



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
PETRÓLEOS MEXICANOS  
SUBDIRECCIÓN DE SERVICIOS DE SALUD  
GERENCIA DE SERVICIOS MÉDICOS  
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

**CORRELACIÓN DE INMUNOFENOTIPOS DE VÍAS DE CO-ESTIMULACIÓN EN LA CÉLULA T CD4+ DE SANGRE PERIFÉRICA, MEDIDOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN ESTADIO 5 DE LA NKF Y PACIENTES DE TRASPLANTE RENAL SIN RECHAZO**

**TESIS DE POSGRADO  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**PRESENTA:  
DR. HÉCTOR LENNIN SANTIAGO JIMÉNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. MARCO ANTONIO CARMONA ESCAMILLA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS  
DR. LUIS RAÚL LÓPEZ Y LÓPEZ**

**ASESOR DE TESIS:  
DR. LUIS OCTAVIO GONZÁLEZ ESPINOSA**

**CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

DR. PORFIRIO VISOSO PALACIOS  
Director

DR. DAVID EDUARDO CERVANTES BARRAGÁN  
Jefe del Departamento de Enseñanza e Investigación

DR. MARTÍN CORONADO MALAGÓN  
Jefe del Servicio y Profesor Titular del Curso

DR. MARCO ANTONIO CARMONA ESCAMILLA  
Director de Tesis

DR. LUIS RAÚL LÓPEZ Y LÓPEZ  
Co-director de Tesis

## RESUMEN

### INDICE GENERAL

a) ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	4
b) ÍNDICE DE ABREVIATURAS	10
c) AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS	11
d) TITULO	12
e) DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	
a. Introducción	13
b. Problemática abordada y justificaciones	14
c. Finalidades generales del trabajo	14
f) Marco teórico-referencial	16
g) Justificación	20
h) Planteamiento del problema	20
i) Pregunta de investigación	20
j) Hipótesis	20
k) Objetivo general	21
l) Objetivos específicos	21
m) Tipo de estudio	21
n) Diseño	22
a. Definición del universo de estudio	22
b. Criterios de inclusión	22
c. Criterios de exclusión	22
d. Definición de variables y cuadro de operacionalización de las variables	23
o) Recursos y logística	24
p) Consideraciones éticas	24
q) Resultados	26
r) Discusión	28
s) Conclusiones	28
t) Limitaciones del estudio	29
u) Estudios posteriores, propuestas	29
v) Referencias	30

a) INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

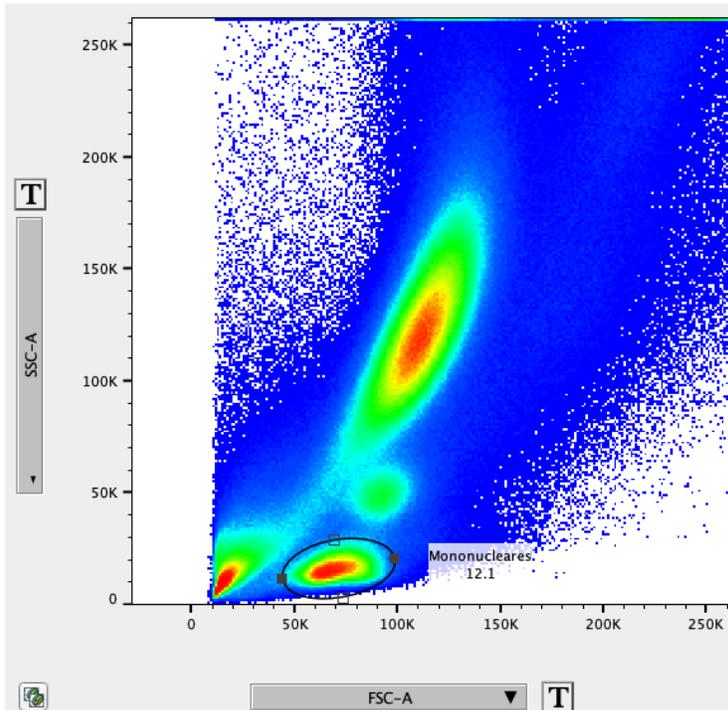


Figura 1

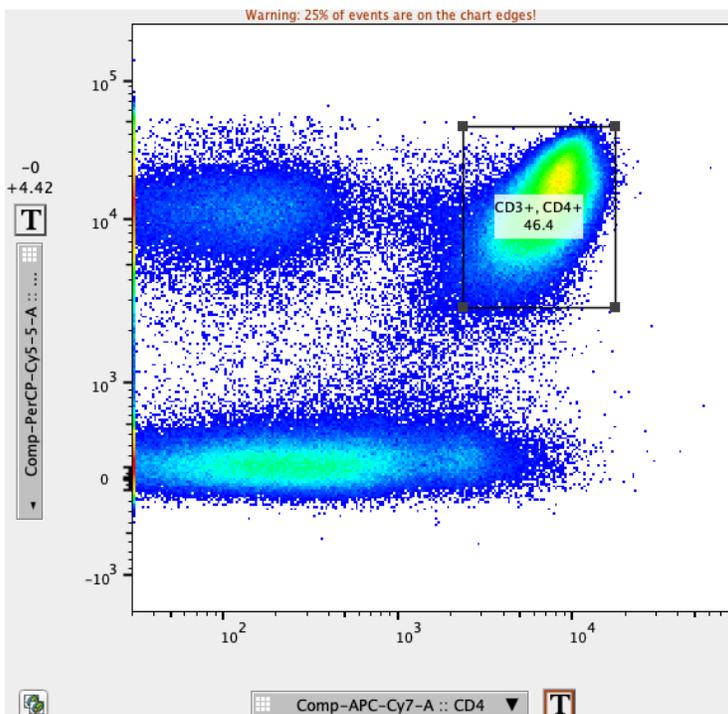


Figura 2

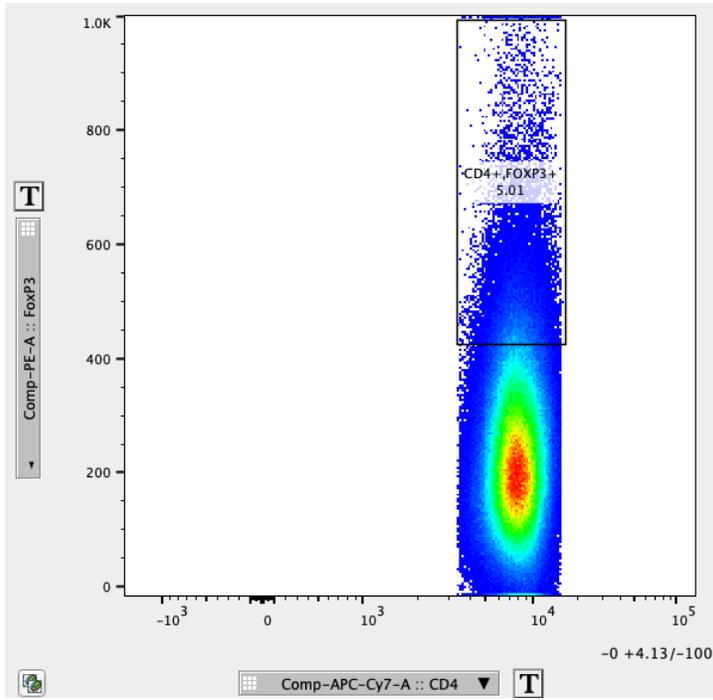
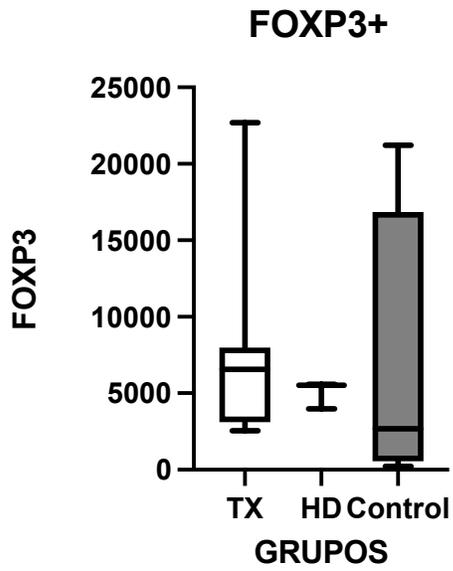


Figura 3



P value	0.4487
Exact or approximate P value?	Exact

Figura 4

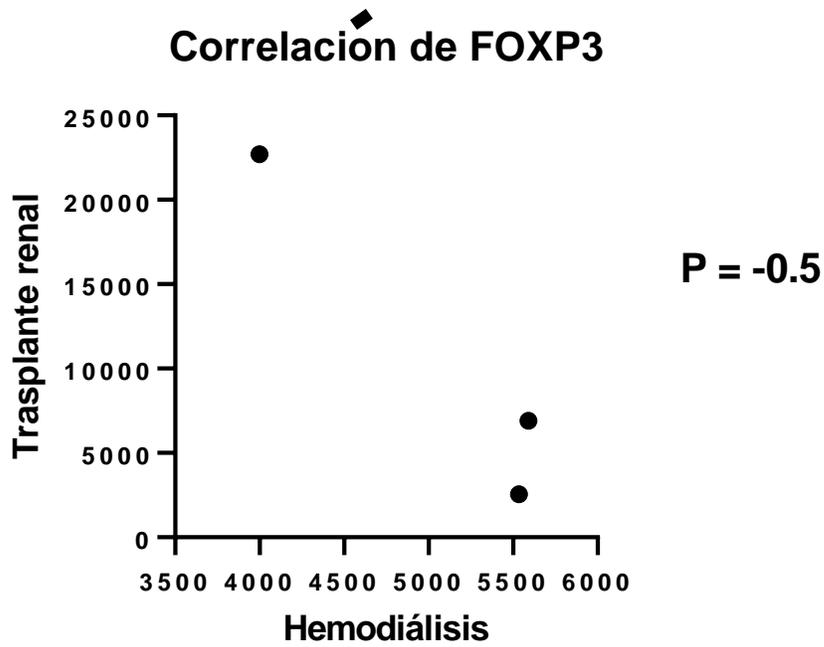
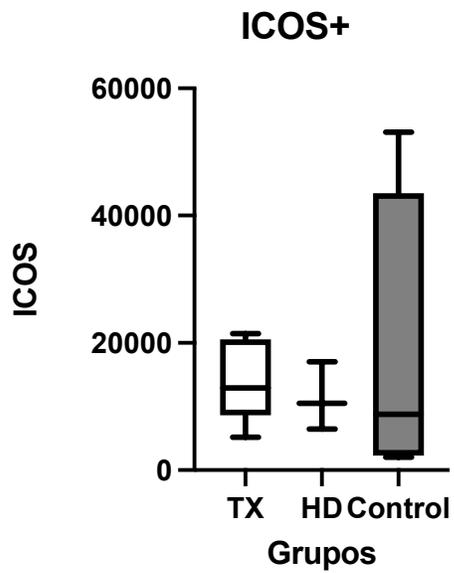


Figura 5



P value	0.8591
Exact or approximate P value?	Exact

Figura 6

### Correlación de fenotipo ICOS en Treg

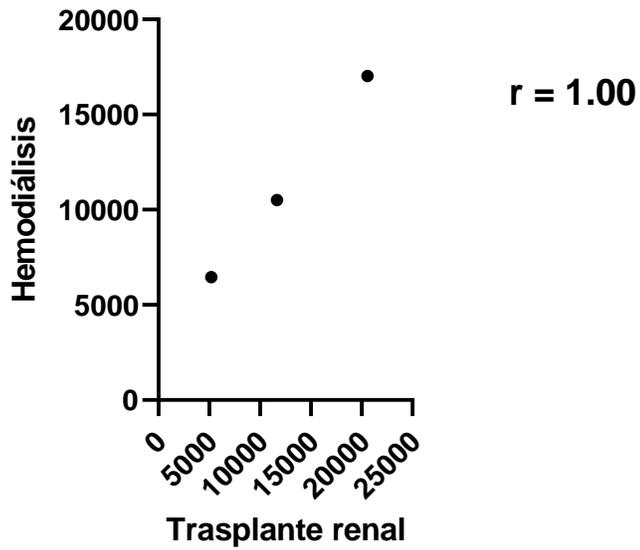
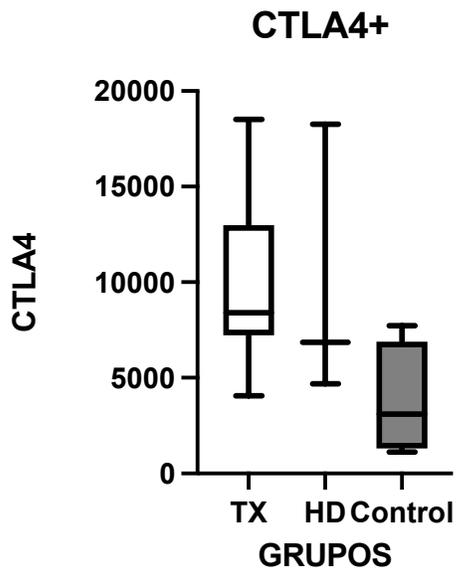


