



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Nefrología



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL DR. IGNACIO MORONES PRIETO

TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE
NEFROLOGÍA

**“MEDICIÓN DE MICROPARTÍCULAS EN PLASMA Y ORINA
DURANTE EPISODIOS DE DAÑO RENAL AGUDO EN PACIENTES
TRASPLANTADOS”**

DR. KEISUKE ENRIQUE MIYAHARA OSUNA

SAN LUIS POTOSÍ S. L. P.

FEBRERO DE 2018



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Nefrología



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL DR. IGNACIO MORONES PRIETO

TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE
NEFROLOGÍA

**“MEDICIÓN DE MICROPARTÍCULAS EN PLASMA Y ORINA
DURANTE EPISODIOS DE DAÑO RENAL AGUDO EN PACIENTES
TRASPLANTADOS”**

DR. KEISUKE ENRIQUE MIYAHARA OSUNA

ASESORES: DR. EN CIENCIAS BIOMÉDICAS ROBERTO FIDENCIO
GONZÁLEZ AMARO

COASESOR: ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA Y NEFROLOGÍA
DR. JAIME ANTONIO BORJAS GARCÍA

SAN LUIS POTOSÍ S. L. P.

FEBRERO DE 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIDAD EN NEFROLOGÍA
TÍTULO DE TESIS
“MEDICIÓN DE MICROPARTÍCULAS EN PLASMA Y ORINA DURANTE
EPISODIOS DE DAÑO RENAL AGUDO EN PACIENTES TRASPLANTADOS”

PRESENTA
DR. KEISUKE ENRIQUE MIYAHARA OSUNA

Firmas

Asesor Dr. Roberto Fidencio González Amaro	
Co – asesor Especialista en Medicina Interna y Nefrología Dr. Jaime Antonio Borjas García	
Sinodales	
Especialista en Medicina Interna y Nefrología Dr. Francisco Aranda Verástegui	
Especialista en Medicina Interna y Nefrología Dr. Alejandro Chevaile Ramos	
Especialista en Medicina Interna y Nefrología Dr. Francisco Gerardo Alfaro Abúndiz	
M.C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefe del Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	Dr. Francisco Gerardo Alfaro Abúndiz Coordinador de la Especialidad en Nefrología



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Nefrología

RESUMEN

Aunque no es específica y su elevación es tardía al evento de lesión, creatinina sérica es el marcador de lesión renal más usado. El estándar para el estudio del paciente con deterioro en la función del injerto continua siendo biopsia renal, sin embargo es un método invasivo, costoso y relativamente riesgoso.

Las micropartículas son vesículas de 100 y 1000 nanómetros de diámetro, se generan durante activación celular, estrés, envejecimiento o apoptosis y se pueden aislar en plasma, líquido sinovial y orina. Las micropartículas conservan los receptores de superficie de la célula que les dio origen, lo que permite identificarlas.

En un estudio local se observó asociación entre conteo de micropartículas de leucocitos en suero y actividad de enfermedades inflamatorias autoinmunes. Dado que las células que participan en daño al injerto son similares, llevamos a cabo este estudio piloto en el que medimos micropartículas derivadas de leucocitos y endotelio en sangre y orina de 13 pacientes trasplantados renales. Durante el seguimiento 8 tuvieron eventos de lesión renal aguda y 5 cursaron libres de eventos de lesión. Observamos que en pacientes sin eventos de lesión renal con afección endotelial como rechazo o NTA, las micropartículas derivadas de Endotelio CD62e disminuyeron post trasplante.

La etiología más frecuente de lesión renal fue rechazo, 3 pacientes con rechazo humoral y 1 celular. En todos ellos se observó elevación de micropartículas en orina derivadas de leucocitos. Dos pacientes con rechazo humoral elevaron en suero micropartículas derivadas de Endotelio CD62e y Linfocitos B CD19, líneas celulares de interés pues participan directamente en la fisiopatogenia del rechazo. Al agrupar a todos los pacientes con daño renal intrínseco por rechazo celular-humoral y NTA observamos en todos ellos elevación de micropartículas de leucocitos en orina.

Aunque es necesario realizar un estudio que incluya más pacientes para poder observar el comportamiento de micropartículas durante eventos de lesión renal, las observaciones de este estudio sugieren que el análisis de micropartículas en orina puede convertirse en un biomarcador valioso para el estudio del paciente trasplantado con deterioro en la función del injerto.

1. Tabla de Contenidos

2.	ANTECEDENTES	9
2.1	GENERALIDADES	9
2.2	EL PROCESO DE FORMACIÓN DE MICROPARTÍCULAS.....	10
2.3	MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	10
2.4	MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES EN TRASPLANTE RENAL	12
2.5	MICROPARTÍCULAS EN ORINA	13
2.6	MICROPARTÍCULAS EN ORINA PARA EL ESTUDIO DE LESIÓN RENAL AGUDA... 14	
2.7	MICROPARTÍCULAS COMO BIOMARCADORES DE DAÑO EN TRASPLANTE RENAL	14
3.	JUSTIFICACIÓN	17
4.	HIPÓTESIS	18
5.	OBJETIVOS.....	18
5.1	OBJETIVO PRINCIPAL	18
5.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	18
6.	SUJETOS Y MÉTODOS	18
6.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	18
6.2	LUGAR Y DURACIÓN.....	18
7.	UNIVERSO, UNIDADES DE OBSERVACIÓN, MÉTODOS DE MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	19
7.1	UNIVERSO	19
7.2	UNIDAD DE OBSERVACIÓN	19
7.3	TAMAÑO DE LA MUESTRA	19
7.4	CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	19
7.5	VARIABLES DEL ESTUDIO	19
7.6	RECLUTAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES	21
7.7	TOMA DE MUESTRAS DURANTE EVENTOS DE LESIÓN RENAL AGUDA	21
7.8	AISLAMIENTO DE MICROPARTÍCULAS	21
7.9	ANÁLISIS CON CITOMETRÍA DE FLUJO	22
7.11	ORGANIZACIÓN.....	23
7.12	RECURSOS HUMANOS.....	23
7.13	RECURSOS MATERIALES.....	23
7.14	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	23
7.15	FINANCIAMIENTO	23
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23



9.	ASPECTOS ÉTICOS	24
10.	RESULTADOS	25
10.1	Características clínicas.....	25
10.2	Inmunosupresión.....	26
10.3	Eventos de lesión renal aguda post trasplante.....	26
10.4	Niveles de micropartículas endoteliales pre y post trasplante.....	27
10.5	Niveles de micropartículas en episodios de infección urinaria.....	28
10.6	Niveles de micropartículas en eventos de rechazo humoral.....	30
10.7	Niveles de micropartículas en rechazo celular.....	34
10.8	Micropartículas durante lesión renal obstructiva.....	36
10.9	Niveles de micropartículas en necrosis tubular aguda por tacrolimus.....	38
11.	DISCUSIÓN	40
12.	LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	42
13.	CONCLUSIONES	43
14.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
15.	ANEXOS.....	46
15.1	Cronograma de actividades.....	46
15.2	Hoja de recolección de datos en la clínica.....	47
15.3	Hoja de recolección de datos en el laboratorio.....	48
15.4	Consentimiento Informado.....	49

Tablas

Tabla 1:	Marcadores de superficie asociados a origen celular.....	9
Tabla 2:	Categorización de las variables.....	19
Tabla 3:	Características clínicas de pacientes con trasplante renal.....	25
Tabla 4:	Causas de lesión renal aguda.....	26
Tabla 5:	Niveles séricos de micropartículas endoteliales CD62e en los periodos pre y post trasplante.....	27
Tabla 6:	Niveles séricos de micropartículas durante episodios de infección urinaria.....	28
Tabla 7:	Niveles de micropartículas en orina durante episodios de infección urinaria.....	28
Tabla 8:	Niveles séricos de micropartículas durante rechazo humoral.....	30
Tabla 9:	Niveles de micropartículas en orina durante rechazo humoral.....	32
Tabla 10:	Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con rechazo celular.....	34
Tabla 11:	Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con trasplante renal complicado con hidronefrosis.....	36
Tabla 12:	Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con necrosis tubular aguda.....	38



Gráficas

Gráfica 1: Niveles séricos de micropartículas endoteliales CD62e en los periodos pre y post trasplante ..	27
Gráfica 2: Niveles séricos de micropartículas durante episodios de infección urinaria.....	29
Gráfica 3: Niveles de micropartículas en orina durante episodios de infección urinaria.....	29
Gráfica 4: Niveles séricos de micropartículas durante rechazo humoral	31
Gráfica 5: Niveles de micropartículas en orina durante rechazo humoral	33
Gráfica 6: Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con rechazo celular	35
Gráfica 7: Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con hidronefrosis.....	37
Gráfica 8: Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con trasplante renal y necrosis tubular aguda	39

Abreviaciones

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ERC: Enfermedad renal crónica

FC: Ficoeritrina

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GNM FyS: Glomerulonefritis focal y segmentaria

HLA: Complejo mayor de histocompatibilidad

HCIMP: Hospital central Ignacio Morones Prieto

KDIGO: Consorcio para la mejoría en los desenlaces globales en enfermedad renal crónica

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NOM: Norma oficial mexicana

PBS: Tampón fosfato salino

TFG: Tasa de filtración glomerular

2. ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES

La búsqueda de marcadores confiables y clínicamente significativos, capaces de predecir y detectar rechazo del injerto en pacientes trasplantados es motivo de investigación reciente. Debido a que el estudio directo del funcionamiento biológico de las células es invasivo, costoso e impráctico, los biomarcadores parecen ser una alternativa confiable para identificar eventos patológicos, evaluar el riesgo de enfermedad y la respuesta a tratamientos farmacológicos (1).

