



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA**  
**“IGNACIO CHÁVEZ”**

**INMUNOMARCAJE PARA LISOZIMA Y MIELOPEROXIDASA EN  
NEUTROFILOS E INFILTRACIÓN PERITUBULAR DE EOSINOFILOS,  
COMO HERRAMIENTAS DIAGNOSTICAS EN CASOS DE RECHAZO  
AGUDO HUMORAL EN PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL**

**TESIS DE TITULACIÓN**

QUE PRESENTA

**DR. FRANCISCO JAVIER DOMÍNGUEZ QUINTANA**

PARA OBTENER EL TITULO DE

**ESPECIALISTA EN NEFROLOGÍA**

DIRECTOR DE ENSEÑANZA:

**DR. JOSÉ FERNANDO GUADALAJARA BOO**

TUTOR:

**DR. FRANCISCO EUGENIO RODRÍGUEZ CASTELLANOS**



JULIO-2013

MEXICO. DF



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  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"

TESIS DE TITULACIÓN DE NEFROLOGÍA

TÍTULO:

**"INMUNOMARCAJE PARA LISOZIMA Y MIELOPEROXIDASA EN NEUTROFILOS E  
INFILTRACIÓN PERITUBULAR DE EOSINÓFILOS, COMO HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS  
EN CASOS DE RECHAZO AGUDO HUMORAL EN PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL"**

PRESENTA:

DR. FRANCISCO JAVIER DOMÍNGUEZ QUINTANA  
RESIDENTE DE NEFROLOGÍA

DIRECTOR DE ENSEÑANZA:

DR. JOSÉ FERNANDO GUADALAJARA BOO

ASESOR DE TESIS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

DR. FRANCISCO EUGENIO RODRÍGUEZ CASTELLANOS  
MÉDICO NEFRÓLOGO ADSCRITO AL SERVICIO DE NEFROLOGÍA

CO-ASESOR DE TESIS Y ASESOR EN NEFROPATOLOGÍA:

DRA. MARÍA VIRGILIA SOTO ABRAHAM  
NEFROPATOLOGA ADSCRITA AL SERVICIO DE PATOLOGÍA

México, DF. Julio del 2013



México, DF. Julio del 2013

**Dr. José Fernando Guadalajara Boo**  
**Director de Enseñanza**  
**Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

**Dra. Magdalena Madero Rovalo**  
**Jefe del Departamento de Nefrología**  
**Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

**Dr. Francisco Eugenio Rodríguez Castellanos**  
**Médico Adscrito al Departamento de Nefrología**  
**Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

**Tutor de Tesis**

## *Agradecimientos*

- Antes que nada agradezco a Dios, de una manera infinita, la oportunidad de llegar a al momento de presentar mi trabajo de tesis, que marca el término de mi preparación como médico residente.
- Quiero expresar mi gran amor y gratitud a mis padres, ya que sin su apoyo y motivación hubiera sido difícil llegar al lugar en donde me encuentro. También mi amor fraternal y agradecimiento a mis hermanos, quienes han constituido un pilar importante en mi vida.
- Me es muy grato externar mi completo agradecimiento, admiración y respeto a mi maestro el Dr. Francisco Eugenio Rodríguez Castellanos, quien con su labor como excelente nefrólogo y completa disposición para ayudarnos en nuestra formación como nefrólogos, constituye mi mayor ejemplo a seguir.
- De manera innegable, expreso también mi profundo agradecimiento, admiración y respeto a mi maestra la Dra. María Virgilia Soto Abraham, quién es otro de los pilares fundamentales de mi formación como nefrólogo.
- Hago extenso mi agradecimiento al Dr. Eduardo Mancilla Urrea, que con su apoyo hizo posible la realización de este proyecto.
- Agradezco también profundamente al resto de mis maestros nefrólogos y al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por permitirme el orgullo de formarme en la mejor escuela de nefrología.

## INDICE

<b>I. Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>II. Antecedentes.....</b>	<b>8</b>
a. Fisiopatología de las células T y B en el evento de rechazo.....	11
b. Fisiopatología de los eosinófilos en el RAH (rechazo agudo humoral).....	12
c. Fisiopatología de los neutrófilos en el RAH (rechazo agudo humoral)....	13
<b>III. Planteamiento del problema.....</b>	<b>13</b>
a. Pregunta de investigación.....	14
b. Hipótesis.....	14
c. Objetivos.....	15
<b>IV. Material y Métodos.....</b>	<b>15</b>
a. Descripción general del estudio.....	15
b. Criterios de inclusión y exclusión.....	17
c. Definición de las variables.....	17
d. Análisis Estadístico.....	18
<b>V. Aspectos éticos.....</b>	<b>19</b>
<b>VI. Recursos humanos, físicos y financieros.....</b>	<b>19</b>
<b>VII. Resultados.....</b>	<b>20</b>
<b>VIII. Discusión.....</b>	<b>26</b>
<b>IX. Conclusiones.....</b>	<b>31</b>
<b>X. Limitantes.....</b>	<b>31</b>
<b>XI. Referencias.....</b>	<b>32</b>

## I. RESUMEN

La esencia de este proyecto es la búsqueda de aspectos morfológicos e inmunohistoquímicos en la biopsia renal que faciliten el diagnóstico de rechazo agudo humoral (RAH), ya que desgraciadamente no se puede realizar en todos los centros de trasplante la determinación de anticuerpos antidonador específicos, tal como lo establecen las recomendaciones de las guías Banff para poder establecer el diagnóstico de RAH, sobre todo en casos con datos histológicos compatibles con RAH y C4d negativo.

**Objetivos:** Evaluar si el infiltrado túbulointersticial de eosinófilos y la presencia de marcadores específicos por inmunohistoquímica en neutrófilos en la biopsia renal se encuentran con mayor frecuencia e intensidad en casos de rechazo agudo humoral documentado por biopsia, así como identificar si existe asociación entre la presencia de C4d con el infiltrado de eosinófilos y el inmunomarcaje para mieloperoxidasa (MPO) y lisozima. **Material y métodos:** Se recabaron todas las biopsias de aloinjertos renales con diagnóstico de RAH durante un lapso de dos años (2011 y 2012). Para fines de comparación se buscaron en el mismo periodo de tiempo casos con diagnóstico de rechazo agudo celular (RAC) documentado por biopsia y se tomaron biopsias cero de aloinjertos renales catalogadas como normales (Bx0) las cuales sirvieron como grupo control. Posteriormente se procedió a buscar en los 3 grupos antes citados, la presencia de eosinófilos a nivel túbulointersticial en las tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) y de los bloques de parafina se tomaron cortes que se marcaron con técnica de inmunoperoxidasa indirecta para mieloperoxidasa y lisozima para identificar el grado de infiltración por neutrófilos. **Resultados:** Se recabaron en total 97 biopsias renales procedentes de 81 pacientes, de las cuales 68 correspondían al diagnóstico de RAH (grupo 1), 18 con diagnóstico de RAC (grupo 2) y 11 Bx0 (grupo 3). Se encontró el infiltrado por eosinófilos en un 85.3% de las biopsias con RAH, en un 66.7% de aquellas con rechazo agudo celular

y en ninguno de los casos de las biopsias cero ( $p < 0.05$  RAH y RAC vs. Bx0). La presencia de MPO fue positiva en un 88.8% en el RAH, un 66.6% en el rechazo celular y un 12.5% en las biopsias cero ( $p < 0.05$  RAH vs. Bx0). En relación a la positividad para lisozima esta se encontró en 88.8% de RAH, 80% para rechazo celular y un 25% en biopsias cero ( $p < 0.05$  RAH y RAC vs. Bx0). Cabe comentar que a mayor intensidad del marcaje para ambos inmunoreactantes, las diferencias entre grupos ya descritas, se acentuaron. No se encontró asociación entre la presencia de eosinófilos peritubulares y el marcaje para MPO y lisozima con la positividad para C4d. Se encontró que únicamente el 69.5% de los casos de RAH fueron positivos para C4d.

