



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

**CARACTERIZACION DE LINFOCITOS T ICOS+ EN SANGRE PERIFERICA DE
PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRONICA DEL INJERTO RENAL**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA:

MARCO ANTONIO CARMONA ESCAMILLA

TUTOR

DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA POSGRADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA
DR. PEDRO SAN CRISTOBAL ZEPEDA

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO "EDUARDO LICEAGA" FACULTAD DE
MEDICINA UNAM

CIUDAD DE MEXICO, MARZO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco nuevamente a la Universidad Nacional Autónoma de México por esta gran oportunidad de realizar mis estudios de posgrado dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas y de la Salud de la Facultad de Medicina. Esta oportunidad no es mas que la continuidad al enorme compromiso con la nuestra Universidad, no es mas que una deuda perpetua con nuestra sociedad y con nuestro país. Agradezco profundamente a todas las personas con las que he tenido la fortuna conocer, convivir y aprender durante mi maestría, Agradezco muy especialmente a la Dra. Queipo y al Dr. Lascurain, ambos para mi la mejor experiencia de este proyecto. Agradezco profundamente a toda mi familia por sacrificar parte de ella para este proyecto

ÍNDICE

I.	Introducción	6
II.	Justificación.....	19
III.	Planteamiento del problema.....	19
IV.	Hipótesis.....	20
V.	Objetivos.....	20
VI.	Sujetos y método	21
	VI.I Tipo de estudio.....	21
	VI.II Universo de Estudio.....	21
	VI.III Cálculo del tamaño de muestra.....	21
	VI.IV Criterios de Inclusión.....	21
	VI.V Citometría de flujo.....	21
	VI.VI Aspectos éticos.....	24
	VI.VII Análisis estadístico.....	27
VII.	Resultados.....	28
	VII.I Titulación de anticuerpos.....	28
	VI.II Determinación de Linfocitos T reguladores.....	32
	VI.II Determinacionde Linfocitos sistema co inducible (ICOS).....	36
VIII.	Discusión.....	40
IX.	Bibliografía.....	45

ABREVIATURAS

Aloficocianina	APC (del inglés <i>Allophycocyanin</i>)
Anticuerpos	Abs (del inglés <i>antibodies</i>)
Célula presentadora de antígeno	CPA
Células mononucleares mononucleadas	CMN
Cianina 7	Cy7 (del inglés <i>cyanine 7</i>)
Grupo de diferenciación	CD (del inglés <i>cluster differentiation</i>)
Co-estimulador inducible	ICOS (del inglés <i>inducible costimulator</i>)
Enfermedad crónica del riñón	CKD (del inglés <i>chronic kidney disease</i>)
Diabetes mellitus	DM
Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	ENSANUT
Enfermedad crónica del injerto	CAN (del inglés <i>chronic allograft nephropathy</i>)
Enfermedad renal crónica	ERC
Forkhead box P3	Foxp3
Glomerulonefritis	GMN
Glomerulopatía del trasplante	GPT
Hemodiálisis	HD
Hipertensión arterial sistémica	HAS (del inglés <i>hypertension arterial systemic</i>)
intensidad media de fluorescencia	IME MFI (del inglés <i>mean fluorescence intensity</i>)

Molécula 1 de adhesión intracelular	ICAM-1 (del inglés <i>intracellular adhesion molecule 1</i>)
Isotiocianato de fluoresceína	FITC (del inglés <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
Resultado global de mejoramiento de la enfermedad renal	KDIGO (del inglés <i>Kidney Disease: Improving global outcomes</i>)
Nefropatía crónica del injerto	CNI (del inglés <i>chronic nephropathy interstitial</i>)
Receptor de célula T	TCR (del inglés <i>T cell receptor</i>)
Trasplante renal	TR
Sistema de Información renal de los Estados Unidos	USRDS (del inglés <i>United States Renal Data System</i>)

FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 Estadística del centro nacional de trasplantes.....	10
Figura 2. Histopatología de rechazo crónico por anticuerpos.....	11
Figura 3. Causas de pérdida del injerto.....	12
Figura 4. Vías de estimulación y co-estimulación.....	15
Figura 5. Receptor de ICOS célula T.....	16
Figura 6. Titulación de anticuerpos.....	31
Figura 7. Estrategia de análisis para el linfocitTregulador.....	33
Figura 8. Contraste de grupos de estudio para T reguladoras	34
Figura 9. Estrategia de análisis para ICOS.....	37
Figura 10. Contraste de grupos de estudio ICOS.....	38
Figura 11. Contraste de grupos de IMF para ICOS.....	38
Figura 12. Estadística no paramétrica para MFI de ICOS.....	39
Tabla 1. Características demográficas en el trasplante renal.....	13
Tabla 2. Características demográficas de nefropatía crónica del injerto (CAN) y glomerulopatía del trasplante	18
Tabla 3. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio.....	26
Tabla 4. Datos demográficos de pacientes incluidos en el estudio	28
Tabla 5. Concentraciones de anticuerpos utilizados.....	30

I. INTRODUCCION

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como una anomalía estructural o funcional que permanece por más de tres meses en un paciente. El riñón tiene funciones como lo son endocrinas, metabólicas y excretoras. Se ha establecido un límite de tres meses para definir y establecer la presencia de ERC, este lapso de tiempo obedece a dejar de lado aquellas causas de daño renal que son potencialmente reversibles como lo son procesos infecciosos, alteraciones hemodinámicas o glomerulonefritis. La parte funcional excretora del riñón es la que nos permite categorizar el daño renal mediante la estimación del filtrado glomerular. Se acepta ampliamente clasificar a una paciente con ERC cuando presenta filtrado glomerular $< 60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ por más de tres meses (Of & Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, 2013). La ERC es una enfermedad que puede ser atendida en sus estadios iniciales por médicos internistas. Sin embargo, en estadios avanzados, es importante que sean valorados por médicos especialistas en este caso nefrólogos, ya que existen factores como lo son hipertensión, albuminuria y demás comorbilidades que determinan la progresión del daño renal crónico a necesidad de tratamiento sustitutivo. El manejo de estos factores de progresión de enfermedad renal son los que definen tanto el éxito al tratamiento como el mantener libre de terapia sustitutiva al paciente portador con ERC (Levey *et al.*, 2012).

La prevalencia de factores de riesgo para ERC en México ha sido identificada mediante la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), la cual es un estudio epidemiológico encaminado a explorar tanto la obesidad como el sobrepeso

en la población. Los resultados de este estudio epidemiológico mostraron que en México, el 9.2% de los adultos son portadores de Diabetes Mellitus (DM), mostrando un aumento en relación al año 2000 donde la proporción era del 5.8%. Otro resultado que llama la atención es que tanto hombres como mujeres tienen una alta proporción de hipertensión arterial sistémica (HAS, del inglés *hypertension arterial systemic*), 33.3 y 30.8% de la población general, respectivamente (Barquera, Campos-Nonato, Hernández-Barrera, Pedroza-Tobías, & Rivera-Dommarco, 2013). La prevalencia de ERC en México es desconocida, sin embargo, se han realizado esfuerzos destacables en materia epidemiológica que han mostrado datos muy importantes en poblaciones específicas. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por el Dr. Obrador (Obrador *et al.*, 2010) donde se compara la prevalencia de ERC en poblaciones de alto riesgo, como lo son DM2 e HAS. El estudio mostró una prevalencia de ERC del 22% en la ciudad de México y del 33% en Jalisco. Es importante hacer énfasis en que entre las poblaciones de estudio había 38 y 35% de pacientes con DM2 así como 31 y 38 % de pacientes con HTA.

Los datos epidemiológicos en América Latina, destacan que México está solo por debajo de Puerto Rico en la tasa de incidencia de ERC avanzada. En cuanto a la población que requiere tratamiento sustitutivo como lo es hemodiálisis o diálisis peritoneal, México tiene una tasa de 420.9 casos por millón habitantes de los cuales el 58 % son diabéticos (Maria Cusumano *et al.*, 2016). En México, la prevalencia de ERC en la población general es de 8 al 11% según datos de la Fundación Mexicana del Riñón. Es importante mencionar que tanto México como Taiwán y EUA son los países donde se reporta la más alta prevalencia de ERC a nivel internacional. En México, actualmente la tasa es de 421 casos por millones de habitantes y en 10

años, la prevalencia aumentó 122% según el reporte de *United States Renal Data System* (USRDS, 2016).

Con esta información parcial sobre el panorama real de datos epidemiológicos sobre la ERC en México, la prevalencia estimada, así como la prevalencia en grupos de alto riesgo como lo son DM y HAS nos obliga a implementar políticas públicas sobre prevención de factores de riesgo y diagnóstico temprano para ERC así como optimizar los parámetros en cuanto al manejo de pacientes con ERC en terapia sustitutiva.

Una vez que el paciente ha sido diagnosticado con ERC avanzada y requiere alguna de las terapias sustitutivas, el trasplante renal (TR) es la modalidad de terapia sustitutiva más efectiva, en relación a calidad de vida y sobrevida (Wolfe *et al.*, 1999).

Los pacientes con ERC que llegan al TR requerirán terapia inmunosupresora de forma definitiva, desde antes que reciban el trasplante propiamente hasta que por alguna razón el injerto renal o riñón trasplantado deje de funcionar. El esquema inmunosupresor estándar usado en los pacientes que son trasplantados comprende tres fases. La primera fase corresponde al tratamiento de inducción, este se refiere al manejo inmunosupresor que el paciente recibe justo antes de recibir el órgano a trasplantar, este tratamiento tiene como función bloquear parcialmente las vías de co-estimulación favoreciendo así la tolerancia inmunológica. La segunda fase corresponde al tratamiento de mantenimiento a base de un triple esquema en el que la mayoría de los casos está conformado por esteroide a dosis bajas, un inhibidor de calcineurina y un medicamento anti-proliferativo, mismo que puede ser azatioprina o mofetil micofenolato. La tercera fase se podría considerar al escenario

donde se presenta el rechazo agudo y es necesario aumentar dosis de inmunosupresión, agregar inmunosupresores de origen biológico o agregar como timoglobulina (Johnson, Feehally, & Floege, n.d.). Con el aumento en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos del trasplante renal y una mayor disponibilidad de inmunosupresores, se puede asegurar que el rechazo agudo ha sido prácticamente reducido a menos de 10% en la mayoría de los centros de Trasplantes (Chapman JR., 2010).