Las micropartículas son una población heterogénea de vesículas que miden entre 100 y 1000 nanómetros de diámetro, la generación ocurre durante diferentes procesos biológicos en los que se incluyen activación celular, estrés, envejecimiento y apoptosis. Estas vesículas pueden ser detectadas en diferentes fluidos corporales incluyendo plasma, líquido sinovial y orina. Aunque las células que las generan son diversas, algunas de las más estudiadas son neutrófilos, células endoteliales, células dendríticas y plaquetas.

Las micropartículas contienen receptores de superficie, proteínas del citosol, ADN, mRNA y micro RNA derivados de la célula que les dio origen, lo que permite identificarlas (ver tabla 1).

Linfocitos T	Anexina V+CD3+
Linfocitos B	Anexina V+CD19+
Monocitos	Anexina V+CD14+
Plaquetas	Anexina V+CD41a+
Endotelio	Anexina V+CD62E+CD144+

Recientemente, se ha demostrado que estas micropartículas tienen funciones biológicas y son importantes en la comunicación intercelular, capaces de transferir moléculas bioactivas y modular diferentes fenómenos biológicos como la respuesta inmune, proliferación celular, angiogénesis y coagulación. Aunque las micropartículas pueden ser detectadas en población sana, se ha demostrado su incremento en situaciones de estrés y de inflamación.

Las micropartículas endoteliales se desprenden del endotelio durante procesos de activación o apoptosis y son consideradas marcadores de disfunción endotelial. Las micropartículas derivadas de leucocitos son capaces de inducir in vitro liberación de citocinas proinflamatorias con consecuencias funcionales relacionadas con amplificación y modulación de la respuesta inmune (2).

2.2 EL PROCESO DE FORMACIÓN DE MICROPARTÍCULAS

La activación celular ocasiona liberación de calcio intracelular desde el retículo endoplásmico, el aumento de calcio en el citosol desencadena la liberación en el citoplasma de calpaina, responsable de la disrupción de los filamentos del citoesqueleto. Finalmente estos cambios membranales generan la formación de deformidades en la membrana celular que culminan en la liberación de las micropartículas (3-4).

En apoptosis la célula sufre contracción, disrupción del contenido nuclear, fragmentación del DNA y liberación acelerada de micropartículas. La formación de micropartículas resulta de la contracción del citoesqueleto formado por actina-miosina mediado por caspasa 3. Las características de los lípidos y de las proteínas en la superficie de las micropartículas liberadas tienen relevancia biológica y clínica, por ejemplo la expresión de fosfatidil serina provee un sitio de fijación para factores de la coagulación, dando lugar a efectos pro coagulantes (5-6).

2.3 MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La activación del endotelio en el enfermo renal crónico esta mediada por diversos estímulos patológicos como: citocinas inflamatorias, factores de crecimiento, agentes infecciosos, lipoproteínas, estrés oxidativo y toxinas urémicas. Este conjunto de fenómenos son causales de disfunción endotelial y liberación de micropartículas a la circulación sistémica.

El estudio de disfunción endotelial en el enfermo renal crónico es muy importante pues es causal de aterosclerosis acelerada y enfermedad cardiovascular, principal factor de mortalidad en esta población.

El deterioro de la función endotelial ocurre en los primeros estadios de la enfermedad renal, cuando la tasa de filtrado glomerular disminuye y los niveles de tensión arterial se incrementan. La presencia de disfunción endotelial es por lo tanto un marcador adverso de riesgo cardiovascular (7).

En pacientes con enfermedad renal crónica, los niveles de micropartículas endoteliales pueden proveer información de utilidad acerca del funcionamiento endotelial, a su vez los niveles incrementados de micropartículas endoteliales también tienen efectos deletéreos al acelerar la disfunción vascular preexistente. Se ha demostrado en enfermos renales crónicos que las micropartículas de origen endotelial interfieren en la vasodilatación mediada por óxido nítrico en las células endoteliales vasculares, lo que sugiere un papel de las micropartículas endoteliales en mecanismos de disfunción endotelial (8).

El índice de grosor intima-media en la carótida, así como la velocidad de la onda de pulso en la arteria carótida y femoral son indicadores de aterosclerosis temprana. El incremento en la circulación de micropartículas endoteliales está estrechamente relacionado con la aparición de aterosclerosis y rigidez capilar. Ambos, el índice de grosor íntima-media y la velocidad de onda de pulso se incrementaron en una población de pacientes pediátricos con enfermedad renal crónica y correlacionaron con niveles elevados de micropartículas endoteliales CD144+ y CD146+ (9).

Faure et al midieron los niveles de micropartículas endoteliales en enfermos renales crónicos pre diálisis y en hemodiálisis, adicionalmente examinaron la capacidad de las toxinas urémicas de liberar micropartículas en cultivos de células endoteliales de vena umbilical de humano. En este estudio demostraron que los niveles de micropartículas endoteliales CD 144+ y CD 146+ pre diálisis y en hemodiálisis fueron superiores al compararlos con controles sanos. También encontraron que las toxinas urémicas indujeron de manera significativa la liberación de micropartículas endoteliales. Adicionalmente describieron que los niveles de las micropartículas no disminuyeron después de hemodiálisis (10).

La relación de las toxinas urémicas indoxil sulfato y p-cresol en la producción y liberación de micropartículas también ha sido descrita en estudios in vitro de cultivos de

células endoteliales. Indoxil sulfato y p-cresol inducen la producción de micropartículas mediante la interacción con el citoesqueleto celular de la célula endotelial (10).

2.4 MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES EN TRASPLANTE RENAL

La sobrevivencia de los pacientes post trasplantados renales supera a la de aquellos que permanecen en diálisis. La disfunción endotelial observada en pacientes en diálisis mejora una vez ocurre el trasplante, esto debido al mejoramiento de diversos factores de riesgo cardiovascular como anemia, sobrecarga de volumen, toxinas urémicas y estrés oxidativo. La reducción de factores de riesgo cardiovascular y la recuperación de la función renal en pacientes trasplantados se postulan como factores que disminuyen la activación celular y la liberación de micropartículas endoteliales (11).

Para comprobar estas observaciones, se realizó un estudio en una población de 213 pacientes sometidos a trasplante renal y 14 pacientes con trasplante páncreas-riñón. Se midieron los niveles séricos de micropartículas endoteliales antes y de manera periódica a los días 7, 14 y 21 post trasplante y se compararon con los niveles séricos de los donadores sanos. En este estudio se observó que los pacientes con diabetes mellitus, uropatía obstructiva y lesión autoinmune como causa de la enfermedad renal crónica mostraron disminución en los niveles de micropartículas endoteliales medidas en sangre 2 semanas posteriores al implante del injerto. Aunque las mediciones de este estudio no se realizaron a un intervalo mayor a 2 meses de tiempo, estudios en poblaciones menores de pacientes con un año de seguimiento han mostrado tendencias similares (12).

El rechazo humoral, celular o mixto es una de las principales causas de la pérdida del injerto renal. Es bien conocido que el endotelio es el principal blanco de ataque inmunológico que debe ser detectado de manera temprana para establecer un tratamiento efectivo y limitar el daño. Desafortunadamente la creatinina sérica es un biomarcador no específico y la biopsia renal es un método diagnóstico invasivo y costoso (13).

Qamri et al midieron los niveles de micropartículas endoteliales en plasma sanguíneo pre trasplante y de manera periódica post trasplante renal, los días 7, 14, 21 y 2 meses después. En este estudio demostraron que los niveles disminuyeron significativamente posterior al trasplante renal. En el seguimiento posterior observaron que el incremento de los niveles de micropartículas endoteliales séricas se asoció a rechazo. Cuando clasificaron los pacientes con tinción capilar peritubular C4D positiva observaron que los niveles de micropartículas endoteliales disminuyeron más lentamente posterior al tratamiento, posiblemente por lesión endotelial mediada por anticuerpos anti-HLA. Con los resultados de este estudio se puede deducir que la medición de los niveles de micropartículas endoteliales en pacientes trasplantados pudiera proveer información valiosa sobre el endotelio vascular ante la presencia de un evento de rechazo (13).

2.5 MICROPARTÍCULAS EN ORINA

La presencia de micropartículas se ha identificado en plasma y diversos fluidos corporales, en orina las micropartículas se considera son originadas de células que componen la nefrona, con una contribución mínima de las células que revisten el epitelio urinario bajo.