**Conclusiones.** La infiltración de eosinófilos y el marcaje de neutrófilos peritubulares para MPO y lisozima en biopsias de aloinjertos renales, puede llegar a constituir una herramienta diagnóstica útil en casos de RAH, sobre todo considerando que hasta 30% de estos casos son negativos para C4d.



## II. ANTECEDENTES

El trasplante renal es en la actualidad un procedimiento relativamente común en la mayoría de los centros hospitalarios del mundo; el éxito de este tipo de tratamiento es el resultado de muchos años de investigación en diferentes ámbitos como la medicina clínica, quirúrgica y ciencias básicas. Desde sus inicios en la historia del trasplante renal, el conocimiento ha presentado un auge creciente, se tiene de conocimiento que el primer trasplante renal fue realizado en 1933 por el cirujano ruso Yurii Voronoy, en Ucrania, quien trasplantó un riñón extraído a un hombre de 60 años, muerto accidentalmente, a otro receptor humano, con 6 hrs de isquemia, y este falleció dos días después con incompatibilidad ABO<sup>1</sup>.

Pese a los considerables avances en la inmunosupresión y en la supervivencia del injerto a corto plazo, poco es lo que se ha logrado avanzar en las tasas de supervivencia a largo plazo. Alrededor del 30% de los pacientes pierden su injerto en los primeros 5 años, y este porcentaje aumenta hasta el 50% a los 10 años. Pérdidas de injerto, debido a causas distintas de la muerte, son una causa importante de enfermedad renal en etapa terminal. Los pacientes con pérdida del injerto representan alrededor de un 4% a 10% de los que se admiten por año para el tratamiento de diálisis<sup>2</sup>.

Varios estudios han asociado el evento de rechazo agudo (RA) en pacientes trasplantados como un factor de riesgo importante para la insuficiencia crónica del injerto<sup>3-5</sup>. Existe quien ha llegado a encontrar que un episodio de RA reduce de 12.5 a 6,6 años la supervivencia del injerto<sup>6</sup>. Por otra parte, después de un RA, el desarrollo de un rechazo crónico se vuelve más probable. Los eventos de RA tempranos después del trasplante, así como frecuentes

episodios de RA, y rechazo agudo refractario pueden afectar drásticamente la supervivencia a largo plazo del injerto renal<sup>6-8</sup>.

La variabilidad en la respuesta inmune ha llevado a la clasificación del RA de diferentes maneras, una de ellas, la más clásica desde el punto de vista clínico-patológico que corresponde al rechazo hiperagudo para aquella falla del injerto en los primeros minutos u horas después del trasplante debida a anticuerpos preformados. En segunda instancia esta el rechazo agudo acelerado, que es una forma de rechazo que se desarrolla en 1 a 2 semanas después del trasplante, con alteraciones importantes de la función y lesiones vasculares severas, considerado también un rechazo con componente humoral. El rechazo agudo corresponde aquel que se presenta en cualquier momento después del trasplante y es mediado principalmente, pero no exclusivamente, por inmunidad celular. Por último el rechazo crónico, que presenta un descenso progresivo de la función renal de causa inmunológica que inicia después del tercer mes post-trasplante; es mediado por inmunidad celular y, en algunos o muchos de los casos por la inmunidad humoral<sup>9</sup>.

Hasta principios de los años 90 no había una clasificación internacional estandarizada para el reporte de las biopsias de injertos renales, ello derivaba en una heterogeneidad considerable en los reportes de los diferentes centros en el mundo. Un grupo de nefropatólogos, nefrólogos y cirujanos de trasplante desarrollo el esquema de Banff en Canadá en 1991. Subsecuentemente se han presentado actualizaciones a intervalos regulares<sup>10</sup>, siendo la decimoprimer conferencia la última llevada a cabo en Francia en junio del 2011. Esta es una clasificación mundialmente aceptada, pero no exenta de dificultades y de algunos problemas de reproducibilidad<sup>11</sup>.

En base a la clasificación de Banff para el diagnóstico de RAH es imprescindible la presencia de 3 componentes: 1) la evidencia morfológica de daño agudo tisular en el órgano trasplantado que consiste en presencia de daño tubular agudo, infiltración de neutrófilos y/o células mononucleares en capilares peritubulares y/o glomérulos, trombosis capilar, así como evidencia de arteritis intimal, necrosis fibrinoide, inflamación intramural o transmural en arterias. 2) evidencia inmunopatológica de actividad de anticuerpos, en este caso C4d y/o rara vez inmunoglobulinas en capilares peritubulares. El depósito de C4d debe ser intenso y difuso (mayor a un 50%). 3) evidencia serológica de anticuerpos circulantes contra antígenos HLA u otros antígenos anti endotelio del donante. Se consideran necesarios los tres criterios para establecer como definitivo el diagnóstico de RAH. Si existen criterios morfológicos indicativos y C4d+, pero falta la demostración de anticuerpos antidonante, debe informarse como sospechoso de RAH. Por último, en el caso de presentar signos histológicos sospechosos y evidencia de anticuerpos circulantes, pero en ausencia de depósitos de C4d, debe considerarse como sospechoso o consistente con RAH. Es importante tener en cuenta que el RAH no siempre aparece como una entidad aislada, sino que puede coexistir con otras entidades, lo cual dificulta su diagnóstico. La clasificación de Banff incluye al RAH dentro de la categoría 2 (rechazo mediado por anticuerpos), pero considera que puede coincidir con otras tres categorías (rechazo limítrofe, rechazo agudo celular y nefropatía crónica del injerto)<sup>12-15</sup>.

Uno de los parámetros para el diagnóstico del RAH es el C4d, que es un fragmento de C4 que se produce durante la activación del complemento por la vía clásica o de las lectinas. Este fragmento es muy estable y se une covalentemente a las superficies celulares<sup>15</sup>. En el año 1993 Feuch y cols describen la importancia de los depósitos de C4d, como marcador que manifiesta un mecanismo humoral de rechazo del injerto<sup>13</sup>. Sin embargo como existen

controversias en relación al nivel de positividad (focal o difuso), la técnica empleada (inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia) e incluso la localización, puesto que la positividad es más intensa en capilares peritubulares de la corteza respecto a los de la médula, todo ello deriva en la importancia de estratificar el grado de C4d por las implicaciones en el diagnóstico, e incluso en el pronóstico<sup>14</sup>.

Así mismo, resulta importante comentar la presencia de eosinófilos en el tejido renal como otro parámetro diagnóstico de RAH. Dichas células contienen cuatro proteínas catiónicas que pueden ser reconocidas en los gránulos secundarios (proteína básica mayor (MBP), proteína catiónica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y la peroxidasa eosinofílica (POE)) siendo la más abundante la MBP<sup>16</sup>, sin embargo en nuestro medio su identificación como marcadores tisulares en biopsias renales es difícil, dada la dificultad de contar con anticuerpos específicos. La importancia de esto radica en que la presencia de los eosinófilos en el evento de RA del injerto renal ha sido observada desde fases tempranas del trasplante y ha sido descrito como diagnóstico y marcador pronóstico. De hecho se ha considerado que la presencia de eosinófilos en la biopsia renal es un predictor negativo que se asocia con un curso más severo de RA y una peor respuesta al tratamiento, con riesgo de disfunción crónica del injerto<sup>17</sup>.