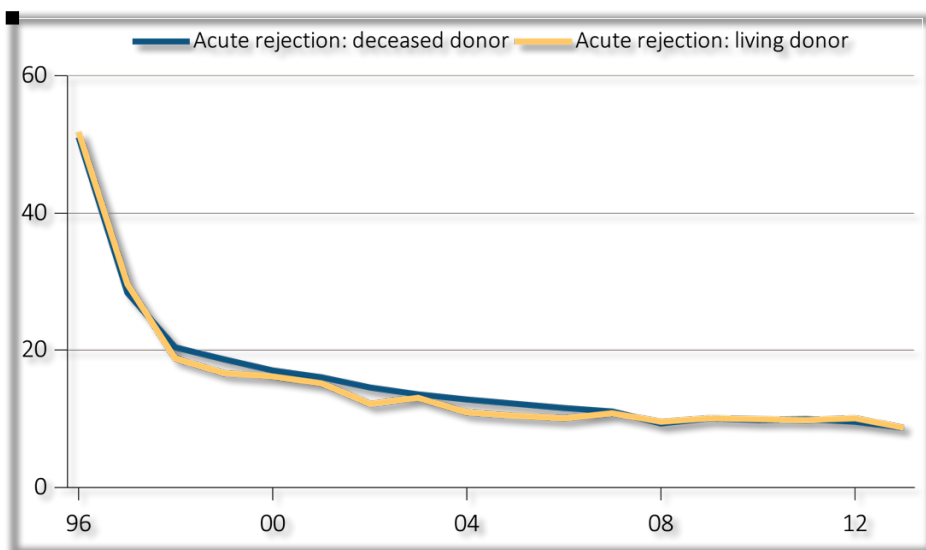


Figura 1. Tomada del Centro Nacional de Trasplantes. Evolución de la probabilidad de rechazo durante en el primer año a lo largo del tiempo, desde 1996 hasta el 2012.

Desde hace varias décadas se ha descrito el rechazo crónico, clasificado inicialmente como Nefropatía Crónica del Injerto (CNI, del inglés, *chronic nephropathy interstitial*) y posteriormente como Enfermedad Renal Crónica del Injerto (CAN, del inglés, *chronic allograft nephropathy*). Actualmente se ha caracterizado histopatológicamente como glomerulopatía del trasplante (Chapman, 2005) (Fig.2).

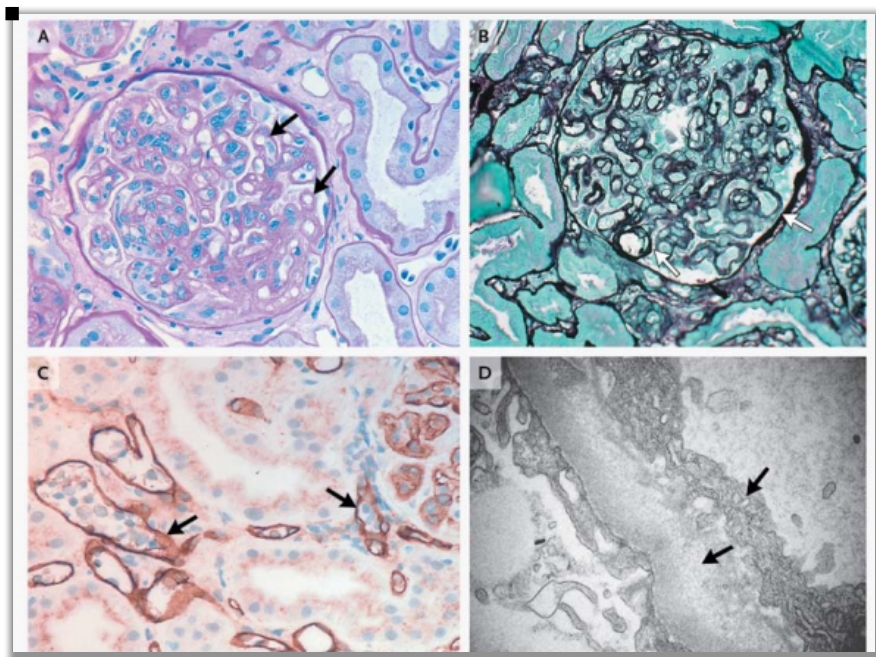


Figura 2. Rechazo crónico mediado por anticuerpos. A) engrosamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares. B) Tinción de plata, dobles contornos en las membranas basales. C) se depositó de C4d en la pared de los capilares peritubulares.

La enfermedad renal crónica del injerto, es una entidad clínica caracterizada por elevación sostenida de la creatinina, hipertensión y proteinuria (Nankivell & Kuypers, 2011). La CAN es la causa más común de pérdida de injerto renal después del primer año del TR y después de la muerte con injerto funcional (Chapman, 2005)(figura 3). La pérdida del injerto renal está asociada principalmente a eventos

de rechazo, de los cuales en muchos casos son eventos subclínicos o con manifestaciones clínicas sutiles como lo muestra el estudio Sellarés et al (Tabla 1) Esta entidad tiene varios factores para su aparición, siendo el aspecto inmunológico el más importante y el más desconocido (Fig 3).

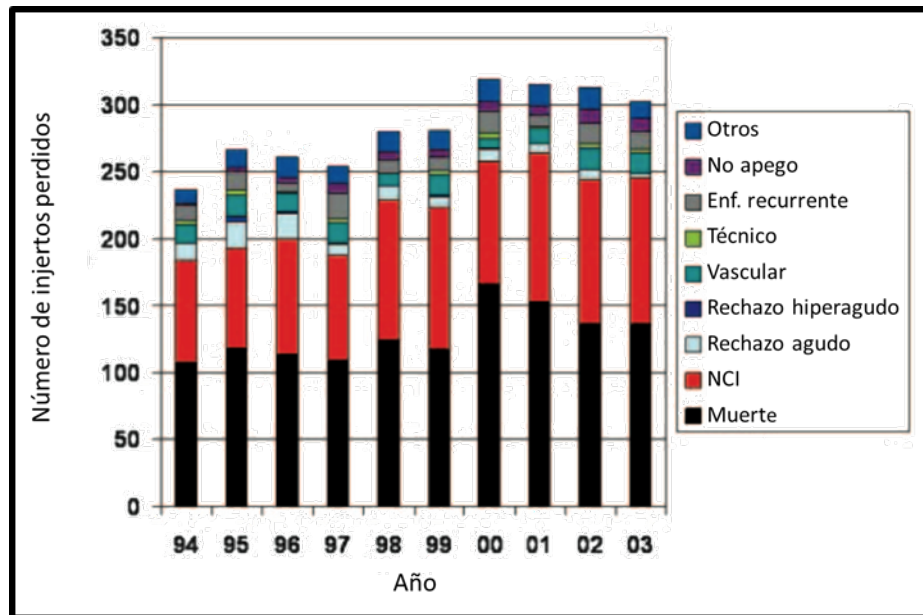


Figura 3. Causas de pérdida de injerto renal en Australia entre 1994 y 2003. La causa más importante de pérdida de injerto (negro), es la muerte con injerto funcional y en segundo lugar la nefropatía crónica del injerto renal.

Número (%) de biopsias por indicación clínica por cada diagnóstico					
Diagnóstico histológico	0-6 semanas	6 semanas - 6 meses	6-12 meses	>12 meses	Total
Rechazo mediado por anticuerpos	4 (5%)	1 (2%)	1 (2%)	67 (29%)	73 (18%)
Probable ABMR	1 (1%)	0	1 (2%)	12 (5%)	14 (4%)
Rechazo mixto	0	1 (2%)	1 (2%)	23 (10%)	25 (6%)
Rechazo mediado por células T	7 (9%)	15 (24%)	5 (12%)	9 (4%)	36 (9%)
Limítrofe	11 (14%)	9 (14%)	9 (22%)	10 (4%)	39 (9%)
Nefropatía por virus de polioma	0	3 (5%)	7 (17%)	2 (1%)	12 (3%)
Enfermedad glomerular	1 (1%)	2 (3%)	3 (8%)	37 (16%)	43 (10%)
Anormalidades menores	49 (62%)	24 (39%)	9 (22%)	37 (16%)	119 (29%)
Fibrosis atrófica	0	3 (5%)	3 (8%)	25 (11%)	31 (8%)
Otros	6a (8%)	4b (6%)	2c (5%)	8d (4%)	20 (5%)
Total	79 (100%)	62 (100%)	41 (100%)	230 (100%)	412 (100%)
	Número de pacientes				Total
No adherencia	0	1	0	25	26
Adherencia o desconocido	59	39	30	161	289

Tabla 1. Características demográficas en el trasplante renal

Datos en modelos experimentales y de análisis de tejido humano, indican que elementos del sistema inmunológico participan activamente en la CAN. Se han realizado diversos estudios inmunológicos en CAN, por ejemplo en la respuesta inmunitaria mediada por células, por aloanticuerpos dirigidos contra el donador, citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y factores mitogénicos como la endotelina 1 (Andersen, 1997; Schwartz, Nankivell, & Alexander, 2010). Sin

embargo, la respuesta inmunitaria celular de rechazo de injerto depende de la actividad de los linfocitos T CD4⁺ efectores que son inhibidos con los fármacos inmunosupresores en el tratamiento pos trasplante. Cabe mencionar que para la activación del linfocito T CD4⁺ se necesitan dos señales; la primera está dada por el receptor del linfocito T (TCR, del inglés, *T cell receptor*) que reconoce de manera específica al antígeno presentado por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II, del inglés class II major histocompatibility complex) en la célula presentadora de antígeno (CPA) (Abul K., Lichtman, Andrew, & Pillai, 2014). La segunda señal se genera mediante la interacción de moléculas co-estimuladoras tanto en el linfocito T como en la CPA. Entre las moléculas de co-estimulación más estudiadas se encuentran CD28 con CD80 y CD86, CD40 con CD40L, CD27 con CD70 e ICOS con ICOS-L (Ford, Adams, & Pearson, 2013). Con respecto al CD28 se han identificado moléculas que se han agrupado como miembros de la familia CD28. Entre estos está CTLA-4, PD1 y el co-estimulador Inducible (ICOS) o CD278 cuyo ligando es ICOS-L o CD275. Para que se exprese ICOS en la membrana del linfocito T CD4⁺ se requiere 48 a 72 horas de activación mediada por el reconocimiento del complejo antígeno-MHC-II y la co-estimulación generada por el CD28 L (Ford, Adams, & Pearson, 2013). Mientras que ICOSL se expresa de manera constitutiva principalmente en células dendríticas, linfocitos B y en células epiteliales bajo condiciones de inflamación (Kadkhoda et al., 2011) (Fig.4).