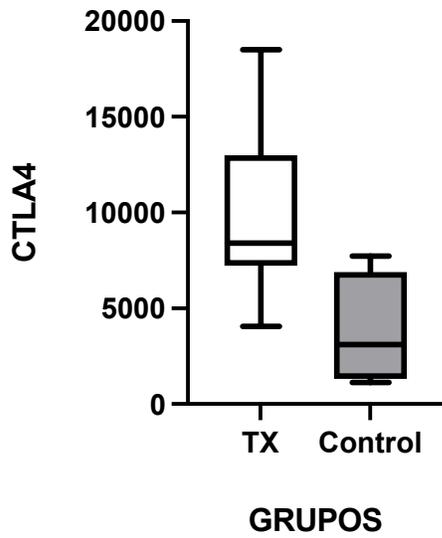
Figura 7



P value	0.1264
Exact or approximate P value?	Exact

Figura 8

## CTLA4+ TX VS CONTROL



P value	0.0364
Exact or approximate P value?	Exact

Figura 9

## Correlación de fenotipo CTLA-4 en Treg

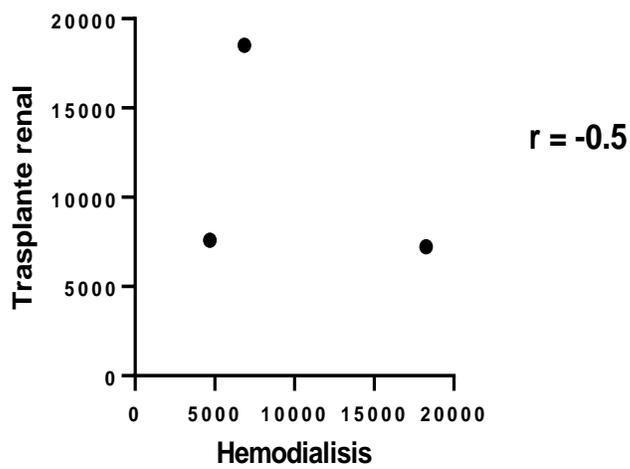


Figura 10

Tabla 1

*Características clínicas y demográficas de los pacientes.*

Variable	Trasplante renal	ERC estadio V de NKF (HD)	Estandarización (Sujetos sanos)	P
	n=7	n=3	n=4	
Edad (años)*	51.57 ± 13.72	70.67 ± 5.774	43.75 ± 13.301	0.046
Sexo**				
Hombre	4 (57.1%)	1 (33.3%)	4 (100.0%)	0.285‡
Mujer	3 (42.9%)	2 (66.7%)	0 (0.0%)	
Leucocitos 10 <sup>3</sup> /ul *	5.88 ± 0.925	4.52 ± 0.604	6.37 ± 2.267	0.246
Neutrófilos 10 <sup>3</sup> /ul *	3.77 ± 0.803	2.79 ± 0.812	3.65 ± 1.684	0.454
Linfocitos 10 <sup>3</sup> /ul *	1.31 ± 0.368	0.95 ± 0.273	2.07 ± 0.884	0.049
Monocitos 10 <sup>3</sup> /ul *	0.60 ± 0.086	0.36 ± 0.075	0.49 ± 0.137	0.016
Eósinofilos 10 <sup>3</sup> /ul *	0.13 ± 0.087	0.37 ± 0.304	0.11 ± 0.067	0.079
Basófilos 10 <sup>3</sup> /ul *	0.04 ± 0.016	0.03 ± 0.023	0.03 ± 0.000	0.664
Células mononucleares *	578690.43 ± 241766.008	439874.00 ± 194602.497	559288.00 ± 737254.366	0.895
CD3+ *	374050.57 ± 167494.875	245300.67 ± 87946.331	355116.50 ± 468744.646	0.795
CD4+ *	176141.86 ± 131711.026	149100.00 ± 39891.895	238451.50 ± 319959.616	0.815
FOXP3+ *	7702.29 ± 6921.263	5041.33 ± 903.106	6697.75 ± 9797.087	0.868

ICOS (CD 278) *	13498.43 ± 5922.645	11332.33 ± 5337.146	18198.00 ± 23995.346	0.781
CTLA-4 (CD 152) *	9928.43 ± 4710.073	9933.33 ± 7286.205	3768.75 ± 2989.106	0.153

---

\* Se expresa en media y desviación estándar, \*\* Se expresa en mediana y rango intercuartílico. DVR: donador vivo relacionado, DVNR: donador vivo no relacionado, DC: donador cadaverico, ND: nefropatía diabética, PQ: poliquistosis renal, EHE: enfermedad hipertensiva del embarazo, PR: posrenal, NTI: nefropatía tubulo intersticial.

|| Prueba de Kruskal Wallis, ‡ Prueba de Chi cuadrada.

Tabla 1

#### b) ABREVIATURAS

- CMH-II. Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II
- ERC. Enfermedad Renal Crónica
- ERCT. Enfermedad Renal Crónica Terminal
- HD. Hemodiálisis
- NKF. National Kidney Foundation
- TFG. Tasa de Filtrado Glomerular
- TR. Trasplante Renal
- TSFR. Tratamiento Sustitutivo de la Función Renal

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

Mi padre siempre me dijo que primero hay que dar gracias a Dios...

Gracias a Dios por enviarme a Durango allá por el 2014 y conocer a la Dra. Diana Herrera, médico internista que hizo que naciera mi curiosidad por ésta la más completa de las especialidades; gracias por poner en mi camino a quien considero mi maestro, el Dr. Antonio Ramírez García, quien me convirtió en su pupilo, gracial a él conocí a la que tiempo después fue mi jefa de residentes, y más importante que eso se convirtió en mi amiga Diana Isabel.

Doy gracias a Dios ya que esa travesía que en algún momento parecía azar, hoy en día me doy cuenta fue su voluntad. Le agradezco que me diera la tenacidad de cruzar ése camino para conocer a mis compañeros, que se convertirían en mis mejores amigos y pilares de residencia, Mara y Sam, por su apoyo, consejos y sobre todo por hacerme sentir en casa estando tan lejos de ella.

Agradezco a mis R más y a mis maestros por toda su paciencia y enseñanzas, tarde algo en darme cuenta sobre lo mucho que me sirvió el tiempo que me dedicaron. A petróleos mexicanos y mi sede que me adoptó para darme la oportunidad de cumplir mi sueño. Gracias especiales a todos los adscritos del HRM, a quienes conozco desde estudiante, siempre me han aconsejado, enseñado y estimado, los considero mis maestros.

Le dedico éste pequeño logro a mis hermanos y sus familias por siempre creer en mí, aún en esas ocasiones en las que ni yo mismo lo hacía; pero sin duda especialmente a mis padres, Elda y Héctor, en quienes siempre he encontrado apoyo en cualquiera de mis decisiones, de quien estoy tan orgulloso de ser su hijo, a donde quiera que vaya siempre están en mi mente y palabras, elegiría ésta vida a su lado mil y un veces más.

Gracias al Dr. Marco Antonio Carmona Escamilla por hacerme parte de éste trabajo.

Una mención especial sin duda para quien aparte de ser mi maestro, considero mi amigo, quien estuvo acompañándome en todo el proceso de éste manuscrito, sé que se convertirá en todo lo que sueña, sus deseos y trabajo para convertirse en el mejor son una inspiración para todos aquellos que lo rodeamos Dr. Luis Raúl López y López.