A continuación se describen las vías inmunopatogénicas en casos de RAH:

**2.1 Fisiopatología de las células T y B en el evento de RAH.** Es importante mencionar que aunque las células T pueden directamente producir citotoxicidad; también facilitan la activación de otras células, incluidos los macrófagos vía producción de IFN- $\gamma$  y activación de linfocitos B, llevando a la producción de anticuerpos. Las células CD4 nativas pueden adoptar diferentes fenotipos de acuerdo al ambiente de citocinas

presente, con interleucinas IL-12 e IL-18 promueven el fenotipo Th1 y las interleucinas IL-4 e IL-13 promueven el fenotipo Th2; ambos tipos tienen un papel en el evento de rechazo del injerto. Las células TH1 producen IFN- $\gamma$  e IL-2, ambas citocinas activan las células CD8 CTLs y células NK. Las CTLs y las células NK causan apoptosis en el injerto, en tanto que los macrófagos activados causan reacción de hipersensibilidad retardada. Sin embargo las células TH1 expresan FasL y por ende pueden causar apoptosis de células que expresan Fas. Adicionalmente las células Th1 promueven la formación de anticuerpos fijadores del complemento (IgG1 e IgG3), tales anticuerpos son capaces de causar lisis en las células del injerto. En contraste las células Th2 desencadenan activación de eosinófilos<sup>18-21</sup>.

Las células Th1 promueven la hipersensibilidad de tipo retardado y la generación de anticuerpos fijadores del complemento; mientras que las células Th2 facilitan las respuestas alérgicas, generación de inmunoglobulina E y anticuerpos con una menor capacidad para fijar complemento. Datos experimentales indican que las glomerulonefritis con proliferación extracapilar son manejadas por respuesta de células T tipo Th1; mientras que la respuesta tipo Th2 favorece la producción de anticuerpos y la formación de depósitos inmunes<sup>18-21</sup>.

**2.2 Fisiopatología de los eosinófilos en el RAH.** Los eosinófilos activados que se reclutan han mostrado mediar rechazo del injerto en modelos de experimentación sin la participación de CTLs, macrófagos y células NK. La importancia de esta vía en el evento de rechazo aún está por ser clarificada. La hipereosinofilia que precede al evento de rechazo ha sido reportado en algún número de casos y los eosinófilos activados han mostrado ser la fuente del rechazo en injertos renales, hepáticos,

cardiacos y de piel. Los eosinófilos son reclutados y activados dentro del injerto a través de la acción combinada de IL-4, IL-5 e IL13 que son producidas por células aloreactivas de tipo Th2<sup>18-21</sup>.

**2.3 Fisiopatología de los neutrófilos en el RAH.** Los neutrófilos contienen 3 tipos de gránulos, dos de ellos catalogados como peroxidadaasa positivos y negativos respectivamente, el tercero como vesículas secretoras. El contenido de los primeros dos principalmente corresponde a mieloperoxidasa, lisozima y lactoferrina; pero también defensinas y gelatinasas<sup>15</sup>. Las vesículas secretoras contienen CD35 y citocromo b. Los neutrófilos constituyen de las primeras células que migran hacia el sitio de acción en procesos inflamatorios, como lo constituye un evento de rechazo. En este proceso están inmiscuidos los efectos agudos del complemento, ya bien descritos e incluyen la quimioatracción de neutrófilos y macrófagos vía C3a y C5a. Además de estos quimioatrayentes derivados del complemento están implicados otros como la IL-8 producida por macrófagos y leucotrieno B4, por lo que esta estirpe celular al igual que el componente C4d están inmiscuidos en la vía mediada por Th1<sup>18-22</sup>.

Existen reportes en relación a que existe una asociación arriba del 50% de la positividad del C4d de manera difusa como se recomienda en las guías Banff para establecer el diagnóstico de RAH con la presencia hallazgos histológicos compatibles y de anticuerpos antidonador específicos circulantes<sup>24</sup>.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico del RAH, es motivo de controversia en el ámbito del trasplante renal. La búsqueda de marcadores histopatológicos, inmunohistoquímicos, inmunofluorescencia

y recientemente por biología molecular, que nos permitan hacer un diagnóstico de RAH, contrariamente a la expresión histológica del rechazo celular o tubulointerstitial, ha sido más problemática. La distinción entre RAH y RAC es importante desde el punto de vista etiopatogénico, diagnóstico y terapéutico, ya que el RAH, conlleva un peor pronóstico y un mayor porcentaje de resistencia al manejo. El problema para establecer el diagnóstico de RAH a diferencia del RAC, es que no existen alteraciones histopatológicas específicas para el evento humoral; en segundo lugar, las alteraciones pueden no ser representativas y de mínima intensidad y en tercer lugar, pueden coexistir con un RAC. Tradicionalmente el diagnóstico de RAH se ha basado en C4d+, sin embargo hasta en un 40-50% puede encontrarse negativo, por lo que la búsqueda de otros criterios diagnósticos es importante. Otra limitante para el diagnóstico de RAH en base a como lo establecen los criterios de Banff, es la detección de los anticuerpos antidonador específico, que esencialmente es por el factor económico que no se encuentra en muchos de los centros de trasplante renal.

### **3.1 Pregunta de investigación.**

¿El infiltrado peritubular por eosinófilos es más frecuente en casos de RAH en comparación con RAC?

¿El inmunomarcaje para MPO y lisozima en neutrófilos peritubulares en biopsias de injertos renales es más frecuente e intenso en casos de RAH en comparación con RAC?

### **Hipótesis.**

La infiltración de eosinófilos y la positividad para MPO y lisozima en neutrófilos peritubulares en biopsias de aloinjertos renales son hallazgos más frecuentes en casos de RAH en comparación con RAC.

### 3.2 Objetivos.

- Evaluar la presencia de infiltración por eosinófilos a nivel tubulointersticial en biopsias de aloinjertos en casos con RAH y RAC, así como en tejido control.
- Evaluar la presencia e intensidad para marcadores específicos de neutrófilos por inmunohistoquímica (lisozima y mieloperoxidasa) en casos de RAH y RAC así como en tejido control (sano).
- Identificar posible asociación entre la presencia de eosinófilos e inmunoreactantes (MPO y lisozima) con inmunomarcaje para C4d en biopsias de aloinjertos renales con RAH y RAC.
- Evaluar la posible asociación entre hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos y la función del aloinjerto renal al momento del diagnóstico de RA (RAH y RAC).

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Descripción general del estudio.

#### 4.1.1 Diseño del estudio.

Estudio transversal, comparativo de casos y controles.

#### 4.1.2 Población de estudio:

Se analizaron muestras de tejido renal, fijado en formol al 10% e incluido en parafina, provenientes de biopsias renales de pacientes con diagnóstico de rechazo agudo de tipo humoral, biopsias con el diagnóstico de rechazo agudo de tipo celular y biopsias cero realizadas en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez; dichas biopsias fueron realizadas en el periodo comprendido de enero 2011 hasta diciembre 2012.



#### 4.1.3 Metodología:

Se recabaron datos demográficos de los pacientes incluidos (edad, género), datos relacionados al trasplante renal (tipo de trasplante, tiempo de isquemia fría y tiempo de isquemia caliente), tiempo de evolución post-trasplante al momento del rechazo agudo y determinación de anticuerpos antidonador específico. Se recabaron también los resultados de inmunoperoxidasa para C4d de las biopsias con diagnóstico de rechazo agudo humoral, así como función renal al momento del diagnóstico de RA.

Para la evaluación microscópica de cada biopsia, se tomaron las tinciones de H-E de cada una de las muestras seleccionadas, para evaluar la presencia de eosinófilos peritubulares en las biopsias de RAH, RAC y Bx0. Así mismo en cada una de las biopsias seleccionadas que se contaba con tejido en el bloque de parafina se realizaron 4 cortes de 2 micras del tejido, para marcar con técnica de inmunoperoxidasa indirecta, 2 cortes con mieloperoxidasa y los otros dos con lisozima, mediante esta técnica se procedió a rastrear el grado de intensidad del infiltrado por neutrófilos en los tres grupos de estudio; el grado de intensidad fue valorado en 4 grados; considerando grado 0 la ausencia de infiltrado por neutrófilos, grado 1 con presencia de 1-4 neutrófilos por campo de alto poder, grado 2 presencia de 5-8 neutrófilos por campos de alto poder, grado 3 presencia de 9-12 neutrófilos por campo de alto poder y grado 4 considerado como más de 13 neutrófilos por campo de alto poder. También se realizó una selección de los hallazgos más frecuentes desde el punto de vista histológico encontrados por microscopia de luz en las biopsias con diagnóstico de RAH, que correspondieron a glomerulitis, capilaritis, presencia de células plasmáticas y presencia de eosinófilos peritubulares; a este constructo se le asignó de manera arbitraria como un índice de severidad del rechazo agudo y se buscó su asociación con el grado de intensidad de positividad para el marcaje de MPO y lisozima.