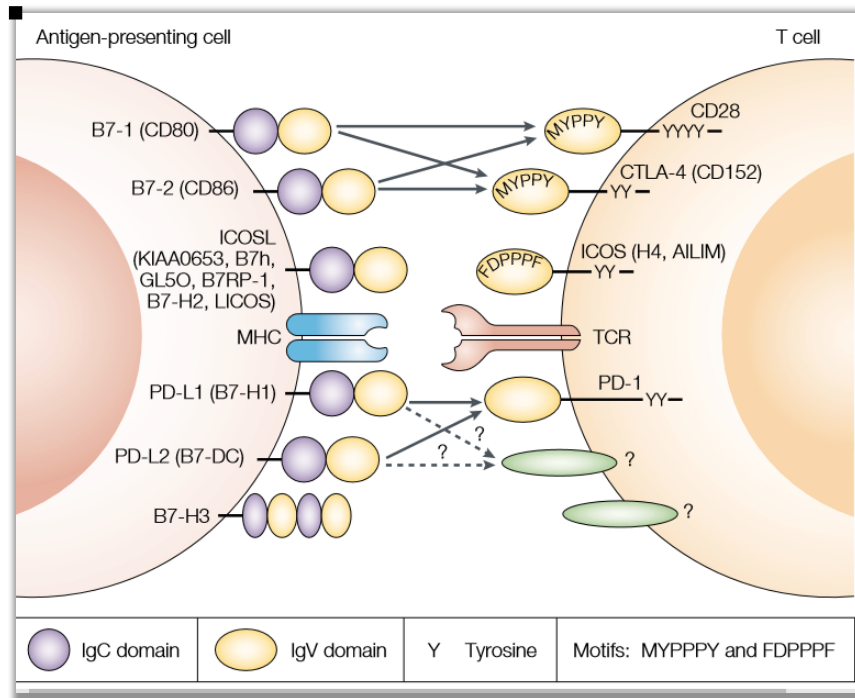


Figura 4. Principales vías de estimulación, coestimulación y coinhibición. Las estructuras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD-86) en las células dendríticas comparten sus receptores el linfocito T CD4⁺ con CD28 y CTLA-4. Este entrecruzamiento de receptores inicia la activación y expansión clonal, por otra parte el estímulo del linfocito T mediante CTLA-4 tiene un efecto inmunosupresor o inmunomodulador a la baja. La otra vía de interrelación entre la CPA y el linfocito T es ICOS, esta coestimulación inducida la cual tiene una función en el desarrollo y activación del linfocito T folicular. (Sharpe & Freeman, 2002)

La función de ICOS/ICOSL en el riñón ha sido descrita por distintos grupos de investigación. Se ha utilizado un modelo murino de glomerulonefritis (GMN) en el cual bloquearon la interacción de ICOS con ICOSL y observaron que en etapas tempranas de la enfermedad hay un incremento en el infiltrado glomerular de linfocitos T CD4⁺ y macrófagos, aumento en la proliferación celular así como la expresión de moléculas de adhesión celular como P-selectina e ICAM-1 (del

inglés, *Intercellular Adhesion Molecule-1* dentro del glomérulo (Odobasic, 2006) (Fig.5).

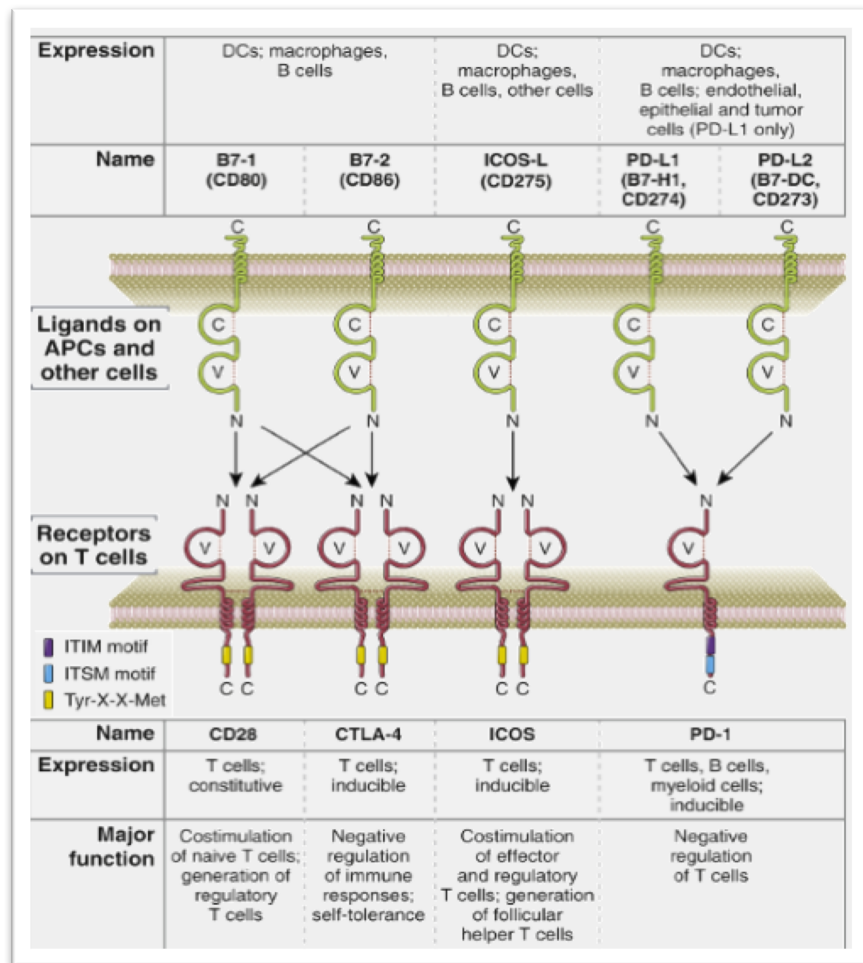


Figura 5. El receptor de ICOS en el linfocito T. Este receptor inducible tiene como una de las principales funciones, co-estimulación del linfocito T así como generación de linfocitos T cooperadores foliculares. Su ligando (ICOS-L) en las CPA es altamente específico y no se comparte con otros receptores con ICOS-L de (Abul K. *et al.*, 2014)

En otro estudio, se utilizó un modelo murino de GMN, demostró que ICOSL tiene un probable papel protector en la fase temprana de este modelo (día 4) de GMN mediante la producción de IL-10 estudiada mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, esta expresión de ICOSL en una fase tardía (día 10) está disminuida lo que da lugar a una mayor presentación de antígenos por parte de las CPA renales. Todavía es desconocido esta ambivalencia en el comportamiento de las células APC en el riñón, tanto protectoras en fases tempranas como pro-inflamatorias en fases tardías (Hochheiser *et al.*, 2011).

En otro estudio se evaluó la expresión de ICOS e ICOSL en biopsias de trasplante renal en humanos, encontraron que los pacientes con CAN y glomerulopatía del trasplante (GPT) expresaban ICOS intraglomerular. Lo que sugiere la importancia de ICOS en el desarrollo de la CAN así como de la GPT (Akalin, Dikman, Murphy, Bromberg, & Hancock, 2003) (Tabla 1).

Características clinicopatológicas de pacientes con CAN con o sin TGP		
Parámetro	CAN+ TGP- (n=11)	CAN+ TGP+ (n=5)
Genero del receptor, hombre	6 (55%)	3 (60%)
Edad del receptor, media (rango)	47 (24-63)	44 (23-57)
Tipo de trasplante, media (rango)	6 (55%)	3 (60%)
Tiempo de biopsia, media (rango)	26 (9-210)	44 (23-57)
Nivel de creatinina sérica (mg/dL)	2.9 ± 0.3	2.4 ± 0.6
Rango nefrótico de proteinuria	0 (0%)	5 (100%)
Pretrasplante PRA>20	4 (36%)	2 (40%)
Episodio previo de rechazo agudo	2 (18%)	6 (60%)
Falla del injerto después del diagnóstico	6 (55%)	2 (40%)
Tiempo de falla del injerto, media (rango)	7 (1-20)	10 (1-20)
<i>CAN Puntuación (Banff), media ± SEM:</i>		
Glomerulopatía aloinjerto (cg)	0.36 ± 0.28	2.67 ± 0.21
Fibrosis intersticial (ci)	2.00 ± 0.27	1.50 ± 0.50
Atrofia tubular (ct)	1.18 ± 0.30	1.33 ± 0.42
Engrosamiento fibroso vascular (cv)	0.91 ± 0.32	0.83 ± 0.31
Peritubular C4d+	7 (64%)	4 (80%)
Glomerular C3d+	1 (9%)	1 (20%)

Patología	Número	ICOS	CXCR3	Mig	IP-10	CCR2	MCP-1
CAN+ TGP+	6	6/6	6/6	6/6	4/6	0/5'	0/6
		100%	100%	100%	67%	0%	0%
CAN+ TGP-	11	0/9	0/7	0/9	0/9	0/11	0/11
		0%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabla 2. Características demográficas de ambos grupos de estudio nefropatía crónica del injerto (CAN) y glomerulopatía del trasplante (TGP). En el recuadro inferior se observa que en 100% del grupo de pacientes con CAN+TGP+ fue positivo para ICOS en la biopsia renal mediante inmunoperoxidasa. En el grupo CAN+TGP+ se hace evidente la relación temporal de ICOS con la activación celular en el mismo escenario tisular (Akalin, Dikman, Murphy, Bromberg, & Hancock, 2003)

La co-estimulación de ICOS-ICOSL ha sido recientemente propuesta como posible terapéutica coadyuvante en el trasplante renal usando también Belatacept, un

inmunosupresor que bloquea la activación de linfocito T mediante el bloqueo del CD28. En este estudio se utilizó un modelo de primates con TR, en el cual se integraron dos grupos, uno con Belatacept más un anticuerpo que bloquea la unión de ICOS/ICOS-L (ICOS-Ig), mientras que el otro grupo recibió solamente ICOS-Ig. En este modelo ICOS-Ig logró prolongar la sobrevida libre de rechazo renal tanto en monoterapia como en combinación con Belatacept (Lo *et al.*, 2015).