El análisis proteómico de las micropartículas urinarias ha demostrado proteínas membranales y del citosol, derivados de células epiteliales tubulares de distintos segmentos de la nefrona así como de podocitos. Dado que las micropartículas están compuestas de proteínas y ácidos nucleicos que posiblemente tengan actividades biológicas y funcionen como mensajeras del estado fisiológico-patológico de las células que revisten la nefrona, pueden proveer información cualitativa y cuantitativa del funcionamiento renal.

Debido a que la orina es un fluido fácil de obtener y su recolección no implica métodos invasivos, el descubrimiento de las micropartículas ha abierto un nuevo campo de investigación. Las aplicaciones en el campo clínico son diversas incluyendo métodos de diagnóstico, pronóstico y biomarcadores para seguir la respuesta a diversos tratamientos en enfermedades tubulares y glomerulares (14).

2.6 MICROPARTÍCULAS EN ORINA PARA EL ESTUDIO DE LESIÓN RENAL AGUDA

Lesión renal aguda es una entidad frecuente en pacientes hospitalizados, cuando ocurre está ligada a un aumento significativo de morbimortalidad. Lamentablemente la creatinina sérica no se eleva de forma temprana para poder ser empleada como biomarcador ideal. En un estudio llevado a cabo en 68 pacientes en terapia intensiva, se empleó como biomarcador la búsqueda de micropartículas con expresión del intercambiador sodio hidrogeniones tipo 3 (NHE3). La presencia de estas micropartículas permitió diferenciar de manera más eficaz azoemia prerenal, necrosis tubular aguda y otras causas de falla renal que el empleo de los índices urinarios clásicos fracción excretada de sodio y urea (15).

2.7 MICROPARTÍCULAS COMO BIOMARCADORES DE DAÑO EN TRASPLANTE RENAL

Después del trasplante renal de donador fallecido, el daño por isquemia reperfusión del injerto ocasiona necrosis tubular aguda y retardo en la función del injerto. Esta complicación se presenta hasta en el 25% de los receptores de trasplante renal. El abordaje actual para el diagnóstico de esta complicación y el diferencial de otras entidades potencialmente severas como rechazo, está basado en la realización de biopsia renal. Contar con herramientas de diagnóstico no invasivas para evaluar daño renal y la capacidad de regeneración sería útil para guiar acciones terapéuticas efectivas (17).

En el riñón humano se han identificado mecanismos intrínsecos de reparación y regeneración tisular que se activan después de lesión isquémica, inflamatoria y tóxica. Evidencia reciente ha mostrado la expresión de células progenitoras CD133+ en diferentes segmentos de la nefrona localizadas en cápsula de Bowman, túbulo proximal y papila medular. Adicionalmente se ha demostrado que el número de células CD133+ se incrementan en la corteza renal posterior a modelos de lesión renal aguda, demostrando su papel en reparación tisular después de lesión. En pacientes con retardo en la función del injerto se ha demostrado también incremento de células CD133+ en túbulo renal en respuesta a lesión por isquemia (18).

Debido a que células CD133+ residentes en la nefrona hipotéticamente pudieran liberar micropartículas CD133+, y la presencia de estas micropartículas en la orina proveer información sobre el estado fisiopatológico del riñón o su capacidad de regeneración, se realizó un estudio para caracterizar las micropartículas urinarias CD133+ en sujetos sanos, en pacientes con ERC-5 con diuresis residual y por último en pacientes trasplantados renales con función inmediata del injerto y con retardo en la función.

En este estudio se demostró la presencia de micropartículas CD133+ en orina de pacientes sanos, no así en pacientes con diuresis residual en ERC-5 en quienes se piensa que el grado de desgaste orgánico terminó con la población de las células CD133+. Para demostrar que estas variaciones no se producen por una menor producción del total de micropartículas urinarias, se realizó un control con medición de micropartículas CD24+ encontrando niveles similares en ambos grupos. Se describió también que la concentración urinaria y la tasa de filtrado glomerular no interfirieron con la producción y recuperación en orina de las micropartículas.

En pacientes trasplantados los niveles se midieron a los días 1 y 7 y se demostró la presencia de micropartículas CD133+ desde el primer día del evento quirúrgico. Para demostrar el origen de estas micropartículas del injerto trasplantado se sometieron a tinción con anticuerpos anti HLA clase I para reconocer antígenos específicos del donador.

Retrospectivamente los pacientes trasplantados fueron divididos en dos grupos, función inmediata del injerto (creatinina $<3\text{mg/dL}$ al día 3) vs retardo en la función del injerto (creatinina $>3\text{mg/dL}$ al día 3). Al día 1 los niveles de las micropartículas CD133+ fueron menores en el grupo con retardo en la función del injerto aunque no de manera significativa. Al día 7 el incremento en los niveles de las micropartículas CD133+ fue significativo solo en el grupo con retardo en la función del injerto. Estos hallazgos orientan a pensar que las micropartículas CD133+ reflejan la actividad de las células progenitoras CD133+ en el riñón y su participación en la regeneración de tejido posterior a daño por isquemia-reperfusión (19).

Finalmente en un ensayo realizado en 55 pacientes con artritis reumatoide y 14 pacientes con lupus eritematoso sistémico, se analizó la proporción de diferentes micropartículas recolectadas en plasma-orina y se estudió su relación con actividad de la



enfermedad y respuesta al tratamiento y se compararon con 20 sujetos sanos. En este estudio se detectó que las proporciones de distintos tipos de micropartículas anexina V+ CD3+, CD14+, CD19+, CD41+ y CD62E+ en plasma y CD14+, CD3+ y CD19+ en orina se encontraban incrementadas en pacientes con artritis reumatoide y un índice de actividad DAS28 >5.1. Los niveles disminuyeron significativamente 4 semanas posteriores al tratamiento inmunosupresor lo que sugiere que estos biomarcadores pueden resultar útiles para monitorizar la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Como hallazgo interesante en este estudio, se encontraron micropartículas derivadas de leucocitos en orina tanto de los sujetos sanos como de los pacientes con artritis reumatoide y lupus. Aunque no se apreciaron diferencias significativas en los niveles de estas micropartículas entre sujetos sanos y con artritis reumatoide y lupus, si se apreciaron diferencias significativas en los niveles de las micropartículas en orina CD14+, CD3+ y CD19+ en los pacientes con artritis reumatoide con índice de actividad alto y bajo (20).

3. JUSTIFICACIÓN

Las células endoteliales y los leucocitos son dos protagonistas importantes en la patogénesis de la disfunción y rechazo del injerto en pacientes con trasplante renal. El reconocimiento del antígeno y posteriormente la activación leucocitaria son eventos obligados en la fisiopatogenia del rechazo del injerto. Adicionalmente, el endotelio es uno de los principales blancos de ataque por el sistema inmune, sobre todo si es del tipo humoral.

Las micropartículas son vesículas conformadas por fragmentos de membranas y lipoproteínas idénticas a las de las células que les dieron origen. La producción de micropartículas se incrementa durante procesos de activación, lesión y estrés. Distintos trabajos han mostrado la utilidad de micropartículas derivadas de leucocitos como marcador de actividad en enfermedades autoinmunes así como también de micropartículas derivadas de endotelio asociadas a daño y disfunción endotelial.

4. HIPÓTESIS

Las micropartículas derivadas de leucocitos y endotelio obtenidas en sangre y orina se incrementan durante lesión renal aguda en el paciente con trasplante renal.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Medir los niveles de micropartículas derivadas de leucocitos, plaquetas y endotelio en sangre y orina durante eventos de lesión renal aguda, en pacientes con trasplante renal.

5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

Evaluar la ocurrencia de lesión renal aguda en una cohorte de pacientes post trasplantados.

Categorizar a los pacientes con lesión renal aguda de acuerdo a la etiología causal
Establecer asociación entre proporción y elevación de micropartículas en orina/suero y la ocurrencia de lesión renal por etiologías específicas.

6. SUJETOS Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Pílogo.

6.2 LUGAR Y DURACIÓN

Pacientes atendidos en el servicio de trasplantes del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” durante los meses de Febrero a Diciembre de 2017.

7. UNIVERSO, UNIDADES DE OBSERVACIÓN, MÉTODOS DE MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

7.1 UNIVERSO

Pacientes entre 18 y 60 años con diagnóstico de enfermedad renal crónica KDIGO estadio 5, trasplantados en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

7.2 UNIDAD DE OBSERVACIÓN

Pacientes adultos receptores de trasplante renal.

7.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Debido al diseño del estudio y con referencia en el trabajo de Browne (20). Se calculó un tamaño de muestra de 30 pacientes.

7.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes adultos con diagnóstico de enfermedad renal crónica en estadio KDIGO 5 y edades entre 18 y 60 años sometidos a trasplante renal de donador vivo o fallecido en el Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

7.5 VARIABLES DEL ESTUDIO

<i>Tabla 2: Categorización de las variables</i>		
Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable
EDAD: Tiempo que ha vivido un ser vivo.	Número de años cumplidos según fecha de nacimiento	CUANTITATIVA
SEXO: Rasgo inherente de cada persona según sea masculino o femenino.	Sexo de asignación fenotípico.	NOMINAL DICOTÓMICA Con los valores: Masculino. Femenino.

