Banff pero no con incompatibilidades al HLA.

BIBLIOGRAFIA

1. Fine RN. Renal transplantation for children the only realistic choice. *Kidney Int* 1985;28:5-15.
2. Najarian JS, Almond PS, Gilligham KJ, Mauer M et al. Renal transplantation in the first five years of life. *Kidney Int* 1993;44(Suppl 43):40-4.
3. Tejani A, Sullivan K. Long-term follow-up of grow in children post-transplantation. *Kidney Int* 1993;44:Suppl43):56-58.
4. French JH, Rapin I, Martinez WC. Neurologic complications of renal failure and their treatment. En:Edelmann CM Jr, editor. *Pediactric Kidney Disease*.2nd ed 1992:695-723.
5. Medeiros M, Romero B, Valverde R. Trasplante renal en pediatría. *Revista de Investigación Clínica* 2005; 57(2):230-236.
6. Waradley BA, Hébert D, Sullivan EK, Alexander SR, Tejani A. Renal transplantation, chronic diálisis, and chronic renal insufficiency in children and adolescents. The 1995 Annual Report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatric Nephrol* 1997;11:49-64.
- 7..Millan MT, Sarwal MM, Lemley KV, Yorgin P, Orlando P, So S, Alexander S Salñvatierra O Jr. A 100% 2 year graft survival can be attained in high-risk 15-kg or smaller infant recipients of kidney allografts. *Arch Surg* 2000;135:1063-8.
- 8.Kohaut EC, Tejani A. The Annual Reporto f the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Nephrol* 1996;10:422-34.
9. Ganadoux MF, Niaudent P, Broyer M. Non immunological risk factors in pediatric renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 1993;7:89-95.
10. Shapiro E, et al. Fk-506 in pediatric kidney transplantation-primary and rescue experience. *Pediatric Nephrol* 1995;9:S43-S48.
- 11..Auchincloss H, Sultan H. Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1996; 8(5):681-7.
12. Renard V, Cambiaggi A,Vely F, et al.Transduction of cytotoxyc signals in natural Killer cells: a general model of fine tuning between activatory and anhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* 1997; 155:205-9.
- 13.Xiaofene Jiang, Takeshi Shimaoka, Satoshi Kojo, Michige harada, Hiroshi Watarai, Hiroshi Wakao, Nobuhiro Ohkohchi, Shian Yonehara, Maseru Taniguchi and Ken-ichiro-Deino. Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerate. *J Immun* 2005;175:2051-2055.

14. Hunter CA. New IL-12-family members IL-23 and IL-27 cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005;5:521-31.
15. Cardona RL, Prigoshin N, Tambutti ML, Ferraris JR. Citocinas reguladoras de la respuesta al trasplante renal alogénico. *Medicina (Buenos Aires)* 2005;65:54-62.
16. Smith PL, Lombardi G, Foster GR. Type I interferons and the innate immune response more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol* 2005;42:869-77.
17. Cardona RL, Prigoshin N, Tambutti ML, Ferraris JR. Citocinas reguladoras de la respuesta al trasplante renal alogénico. *Medicina (Buenos Aires)* 2005;65:54-62.
18. R. García del Moral Garrido, Mampaso Martín-Buitrago, F. O'Valle Ravassa, F. J. Pardo Mindán, M. Rivera Gorrín, E. Vázquez Martul. Biopsia Renal Normas de actuación clínica en nefrología pag 139-171.
19. Lander ES, Linton LM, Birren B. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921.
20. Venter JC, Adams MD, Myers EW. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 1304-1351.
21. Furness PN 2001 Chronic allograft nephropathy: what can the biopsy tell us? *Transplant Proc* 33:3357-3358.
22. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al. 1999 The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55:713-723.
23. Racusen LC, Halloran PF, Solez K 2004 Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 4:1562-1566.
24. Tejani A, Sullivan EK 2000 The impact of acute rejection on chronic rejection: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Transplant* 4:107-111.
25. Birk PE, Stannard KM, Konrad HB, Blydt-Hansen TD, Ogborn MR, Cheang MS, Gartner JG, Gibson IW 2004 Surveillance biopsies are superior to functional studies for the diagnosis of acute and chronic renal allograft pathology in children. *Pediatr Transplant* 8:29-38.
26. Seikku P, Krogerus L, Jalanko H, Holmberg C 2005 Better renal function with enhanced immunosuppression and protocol biopsies after kidney transplantation in children. *Pediatr Transplant* 9:754-762.