II. JUSTIFICACION

Establecer la participación de las vías de co-estimulación en la activación de las células T mediante el estudio de ICOS, brinda la oportunidad de entender la interacción de las células presentadoras de antígenos con las células T efectoras. Con base en los estudios experimentales previamente descritos, de la caracterización de la vía de co-estimulación de ICOS, este trabajo podría aportar datos en la inmunología del trasplante para conocer patrones de comportamiento de las poblaciones celulares ICOS+. Estos resultados podrían dar pauta para establecer nuevas líneas de investigación con el objetivo de desarrollar herramientas pronósticas e identificar aquellos pacientes con rechazo crónico, e incluso para proponer nuevos tratamientos de esta entidad clínica.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Nefropatía Crónica del Injerto es la principal causa de pérdida del injerto renal después de la muerte con injerto funcional. El estudio de los aspectos inmunológicos del trasplante renal podría mejorar la sobrevida del injerto, un ejemplo es el rechazo crónico en el que hay muchos aspectos aun por describir, de tal manera que es

urgente que se genere el conocimiento para poder incidir positivamente en la sobrevida del injerto renal a largo plazo. En este momento no se cuenta con el tratamiento selectivo y específico para el rechazo crónico o Nefropatía Crónica del Injerto, de tal manera que los clínicos no han logrado disminuir la pérdida de injertos renales secundaria a la evolución natural del rechazo crónico.

IV. HIPOTESIS

SI los pacientes con trasplante renal y nefropatía crónica de injerto por rechazo, tienen sobre expresadas las vías de co-estimulación en la inmunidad celular, **ENTONCES** encontraremos un incremento estadísticamente significativo de linfocitos T CD4+ ICOS+ en la sangre periférica de pacientes con nefropatía crónica del injerto por rechazo con respecto a los pacientes trasplantados control.

V. OBJETIVOS

*** Primario**

Identificar mediante citometría de flujo las vías de co- estimulación TCD4+ ICOS+ en pacientes con CAN.

***Secundarios**

- Estandarizar la técnica de citometría de flujo los linfocitos de pacientes con nefropatía crónica en hemodiálisis y en pacientes con trasplante renal
- Caracterizar en sangre periférica la población de Linfocitos T reguladores CD4+, CD3+, CD25+

- Estudiar la participación de FOXP3 en la actividad T reguladora de los linfocitos de los pacientes incluidos
- Determinar la intensidad media de fluorescencia para la expresión de ICOS en la célula T CD4+
- Proponer si los resultados obtenidos podrían ser útiles en el seguimiento de los pacientes con trasplante renal

VI. SUJETOS Y MÉTODOS

VI.I Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional, transversal y descriptivo.

VI.II Universo de estudio

Pacientes receptores de trasplante renal del H.G.M. que fueron sometidos a trasplante renal a partir del 2010 hasta el momento del estudio.

VI.III Cálculo del tamaño de Muestra

El número de sujetos que se incluyeron en el estudio se obtuvo mediante el programa G*Power (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany). El cálculo para el tamaño de la muestra se obtuvo de la referencia del artículo de Chen *et al.*, con un error alfa de 0.5 y un poder del 95%. El resultado fue un total de 9 sujetos por grupo. Se incluyeron un total de 42 muestras divididas en 3 grupos distribuidos de la siguiente manera: 13 sujetos sanos sin patología infecciosa o inflamatoria

aparente, 12 pacientes con nefropatía crónica en hemodiálisis estadio G5 (CKD G5) y 12 pacientes con trasplante renal.

VI.IV Criterios de inclusión

- Grupo con Trasplante renal (TR): Pacientes con TR de más de un año de evolución, con proteinuria > de 500 mg/día, con CrS > a 1.5 mg/dl sin variaciones en las últimas tres determinaciones y con niveles terapéuticos del inmunosupresor. Con diagnóstico de nefropatía crónica del injerto mediante biopsia.
- Grupo con Insuficiencia Renal crónica en hemodiálisis (HD): pacientes con insuficiencia renal que requieran tratamiento sustitutivo de la función renal mediante hemodiálisis sin tener proceso infeccioso concurrente.
- Grupo de pacientes sanos: pacientes sanos sin tener proceso infeccioso o inflamatorio concurrente.

e) Criterios de exclusión

Presencia de procesos infecciosos o enfermedades autoinmunes

f) Criterios de eliminación

No aplica

VI.V Citometría de flujo

Los pacientes trasplantados tenían en promedio un año de la cirugía y la muestra se tomó durante el procedimiento de rutina de toma de biopsia de seguimiento al año. Todos ellos con un esquema de inmunosupresión con dosis convencional de

Tacrolimus (2-6 mg/24 hr). Los sujetos incluidos en el estudio fueron de la Unidad de Trasplante del Hospital General de México.

El análisis de las subpoblaciones de células T reguladores, así como la vía de co estimulación de ICOS se analizaron mediante citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales utilizados se muestran en las tablas 2,3 y4.

Las células mononucleares (CMN) fueron aisladas a partir de sangre total heparinizada utilizando Ficoll-Hypaque™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Se realizó un gradiente de densidad a 500g durante 30 minutos a temperatura ambiente de acuerdo a la técnica reportada por Boyum A y colaboradores. (isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand J Immunol 1976, Suppl 5: 9-15). Después de la centrifugación, las células contenidas en la interface fueron recuperadas, lavadas en dos ocasiones con una solución de fosfatos (PBS1X, pH 7.2) y contadas en un hemocitómetro. La viabilidad celular se realizó con azul tripan. La expresión de los marcadores seleccionados para el estudio se realizó con inmunofluorescencia directa. Alícuotas de 2×10^5 células re suspendidas en PBS se lavaron y fijaron con formaldehído al 4% en PBS, se agitaron suavemente durante 10 minutos a 4°C. Los mononucleares fueron lavados nuevamente con PBS e incubados con agitación suave durante 5 minutos a 4°C en el buffer de permeabilización (BD Perm/Wash™; BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Posterior a esto las células fueron suspendidas en buffer de tinción celular (PBS con 0.2% de albumina bovina (BSA) y 0.2% de azida de sodio) e incubadas en la oscuridad durante 30 minutos utilizando los anticuerpos monoclonales marcados (tablas 1). Al finalizar esta incubación las células se lavaron en dos

ocasiones en el buffer de tinción celular y re suspendidas en buffer MACS, para ser analizadas en el citometro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Para el análisis de las células marcadas, se leyeron 30,000 eventos y las células linfoides fueron seleccionadas de acuerdo a sus propiedades físicas como son tamaño y complejidad interna. Una segunda selección se creó en función de las características de la inmunofluorescencia de las células aisladas, evaluando las poblaciones celulares mediante gráficas de cuadrantes en una escala logarítmica. Para el estudio de la tinción intracelular, las células fueron aisladas de acuerdo a si eran o no fluorescentes basándose en la distribución de la tinción con PE-, APC-Cy7-, PE-Cy5-, or Alexa Fluor 647

Las células muertas fueron excluidas al añadir al buffer MACS 7-amino-actinomycin D previo del análisis en el citómetro. Los valores obtenidos se muestran como gráficas bidimensionales de puntos, y analizados con el programa FlowJo 10.0.7 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

VI.VI Aspectos éticos

El proyecto fue aprobado por los comités de Ética e Investigación del Hospital General con número de aprobación DI/16/304-B/03/142 y en todos los casos se firmó carta de consentimiento informado.

Anticuerpo monoclonal	Marca	Clona	Reactividad	*Fluorocromo acoplado	Control de isotipo
CD3	BioLegend	HIT3a	Humano	APC-Cy7	Mouse IgG1,k
CD4	BioLegend	OKT4	Humano	PE	Mouse IgG1,k
CD25	BD Biosciences	6238758	Humano	PECy-5	Mouse IgG1,k
Foxp3	BD Biosciences	259D/C7	Humano	Alexa Fluor 647	Mouse IgG1,K
CD28	Ebioscience	CD 28.2	Humano	FITC	Mouse IgG1,K
CTLA-4	BD Biosciences	44810	Humano	PECy5	Mouse IgG1,K
ICOS	MACS Milteny Biotec	5160425212	Humano	VioBlue	Mouse IgG1,K

Tabla 3: Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio *APC= Aloficocianina, APC-Cy7= Aloficocianina y cianina 7, PE= Ficoeritrina, FITC= Isotiocianato de fluoresceína.

VI.VII Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue analizada con la prueba de Levene. Los valores se muestran como la media \pm la desviación estándar del porcentaje de células positivas, el valor de $P \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Para el análisis de los datos se utilizaron las pruebas de U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis utilizando la prueba pos hoc de Dunn. Todos los análisis fueron realizados con SPSS Statistics for Windows, Version 22 software (IBM, Armonk, NY, USA). Las gráficas fueron realizadas utilizando GraphPad PRISM 7.03 software (Fay Avenue, La Jolla, CA 92037 USA).