Gracias a la vida que me ha dado tanto.

## **TÍTULO**

**CORRELACIÓN DE INMUNOFENOTIPOS DE VÍAS DE CO-ESTIMULACIÓN EN LA CÉLULA T CD4+ DE SANGRE PERIFÉRICA, MEDIDOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN ESTADIO 5 DE LA NKF Y PACIENTES DE TRASPLANTE RENAL SIN RECHAZO**

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

### a) Introducción

La pandemia de las enfermedades crónico degenerativas se encuentra cada año en mayor auge, podemos encontrar cada día nueva información de éstas enfermedades, entre ellas una de las que mas destaca es la enfermedad renal crónica (ERC), tanto por el número de pacientes afectados, que en su mayoría es secundario a otras enfermedades crónico degenerativas, como por su costo; especialmente tomando en cuenta la enfermedad renal crónica terminal (ERCT), que el estadio más avanzado.

A nivel global no se cuenta con datos epidemiológicos exactos y actuales, especialmente en países en vías de desarrollo como el nuestro, ésto debido al gran número de pacientes, las carencias de los diversos sistemas de salud y su forma de recopilar información; lo cual hacen difícil obtener un registro. Sin embargo, el conocimiento actual indica una meseta en la incidencia y aumento en la prevalencia, dado posiblemente por las nuevas terapias que han logrado una mayor sobrevida de los pacientes con ERC (1).

En México no contamos con un sistema preciso de epidemiología que nos de respuesta exacta de la situación de dicha patología, sin embargo, acorde a estimaciones en 2017 contábamos con una prevalencia de ERC de 14 556 534 habitantes con una mortalidad en el mismo año de 65 033 habitantes(2).

La importancia del número de habitantes afectados radica en la historia natural de la enfermedad, la cual conduce a un deterioro progresivo de la función renal y culmina en muerte o estrategias de reemplazo de la función renal, como son diálisis peritoneal, hemodiálisis y trasplante renal (TR).

En cuanto a la elección de la estrategia de sustitución de la función renal, hoy en día se considera que el TR es la mejor (3), ya que entre las previamente mencionadas la única que ha logrado evitar la uremia es el TR, así mismo mejora la calidad de vida y la sobrevida de los pacientes comparado con las terapias de sustitución de la función renal. Sin embargo, representa un problema la falta de donaciones, infraestructura, los criterios de selección y los elevados costos iniciales. Sánchez y cols. publican la información más reciente a nivel nacional con la que contamos respecto a los costos de las diversas terapias en nuestro país

(4), tras lo cual podemos concluir que el TR pese a sus limitaciones sigue siendo la estrategia más rentable.

Habiendo dejado en claro la mejor estrategia, debemos tener en cuenta diversas oportunidades de investigación en cuanto a trasplante.

La mejora en la supervivencia de los pacientes trasplantados es la meta terapéutica principal. Actualmente la supervivencia a 10 años del paciente postrasplantado es de 66.9% (5); en nuestro país hasta el momento en que se escribe éste manuscrito no hay un registro de la mortalidad o pérdidas del injerto.

#### b) Problemática abordada y justificaciones

El rechazo del injerto es a nivel mundial la principal causa de disfunción del mismo, siendo éste catastrófico ya que el paciente ameritará regresar a terapias de sustitución, ingresar nuevamente al programa de trasplante y esperar en la larga lista de receptores; y a su vez ya que el rechazo humoral es de éstos la causa número uno, parece lógico desarrollar medidas que ayuden a combatir éste blanco.

La respuesta inmunológica está mediada por fenotipos de co-estimulación y co-inhibición en las células T reguladoras, dichos inmunofenotipos en el paciente en tratamiento con hemodiálisis y en pacientes con trasplante renal, no han sido estudiados, la inducción depletores o no depletores por fármacos al momento del trasplante modifica la respuesta inmunológica del paciente, por lo que el conocimiento de los inmunofenotipos de vías de co-señalización es importante ya que se podrá elegir el tratamiento más adecuado tras individualizar al paciente.

#### c) Finalidades generales del trabajo

Con el siguiente trabajo conoceremos mediante la citometría de flujo los niveles de células T CD4+ así como sus vías de co-señalización en pacientes con trasplante renal sin rechazo, así como en pacientes con ERC estadio V, para establecer un análisis de correlación; y de

ésta forma tratar de establecer un valor estándar en el grupo de pacientes antes mencionados, los cuales tienen la particularidad de ser latinos.

La variable a estudiar será el número de linfocitos T reguladores y las vías de co-señalización, tras la medición se realizará un análisis para correlacionar esto con las variables independientes, con esto estableceremos la correlación con dichas variables.

## MARCO TEÓRICO-REFERENCIAL

Como se evidenció en los antecedentes la ERCT es un gran problema de salud pública que debido al aumento en la prevalencia de diabetes e hipertensión, la ERC se proyecta para convertirse en uno de los problemas de salud más importantes del siglo XXI.

El tratamiento ideal de la ERCT es el TR, ya que es la única medida terapéutica definitiva para el manejo de la ERCT que ha mostrado disminuir la mortalidad; debido a la poca disponibilidad de éste tratamiento y el alto costo de éste manejo se han realizado estudios para mejorar y prevenir las fallas a dicha terapéutica; sin embargo aún en países primermundistas es un problema debido a la dificultad para conseguir un injerto, además del costo inicial, el problema para el seguimiento, ya que éste tratamiento amerita un amplio grupo de especialistas, usualmente en centros de tercer nivel de atención, lo cual en países tercermundistas como el nuestro suma otro problema a éste tratamiento.

Las causas más frecuentes de falla en el TR son los problemas vasculares relacionados al evento postquirúrgicos y los problemas inmunológicos caracterizados por el rechazo del TR (6). No está demás resaltar lo catastrófico que resulta la pérdida de un tratamiento tan valioso; secundario a esto resulta un área de extremo interés el estudio de dichas causas y sobre todo la forma de prevenirlas. En lo que compete al área clínica de la medicina el rechazo del injerto renal es el de mayor interés ya que diversas investigaciones se han centrado en encontrar factores de riesgo para el desarrollo de ésta patología.

Los pacientes con ERC presentan “per se” alteración en el sistema inmune debido a la uremia que ocasiona la enfermedad, Xiang Fang y colaboradores realizaron una correlación, donde encontró mayor disminución de linfocitos a mayor deterioro de la TFG (7). Las terapias sustitutivas de reemplazo renal en sus modalidades de hemodiálisis y diálisis peritoneal han demostrado disminución en el conteo de linfocitos totales (8,9); entre éstas alternativas de sustitución de la función renal los estudios han reportado mayores niveles de linfocitos T reguladores cuando se compara diálisis peritoneal vs hemodiálisis (10). Los pacientes con TR debido al uso de fármacos inmunosupresores también presentan disminución en el número total de linfocitos (11).