<p>ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA:</p> <p>Disminución de la función renal, expresada por una tasa de filtración glomerular TFG <60 ml/min/1.73 m² o como la presencia de daño renal (alteraciones histológicas, albúmina-proteinuria, alteraciones del sedimento urinario o alteraciones en pruebas de imagen) de forma persistente durante al menos 3 meses.</p>	<p>Disminución de la función renal, expresada por una tasa de filtración glomerular TFG <60 ml/min/1.73 m² o como la presencia de daño renal (alteraciones histológicas, albúmina-proteinuria, alteraciones del sedimento urinario o alteraciones en pruebas de imagen) de forma persistente durante al menos 3 meses.</p>	<p>NOMINAL</p> <p>Con los valores:</p> <p>Estadio 1. ≥ 90 ml/min/1.73 m² Estadio 2. 60-89 ml/min/1.73 m² Estadio 3a. 45-59 ml/min/1.73 m² Estadio 3b. 30-44 ml/min/1.73 m² Estadio 4. 15-29 ml/min/1.73 m² Estadio 5. <15 ml/min/1.73 m²</p>
<p>TRASPLANTE RENAL:</p> <p>Es el trasplante de un riñón en un paciente con enfermedad renal avanzada. Dependiendo de la fuente del órgano receptor, el trasplante de riñón es típicamente clasificado como de donante fallecido o como trasplante de donante vivo</p>	<p>Es el trasplante de un riñón en un paciente con enfermedad renal avanzada. Dependiendo de la fuente del órgano receptor, el trasplante de riñón es típicamente clasificado como de donante fallecido o como trasplante de donante vivo</p>	<p>NOMINAL DICOTÓMICA</p> <p>Con los valores:</p> <p>Donador fallecido.</p> <p>Donador vivo.</p>
<p>INDUCCIÓN PRETRASPLANTE:</p> <p>Es el tratamiento inmunosupresor a base de anticuerpos mono o policlonales dirigidos contra linfocitos o citocinas empleado en pacientes con riesgo inmunológico por historia de alosensibilización</p>	<p>Tratamiento inmunosupresor a base de anticuerpos mono o policlonales dirigidos contra linfocitos o citocinas empleado en pacientes con riesgo inmunológico por historia de alosensibilización</p>	<p>NOMINAL DICOTÓMICA</p> <p>Con los valores:</p> <p>Timoglobulina</p> <p>Basiliximab</p>
<p>MICROPARTÍCULAS:</p> <p>Vesículas con tamaños entre 100 y 1000 nanómetros de diámetro, generadas de diversas estirpes celulares durante procesos de activación celular, estrés, envejecimiento y apoptosis.</p>	<p>Vesículas con tamaños entre 100 y 1000 nanómetros de diámetro, generadas de diversas estirpes celulares durante procesos de activación celular, estrés, envejecimiento y apoptosis.</p>	<p>NOMINAL</p> <p>Con los valores:</p> <p>Micropartículas de linfocitos T Micropartículas de linfocitos B Micropartículas de monocitos Micropartículas de plaquetas Micropartículas del endotelio</p>
<p>LESIÓN RENAL AGUDA:</p> <p>Incremento en 1.5 o más veces la creatinina basal o absoluto ≥ 0.3mg/dL en un paciente con función renal previamente conocida y estable</p>	<p>Incremento en 1.5 o más veces la creatinina basal o absoluto ≥ 0.3mg/dL en un paciente con función renal previamente conocida y estable</p>	<p>NOMINAL DICOTÓMICA.</p> <p>Con los Valores:</p> <p>Presente. Ausente.</p>

7.6 RECLUTAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES

Durante el operativo de trasplante renal, previo al evento quirúrgico se solicitó al receptor su participación, se explicó y entregó consentimiento informado y se solicitó su autorización. Durante la venopunción para la toma de laboratorios pre quirúrgicos se obtuvo de forma adicional 15ml de sangre venosa para el procesamiento de micropartículas pre trasplante. Al cumplirse 21 días del evento quirúrgico, se extrajeron 15 ml de sangre venosa y 20 ml de orina adicionales a la toma de exámenes de seguimiento del paciente trasplantado. Cuando no ocurrieron eventos de lesión renal aguda se extrajeron 15 ml de sangre venosa y 20 ml de orina al cumplirse tres meses post trasplante.

7.7 TOMA DE MUESTRAS DURANTE EVENTOS DE LESIÓN RENAL AGUDA

En pacientes con criterios de lesión renal aguda, se extrajeron 15 ml de sangre venosa y 20 ml de orina adicionales a la toma de exámenes protocolizados del paciente con deterioro de la función del injerto. Los exámenes de sangre y orina fueron enviados y procesados inmediatamente después de su recolección en el laboratorio de inmunología.

7.8 AISLAMIENTO DE MICROPARTÍCULAS

A partir de 15 ml de sangre venosa periférica se obtuvo plasma libre de células por centrifugación a 1100 rpm por 20 min. El plasma libre de células se sometió a 4 centrifugaciones consecutivas (1 a 2500 rpm/20 minutos, 2 a 2600rpm/20 minutos y 1 a 14,000 rpm/2min) con eliminación de una tercera parte del sobrenadante en las primeras tres centrifugaciones y eliminación total del sobrenadante de la cuarta. El pellet obtenido correspondiente a las micropartículas aisladas, fue re suspendido en buffer de unión a Anexina V.

En el caso de las micropartículas provenientes de orina, se les pidió a los pacientes recolectar 20 ml de la primera orina de la mañana en los días antes señalados, el procedimiento a seguir fue el antes descrito.

7.9 ANÁLISIS CON CITOMETRÍA DE FLUJO

Las micropartículas se marcaron con anexina V identificada con FITC más uno de los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con PE, anti-CD3 (linfocitos T), -CD14 (monocitos), -CD19 (células B), -CD41a (plaquetas) y -CD62E (endoteliales), éste último también fue marcado con anti-CD144-APC (endoteliales), durante 30 minutos en oscuridad, pasado este tiempo se lavaron con buffer de unión a Anexina V o PBS y se analizaron en el citómetro Accuri, usando el software Accuri C6.

Para establecer los parámetros de tamaño de las micropartículas para ser analizadas, se utilizaron perlas de poliestireno de 0.2 y 1.0 μm que se observaron en un dot-plot utilizando forward contra side-scatter. Se adquirió toda la muestra a velocidad lenta, del total de eventos registrados se identificaron como micropartículas de nuestro interés a las Anexina-V positivas, así como al anticuerpo correspondiente unido a PE y APC. Como control se utilizaron dos tubos con muestra sin marcar con anticuerpos con PE, pero uno solo si tendrá Anexina-V-FITC.

7.10 RECOLECCIÓN DE DATOS

Para la recolección de datos durante el reclutamiento y seguimiento de los pacientes en la clínica se utilizó la hoja de recolección de datos que se muestra en el anexo 15.2. Para el registro de los datos obtenidos del conteo de micropartículas por el citómetro de flujo se empleó la hoja de recolección de datos que se muestra en el anexo 15.3.

No fue posible completar el total de la muestra proyectada por desabasto de los marcadores inmunológicos necesarios para la identificación de las micropartículas. En total se reclutaron 17 pacientes de los cuales:

1 Paciente abandonó seguimiento.

En 3 pacientes no se pudieron procesar las muestras subsecuentes post trasplante por desabasto de los insumos necesarios.

En total 13 pacientes completaron seguimiento a 1 año.

7.11 ORGANIZACIÓN

7.12 RECURSOS HUMANOS

Dr. Keisuke Enrique Miyahara Osuna: Estudio clínico y selección de los pacientes incluidos en el proyecto, seguimiento de la evolución de los pacientes trasplantados, evaluación diagnóstica de los pacientes trasplantados con criterios de lesión renal aguda, selección de los pacientes que requirieron ser muestreados en episodios de lesión renal aguda, obtención de las muestras clínicas correspondientes y elaboración del análisis e interpretación de los resultados.

LN. Norma Alejandra Mendoza Pérez: Recogida de muestras clínicas, aislamiento de micropartículas, marcaje de las mismas con anexina V y anticuerpos monoclonales, análisis multiparamétrico por citometría de flujo, análisis de resultados, elaboración de gráficas y elaboración del manuscrito.

7.13 RECURSOS MATERIALES

Computadora personal del investigador principal, material común de papelería, tubos de recolección de sangre, frascos de recolección de orina. Anticuerpos monoclonales marcados con PE: anti CD3, CD14, CD19, CD41a y CD62E (BD Biosciences, San Jose, California EEUA). Citómetro de flujo (Becton Dickinson, San Jose California EEUA) con software CellQuest (Becton Dickinson).

7.14 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Ver anexo 15.1.

7.15 FINANCIAMIENTO

Interno: Fondos propios del departamento de Inmunología de la facultad de Medicina-CICSaB, obtenidos por servicios externos.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

8.1 Se realizaron pruebas de normalidad por análisis de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene.

8.2 En caso de cumplir con requisitos para prueba paramétrica se realizó un ANOVA de medidas repetidas o T de student pareada.