VII. RESULTADOS

Los datos demográficos de los se muestran en la tabla 5. El número de sujetos incluidos por grupo fue similar, el análisis de Levene mostro una distribución no normal. La edad de los pacientes fue mayor en el grupo de nefropatas crónicos en hemodiálisis comparada con los pacientes sanos y los trasplantados que tuvieron edades sin diferencias estadísticas. En todos los grupos los leucos totales fueron normales (valor de referencia 5-10,000 $10^3/\mu\text{l}$) y las diferencias observadas en la concentración de hemoglobina fueron consistentes con la enfermedad renal y estado renal en cada uno de los grupos. El grupo de sujetos sanos mostró valores normales de hemoglobina, mientras que en los pacientes en hemodiálisis se observó un promedio de 9.7 g/dL y en el de los pacientes trasplantados la

concentración fue limítrofe (13 g/dL), estos valores son los esperados para cada grupo.

	Controles sanos	Hemodiálisis	Trasplante de riñón
Número de sujetos	14	12	13
Edad	33 ± 5.1	55.3 ±23.3	30.1±2
Mujeres	6	8	7
Hombres	8	4	6
Donadores vivos/muertos			4/9
Patología renal			
Nefropatía diabética	NA	9	4
Enfermedad quística renal	NA	1	2
Hipertensión	NA	-	1
Hipoplasia	NA	-	1
Desconocido	NA	2	5
Hemoglobina g/dL	15.5±3	9.7±1.5	13±1.7
Leucocitos totales 10³/µl	8±2	5.2±1.7	7.1±1.5
Linfocitos %	23±3.2	25.8±4.9	21.4±10

Tabla 4: Datos demográficos

VIII.I Titulación de anticuerpos

La titulación de anticuerpos es un procedimiento diseñado para determinar las concentraciones de anticuerpos (Abs) apropiada para emplear en técnicas de citometría. Se ha descrito que la mejor concentración de Abs es aquella que permite discriminar mejor entre una célula positiva y una célula negativa, lo que hace importante determinar la intensidad de fluorescencia de la tinción y el ruido o uniones inespecíficas; para esto, se debe obtener la intensidad media lineal del

canal de fluorescencia para las células positivas y para las negativas o ruido. Para identificar la concentración óptima de anticuerpo se procedió a titular los anticuerpos utilizados en el presente proyecto como: CD3, CD4, CD25 y FOXP3 así como los anticuerpos de la vía de co-estimulación (ICOS) tabla 4. Se realizaron curvas de titulación con las siguientes concentraciones Las dosis estandarizadas más comunes de anticuerpos son: 0.5 μ l, 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, y 5 μ l. La tabla 6 muestra las concentraciones utilizadas y los valores reportados de cada concentración.

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

Tabla 5. Concentraciones de anticuerpos utilizadas para titulación

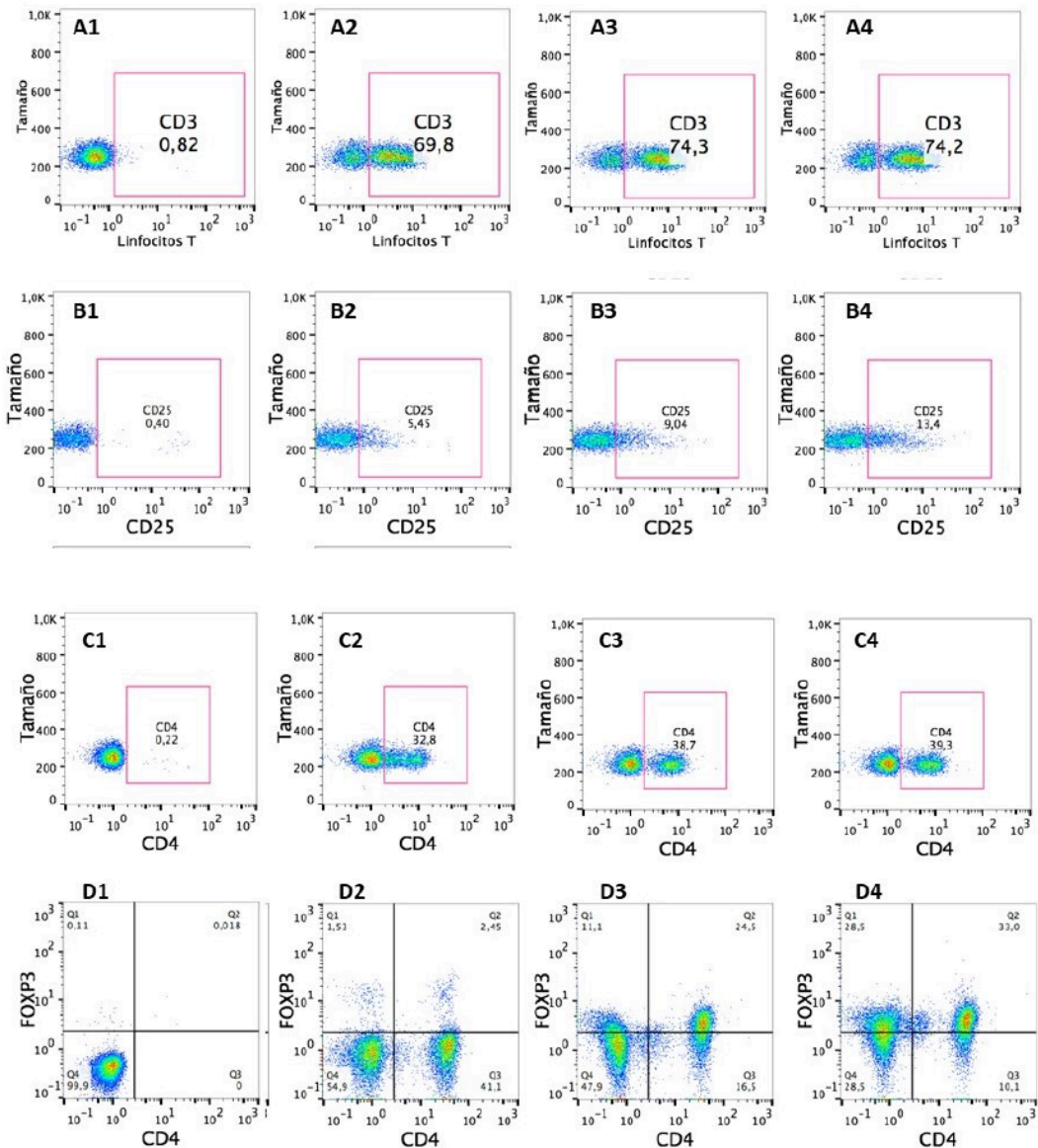


Figura 6. Titulación de anticuerpos CD3, CD25, CD4 y FOXP3. La figura muestra los resultados de citometría para cada una de las condiciones analizadas. Panel A, Células marcadas con anticuerpo anti-CD3. A1) Control negativo, A2) 0.5 µl, A3) 1.5µl, A4) 2 µl. Panel B, Células marcadas con anticuerpo anti-CD25. B1) Control negativo, B2) 0.5µl, B3) 1.5 µl, B4) 2 µl. Panel C, Células marcadas con anticuerpo anti-CD3. C1) Control negativo, C2) 0.5 µl, C3) 1.5 µl, C4) 2 µl. Panel D, Células marcadas con anticuerpo anti-FOXP3. D1) Control negativo, D2) 1 µl, D3) 1.5 µl, D4) 2µl.

Los resultados de la tabla 6 y figura 6, muestran los valores para el índice correspondiente a la titulación de anticuerpo que permite la mejor discriminación

entre poblaciones que expresan determinado antígeno y las poblaciones negativas para el mismo. Esto demuestra que la estandarización de la citometría es correcta, seleccionando de esta manera las concentraciones para CD3+ 1.5mcl, CD4+ 2 mcl, CD25+ y FoxP3+ 1 mcl. El mismo procedimiento se siguió para obtener la dosis óptimas de anticuerpos para el análisis de ICOS.

VIII.II Determinación de Linfocitos reguladores

Con el objetivo de caracterizar si existen cambios en la población de células T reg en nuestros grupos de estudio y definir si estas diferencias pueden ser utilizadas durante en el seguimiento clínico, se realizó citometría de flujo en los tres grupos de estudio. Los resultados de los *dot plots* de la citometría de flujo se observan en la figura 7.

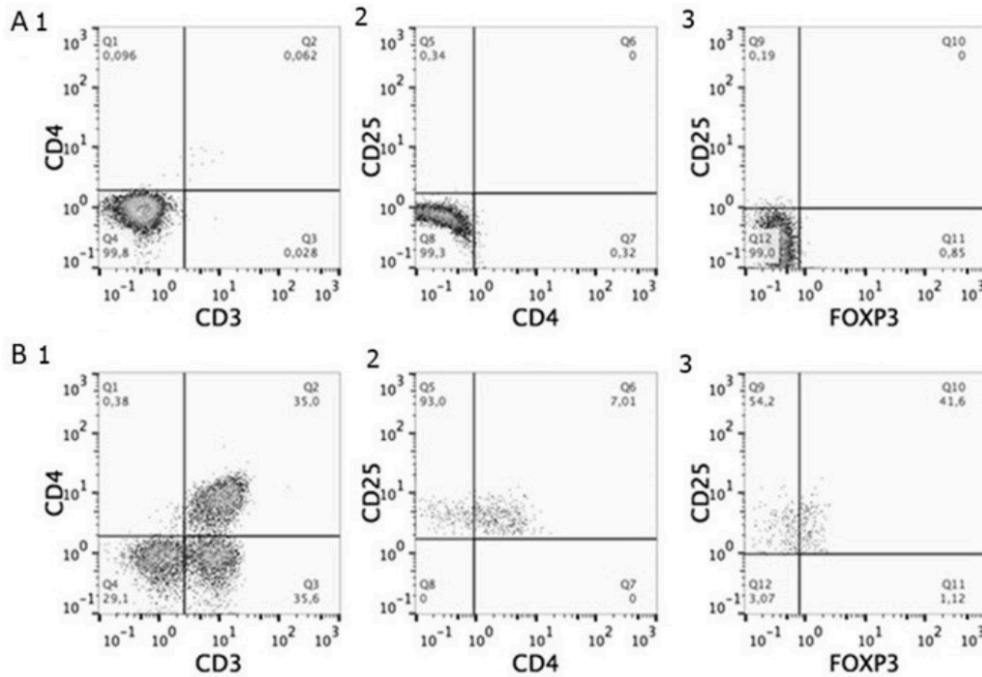


Figura 7: Gráfica de puntos del inmunofenotipo T regulador: A) 1-3 Gráfica de puntos, donde se muestran tres de los controles para CD4+, CD25+ y FOXP3+ respectivamente. B1 muestra el análisis para la identificación de las poblaciones de linfocitos dobles positivos para CD3+ y CD4+ B-3 FOXP3 se incluyó en conjunto con CD3+, CD4+ y CD25+. Estos resultados establecen el fenotipo T regulador

Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, las poblaciones CD3+, CD4+ no mostraron cambios significativos entre los tres grupos, indicando una proporción homogénea de células T colaboradoras. Con la finalidad de hacer más específico el estudio de Treg, se agregó el análisis de la población de mononucleares CD25 (cadena alfa del receptor de Interleucina 2). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos, sugiriendo que en los pacientes con nefropatía crónica y los de trasplante renal estas poblaciones celulares permanecen estables independientemente de la patología renal. Se evaluaron diferencias en la expresión del marcador FOXP3 en el fenotipo celular CD3+, CD4+,

CD25+, FOXP3+, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes.

La comparación entre los sujetos sanos y los pacientes en hemodiálisis mostraron en este último grupo mayor porcentaje de células T reg. El análisis para tres grupos mostró diferencias significativas en todos los grupos. La prueba pos hoc de Dunn fue significativa, indicando que la proporción de células Treg en los pacientes con trasplante renal es menor que en el resto de los grupos (Figura 8).

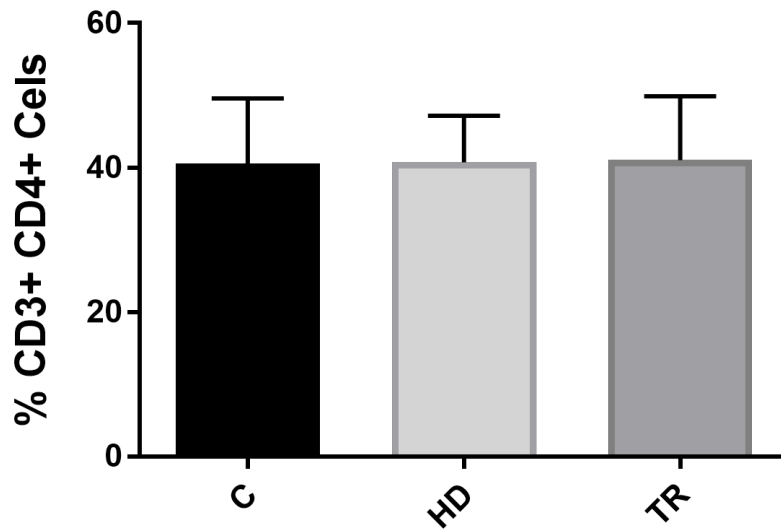
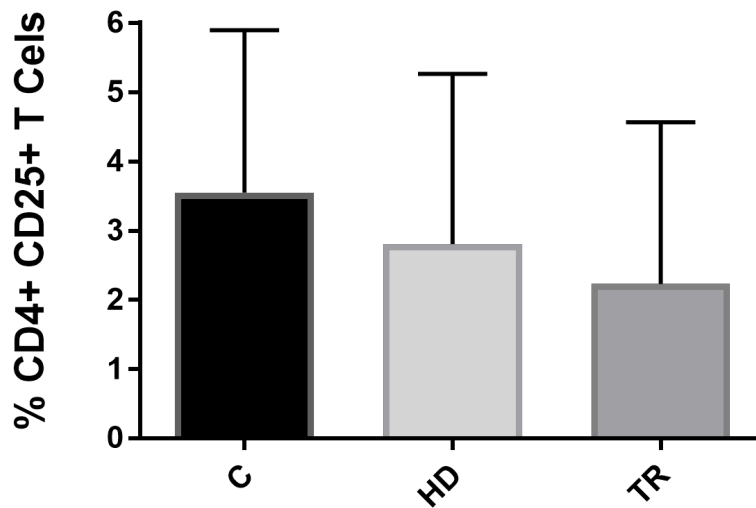
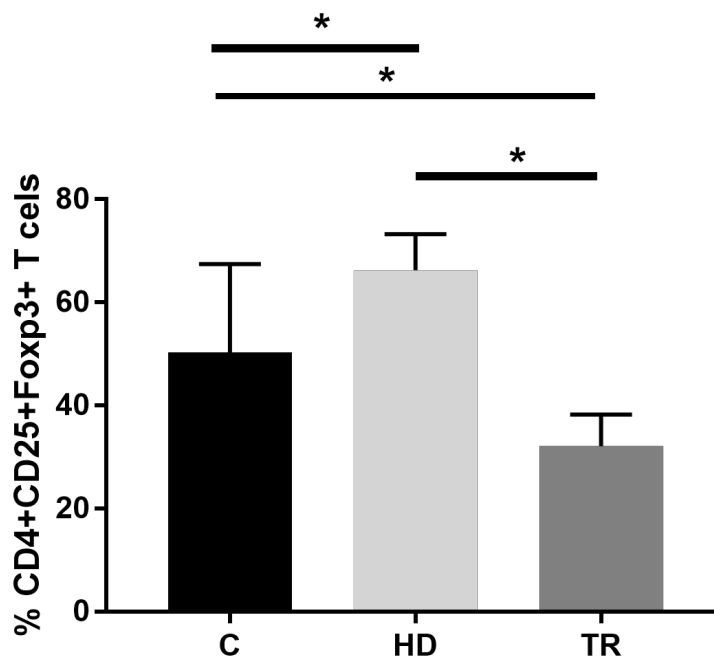


Figura 8. Graficas de los resultados de Treg comparando los tres grupos de estudio La gráfica muestra el contraste de los tres grupos caracterizando las poblaciones CD3+ y CD4+ C=controles, HD=hemodiálisis y TR=trasplante renal. Análisis Kruskal-Wallis test p =0.97.



La gráfica muestra el contraste de los tres grupos caracterizando las poblaciones CD3+, CD4+ y CD25+ HC=sanos, HD=hemodiálisis y KT=trasplante renal . Análisis Kruskal-Wallis test p =0.72.



La gráfica muestra el contraste de los tres grupos, HC=sanos, HD=hemodiálisis y KT=trasplante renal. Análisis $p < 0.0001$. El análisis *post-hoc* de Dunn demostró diferencias significativas entre los tres grupos.

VIII.III Determinación de linfocitos Co-estimulador inducible (ICOS)

Con la finalidad de conocer el comportamiento y participación de la vía de Co-estimulación inducible de la célula T CD4+. Se inmunotipificaron linfocitos T en sangre periférica de los grupos de estudio, utilizando los anticuerpos descritos en las tablas 1 y 3. El análisis cuantificó la proporción de células T CD4+ ICOS+ (Figura 9). Se observó en sujetos sanos las siguientes proporciones de CD4+ICOS+: sanos 3.3 ± 1.06 %, hemodiálisis 2.94 ± 1.45 % y TR 2.75 ± 1.0 %, en el análisis estadístico no se encontró diferencia significativas $p=0.47$ Figura 10.

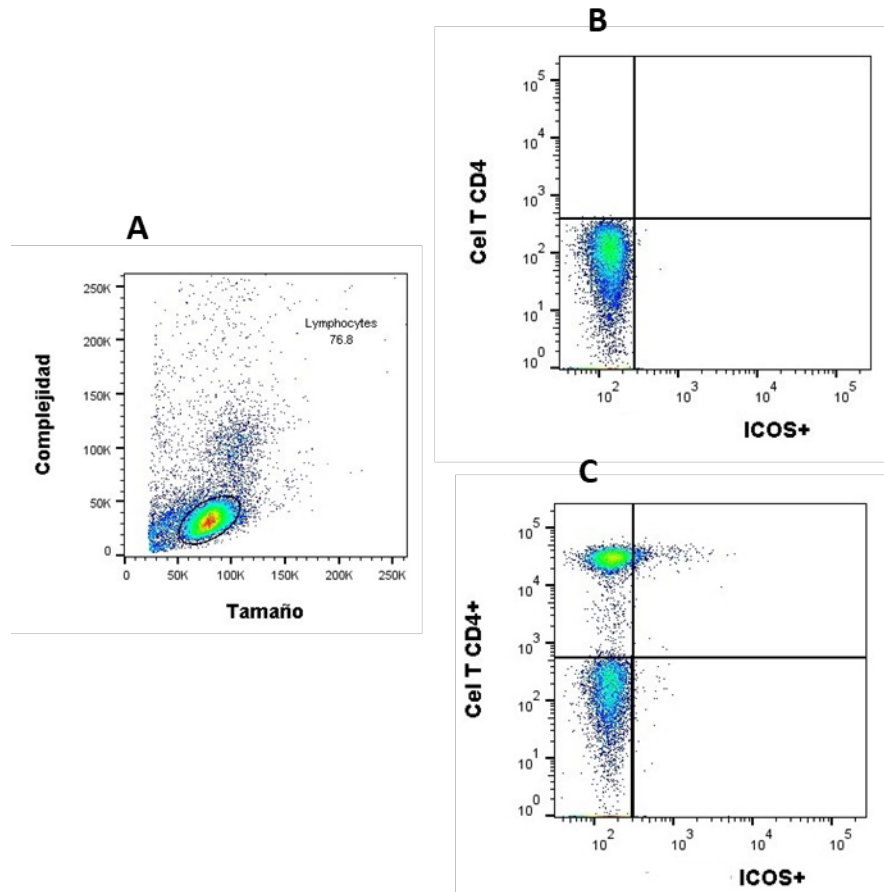


Figura 9. Gráfica de puntos de sistema ICOS A). Gráfica de puntos, donde se muestra la distribución de las células por tamaño y complejidad. B). Gráfica de control negativo para CD4+, ICOS+. C). En la gráfica se muestran tres poblaciones; la población en estudio (%ICOS) dobles positivas, ICOS+, CD4+, una población doble negativa y la población CD4+, ICOS-.