## 4.2 Criterios de selección:

### 4.2.1 Inclusión:

4.2.1.1 Se seleccionaron todas las biopsias de tejido renal disponibles en el archivo de patología bajo el diagnóstico de rechazo agudo humoral, en el lapso de tiempo comprendido del 1 de enero del 2011 al 31 de diciembre del 2012.

4.2.1.2 Se seleccionó un grupo de biopsias con diagnóstico de rechazo agudo celular y otro más de biopsias cero catalogadas como normales.

4.2.1.3 Se analizaron casos en los que se contó al menos con laminillas de tinción de hematoxilina-eosina.

### 4.2.2 Exclusión:

4.2.2.1 Se excluyeron del estudio aquellas biopsias en la que no se contó con material histológico suficiente en la tinción de hematoxilina-eosina.

## 4.3 Definición de las variables

Variable	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición
Sexo	División biológica y genética que divide a los seres humanos en mujer u hombre	Cualitativa	Nominal dicotómica
Edad	Número de años que tiene el paciente referido en expediente clínico	Cuantitativa	Continua
Rechazo humoral	Presencia de lesión glomerular, lesión tubular, presencia de células plasmáticas, microangiopatía trombótica y/o lesión vascular.	Cualitativo	Nominal
Rechazo celular	Inflamación intersticial mayor a un 25% con tubulitis mayor a 10 células inflamatorias en la luz	Cualitativo	Nominal
Biopsia cero normal	Biopsia realizada inmediatamente después de un trasplante renal, sin alteraciones histológicas.	Cualitativo	Nominal
Infiltración peritubular de eosinófilos	Presencia en la tinción de hematoxilina-eosina de eosinófilos peritubulares	Cualitativo	Nominal

MPO	Presencia de células positivas para el marcaje de mieloperoxidasa por campo de alto poder, 1-4 grado 1, 5-8 grado 2, 9-12, más de 13 grado 4	Cualitativo	Ordinal
LISOZIMA	Presencia de células positivas para el marcaje de lisozima por campo de alto poder, 1-4 grado 1, 5-8 grado 2, 9-12, más de 13 grado 5	Cualitativo	Ordinal
C4d	Presencia de positividad de capilares peritubulares para el marcaje de C4d, catalogado como focal con positividad en menos del 10-50%, difusa mayor a un 50%	Cualitativo	Ordinal
Severidad del Rechazo humoral	Presencia de diferentes características histopatológicas, glomerulitis, capilaritis, células plasmáticas y eosinófilos peritubulares, grado 1 con una característica, grado 2 con 2 características, grado 3 con 3 características y grado 4 con todas las características seleccionadas.	Cualitativo	Ordinal
Cifras de creatinina el momento del rechazo	Niveles séricos de creatinina reportado en el eventos del rechazo en su expediente clínico	Cuantitativa	Continua

#### 4.4 Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  DS o como proporciones, según corresponda. La comparación de medias se realizó con la prueba T de student o con ANOVA de 1 vía para el caso de más de dos medias o bien, con sus alternativas no paramétricas de acuerdo con la distribución de cada variable. Como prueba de comparación múltiple de medias (post-hoc) se utilizó el test de Bonferroni o Dunett. La comparación de proporciones se llevó a cabo con la prueba de X<sup>2</sup>. Las pruebas de asociación se efectuaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson o su alternativa no paramétrica (Spearman). Se consideró un valor de significancia a una  $p < 0.05$ . Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15 para Windows.

## **V. Aspectos éticos**

El estudio no incluyó alguna maniobra de intervención, ya que únicamente se trabajó con muestras histológicas obtenidas por biopsia ya disponibles previamente en el departamento de Patología. El estudio permitió identificar la presencia del infiltrado por eosinófilos en los eventos de rechazo agudo humoral, celular y biopsias cero del injerto renal y marcaje de neutrófilos por inmunoperoxidasa con determinación de mieloperoxidasa y lisozima.

En el estudio se siguieron los principios éticos emitidos en la declaración de Helsinki, las pautas establecidas por la Organización Mundial de la Salud y lo establecido en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. El estudio se consideró de riesgo menor al mínimo.

## **VI. Recursos humanos, físicos y financieros**

Este estudio se realizó en un instituto de atención a la salud de tercer nivel: el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. El tejido renal fue tomado del archivo de bloques de parafina del servicio de patología del instituto y el análisis de microscopia de luz e inmunoperoxidasa se realizó en el mismo hospital por un patólogo cegado para el estudio. La recolección de la información clínica la realizó el médico residente de nefrología Francisco Javier Domínguez Quintana. Se utilizaron fondos del servicio de nefrología y patología del INCICH así como la infraestructura ya disponible para los estudios patológicos.

## VII. Resultados

Se incluyeron en total 97 biopsias renales de 81 pacientes; 48 hombres y 33 mujeres; la edad promedio de los pacientes fue de  $30.8 \pm 10.4$  años. En relación a los datos del trasplante se encontró un tiempo de isquemia caliente de  $5.48 \pm 7.8$  minutos; una isquemia fría de  $185.8 \pm 303.4$  minutos. Al momento del evento los pacientes tenían en promedio  $38.8 \pm 43.2$  meses post-trasplante. El promedio de creatinina basal fue de  $1.7 \pm 1.2$  mg/dl, con un valor promedio al momento del RA de  $4.0 \pm 2.5$  mg/dl durante el evento de rechazo agudo.

De la totalidad de las biopsias recabadas se formaron tres grupos, el primero con 68 biopsias que correspondían a RAH, el segundo con 18 biopsias que correspondían a RAC y finalmente el tercero con 11 biopsias que correspondían a Bx0 (catalogadas como normales). De las 68 biopsias con diagnóstico de RAH, 86.7% contaron con marcaje para C4d; así mismo se logró marcar con MPO y lisozima un total de 77% de las biopsias de las que se disponía tejido en los bloques de parafina de los grupos de estudio. De los pacientes con diagnóstico de RAH, solo dos contaban con la determinación de anticuerpos antidonador específico positivos y uno de ellos con C4d negativo.

Al valorar los parámetros histopatológicos se encontró que la presencia del infiltrado por eosinófilos estaba presente en un 85.3% de las biopsias con RAH; un 66.7% en aquellas con rechazo celular, y en ninguno de los casos de las biopsias cero ( $p < 0.05$  RAH y RAC vs. Bx0) (Imagen1). La presencia de MPO tuvo una positividad en un 88.8% en las biopsias con diagnóstico de RAH, un 66.6% en biopsias con diagnóstico de RAC y un 12.5% en las biopsias cero ( $p < 0.05$  RAH vs. Bx0). En relación a la positividad para lisozima fue de 88.8% para biopsias con RAH, un 80% para aquellas con RAC y un 25% de las Bx0

( $p < 0.05$  RAH y RAC vs. Bx0) (Gráficos 1) Aunque en las comparaciones directas de RAH y RAC no se apreció una diferencia estadísticamente significativa, sí se hizo evidente que en cada una de las características previamente citadas existió una tendencia clara de mayor presencia de eosinófilos e inmunomarcaje para MPO y lisozima en el RAH respecto a RAC, y cuando se dividió por grados de infiltración para MPO y lisozima, se encontró que existía una mayor tendencia de aquellos grados de infiltración 3 y 4 para asociarles a RAH.