8.3 Para el caso de un análisis no paramétrico, se realizó la prueba de Friedman o Wilcoxon.

8.4 Se tomó como estadísticamente significativa una $p < 0.05$

9. ASPECTOS ÉTICOS

9.1 Dado que es un estudio en el cual se obtuvo información sólo de muestras sanguíneas y de orina protocolizadas durante el estudio habitual del paciente, se consideró investigación con riesgo mínimo de acuerdo a lo establecido en la ley general de salud en materia de investigación para la salud título segundo, capítulo I, artículo 17. Los residuos generados del procesamiento de micropartículas fueron tratados y desechados de acuerdo a la NOM 087.

9.2 El estudio no violó los derechos de los pacientes, los exámenes realizados fueron los considerados por el médico tratante como los necesarios.

9.3 Aunque se obtuvo acceso al expediente clínico del paciente, los investigadores se comprometieron a mantener la información personal de los pacientes de manera confidencial. Sólo la información en conjunto fue publicada.

Sin embargo, siguiendo las recomendaciones de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, en el Reglamento de la Ley en Materia de Investigación para la Salud, Capítulo Único, Título Segundo, Artículos 13, 14, 16, 17, 20, 21 y 22; se sometió el protocolo para revisión por parte del Comité de Ética en Investigación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” obteniendo aprobación para su realización y número de registro 69-17. Por último, se solicitó la autorización del paciente mediante la firma de consentimiento informado que se incluye en el anexo 15.4.

10. RESULTADOS

10.1 Características clínicas.

Se analizaron un total de 13 pacientes que acudieron al servicio de Nefrología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” para recibir trasplante renal entre Febrero y Diciembre de 2017. Las características clínicas de la población se describen en la Tabla 3.

<i>Tabla 3: Características clínicas de pacientes con trasplante renal atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP</i>	
<i>Característica</i>	<i>Número (N=13)</i>
<i>Género femenino (%)</i>	2 (15.4)
<i>Género masculino (%)</i>	11 (84.6)
<i>Edad mediana (min-máx.)</i>	28.5 (17-60)
<i>Diabetes (%)</i>	1 (7.6)
<i>Hipertensión (%)</i>	13 (100)
<i>Causa de la enfermedad renal crónica</i>	
<i>Desconocida (%)</i>	9 (69.2)
<i>GNM FyS (%)</i>	3 (23)
<i>Nefropatía diabética (%)</i>	1 (7.6)
<i>Modalidad de terapia de reemplazo renal</i>	
<i>Hemodiálisis (%)</i>	8 (61.5)
<i>Diálisis Peritoneal (%)</i>	3 (23)
<i>Sin terapia de reemplazo renal (%)</i>	2 (15)
<i>Terapia de Inducción</i>	
<i>Timoglobulina (%)</i>	2 (15)
<i>Basiliximab (%)</i>	8 (61.5)
<i>Sin inducción (%)</i>	3 (23)
<i>Tipo de donación</i>	
<i>Donador fallecido (%)</i>	10 (76.9)
<i>Donador vivo (%)</i>	3 (23)

10.2 Inmunosupresión

El esquema de inmunosupresión consistió en terapia de inducción depletores con Timoglobulina a dosis de 1mg/kg/día por 3 dosis o Basiliximab a dosis de 20mg los días 0 y 4 de acuerdo al riesgo inmunológico determinado por el protocolo interno de tratamiento. Cuando no existió historia de alo sensibilización y el panel reactivo de anticuerpos fue menor al 20% se obvió el empleo de inducción.

Al iniciar la vía oral todos los pacientes recibieron tratamiento inmunosupresor de mantenimiento a base de tacrolimus, las metas de niveles séricos fueron de 10-15ng/ml los primeros 3 meses y 6-8ng/ml los meses subsecuentes, micofenolato de mofetilo 500mg cada 12 horas y esquema de esteroide 1gr de metilprednisolona en quirófano y prednisona 2mg/kg los días 1 y 2, 1.5mg/kg los días 3 y 4, 1mg/kg los días 5 y 6, .8mg/kg los días 7 y 8 y en dosis reducción 2.5 mg por semana hasta llegar a 10mg durante 6 meses, posteriormente se mantuvo en 5mg al día de forma subsecuente.

10.3 Eventos de lesión renal aguda post trasplante

Durante el seguimiento 5 pacientes cursaron con evolución post trasplante sin eventualidades, en 8 pacientes ocurrieron eventos de lesión renal aguda secundaria a diversas etiologías como se detalla en la Tabla 4.

<i>Tabla 4: Causas de lesión renal aguda en pacientes con trasplante renal atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP</i>	
<i>Causa</i>	<i>Número (N=8)</i>
<i>Infeción urinaria</i>	2
<i>Rechazo humoral</i>	3
<i>Rechazo celular</i>	1
<i>NTA secundaria a tacrolimus</i>	1
<i>Hidronefrosis</i>	1

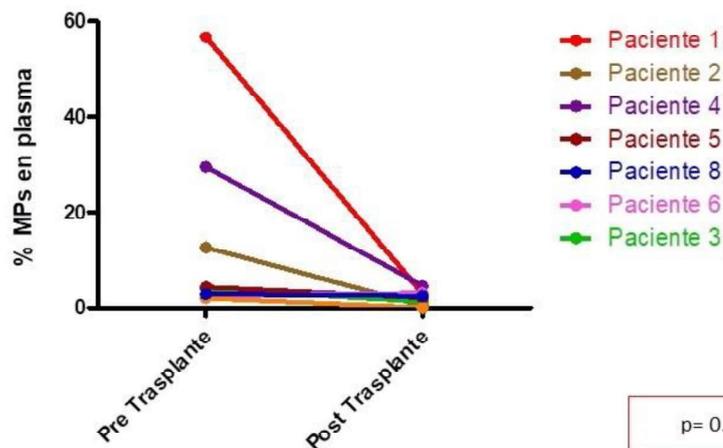
10.4 Niveles de micropartículas endoteliales pre y post trasplante

Al excluir a los pacientes con daño endotelial por eventos de rechazo humoral-celular y necrosis tubular aguda por tacrolimus, se observó disminución en la proporción de micropartículas CD62e derivadas de endotelio entre el periodo pre y post trasplante, los cambios más significativos sucedieron en los pacientes con niveles más altos pre trasplante $P=0.0234$, ver Tabla 5 y Gráfica 1.

Tabla 5: Niveles séricos de micropartículas endoteliales CD62e en los periodos pre y post trasplante de pacientes atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP

Numero de paciente	Pre trasplante	Post trasplante
Paciente 1	56.7	2.9
Paciente 2	12.6	0.46
Paciente 3	4.08	1.34
Paciente 4	29.5	4.55
Paciente 5	4.33	2.12
Paciente 6	2.49	3.1
Paciente 7	2.03	0.04
Paciente 8	2.86	2.46

Gráfica 1: Niveles séricos de micropartículas endoteliales CD62e en los periodos pre y post trasplante de pacientes atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP



10.5 Niveles de micropartículas en episodios de infección urinaria

Dos pacientes cursaron con deterioro en la función del injerto debido a infección urinaria confirmada por urocultivo. Solamente se observó elevación significativa de micropartículas de leucocitos en suero de un paciente $P=0.0297$. Tabla 6 y Gráfica 2.