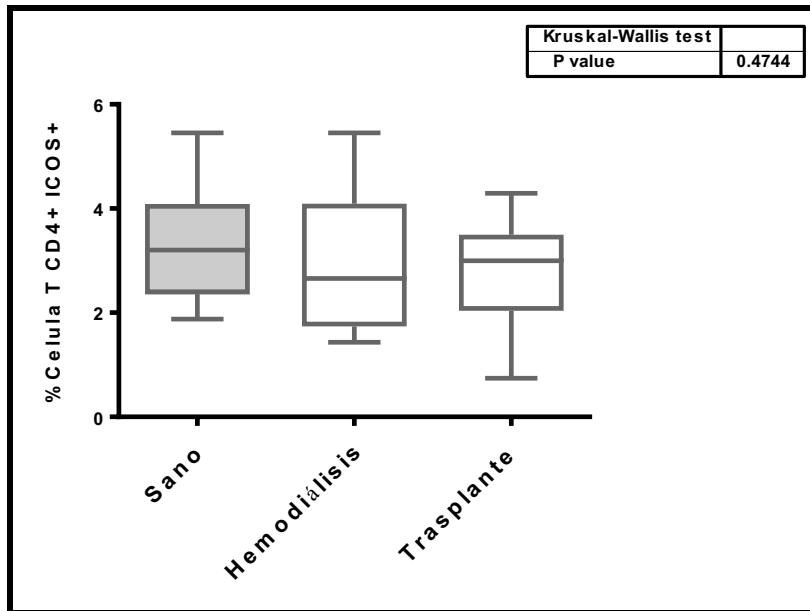


Figura 10. El análisis no paramétrico mediante el uso de la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas. Lo que indica que el estudio tal como está diseñado no tiene la capacidad de discriminar la participación de estos linfocitos en ninguno de los grupos.

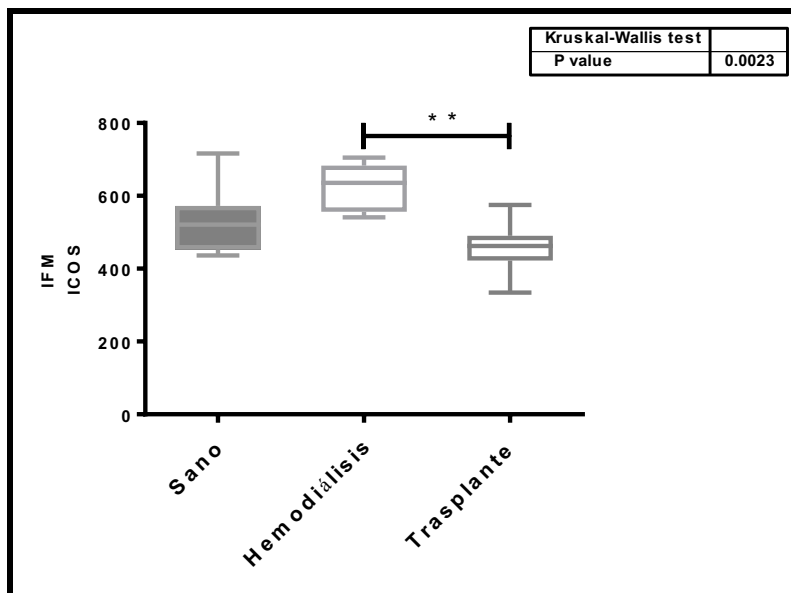


Figura 11. Contraste observado en la intensidad media de fluorescencia (IMF)

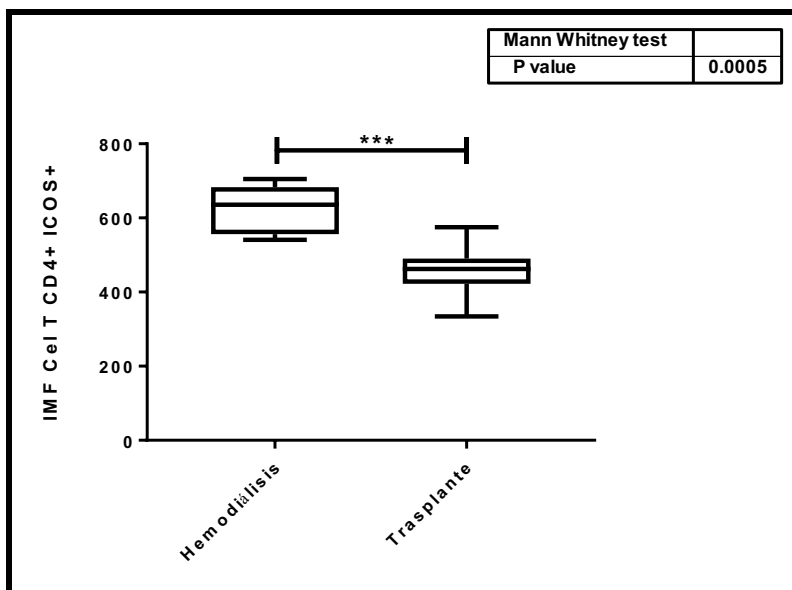


Figura 12. Se muestra estadística no paramétrica con la prueba de Mann Whitney, esta diferencia significativa fue congruente en el análisis de dos grupos ($p=0.0005$); lo que indica un proceso de inmuno reactividad diferente entre estos dos grupos.

Los resultados observaron en la intensidad media de fluorescencia (IMF) en las células T CD4+,ICOS+ en el grupo de sanos fue $526.9 \pm 86.7\%$, hemodiálisis $625.7 \pm 67.06\%$, TR $460.3 \pm 59.9\%$. La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0023$) entre la IMF de los tres grupo en estudio. En el análisis post hoc mediante la prueba de comparaciones múltiples con la prueba Dunn encontró significancia en el contraste de los grupos HD con TR (Figura 11).

IX. DISCUSIÓN

La identificación oportuna de pacientes con riesgo de desarrollar fibrosis después del trasplante renal es un reto en la nefrología, el objetivo de los grupos de investigación es disminuir la pérdida del injerto. Los estudios de las células inmunes que están involucradas en los mecanismos que participan en la respuesta reguladora antes y después del trasplante puede ser de gran utilidad en el desarrollo de nuevas herramientas para poder identificar aquellos pacientes que tienen alto riesgo de desarrollar nefropatía crónica al injerto (Nankivell & Kuypers, 2011).

Este trabajo evaluó dos de las vías inmunes que pudieran estar participando en la regulación de la respuesta inmune en estos pacientes. Durante el presente proyecto se caracterizaron dos tipos de células, las células T reguladoras, así como las células co-inducibles (ICOS). Se analizaron y contrastaron tres grupos de pacientes, un grupo de pacientes con enfermedad renal crónica en tratamiento sustitutivo en hemodiálisis, un grupo de pacientes con trasplante renal un año después de la cirugía, además de incluir un grupo de sujetos aparentemente sanos sin problema infecciosos o autoinmune (Tabla 5). Esta composición de grupos se diseñó por varios objetivos. Uno de ellos fue evaluar la capacidad de discriminar con nuestras técnicas de citometría de flujo poblaciones celulares en sangre periférica de pacientes con trasplante renal. Se decidió agregar a la población sana para establecer el contraste más importante de trasplante vs sujetos sanos y posteriormente realizar el segundo contraste de pacientes trasplantados en diferentes circunstancias.

El estudio inicial al establecer o definir las poblaciones celulares CD4+, CD3+ no mostraron ninguna diferencia estadística al contraste de los tres grupos. Estos datos indican que las células T periféricas no se ven afectadas por el tratamiento, y se mantienen estables. La combinación de linfocitos T CD4+, CD25+ de igual manera no mostró cambios entre los grupos (Afzali et al., 2013), al no identificar ningún cambio podemos sugerir que no existe un efecto biológico en la inmunidad mediada por estas células. Al incluir dentro de la plantilla de marcadores estudiados FoxP3, se observan diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos. La comparación entre el grupo de pacientes en hemodiálisis reveló una mayor expresión del fenotipo T regulador CD4+, CD3+; Cd35+, FOXP3 (células T reguladoras), en comparación de los pacientes con trasplante renal y los sujetos sanos. Estos resultados sugieren que existe un estado inflamatorio crónico en los pacientes que se encuentran en hemodiálisis. Es posible que los pacientes con hemodiálisis desarrollen una condición clínica y sistémica de respuesta inflamatoria crónica, en donde un desbalance entre la respuesta inmune celular y humoral permanente promueve un estado inflamatorio. Esto puede ser una explicación al porque estos pacientes, en presencia de mediadores pro inflamatorios así como de activación de monocitos, son susceptibles de desarrollar mayor número de infecciones que aquellos sujetos sanos. (Caprara et al., 2016).