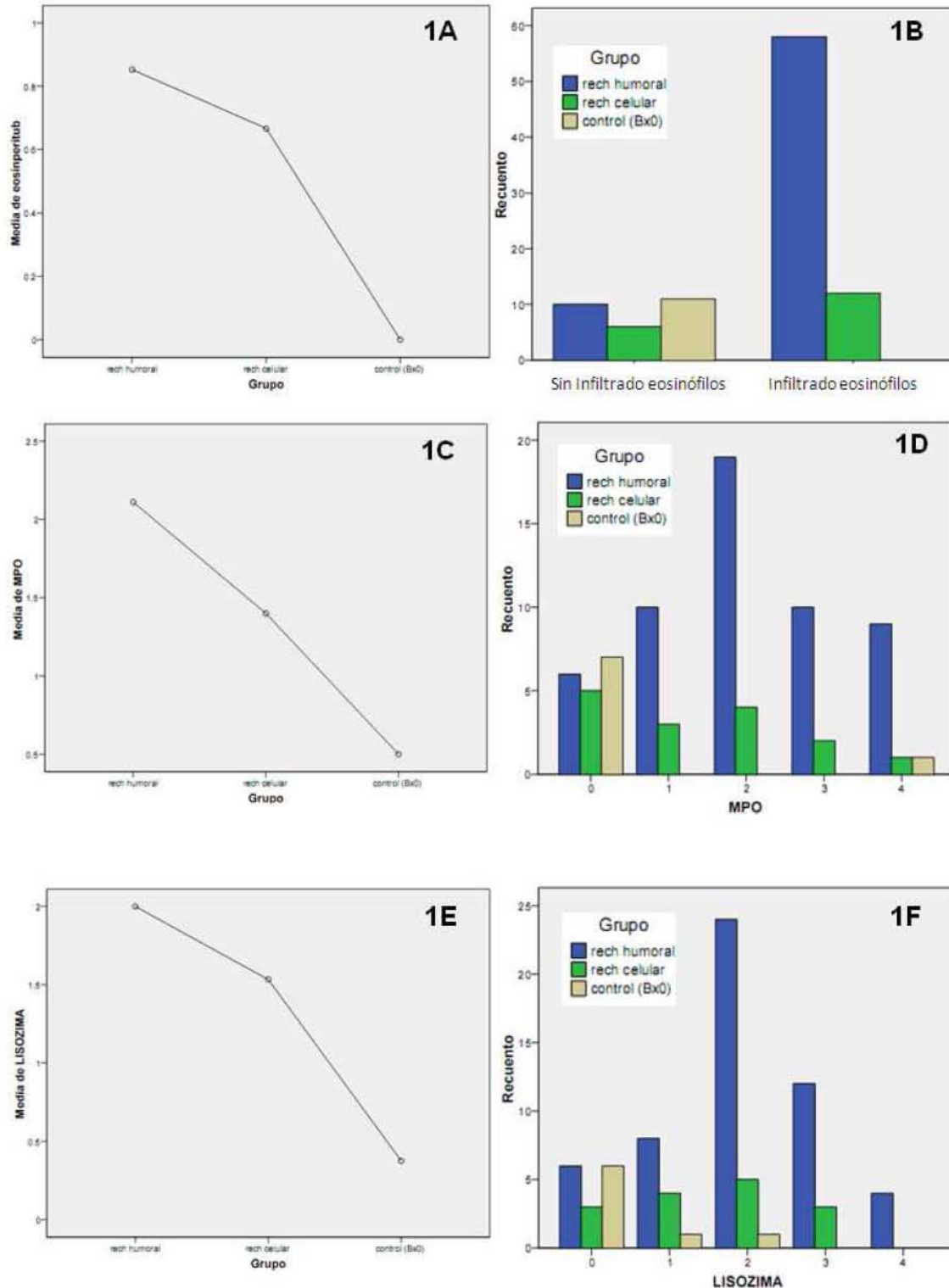
	RAH	RAC	Bx0
Eosinófilos peritubulares	85.3%	66.7%	0%
MPO grado 1	18.5%	20%	0%
MPO grado 2	35.2%	26.7%	0%
MPO grado 3	18.5%	13.3%	0%
MPO grado 4	16.7%	6.7%	12.5%
Lisozima grado 1	14.8%	26.7%	12.5%
Lisozima grado 2	44.4%	33.3%	12.5%
Lisozima grado 3	22.2%	20%	0%
Lisozima grado 4	7.4%	0%	0%

Tabla 1. Se observa una tendencia a presentar mayor infiltrado por eosinófilos en el grupo con RAH aunque al compararlo con RAC se obtiene una  $p > 0.05$ . Igualmente la tendencia de mayor presencia en RAH se hace evidente en el marcaje con MPO y lisozima, aunque al compararlo con RAC se obtiene una  $p > 0.05$ , y se aprecia que dicha tendencia es mayor en los grados de infiltración 3 y 4 para ambos inmuno marcadores. En el análisis de proporciones con prueba de  $X^2$  se encontró una  $p < 0.05$  para eosinófilos peritubulares, presencia de mieloperoxidasa y lisozima entre RAH, RAC y Bx0

Se encontró que la diferencia entre grupos es más marcada a mayor grado de infiltración de los neutrófilos. Al buscar asociaciones entre la presencia de eosinófilos peritubulares identificados con tinción de H-E, presencia de neutrófilos con marcaje por inmunohistoquímica de MPO y lisozima y la presencia del C4d, se encontró que existía una correlación significativa positiva entre la presencia de eosinófilos y ambos marcajes para neutrófilos ( $r=0.370$ ,  $p<0.05$ ;  $r=0.276$ ,  $p<0.05$ , para MPO y lisozima respectivamente), siendo mayor la asociación con MPO. (Tabla 2)

No se identificó asociación significativa entre la positividad de ambos inmunoreactantes en neutrófilos y la presencia de eosinófilos peritubulares con tinción + para C4d. De las biopsias con diagnóstico de RAH un total de 60.8% contaban con marcaje para C4d y solo un 69.5% presentaban positividad para este, con un 25.4% en forma focal y un 44.1% de manera difusa, siendo un 30.5% negativas para C4d en un contexto de parámetros morfológicos compatibles para RAH.

Al evaluar los diferentes parámetros histopatológicos en los 2 grupos con RA, se encontró una expresión significativamente diferente para glomerulitis, capilaritis y células plasmáticas, siendo mayor la expresión de las 3 variables en el grupo con RAH (Tabla 3). Aunque menos notable, también hubo diferencia significativa para la expresión de arteriopatía hialina, el grado de fibrosis, la presencia de glomerulopatía crónica del injerto y MAT, siendo mayor en los casos RAH ( $p<0.05$ ).



**GRAFICOS 1.** 1A Distribución por grupo del infiltrado por eosinófilos, 1B Distribución por grupos de aquellos negativos y positivos para la presencia de infiltrado intersticial por eosinófilos. 1C Distribución por grupos de la positividad para mieloperoxidasa, 1D Distribución por grupos de las diferentes intensidades encontradas para la mieloperoxidasa, 1E Distribución por grupos de la positividad para lisozima, 1F Distribución por grupos de las diferentes intensidades encontradas para la lisozima.