Existen diversos mecanismos para la pérdida de función en el injerto dentro de los cuales el inmunológico figura como uno de los más importantes (12), por lo tanto la importancia sobre el desarrollo de nuevas herramientas que permitan predecir el desarrollo de rechazo es vital y se encuentra en marcha (13).

Actualmente se sospecha afección en el injerto si el paciente presenta alteraciones clínicas, como disminución en los volúmenes urinarios o uremia, o alteración en los parámetros de laboratorio, como elevación de la creatinina, microalbuminuria, y se confirma después con el método biopsia del injerto, el cuál es el método “gold standard” diagnóstico (14,15).

Los linfocitos T son considerados la célula de mayor importancia en el TR ya que se encargan de mediar la inmunidad tras su activación por el CMH-II, así se encargan de conducir la destrucción de las células del injerto (16).

Conforme ha avanzado el conocimiento acerca de los diferentes inmunofenotipos de los linfocitos T se ha logrado entender la importancia en las distintas partes de la cadena inmune, dando paso a la terapia dirigida, la cual es de suma importancia en pacientes con TR.

La acción de los linfocitos T CD4+ en el sistema inmune se encuentra bastante estudiada, a pesar de que no se ha logrado desenrollar cada uno de los mecanismos de los distintos inmunofenotipos mediante los cuales éstos ejercen su acción, ya que los diversos inmunofenotipos presentan desde pequeñas a grandes diferencias en su actuar inmune (17).

Los pacientes con ERCT, sobre todos aquellos en TSFR, se han clasificado como inmunodeprimidos por estudios como el de Morra y colaboradores (18), publicado en 1990 donde se describe como en los pacientes uremicos crónicos en hemodiálisis se inhibe la estimulación en la producción de linfocitos, por lo cual tras la medición de linfocitos T se concluyó que existe una diferencia en el número de linfocitos T CD4+ y T CD8+ circulantes; dando razón al conocimiento sobre la inmunosupresión de los enfermos renales con uremia. Lisowska y colaboradores observaron que la medición de inmunofenotipos de linfocitos T CD4+ y la vía de co-estimulación CD28 en pacientes con hemodiálisis tras ser sometidos a

ésta terapia comparados con pacientes sanos y pacientes en diálisis peritoneal se mostró disminuida (8).

En el rechazo en agudo está demostrado que los linfocitos T CD4+ son aquellos que ejercen mayormente la regulación del mismo (16,19). Dentro de la familia de linfocitos, los T reguladores son de especial interés, ya que son los encargados de mediar la inmunidad actuando en procesos infecciosos, inflamatorios, autoinmunes y respuestas autoinmunes tras trasplantes (20,21), un mayor número de éstos se asocia a mayor tolerancia del aloinjerto, así como protección autoinmune, esto probablemente mediante la modulación negativa de las citocinas proinflamatorias producidas por otras células T (11,22–24).

La importancia en las vías de co-señalización es la estimulación así como la inhibición de los linfocitos T (25); en los linfocitos T CD4+ reguladores la vía de co-estimulación que hasta el momento se considera la más importante es dada por CD28/B7, la activación de ésta vía mediante los ligandos B7.1 y B7.2, expresados en las células presentadoras de antígenos, disminuyen el umbral de los receptores de células T, promoviendo de ésta manera la proliferación de células T reguladoras activación de citocinas (entre ellas I-10, IL-35, TGF  $\beta$ -1, etc.) y diferenciación, esto junto con otras moléculas co-estimuladoras como ICOS, la cuál sólo actúa en la proliferación y mantenimiento, mas no en la estimulación generadora (25,26). Por otra parte la molécula de co-inhibición CTLA4 se une con mayor afinidad a los ligandos de CD28/B7 inhibiendo la actividad de CD28 antagonizando de ésta forma su papel, convirtiéndose en una de las principales moléculas co-inhibidoras (16,25,27). Es también importante hacer notar que las moléculas co-señalizadoras pueden actuar de forma bidireccional (estimulando cierta población de linfocitos e inhibiendo otra) dependiendo del tipo de los diferentes inmunofenotipos de linfocitos T; como es el caso de la vía de co-señalización PD-1, la cual en linfocitos T reguladores es co-estimuladora promoviendo la proliferación, supervivencia y mantenimiento; sin embargo en linfocitos T convencionales actúa como molécula co-inhibitoria (25).

Mostafa y colaboradores demostraron en su estudio que existe una disminución de los linfocitos T reguladores entre los grupos de pacientes sanos, pacientes con ERCT, pacientes con trasplante menor a un año, pacientes con trasplante mayor a un año y pacientes con rechazo agudo (demostrado por biopsia) tratado con esteroides (28), Valloton y colaboradores en su estudio en el cual incluyeron 90 pacientes postrasplantados renales

(manejados con diferentes esquemas de inmunosupresión) vs 73 controles sanos, encontraron que los pacientes postrasplantados presentaron menores cargas de linfocitos T reguladores comparados con un grupo control de personas sanas ( $74.05\% \pm 2.01\%$  y  $49.23\% \pm 2.06\%$ ;  $P < 0.001$ ) respectivamente (29).

Existe un vacío en el conocimiento acerca de los inmunofenotipos de las vías de co-señalización, el de linfocitos T CD4+ reguladores y su valor en la monitorización de la respuesta inmune en pacientes sanos, enfermos renales crónicos con uremia y pacientes trasplantados (11). Es importante tener un valor basal estandarizado ya que la diferencia en éstos grupos daría oportunidad para investigar si el tener valores fuera de los rangos otorga riesgo ó beneficio ante las diversas patologías; así mismo otorgará mejor evidencia para el inicio de terapias dirigidas a estimular linfocitos T reguladores en pacientes con ERCT previo al trasplante (30).

Ésta falta en el conocimiento da pauta a la teoría de que en pacientes postrasplantados sería relevante si previo al trasplante renal un valor fuera del rango de normalidad puede ser factor de riesgo para desarrollar rechazo o así mismo un factor protector.

## **JUSTIFICACIÓN**

Existe un vacío en el conocimiento acerca de cuál es el valor “normal” de linfocitos T CD4+ y sus diferentes inmunofenotipos en pacientes sanos, enfermos renales crónicos con uremia y pacientes trasplantados. Es importante tener un valor basal estandarizado ya que la diferencia en éstos grupos daría oportunidad para investigar si el tener alteraciones en dichos valores otorga riesgo ó beneficio ante los diferentes tratamientos.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se sabe que los valores de T CD4+ disminuyen en pacientes con uremia, hemodiálisis, así como en pacientes con inmunosupresión, sin embargo, no se ha establecido un valor estándar de linfocitos T CD4+ en pacientes con enfermedad renal crónica terminal y pacientes con trasplante renal sin rechazo.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál correlación de inmunofenotipos de vías de co-estimulación en la célula T CD4+ de sangre periférica, medidos por citometría de flujo en pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 5 de la NKF y pacientes de trasplante renal sin rechazo?