27. (Jain S, Furness PN, Nicholson ML. The role of transforming growth factor beta in chronic renal allograft nephropathy. Overview. *Transplantation* 2000;69:1759-66.
28. Tary Lehmann M, Hricik DE, Justice AC Potter NS, Heeger PS. Enzyme-linked immunosorbent assay spot detection of interferon-gamma and interleukin 5-producing cells as a predictive marker for renal allograft failure. *Transplantation* 1998;66:219-24.
29. Carpenter CB. Mechanism of rejection. *Current Opinion in Organ Transplantation* 1997; 2:1-2.
30. Kim YS, Li XC, Maslinski W, et al. The role of novel T-cell growth factor in rejection. *Current Opinion in Organ Transplantation* 1997; 2:13-7.
31. Campistol JM, Cuervas-Mons V, Manito N. Aula sobre trasplantes de órganos sólidos. Madrid. *Drug Farma* 2001: 71-73.
32. (Bueno J, Ramil C, Sánchez A, Solar A, Medrano C García –Alonso L. Cuidados en el niño trasplantado a corto y medio plazo en atención primaria. *Bol Pediatr* 2003;43:129-34.
33. Boratynska M. Soluble cell adhesion molecules in chronic renal graft rejection. *Pol Arch Med Wewn* 1998;100:410-8.
34. Panigrahi A, Deka R, Bhowmik Dm Dash S, Tiwari S, Guleria S, Metha S, Mehra N. Functional assessment of immune markers of graft rejection: a comprehensive study in live-related donor renal transplantation. *Clinical Transplantation*. 20(1):2006:85-90.
35. Humar I, Slavicek J; Puretic Z; Pasini J; Kerhin V, Marekovic Z. Serial Monitoring of pre and posttransplant TH1 cytokine following renal transplantation. *Transplantation* 2004, 78(2) (suppl 1):731.
36. Oliveira JG, Xavier P, Sampalo SM, Mendes AA y Pestana M. sTNFR1 and sTNFR2 synthesis by fine-needle aspiration biopsy simple cultures is significantly associated with acute rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2001;27:1835-9.
37. Gorczynski RM, Adams RB, Levy GA, Chung SW 1996 Correlation of peripheral blood lymphocyte and intragraft cytokine mRNA expression with rejection in orthotopic liver transplantation. *Surgery* 120:496-502.
38. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, Strom TB 1998 Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 66:562-566.

39. Dugre FJ, Gaudreau S, Belles-Isles M, Houde I, Roy R 2000 Cytokine and cytotoxic molecule gene expression determined in peripheral blood mononuclear cells in the diagnosis of acute renal rejection. *Transplantation* 70:1074-1080.
40. Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Susal C 2003 Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 3:1121-1127.
41. Dadhania D, Muthukumar T, Ding R, Li B, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Sharma VK, Kapur S, Suthanthiran M 2003 Molecular signatures of urinary cells distinguish acute rejection of renal allografts from urinary tract infection. *Transplantation* 75:1752-1754.
42. Ding R, Li B, Muthukumar T, Dadhania D, Medeiros M, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Sharma VK, Kapur S, Suthanthiran M 2003 CD103 mRNA levels in urinary cells predict acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 75:1307-1312.
43. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, Sharma VK, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Schwartz JE, Suthanthiran M 2005 Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 353:2342-2351.
44. Li B, hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R and et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344:947-54.
45. Dugre FJ, Gaudreau S, Belles-Isles M, Houde I and Roy R. Cytokine and cytotoxic molecule gene expression determined in peripheral blood mononuclear cell in the diagnosis of acute renal rejection. *Transplantation* 2000;70:1074-80).