La observación en los pacientes con trasplante renal que presentan porcentajes de células T reguladores más bajos con respecto a los demás grupos podría implicar un pronóstico adverso del injerto relacionado con un efecto deletéreo en la producción de IL-10 o TGF-beta ya que la disminución del factor de transcripción

Foxp3 sugiere una disminución en la capacidad para activar poblaciones de linfocitos T. Existen varios experimentos en modelos animales que sugieren un papel de las células T en la regulación y mantenimiento del riñón; el balance entre las células T ayudadores y las Treg es crucial para mantener la homeostasis inmune. Estos mecanismos involucran la activación de células T ayudadoras, seguido de una expansión de Treg con la finalidad de limitar la función de la activación de células T efectoras. En varios reportes en la literatura la caracterización de células Treg mediante citometría de flujo es generalmente identificadas con la co-expresión de CD4 y CD25, sin embargo, recientemente se ha mostrado que la expresión del factor de transcripción FoxP3 es un fenómeno estrictamente relacionado al desarrollo de la actividad de células T reguladores. Ejemplo de esto el grupo de (Gavin et al., 2007)(Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003) han mostrado que la respuesta inmune está controlada por la población de Tregs de la misma manera que se ha observado en los experimentos de inducción de tolerancia inmunológica post trasplante en modelos animales en donde se ha asociado con un incremento de un sub grupo de células Treg. Estas células previenen de enfermedad autoinmune inhibiendo a la activación mediada por células en contra de sus propios blancos celulares, incluyendo células T efectoras y células presentadoras de antígeno, lo que resulta en la prevención del rechazo al injerto en modelo animal (Sagoo et al., 2010). Los hallazgos obtenidos con las células T reguladores sugieren que estas células podrían ser utilizadas como herramienta pronóstica, a través de monitorear sus niveles en los pacientes con trasplante renal.

Nuestros resultados muestran diferentes aspectos de la vía de estimulación. Inicialmente describimos la estandarización de la técnica para estudiar en sangre periférica las vías de Co-estimulación. En este trabajo se encontró que el grupo de sujetos sanos tuvo una proporción de célula T CD4+ ICOS+ fue 3.3 ± 1.06 % congruente con otros trabajos publicados en la literatura con 2 ± 1 %. (Chen et al., 2009) Estos resultados dan certeza a nuestra técnica de estandarización y a la exploración del fenómeno en una población de pacientes mediante citometría de flujo en el modelo de trasplante renal.

En cuanto a la proporción de la expresión de ICOS en la célula T entre los diferentes grupos de estudio no encontramos diferencias. Esto puede explicarse en función de varios fenómenos. El más importante podría ser la naturaleza del sistema que utilizamos para el estudio, como son las células mononucleares totales analizadas de manera directa y siendo ICOS esencialmente inducible, nuestro estudio lo valoró de forma basal. De tal manera que este mismo fenómeno lo tendríamos que explorar en un modelo de cultivo celular con estímulo. Otra explicación del por qué no encontramos diferencias entre los grupos de estudio podría ser la magnitud del fenómeno, en este estamos explorando en trasplante renal son pacientes sin eventos de rechazo agudo, son principalmente pacientes que tuvieron en algún momento de su evolución un evento de rechazo.

Aunque no hubo diferencias entre las proporciones de las células T positivas para ICOS, sí encontramos diferencias en la IMF, este resultado se refiere de manera directa a la presencia del antígeno ICOS, no a la expresión de la inmunofluorescencia en la superficie de la célula T. Nuestros resultados evidencian

una menor actividad de las células T CD4+ ICOS+ de los pacientes trasplantados en relación a los pacientes en HD, posiblemente explicado por la inmunosupresión.

Finalmente nuestros resultados sugieren que la vía ICOS medida mediante citometría de flujo en sangre periférica no tiene la capacidad de discriminar proporciones basales de células CD4+ ICOS+ entre las diferentes poblaciones aquí estudiadas, de tal manera que en futuros trabajos se tendrá que considerar fuertemente trabajar en cultivos celulares y también hacer énfasis no solo en las diferencias entre las proporciones de células positivas si no que tan activas están mediante la IMF.

X. Bibliografía

- Abbas K., A., Lichtman, Andrew, H., & Pillai, S. (2014 2018). *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier (Vol. 9th edition.).
- Afzali, B., Edozie, F. C., Fazekasova, H., Scottà, C., Mitchell, P. J., Canavan, J. B., ... Lombardi, G. (2013). Comparison of regulatory T cells in hemodialysis patients and healthy controls: implications for cell therapy in transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 8(8), 1396–1405. <https://doi.org/10.2215/CJN.12931212>
- Akalin, E., Dikman, S., Murphy, B., Bromberg, J. S., & Hancock, W. W. (2003). Glomerular infiltration by CXCR3+ ICOS+ activated T cells in chronic allograft nephropathy with transplant glomerulopathy. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(9), 1116–20. <https://doi.org/151> [pii]
- Andersen, C. B. (1997). Acute kidney graft rejection morphology and immunology. *APMIS. Supplementum*, 67, 1–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9063492>
- Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., & Rivera-Dommarco, J. A. (2013). Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Publica de Mexico*, 55(SUPPL.2), 151–160.
- Caprara, C., Kinsey, G. R., Corradi, V., Xin, W., Ma, J. Z., Scalzotto, E., ... Ronco, C. (2016). The Influence of Hemodialysis on T Regulatory Cells: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Blood Purification*, 42(4), 307–313. <https://doi.org/10.1159/000449242>
- Chapman, J. R. (2005). Chronic Renal Allograft Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(10), 3015–3026. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005050463>
- Chapman JR. (2010). KDIGO Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Transplantation*, 27(89(6)), 644–5. Retrieved from http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/TxpGL_publVersion.pdf
- Chen, H., Liakou, C. I., Kamat, A., Pettaway, C., Ward, J. F., Tang, D. N., ... Sharma, P. (2009). Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOS^{hi} T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2729–2734. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813175106>
- Ford, M. L., Adams, A. B., & Pearson, T. C. (2013). Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nature Publishing Group*, 10(10). <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.183>

- Gavin, M. A., Rasmussen, J. P., Fontenot, J. D., Vasta, V., Manganiello, V. C., Beavo, J. A., & Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, *445*(7129), 771–5. <https://doi.org/10.1038/nature05543>
- Harada, H., Salama, A. D., Sho, M., Izawa, A., Sandner, S. E., Ito, T., ... Sayegh, M. H. (2003). The role of the ICOS-B7h T cell costimulatory pathway in transplantation immunity. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(2), 234–243. <https://doi.org/10.1172/JCI200317008>
- Hochheiser, K., Engel, D. R., Hammerich, L., Heymann, F., Knolle, P. A., Panzer, U., & Kurts, C. (2011). Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria, 306–316. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010050548>
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5609), 1057–61. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>
- Hutloff, A., Dittrich, A., Beier, K., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., & Kroczek, R. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, *397*(6716), 263–266. <https://doi.org/10.1038/16717>
- Johnson, R. J. (Richard J., Feehally, J., & Floege, J. (n.d.). *Comprehensive clinical nephrology*. Retrieved from <http://booksmedicos.org/comprehensive-clinical-nephrology-5th-ed/>
- Kadkhoda, K., Wang, S., Fan, Y., Qiu, H., Basu, S., Halayko, A. J., & Yang, X. (2011). ICOS ligand expression is essential for allergic airway hyperresponsiveness. *International Immunology*, *23*(4), 239–249. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq476>
- Levey, A. S., Coresh, J., Hillege, H., Investigators, for the P. of R. and V. E. D. I. T. (PREVEND I., al., et, & Investigators, for the C. and R. E. (CARE) T. (2012). Chronic kidney disease. *The Lancet*, *379*(9811), 165–180. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60178-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60178-5)
- Lo, D. J., Anderson, D. J., Song, M., Leopardi, F., Brad Farris, A., Strobert, E., ... Kirk, A. D. (2015). A Pilot Trial Targeting the ICOS-ICOS-L Pathway in Nonhuman Primate Kidney Transplantation HHS Public Access. *Am J Transplant*, *15*(4), 984–992. <https://doi.org/10.1111/ajt.13100>
- López-Hoyos, M., Segundo, D. S., Fernández-Fresnedo, G., Marín, M. J., González-Martín, V., & Arias, M. (2009). Regulatory T cells in renal transplantation and modulation by immunosuppression. *Transplantation*, *88*(3 Suppl), S31-9. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181af7b99>
- Maria Cusumano, A., Javier Rosa-Diez, G., Carlota Gonzalez-Bedat Ana Maria Cusumano, M., Carlota Gonzalez-Bedat, M., to, C., & Latin, G.-B. M. (2016). Latin American Dialysis and Transplant Registry: Experience and contributions to end-stage renal disease epidemiology. *World J Nephrol*, *5*(55), 389–397. <https://doi.org/10.5527/wjn.v5.i5.389>

- Nankivell, B. J., & Kuypers, D. R. (2011). Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *The Lancet*, 378(9800), 1428–1437. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60699-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60699-5)
- Obrador, G. T., García-García, G., Villa, A. R., Rubilar, X., Olvera, N., Ferreira, E., ... Plascencia-Pérez, S. (2010). Prevalence of chronic kidney disease in the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) México and comparison with KEEP US. *Kidney International*, 77, S2–S8. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.540>
- Odobasic, D. (2006). Inducible Co-Stimulatory Molecule Ligand Is Protective during the Induction and Effector Phases of Crescentic Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(4), 1044–1053. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005101022>
- Of, O. J. O. S., & Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. (2013). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*, 3(1), 4–4. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.76>
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D. A., Miqueu, P., ... Lechler, R. I. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1848–61. <https://doi.org/10.1172/JCI39922>
- Schwartz, R. S., Nankivell, B. J., & Alexander, S. I. (2010). Rejection of the Kidney Allograft. *New England Journal of Medicine*, 363(15), 1451–1462. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0902927>
- Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. (2002). the B7–Cd28 Superfamily. *Nature Reviews Immunology*, 2(2), 116–126. <https://doi.org/10.1038/nri727>
- USRDS. (2016). 2015 USRDS Annual Data Report Volume 1: CKD in the United States. *United States Renal Data System*, 1, 1–120. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.02.002>
- Wolfe, R. A., Ashby, V. B., Milford, E. L., Ojo, A. O., Ettenger, R. E., Agodoa, L. Y. C., ... Port, F. K. (1999). Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. *New England Journal of Medicine*, 341(23), 1725–1730. <https://doi.org/10.1056/NEJM199912023412303>