## **HIPÓTESIS**

Hipótesis alterna: En pacientes con ERC EV de NKF, y pacientes postrasplantados renal sin rechazo, existe correlación negativa en la medición de inmunofenotipos de linfocitos T CD4+ y vías de co-estimulación realizado mediante citometría de flujo.

Hipótesis nula: En pacientes con ERC EV de NKF, y pacientes postrasplantados renal sin rechazo, NO existe correlación negativa en la medición de inmunofenotipos de linfocitos T CD4+ y vías de co-estimulación realizado mediante citometría de flujo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer si existe una correlación entre la medición de inmunofenotipos de vías de co-estimulación en la célula T CD4+ de sangre periférica de pacientes con enfermedad renal crónica estadio V de NKF y pacientes postrasplantados renales sin rechazo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener las muestras de sangre periférica de los pacientes con enfermedad renal crónica estadio V de NKF, así como la de los pacientes postrasplantados sin rechazo.
- Realizar la medición mediante citometría de flujo de las muestras de los pacientes la cuantificación de inmunofenotipos de CD4+ y vías de coestimulación.
- Obtener los datos demográficos de los pacientes.
- Realizar el análisis de la medición de las muestras.

## **TIPO DE ESTUDIO**

Observacional, Descriptivo, Analítico, de corte transversal.

## **DISEÑO**

### **a) Definición del universo de estudio**

Población

Pacientes del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos

Muestra

Muestreo no probabilístico por conveniencia de pacientes con enfermedad renal crónica estadio V de la NKF y pacientes postrasplantados renales sin rechazo agudo.

Unidad de análisis

Inmunofenotipos de vías de co-estimulación en la célula T CD4+ de sangre periférica

### **b) Criterios de inclusión**

- Pacientes con edad mayor a 18 años.
- Paciente con enfermedad renal crónica estadio V de NKF en hemodiálisis.
- Pacientes con trasplante renal sin rechazo.
- Pacientes que no se encuentren en tratamientos con fármacos autoinmunes diferentes a los utilizados convencionalmente para el trasplante renal.

### **c) Criterios de exclusión**

- Pacientes que desean egresar del estudio de forma voluntaria.
- Pacientes que no acudan a la toma voluntaria del estudio.

### **d) Definición de variables y cuadro de operacionalización de las variables**

<b>Variable</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Unidad de medida</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Prueba estadística</b>
<i>Edad</i>	<i>Número de años cumplidos</i>	<i>Años</i>	<i>Cuantitativa discontinua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>Sexo</i>	<i>Característica biológica que define a un hombre ó mujer.</i>	<i>Femenino / Masculino</i>	<i>Nominal dicotómica</i>	<i>Chi cuadrada</i>
<i>Enfermedad autoinmune</i>	<i>Afección por la que el sistema inmunitario del cuerpo ataca los tejidos sanos propios porque los confunde con tejidos ajenos.</i>	<i>Presente ó ausente</i>	<i>Nominal dicotómica</i>	<i>Chi cuadrada</i>
<i>Causa de ERC</i>	<i>Motivo por el cual se presentó la disminución en la función renal.</i>	<i>0: Nefropatía diabética 1: Poliquistosis renal 2: Enfermedad hipertensiva del embarazo 3: Posrenal 4: Nefropatía tubulo intersticial 5: Probable Alport 6: Sano</i>	<i>Nominal</i>	<i>Chi cuadrada</i>
<i>Tipo de injerto</i>	<i>Tipo de donador y relación con el receptor</i>	<i>0: Donador vivo renacionado 1: Donados cadavérico 2: Donador vivo no relacionado 3: Sano</i>	<i>Nominal</i>	<i>Chi cuadrada</i>
<i>Hemodiálisis</i>	<i>Tratamiento sustitutivo de la función renal mediante hemodiálisis</i>	<i>Presente ó ausente</i>	<i>Nominal dicotómica</i>	<i>Chi cuadrada</i>
<i>Leucocitos</i>	<i>Valor obtenido del número total de leucocitos.</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>Neutrófilos</i>	<i>Valor obtenido del número total de neutrófilos.</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>Linfocitos</i>	<i>Valor obtenido del número total de linfocitos.</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>Monocitos</i>	<i>Valor obtenido del número total de monocitos.</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>Eosinófilos</i>	<i>Valor obtenido del número total de eosinófilos.</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>

<i>Basófilos</i>	<i>Valor obtenido del número total de basófilos.</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>Proporción de CD3+, CD4+ FOXP3+</i>	<i>Valor obtenido del número de total de células CD3+, CD4+, FOXP3+</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>Proporción de CD3+, CD4+ FOXP3+ ICOS +</i>	<i>Valor obtenido del número de total de células CD3+, CD4+, FOXP3+ ICOS +</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>Proporción de CD3+ CD4+ FOXP3+ CTLA4+ (CD 278)</i>	<i>Valor obtenido del número de total células CD3+ CD4+ FOXP3+ CTLA4+</i>	<i>Unidades numéricas continuas</i>	<i>Numérica continua</i>	<i>Kruskal Wallis</i>

### RECURSOS Y LOGÍSTICA (CALENDARIO Y COSTOS)

#	ACTIVIDAD	Mes Calendario Programado AÑO 2022											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Revisión bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	Redacción de protocolo de investigación			■	■	■	■	■	■	■			
	Presentación a comité								■				
	Realización de base de datos									■			
	Análisis de resultados										■		

### CONSIDERACIONES ÉTICAS

En apego a las normas éticas de la declaración de Helsinki y al artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la participación de los pacientes en este estudio conlleva un tipo de riesgo: mínimo.

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el Investigador principal, Dr Marco Antonio Carmona Escamilla en la PC del servicio de Nefrología así como en la PC del Dr. Pedro

Zárate Rodríguez, Jefe del Laboratorio clínico, utilizando la base de datos elaborada en programa Excel. La información del resultado de la muestra para identificar los inmunofenotipos de Linfocitos T reguladores, Linfocitos T de coestimulación y Linfocitos B reguladores quedarán incluidos en una carpeta electrónica dentro del software Diva de la computadora/estación de trabajo del Citómetro de Flujo FACS Canto II que se encuentra en el laboratorio clínico del Hospital Central Sur. Una vez analizados los archivos terminación .fcs, en el software Infinicyt versión 2.0, quedarán guardados como archivos con la terminación .cyt. Serán guardados en carpetas electrónicas específicas identificadas con el nombre completo y ficha institucional de cada paciente. Las únicas personas que tendrán acceso a esta información son los médicos mencionados anteriormente. El tiempo de resguardo de la información es indefinido y esta formará parte de su expediente de estudios de laboratorio, después de presentar los resultados del presente proyecto en la publicación en revista médica indexada, que se deberá generar al respecto. A cada paciente, también se le podrán informar sus resultados si así lo desean, manifestando dicha petición a su médico tratante del servicio de Nefrología.