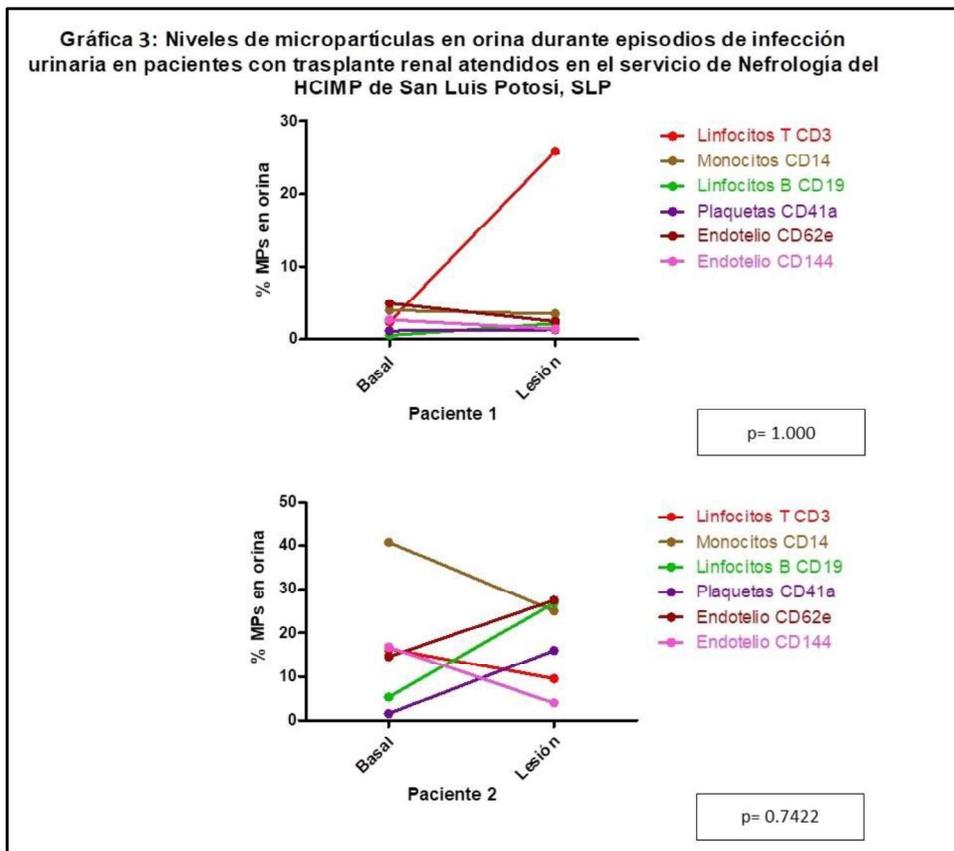
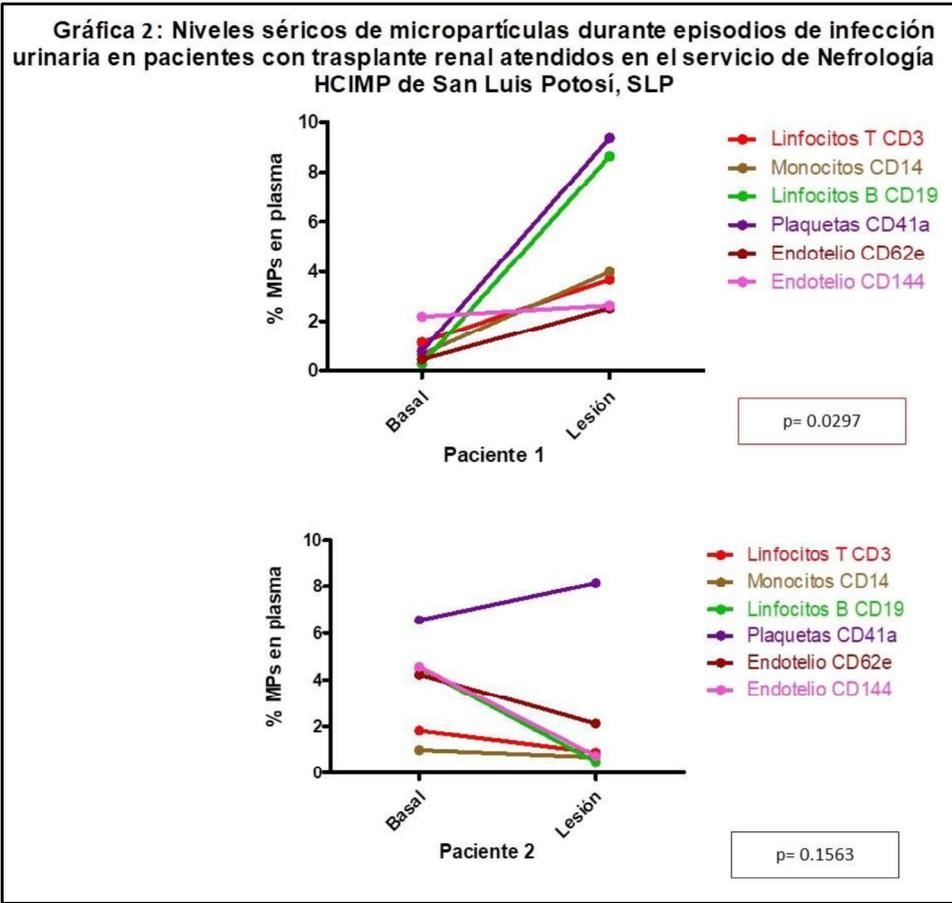
Tabla 6: Niveles séricos de micropartículas durante episodios de infección urinaria en pacientes con trasplante renal atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP

<i>Marcador celular y tiempo de toma de la muestra</i>	<i>Paciente 1</i>		<i>Paciente 2</i>	
	<i>Basal</i>	<i>Lesión</i>	<i>Basal</i>	<i>Lesión</i>
<i>Linfocitos T CD3</i>	1.14	3.68	1.81	0.88
<i>Monocitos CD14</i>	0.66	3.99	0.99	0.68
<i>Linfocitos B CD19</i>	0.28	8.65	4.5	0.49
<i>Plaquetas CD41a</i>	0.78	9.39	6.56	8.15
<i>Endotelio CD62e</i>	0.46	2.52	4.22	2.12
<i>Endotelio CD144</i>	2.19	2.63	4.55	0.74

En orina ocurrieron elevaciones no significativas en micropartículas de linfocitos B CD19 y plaquetas CD41a. Tabla 7 y Gráfica 3.

Tabla 7: Niveles de micropartículas en orina durante episodios de infección urinaria en pacientes con trasplante renal atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP

<i>Marcador celular y tiempo de toma de la muestra</i>	<i>Paciente 1</i>		<i>Paciente 2</i>	
	<i>Basal</i>	<i>Lesión</i>	<i>Basal</i>	<i>Lesión</i>
<i>Linfocitos T CD3</i>	2.42	25.9	16.4	9.52
<i>Monocitos CD14</i>	4.02	3.54	40.8	25.1
<i>Linfocitos B CD19</i>	0.58	2.22	5.31	26.9
<i>Plaquetas CD41a</i>	1.2	1.36	1.5	16
<i>Endotelio CD62e</i>	4.97	2.48	14.6	27.5
<i>Endotelio CD144</i>	2.71	1.46	16.8	3.97



10.6 Niveles de micropartículas en eventos de rechazo humoral

Tres pacientes cursaron con deterioro de la función del injerto por rechazo humoral confirmado por biopsia. Dos pacientes recuperaron función renal y uno progresó a pérdida del injerto y anuria, evento que impidió recolectar una muestra adecuada para su análisis. Las micropartículas que más se incrementaron en suero fueron derivadas de leucocitos en todos los pacientes y de endotelio CD62e, CD144 y linfocitos B CD19 de forma significativa en dos pacientes $P=0.0070$ y $P=0.0313$. En orina de dos pacientes, las micropartículas que se incrementaron fueron de linfocitos TCD3, un paciente mostró además elevación significativa en micropartículas de endotelio CD62e y linfocitos B CD19, $P=0.0313$. Ver Tabla 8 y Gráfica 4 para los niveles séricos y Tabla 9 y Gráfica 5 para los niveles en orina.

Tabla 8: Niveles séricos de micropartículas durante rechazo humoral en pacientes con trasplante renal atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP						
Marcador celular y tiempo de toma de la muestra	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3	
	Basal	Lesión	Basal	Lesión	Basal	Lesión
Linfocitos T CD3	2.14	7.8	5.66	28.2	0.7	7.84
Monocitos CD14	4.41	30.9	14.4	34.2	0.49	17.6
Linfocitos B CD19	0.79	0.18	4.06	21.9	0.26	49.5
Plaquetas CD41a	3.77	6.57	9.19	11.5	1.67	15.3
Endotelio CD62e	1.85	0.96	5.97	24.2	0.51	16.2
Endotelio CD144	3.21	0.48	4.12	10.8	0.4	13

Gráfica 4: Niveles séricos de micropartículas durante rechazo humoral en pacientes con trasplante renal atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP