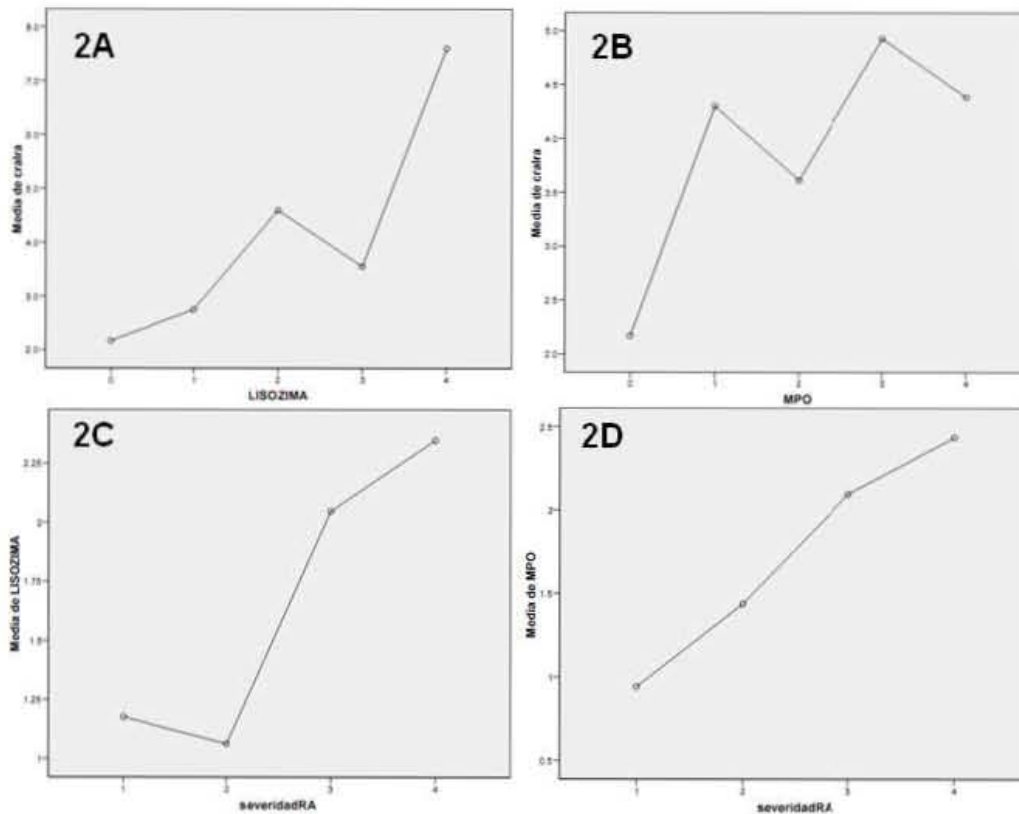
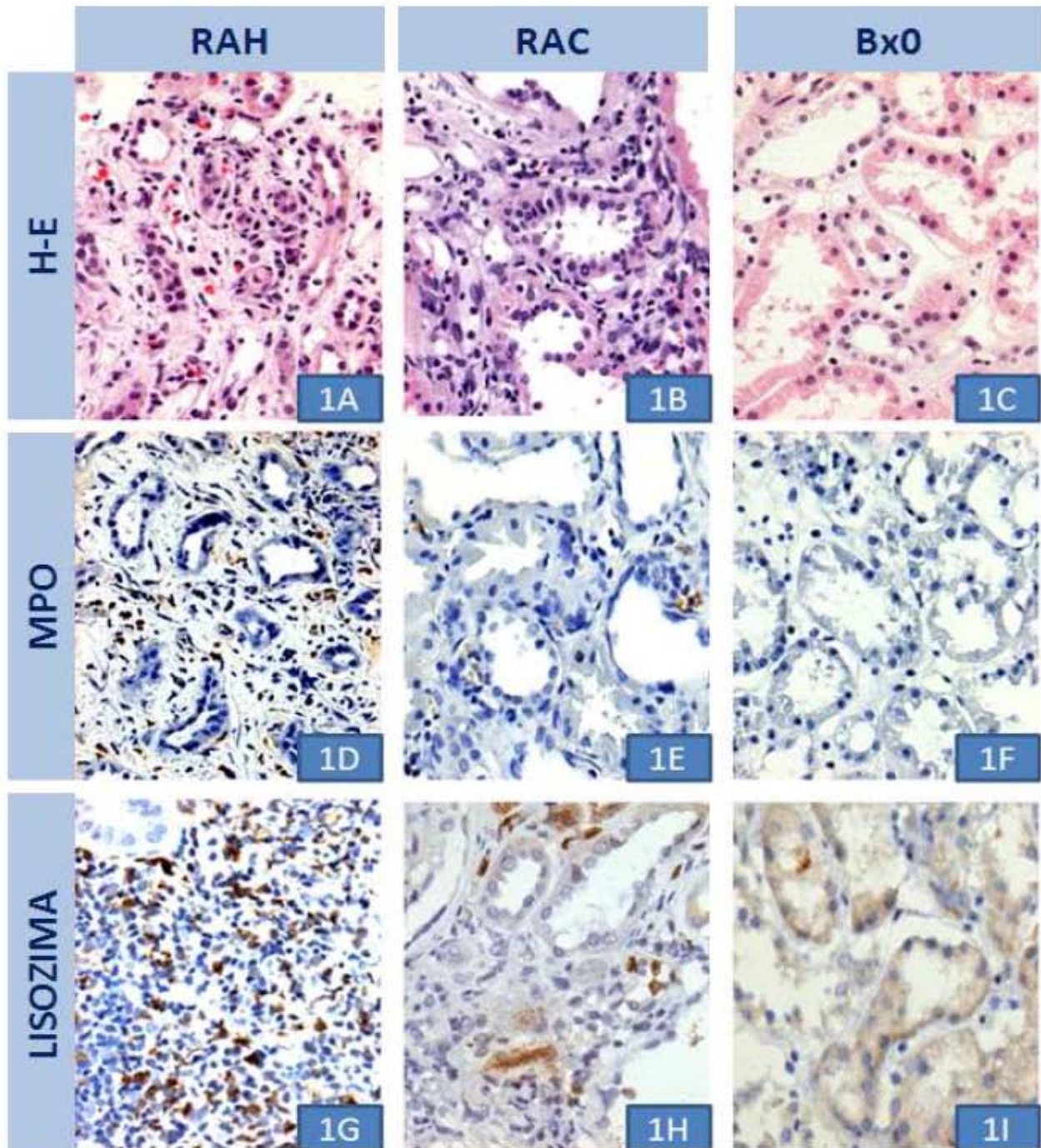


GRAFICO 2. 2A Se aprecia una tendencia a presentar mayores cifras de creatinina a mayor positividad de lisozima todos los grupos (p 0.2). 2B Aunque menos marcada se aprecia una tendencia a presentar mayores cifras de creatinina a mayor positividad de MPO en todos los grupos (p 0.58), 2C Se aprecia una asociación más marcada de lesión tisular en los diferentes grupos de estudio a mayor grado de positividad para lisozima (p 0.002) y MPO (p 0.00)

	Eosinófilos peritubulares	C4d	MPO	Lisozima	Cifras de creatinina
Eosinófilos peritubulares		0.114/0.391	0.370/0.001	0.276/0.015	0.190/0.150
C4d	0.114/0.391		0.200/0.151	0.132/0.347	0.356/0.019
MPO	0.370/0.001	0.200/0.151		0.640/0.000	0.204/0.165
Lisozima	0.276/0.015	0.132/0.347	0.640/0.000		0.159/0.279
Cifras de creatinina	0.190/0.150	0.356/0.019	0.204/0.165	0.159/0.279	

CUADRO 2. Cuadro de correlaciones Rho Spearman entre las variables para el diagnóstico de rechazo agudo humoral. Reportado como coeficiente de correlación / valor de p



**IMAGEN 1.** **1A.** Campo 40X con hematoxilina-eosina, de biopsia con RAH, en la que se aprecia importante infiltrado por eosinófilos, **1B.** Campo 40X con hematoxilina-eosina de biopsia con diagnóstico de RATI, en el que se aprecia infiltrado escaso por eosinófilos, **1C.** Campo 40X con hematoxilina-eosina de biopsia cero, en la que no se encuentra infiltrado por eosinófilos, **1D.** Inmunomarcaje con MPO de biopsia con RAH en la que se encuentra positividad grado 4, **1E.** Inmunomarcaje con MPO de biopsia con RATI que expresa positividad grado 1, **1F.** Inmunomarcaje con MPO negativo en una biopsia cero, **1G.** Inmunomarcaje con Lisozima en una biopsia con diagnóstico de RAH con positividad grado 4, **1H.** Inmunomarcaje con Lisozima en una biopsia con diagnóstico de RATI con positividad grado 1, **1I.** Inmunomarcaje con Lisozima negativo en una biopsia cero.