## RESULTADOS

Realizamos el análisis de los archivos obtenidos del citómetro de flujo (inmunofenotipos de células T e inmunofenotipos de co-estimulación) mediante el software FlowJo versión 10.8.1 para sistema Mac OS X.

Tras abrir el archivo codificado de cada paciente, primero se analizó el archivo de células T, se realizó la selección de las células según su tamaño mediante FSC-A y la complejidad mediante SSC-A en la región de mayor fluorescencia en la biometría hemática (Fig. 1), mediante el tamaño estimado se seleccionaron las células mononucleares; una vez obtenida la selección se aisló y se procedió a identificar los inmunofenotipos, en el eje de las Y se realizó la selección en el programa de las células CD3+, posteriormente en el eje de las X se realizó la selección de las células CD4+, tras lo cual mediante el programa realizamos el “gathering”, seleccionándose en el área de mayor fluorescencia las células CD3+CD4+ (Fig. 2).

Al contar con identificación de las células CD3+CD4+ se procedió a la selección en el eje de las Y de FOXP3+, tras lo cual se identificaron las células T reguladoras en números totales (CD3+CD4+FOXP3+) (Fig. 3).

Posterior a ello analizamos las células de co-estimulación, se realizó la selección de las células según su tamaño mediante FSC-A y la complejidad mediante SSC-A en la región de mayor fluorescencia en la biometría hemática al igual que en el primer análisis, mediante el tamaño estimado se seleccionaron las células mononucleares; una vez obtenida la selección se realizó el “gathering” y se procedió a identificar los inmunofenotipos, en el eje de las Y se realizó la selección en el programa de las células CD4+, se hizo el “gathering” las células CD4+, posteriormente se procedió a en el eje de las X seleccionar las células positivas a CD 152 (CTLA-4) y en una segunda selección sobre el mismo eje se seleccionaron las células positivas a CD 278 (ICOS).

Se realizó el método previamente comentado con las muestras de cada paciente, incluyendo en las figuras una imagen significativa de un experimento al azar.

Tras realizar la bibliografía y determinar la relevancia y reproductibilidad del estudio, se estimó la proporción del tamaño de muestra en base a una población infinita para variables

no paramétricas independientes con la siguiente fórmula,  $n = 2 \left[ \frac{(Z_{\alpha} - Z_{\beta}) DE}{\mu_1 - \mu_2} \right]^2$ , se utilizó el estudio de Mostafa y colaboradores como precedente; para obtener la diferencia de medias se calculó una muestra total de 12 pacientes, sin embargo el número total de pacientes obtenidos en ambos grupos fue 10 y 4 sujetos para el grupo de estandarización (pacientes sanos). Tras el reclutamiento se contó con un total de 14 pacientes, 7 pacientes con trasplante renal, 3 pacientes de ERC estadio V de la NKF y 4 sujetos en el grupo de estandarización.

Se analizaron los resultados con la prueba de Kruskal Wallis para más de 2 variables independientes, de muestras no paramétricas, comparando el grupo de pacientes con trasplante renal sin rechazo, el grupo de pacientes con enfermedad renal crónica estadio V de NKF en hemodiálisis y el grupo de estandarización. Posterior a ello para analizar la correlación utilizamos el método de correlación de Spearman para variables independientes de muestras no paramétricas.

Al analizar las células de los grupos con inmunofenotipo de célula T cooperadora (CD3+CD4+) y la molécula de FOXP3+ se estableció una P = 0.4487 (Fig. 4), tras realizar la correlación se estableció una r = -0.5 (Fig. 5).

Al analizar las células de los grupos con inmunofenotipo de célula T reguladora (CD3+CD4+FOXP3+) y la molécula de co-estimulación ICOS (CD 278) se estableció una P = 0.8591 (Fig.6), tras realizar la correlación se estableció una r = 1.00 (Fig. 7).

Al analizar las células de los grupos con inmunofenotipo de célula T reguladora (CD3+CD4+FOXP3+) y la molécula de co-inhibición CTLA-4 (CD 152) se estableció una P = 0.1264 (Fig. 8), al comparar la figura se decidió realizar un análisis agregado por la diferencia de medias mostrada en el grupo control y grupo trasplante mediante U de Mann Whitney que estableció una P=0.0364 (Fig. 9), tras realizar la correlación de los 3 grupos se estableció una r = -0.5 (Fig. 10).

## **DISCUSIÓN**

Como hemos observado a lo largo de éste trabajo es más que clara la reelevancia de la medición de las vías de co-señalización en el linfocito T regulador en los pacientes con alteraciones renales debido a la inmunosupresión que presentan. Al ser el trasplante renal la mejor terapia para los pacientes con ERCT y ser éste un tratamiento sumamente valioso, es claro que se deben obtener herramientas para predecir qué pacientes podrían presentar rechazo.

Previa a la obtención de una herramienta tenemos que evaluar el comportamiento de el objeto a estudiar, en éste estudio a pesar de no lograr el tamaño de muestra requerido queda como precedente el comportamiento de las células T reguladoras y su correlación negativa en los grupos, tal como se planteo en la hipótesis alterna.

En lo que respecta al comportamiento de las vías de co-señalización llama la atención la correlación perfecta de ICOS, por lo que habrá que realizar un mayor número de estudios con el número adecuado de participantes para observar si se reproduce el efecto; en cuanto a la vía de co-inhibición existe una correlación negativa por lo que habrá que dar seguimiento a éstos pacientes para determinar si desarrollan algún evento de rechazo a futuro.

## **CONCLUSIONES**

La importancia en la medición de las vías de co-señalización como se han mencionado a lo largo de éste trabajo es conseguir una nueva forma de predecir qué pacientes presentaran desenlaces adversos en el trasplante renal, sin embargo éste tipo de estudios aún tiene un largo camino por recorrer; por lo cual realizamos éste estudio.

A pesar de no haber completado el tamaño de muestra queda como un precedente y podrá continuarse el estudio para estandarizar de forma adecuada los valores “normales” en éstos grupos de pacientes y de ésta forma valorar con mayor interés a aquellos pacientes que se encuentren fuera de normalidad para determinar el potencial de éstos valores como predictores de eventos futuros autoinmunes.

## **LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

La limitación más evidente en el estudio fue que no se alcanzó el tamaño de muestra requerido. Por lo tanto el estudio se puede tomar como un precedente, sin embargo el no cumplir con el tamaño de muestra hace que se deba tomar los resultados con cautela, ya que el tomarlos como reproductibles en todas las poblaciones pueda prestarse a presentar errores en las interpretaciones.

## **ESTUDIOS POSTERIORES, PROPUESTAS**

Se propone realizar el estudio con el tamaño de muestra adecuado, además convertirlo en una cohorte para darle seguimiento a aquellos pacientes que presentaron alteración en las vías de co-señalización y observar si tiene relación con algún evento de tipo rechazo.

Pueden realizarse mediciones previo a los trasplantes y dar seguimiento en el tiempo, para evaluar si existe alguna relación entre el número de T reguladores y vías de co-señalización previo al trasplante y posterior a éste respecto a los eventos de rechazo.

Realizar medición de vías de co-señalización de linfocitos T reguladores previo a los distintos tipos de inmunosupresión y evaluar si el número previo tiene diferencia sobre los desenlaces como rechazo o pérdida del injerto.

## REFERENCIAS

1. Thurlow JS, Joshi M, Yan G, Norris KC, Agodoa LY, Yuan CM, et al. Global epidemiology of end-stage kidney disease and disparities in kidney replacement therapy. Vol. 52, *American Journal of Nephrology*. S. Karger AG; 2021. p. 98–107.
2. Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2020 Feb 29;395(10225):709–33.
3. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, et al. Systematic review: Kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *American Journal of Transplantation*. 2011 Oct;11(10):2093–109.
4. Sánchez-Cedillo A, Cruz-Santiago José, Mariño-Rojas FB, Hernández-Estrada S, García-Ramírez C. Carga de la enfermedad: insuficiencia renal, diálisis-hemodiálisis y trasplante renal en México. Costo de la enfermedad. *Revista Mexicana de Trasplantes*. 2020;9(1):15–25.
5. Hariharan S, Israni AK, Danovitch G. Long-Term Survival after Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2021 Aug 19;385(8):729–43.
6. Journal C, Cubillos Gutiérrez J, Liliana C, Riveros S, Andrade Cerquera E, Hamid N, et al. *Revista Colombiana de Anestesiología Scientific and Technological Research*. 2007.
7. Xiang FF, Zhu JM, Cao X sen, Shen B, Zou JZ, Liu ZH, et al. Lymphocyte depletion and subset alteration correlate to renal function in chronic kidney disease patients. *Ren Fail*. 2016 Jan 2;38(1):7–14.
8. Lisowska KA, Dębska-Ślizień A, Jasiulewicz A, Heleniak Z, Bryl E, Witkowski JM. Hemodialysis affects phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes. *J Clin Immunol*. 2012;32(1):189–200.
9. Xiaoyan J, Rongyi C, Xuesen C, Jianzhou Z, Jun J, Xiaoqiang D, et al. The difference of T cell phenotypes in end stage renal disease patients under different dialysis modality. *BMC Nephrol*. 2019 Aug 5;20(1).
10. Caprara C, Corradi V, Scalzotto E, Frigo AC, Proglia M, Sharma R, et al. Differential effects of peritoneal and hemodialysis on circulating regulatory T cells one month post initiation of renal replacement therapy. *Clin Nephrol*. 2021 Jan 1;95(1):37–44.
11. Martin-Moreno PL, Tripathi S, Chandraker A. Regulatory T cells and kidney transplantation. Vol. 13, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2018. p. 1760–4.
12. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). In: *American Journal of Transplantation*. 2007. p. 518–26.
13. Hariharan S, Israni AK, Danovitch G. Long-Term Survival after Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2021 Aug 19;385(8):729–43.
14. Goerlich N, Brand HA, Langhans V, Tesch S, Schachtner T, Koch B, et al. Kidney transplant monitoring by urinary flow cytometry: Biomarker combination of T cells, renal tubular epithelial cells, and podocalyxin-positive cells detects rejection. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
15. Cooper JE. Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2020 Mar 6;15(3):430–8.
16. Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. Vol. 25, *Pediatric Nephrology*. 2010. p. 61–74.

17. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4 +T cells: Differentiation and functions. Vol. 2012, *Clinical and Developmental Immunology*. 2012.
18. Morra L, Ponassi GA, Gurreri G, Moccia F, Mela GS, Bessone G. T lymphocyte subsets in chronic uremic patients treated with maintenance hemodialysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 1990;44(1):53–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/075333229090070P>
19. Furuzawa-Carballeda J, Lima G, Simancas P, Ramos-Bello D, Simancas M, Bostock IC, et al. Peripheral Regulatory Cells Immunophenotyping in Kidney Transplant Recipients with Different Clinical Profiles: A Cross-Sectional Study. *J Transplant*. 2012;2012:1–15.
20. Darrigues J, van Meerwijk JPM, Romagnoli P. Age-Dependent Changes in Regulatory T Lymphocyte Development and Function: A Mini-Review. *Gerontology*. 2017;64(1):28–35.
21. Alikhan MA, Huynh M, Kitching AR, Ooi JD. Regulatory T cells in renal disease. Vol. 7, *Clinical and Translational Immunology*. Wiley-Blackwell; 2018.
22. Martin-Moreno PL, Tripathi S, Chandraker A. Regulatory T cells and kidney transplantation. Vol. 13, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2018. p. 1760–4.
23. Hu M, Rogers NM, Li J, Zhang GY, Wang YM, Shaw K, et al. Antigen Specific Regulatory T Cells in Kidney Transplantation and Other Tolerance Settings. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
24. Siachoque H, Satisteban N, Iglesias-Gamarra A. T regulatory lymphocytes: subpopulations, mechanism of action and importance in the control of autoimmunity. Vol. 18, *Revista Colombiana de Reumatologia*. Asociacion Colombiana de Reumatologia; 2011. p. 203–20.
25. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 227–42.
26. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Vol. 8, *Nature Reviews Immunology*. 2008. p. 523–32.
27. Magee CN, Boenisch O, Najafian N. The role of costimulatory molecules in directing the functional differentiation of alloreactive T helper cells. Vol. 12, *American Journal of Transplantation*. 2012. p. 2588–600.
28. Aly MG, Ibrahim EH, Karakizlis H, Weimer R, Opelz G, Morath C, et al. CD4+CD25+CD127-Foxp3+ and CD8+CD28- Tregs in Renal Transplant Recipients: Phenotypic Patterns, Association With Immunosuppressive Drugs, and Interaction With Effector CD8+ T Cells and CD19+IL-10+ Bregs. *Front Immunol*. 2021 Jul 15;12.
29. Vallotton L, Hadaya K, Venetz JP, Buehler LH, Ciuffreda D, Nseir G, et al. Monitoring of CD4+CD25<sup>high</sup>IL-7R $\alpha$ <sup>high</sup> activated T cells in kidney transplant recipients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2011 Aug 1;6(8):2025–33.
30. Afzali B, Edozie FC, Fazekasova H, Scottà C, Mitchell PJ, Canavan JB, et al. Comparison of regulatory T cells in hemodialysis patients and healthy controls: implications for cell therapy in transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(8):1396–405.