	RAH	RAC	Bx0	p
<b>GLOMERULITIS</b>	67.6%	0%	0%	<0.05
<b>CELULAS PLASMATICAS</b>	60.3%	5.6%	0%	<0.05
<b>CAPILARITIS</b>	89.7%	100%	0%	<0.05

CUADRO 3. Características histopatológicas evaluadas donde se encontró mayor diferencia, estadísticamente significativa,

Se identifico una tendencia a presentar mayores cifras de creatinina a mayor positividad de lisozima en todos los grupos (p 0.2). Aunque menos marcada se también se aprecio una tendencia a presentar mayores cifras de creatinina a mayor positividad de MPO en todos los grupos (p 0.58). (Gráficos 2)

Para fines de comparación de acuerdo con el nivel de lesión tisular se creó un score de severidad en base a los parámetros histopatológicos más frecuentes encontrados en las biopsias de RAH. Se encontró una asociación más marcada de lesión tisular en los diferentes grupos de estudio a mayor grado de positividad para lisozima (p 0.002) y MPO (p 0.00). (Gráficos 2)

## VIII. Discusión

La biopsia renal sigue siendo el mejor método para diagnosticar la existencia de rechazo en el injerto renal y en caso positivo, la indicación de un manejo inmunosupresor adecuado<sup>23</sup>. Las sucesivas reuniones de Banff, han intentado establecer criterios diagnósticos histopatológicos objetivos y graduación de la intensidad de las lesiones renales con la finalidad de establecer un diagnóstico, correlación clinicopatológica y con

ello otorgar un pronóstico<sup>23</sup>. Sabemos que las características histopatológicas son muy variables, habiéndose descrito casos con muy poca expresión morfológica, limitándose a edema intersticial y aislados signos de necrosis tubular aguda, casos de afección moderada con marginación de leucocitos en los capilares peritubulares y congestión capilar y por último, casos muy floridos, en los que se observan trombos en capilares peritubulares y glomerulares, lesiones tipo MAT y necrosis fibrinoide arterial y arteriolar<sup>23</sup>.

En relación a la presencia de C4d, que constituye uno de los factores esenciales del constructo que sirve para establecer el diagnóstico del RAH, trabajos como el de Collins y cols. han encontrado una correlación entre depósitos de C4d intensos y difusos (superior al 50%) en capilares peritubulares, anticuerpos antidonante circulantes y hallazgos histológicos indicativos de RAH, siendo de estos el dato más útil la presencia de neutrófilos en CPT<sup>24</sup>. De acuerdo con lo anterior se decidió en este trabajo realizar la búsqueda del infiltrado por neutrófilos en las biopsias renales, con ayuda de marcadores específicos que hicieran más fácil graduar la intensidad del infiltrado, así como permitir diferenciar con mayor certeza cada tipo de RA, con la finalidad de encontrar otros marcadores además del muy específico pero poco sensible C4d.

Existen autores como Mauiyyedi, y cols., quienes demostraron una sensibilidad del 95% y una especificidad del 96% para el C4d, siempre y cuando se incluya la presencia de anticuerpos antidonante como criterio diagnóstico de RAH<sup>25</sup>. Sin embargo, existen otros autores que encuentran una sensibilidad mucho más baja (entre el 23 y el 31%), pero mantienen una especificidad muy alta (93%), en relación con la presencia de anticuerpos antidonante anti-HLA. Estas discrepancias pueden justificarse por la diferente sensibilidad de las técnicas empleadas para la detección de anticuerpos antidonante circulantes, así

como por el tipo de técnica (inmunohistoquímica o inmunofluorescencia) y el tipo de anticuerpo utilizado para detectar el C4d (monoclonal o policlonal)<sup>26-27</sup>. En nuestro grupo de muestras no hubo la correlación esperada en la presencia de C4d con el infiltrado por neutrófilos, dado que participan en la misma vía, incluso se encontró un porcentaje considerable de casos C4d negativos dentro de las biopsias con criterios histológicos para RAH, lo cual nos lleva a considerar que la detección de la vía de lesión inmunológica activa, en la que participa el C4d, se podría ver beneficiada por algún método más sensible que se complemente con la especificidad alta encontrada en algunos trabajos para el C4d; por esto en nuestro trabajo consideramos que los infiltrados importantes de neutrófilos identificados con marcadores específicos de esta estirpe celular pueden ser un complemento para identificar la vía de lesión que activa el complemento, y que corresponde a la que identifica el C4d.

Recientemente, la clasificación de Banff ha incluido una nueva subcategoría dentro del RAH, los depósitos de C4d sin evidencia morfológica de rechazo activo, que se define como presencia de depósitos de C4d en capilares peritubulares y anticuerpos antidonante, sin criterios histológicos de rechazo humoral o celular, ni glomerulitis, ni datos de glomerulopatía de trasplante, ni capilaritis, sin laminación de capilares peritubulares y sin datos de necrosis tubular aguda. Si existe inflamación bordeline, el diagnóstico es indeterminado<sup>14,28</sup>.

Por ello consideramos que se debe indagar más en métodos diagnósticos a nivel histopatológico, inmunohistoquímico e inmunofluorescencia, para el diagnóstico de rechazo agudo humoral que resulten más accesibles que la determinación de anticuerpos antidonador específico que desafortunadamente no se pueden realizar en muchas

instituciones como la nuestra. Tras la búsqueda de los neutrófilos en las biopsias renales mediante marcaje por técnica de inmunoperoxidasa indirecta, se encontró mayor presencia de estos en biopsias con diagnóstico de rechazo humoral, en relación a las biopsias con rechazo celular y biopsias cero, con diferencia más marcada a mayor intensidad del infiltrado. Un dato interesante fue que no se encontró asociación entre la positividad para MPO y lisozima con la positividad para C4d, ya que como se comentó previamente, los neutrófilos están vinculados a la vía donde está activado el complemento, y se hubiera esperado alguna correlación entre ambos, una probable explicación a ello es que se ha identificado que el C4d tiene presencia oscilante en el evento humoral al igual que la encontrada en los anticuerpos antidonador específico.

En relación a la presencia de eosinófilos peritubulares teniendo como antecedente el hecho de que participan en la vía de lesión humoral que no vincula complemento, se encontró que efectivamente existe una asociación significativa entre presencia de eosinófilos peritubulares y rechazo de tipo humoral al compararlo con RAC.

Existen antecedentes en este sentido desde hace muchos años, por ejemplo en el trabajo de Kormendi F y cols, realizado en 1988 donde estudiaron 83 receptores renales mediante citología con técnica de aspiración con aguja fina en las primeras 4 semanas del trasplante, encontrando que existía un porcentaje más alto de eosinófilos en pacientes quienes tenían rechazos irreversibles en comparación con aquellos casos que presentaban un rechazo reversible (12.5 % vs 3.79 % respectivamente)<sup>29</sup>.

Así también en otros estudios realizados como el de Meleg y cols quienes estudiaron 29 injertos renales obtenidos por nefrectomía, evaluando si la infiltración por eosinófilos mayor

a 10% se correlacionaba con mayor componente vascular del rechazo. Dicho grupo encontró que a mayor infiltrado por eosinófilos el componente vascular del rechazo era más importante<sup>30</sup>.

En una revisión Weir y cols, incluyeron 187 eventos de rechazo agudo documentados por biopsia ocurridos en 132 pacientes. En este estudio se concluyó que el porcentaje de eosinófilos en los pacientes con rechazo agudo irreversible fue significativamente mayor en comparación con casos de rechazo agudo reversible ( $5.2\pm 5.7$  vs.  $2.9\pm 3.5\%$ , respectivamente)<sup>31</sup>.

Ten y cols., demostraron que en pacientes con RA las tinciones convencionales para determinar la presencia de eosinófilos tisulares subestima su número y no detecta usualmente la degranulación de los mismos, por ello estudiaron mediante inmunofluorescencia la localización de proteína básica mayor de los gránulos de eosinófilos (MBP) en tejido renal, orina y en plasma, encontrando que a nivel tisular la presencia de eosinófilos y degranulación de estos fue de un 94% y 87 % respectivamente. Así mismo se encontraron niveles elevados de MBP en orina, más no en plasma<sup>32</sup>.

En este estudio al analizar la asociación entre el índice de severidad de daño tisular y la tinción para MPO y lisozima, encontramos que a mayor grado de lesión tisular la intensidad de la tinción para ambos inmunoreactantes era mayor.

## IX. Conclusiones

- En este estudio se ha documentado que en presencia de RAH la infiltración por eosinófilos y el inmunomarcaje para MPO y lisozima en neutrófilos peritubulares, son mayores con una tendencia clara en comparación con el grupo de RAC.
- No se encontró asociación significativa entre la infiltración de eosinófilos y el marcaje de neutrófilos peritubulares con la tinción para C4d.
- Asimismo, no se encontró asociación significativa entre la infiltración de eosinófilos y el marcaje de neutrófilos peritubulares con la función renal al momento del diagnóstico de RA, si bien se observó una tendencia a la misma.
- La tinción para C4d en casos de RAH fue positiva únicamente en el 69% de las muestras y sólo en un 40% de las mismas fue positiva de manera difusa.
- La infiltración de eosinófilos y el marcaje de neutrófilos peritubulares para MPO y lisozima en biopsias de aloinjertos renales, pueden llegar a constituir una herramienta diagnóstica útil en casos de RAH, sobre todo considerando que hasta 30% de estos casos son negativos para C4d.

## X. Limitantes

- La naturaleza retrospectiva del estudio que impide el control de muchas de las variables de estudio.
- La población de estudio es limitada respecto a otras encontradas, y dado a que se observaron algunas tendencias en ciertas comparaciones evaluadas, quizás con una población más grande se hubiera logrado la significancia estadística.
- No se contó con determinación de anticuerpos antidonador específico en las biopsias catalogadas con diagnóstico de RAH.
- No se logró contar con ningún marcador específico para eosinófilos, para medir objetivamente la intensidad del infiltrado de estos.



## XI. Referencias

1. Edouard Matevossian, Hans Kern, Norbert Hüser, Dietrich Doll. Surgeon Yurii Voronoy (1895–1961). A pioneer in the history of clinical transplantation: in Memoriam at the 75th Anniversary of the First Human Kidney Transplantation. *Transplant International*. 2009 Dec ;22(12) ; 1132–1139.
2. Marcén R, Teruel JL. Patient outcomes after kidney allograft loss. *Transplant Rev*. Jan 2008;22(1):62-72.
3. L.Kyllonen, S.Koskimies and K.Salmela. Renal transplant recipients with graft survival longer than 20 years: report on 107 cases,” *Transplantation Proceedings*, 2001 ;33 (4), 2444–2445.
4. S. Alarrayed, A. El-Agroudy, A.Al-Arrayedetal. Why does Kidney allograft fail? Along-term single center experience. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 2011; 22(4):818–824.
5. S.Prommool, G.S.Jhangri, S.M.Cockfield, P.F.Halloran. Time dependency of factors affecting renal allograft survival. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2000 11(3), 565–573.
6. W.Wang, X.B.Li, H.Yinetal. Factors affecting the long-term renal allograft survival, *Chinese Medical Journal*, 2011; 124(8); 1181–1184.
7. R.Emiroglu, M.C.Yagmurdur, F.Karakayali. Role of donor age and acute rejection episodes on long-term graft survival in cadaveric kidney transplantations.*Transplantation Proceedings*. 2005 37(7): 2954–2956.
8. Y.H.Park, S.K.Min, J.N.Lee. Risk factors on graft survival of living donor kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2004; 36(7):2023–2025.

9. Perkins DL, Carpenter CB. Immunobiology of transplantation. In: Brenner BM, editor. Brenner and Rector's The Kidney. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. p. 2576-601
10. Bhowmik DM, Dinda AK, Mahanta P, Agarwal SK. The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. Indian J Nephrol. 2010 Jan;20(1):2-8.
11. Furness, Peter N. International Variation in Histologic Grading Is Large, and Persistent Feedback Does Not Improve Reproducibility. American Journal of Surgical Pathology, 2003 Jun ; 27(6) ; 805-810
12. Lorraine C. Racusen, Philip F. Halloran and Kim Solez. Banff 2003 Meeting Report: New Diagnostic Insights and Standards. American Journal of Transplantation 2004; 4: 1562-1566
13. Helmut E Feucht, Helmut Schneeberger, Günther Hillebrand, Klaus Burkhardt. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. Kidney International 1993; 43, 1333–1338
14. K. Solez, R. B. Colvin, L. C. Racusen, M. Haas. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. American Journal of Transplantation, April 2008, 8(4), 753–760.
15. Mario Espinosa-Hernández, Rosa Ortega-Salas, María López-Andreu. C4d como herramienta diagnóstica en la nefropatía membranosa. Nefrología 2012;32(3):295-9
16. Wardlaw AJ, Kay AB. Eosinophils: production, biochemistry, and function. Fifth edition. Williams Hematology.
17. Jezior D, Boratynska M, Halon A, Kuzstal M. Biopsy eosinophilia as predictor of renal graft dysfunction. Trasplant Proc. 2003; 35 (6); 2182-5.

18. Lynn D. Cornell, R. Neal Smith, Robert B. Colvin. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2008;3:189-220.
19. James J. Lee, Helene F. Rosenberg, *Eosinophils in Health and Disease*, 1st edition. Pp 527-9
20. Brian J. Nankivell, M.D., Ph.D., and Stephen I. Alexander. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med* 2010;363:1451-62.
21. Claudio Ponticelli. The mechanisms of acute transplant rejection revisited. *JNEPHROL* 2002(25) 150-158.
22. Niels Borregaard, Jack B. Cowland Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* May 1997, 89 (10) 3503-3521
23. Eduardo Vázquez Martul, y J Veiga Barreiro. Patología del trasplante renal, Importancia de la biopsia en la correlación Clínico-patológica. *Rev Esp Patol* 2002; (35), 3: 279-294.
24. A. Bernard Collins, Eveline E. Schneeberger, Manuel A. Pascual. Complement Activation in Acute Humoral Renal Allograft Rejection Diagnostic Significance of C4d Deposits in Peritubular Capillaries. *JASN*. October 1, 1999; 10 (10) 2208-2214
25. Shamila Mauyyedi, Marta Crespo, A. Bernard Collins. Acute Humoral Rejection in Kidney Transplantation: II. Morphology, Immunopathology, and Pathologic Classification. *JAmSocNephrol* 2002; 13: 779–787.
26. Koo, Dicken D. H; Roberts, Ian S. D; Quiroga, Isabel. C4d Deposition in Early Renal Allograft Protocol Biopsies. *Transplantation*: August 2004 ; 78 (3) : 398-403
27. Georg A. Böhmig, Markus Exner, Antje Habicht. Capillary C4d Deposition in Kidney Allografts: A Specific Marker of Alloantibody-Dependent Graft Injury. *JASN* April, 2002;13 (4): 1091-1099.

28. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Banff09 Meeting Report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010;10: 464-71.
29. Kormendi, Ferenc; Amend, William J. C. Jr. The Importance of Eosinophil Cells in Kidney Allograft Rejection. *Transplantation* 1988; 45(3).
30. Meleg-Smith, Suzanne Gauthier, Philippe M. Abundance of interstitial Eosinophils in Renal Allografts Is Associated with Vascular Rejection *Transplantation*, 2005; 79(4); 440.
31. Weir MR, Hall-Craggs M, Shen S-Y, et al. The prognostic value of the eosinophil in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1986 ; 41(6) : 709
32. Ten RM, Gleich GJ, Holley KE, Perkins JD, Torres VE . Eosinophil granule major basic protein in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1989, 47(6):959