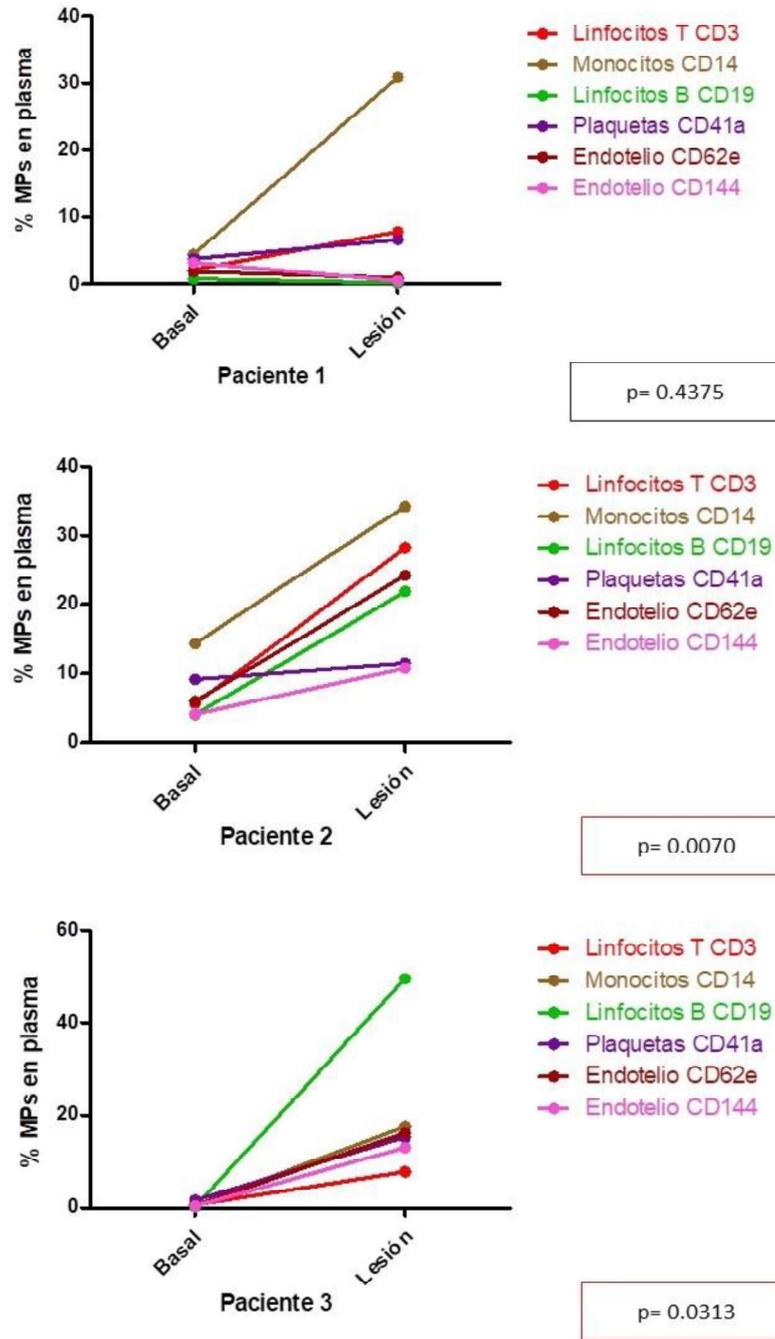
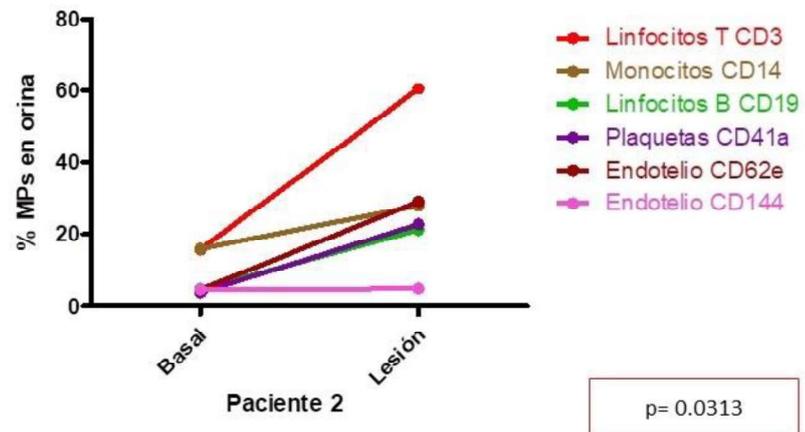
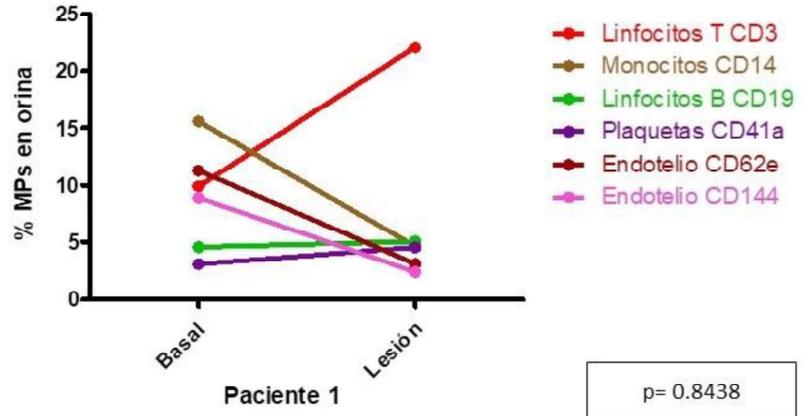


Tabla 9: Niveles de micropartículas en orina durante rechazo humoral en pacientes con trasplante renal atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP						
Marcador celular y tiempo de toma de la muestra	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3	
	Basal	Lesión	Basal	Lesión	Basal	Lesión
Linfocitos T CD3	9.92	22.10	15.8	60.6	17.7	ND
Monocitos CD14	15.6	4.63	16	27.9	4.06	ND
Linfocitos B CD19	4.57	5.07	4.8	21.3	7.82	ND
Plaquetas CD41a	3.09	4.55	3.82	22.8	5.73	ND
Endotelio CD62e	11.3	3.12	4.73	29.1	6.35	ND
Endotelio CD144	8.9	2.4	4.69	4.93	3.8	ND

Gráfica 5: Niveles de micropartículas en orina durante rechazo humoral en pacientes con trasplante renal atendidos en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP



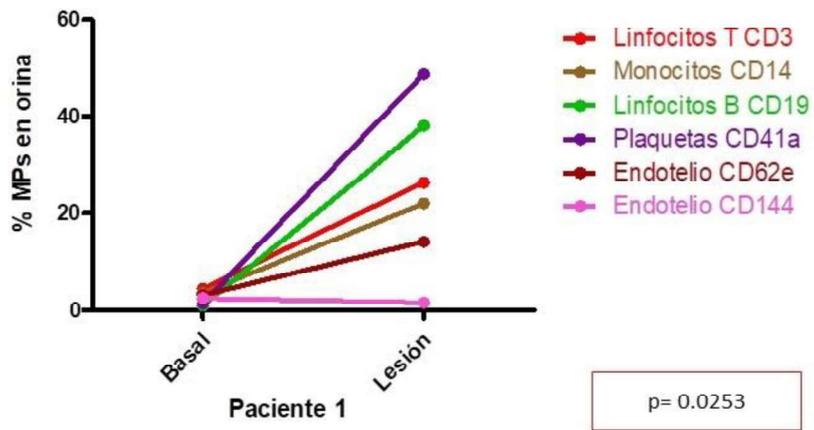
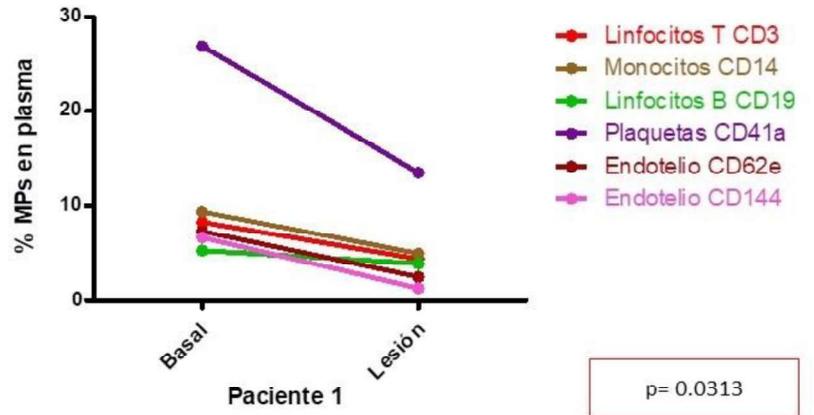
10.7 Niveles de micropartículas en rechazo celular

Durante el seguimiento, solo observamos un paciente con deterioro del injerto por rechazo celular con clasificación Banff 1A, los niveles de micropartículas de interés en suero no mostraron elevación, sin embargo los niveles en orina tuvieron incremento significativo de micropartículas derivadas de leucocitos $P=0.0253$. Tabla 10 y Gráfica 6.

Tabla 10: Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con rechazo celular atendido en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP

<i>Marcador celular y tiempo de toma de la muestra</i>	<i>Paciente 1</i>			
	<i>Basal Suero</i>	<i>Lesión</i>	<i>Basal Orina</i>	<i>Lesión</i>
<i>Linfocitos T CD3</i>	8.25	4.39	4.42	26.4
<i>Monocitos CD14</i>	9.36	4.96	3.61	22
<i>Linfocitos B CD19</i>	5.26	3.92	1.02	38
<i>Plaquetas CD41a</i>	26.9	13.5	1.49	48.7
<i>Endotelio CD62e</i>	7.29	2.52	3.18	14.1
<i>Endotelio CD144</i>	6.64	1.33	2.53	1.64

Gráfica 6 : Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con rechazo celular atendido en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP

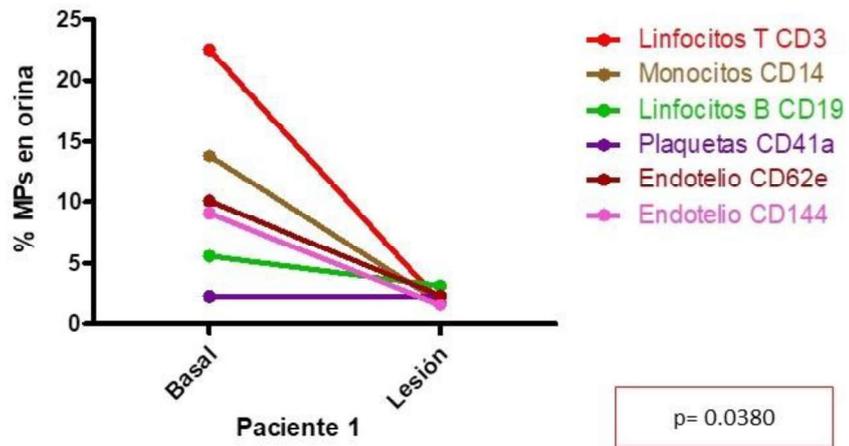
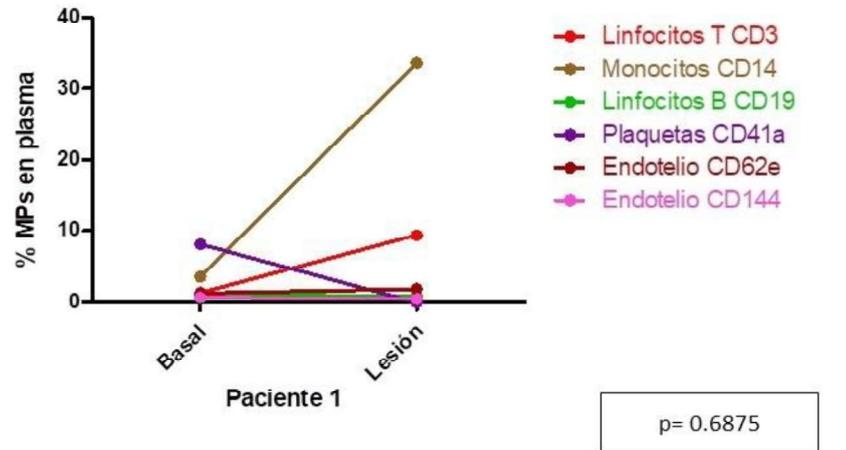


10.8 Micropartículas durante lesión renal obstructiva

Un paciente tuvo lesión renal aguda por hidronefrosis secundaria a estenosis ureteral. Los niveles séricos de micropartículas mostraron elevaciones no significativas con respecto al basal en Linfocitos T CD3 y Monocitos CD14 $P=0.6875$, en las analizadas en orina no se observó incremento derivado de ninguna línea celular. Tabla 11 y Gráfica 7.

<i>Tabla 11: Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con trasplante renal complicado con hidronefrosis atendido en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP</i>				
<i>Marcador celular y tiempo de toma de la muestra</i>	<i>Paciente 1</i>			
	<i>Basal Suero</i>	<i>Lesión</i>	<i>Basal Orina</i>	<i>Lesión</i>
<i>Linfocitos T CD3</i>	1.36	9.4	22.5	1.81
<i>Monocitos CD14</i>	3.6	33.6	13.8	1.78
<i>Linfocitos B CD19</i>	1.16	0.87	5.59	3.14
<i>Plaquetas CD41a</i>	8.1	0.01	2.29	2.27
<i>Endotelio CD62e</i>	1.3	1.9	10.1	2.34
<i>Endotelio CD144</i>	0.68	0.48	9.1	1.57

Gráfica 7 : Niveles séricos y urinarios de micropartículas en hidronefrosis en un paciente con trasplante renal atendido en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP

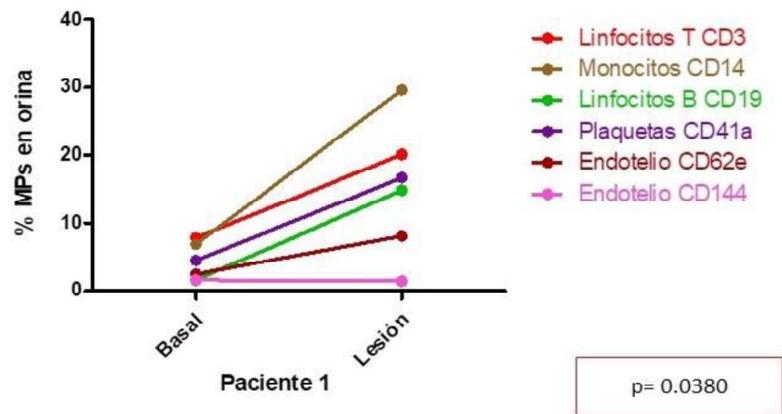
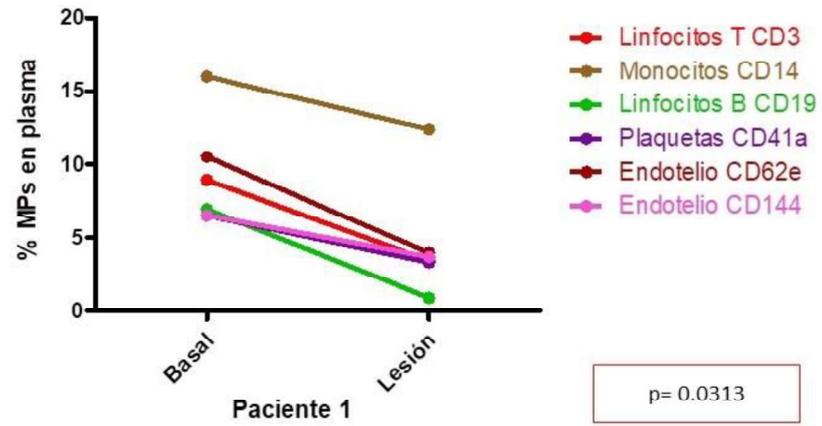


10.9 Niveles de micropartículas en necrosis tubular aguda por tacrolimus

Se realizó biopsia de un paciente con deterioro en la función del injerto encontrándose necrosis tubular aguda y datos histopatológicos de toxicidad por inhibidor de calcineurina. Los niveles séricos de micropartículas no mostraron aumento pero los niveles urinarios si elevaron de forma significativa micropartículas derivadas de leucocitos $P=0.0380$. Tabla 12 y Gráfica 8.

<i>Tabla 12: Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con trasplante renal y NTA atendido en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP</i>				
<i>Marcador celular y tiempo de toma de la muestra</i>	<i>Paciente 1</i>			
	<i>Basal Suero</i>	<i>Lesión</i>	<i>Basal Orina</i>	<i>Lesión</i>
<i>Linfocitos T CD3</i>	8.92	3.43	7.87	20.1
<i>Monocitos CD14</i>	16	12.4	6.91	29.6
<i>Linfocitos B CD19</i>	6.94	0.87	1.63	14.9
<i>Plaquetas CD41a</i>	6.51	3.29	4.51	16.7
<i>Endotelio CD62e</i>	10.5	3.96	2.49	8.16
<i>Endotelio CD144</i>	6.52	3.67	1.65	1.44

Gráfica 8 : Niveles séricos y urinarios de micropartículas en un paciente con trasplante renal y NTA atendido en el servicio de Nefrología del HCIMP de San Luis Potosí, SLP



11. DISCUSIÓN

El incremento de micropartículas derivadas de endotelio en el paciente con ERC-5 probablemente tiene implicaciones pronósticas sobre eventos cardiovasculares y sobrevida como lo describieron Amabile et al. (5,8)

Aunque la elevación es multifactorial, entre los factores postulados más importantes destacan toxinas uremias, estrés oxidativo, pérdida en la homeostasis de líquidos-electrolitos y descontrol en las cifras de tensión arterial. (5)

De forma similar a otros autores, en nuestro estudio observamos disminución en los niveles de micropartículas derivadas de Endotelio CD62e en pacientes con trasplante renal normo evolutivo (12). La disminución fue más notable en los pacientes que tenían niveles pre trasplante más altos. Estos hallazgos pueden estar relacionados con la mejoría en la morbimortalidad cardiovascular que se observa en el paciente trasplantado.

El evento de lesión renal más frecuente en este estudio fue inesperadamente causado por rechazo humoral, en estos pacientes observamos incremento en los niveles séricos de micropartículas derivadas de linfocitos T CD3, plaquetas CD41a y monocitos CD14. En dos pacientes con rechazo humoral observamos incremento significativo en los niveles séricos de micropartículas de endotelio CD62e y linfocitos B CD19.

La relación entre micropartículas derivadas de endotelio y de linfocitos B es esperada si tomamos en consideración la fisiopatogenia del rechazo humoral. La presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos HLA expresados en el endotelio precipitaría daño mediado por complemento y elementos celulares del sistema inmune innato, esto llevaría a la liberación de micropartículas endoteliales por daño inmunológico y liberación de micropartículas derivadas de leucocitos por activación.

Dado que en el rechazo humoral es obligada la participación de linfocitos B y endotelio, no podemos explicar porque un paciente con rechazo humoral no mostró elevación de micropartículas derivadas de estas líneas celulares.

Un paciente con rechazo humoral cursó rápidamente con anuria y pérdida del injerto, debido a esto solo se pudo procesar micropartículas en orina de dos pacientes. En estos, observamos en común elevación de micropartículas derivadas de linfocitos T CD3.

En un paciente con rechazo humoral y elevación en suero de micropartículas de endotelio CD62e y linfocitos B CD19 se observó también elevación significativa de estos marcadores en orina, no fue posible conocer si estos hallazgos se repetirían en otro paciente cambios en suero similares ya que perdió diuresis rápidamente. Encontrar la presencia de estos marcadores en orina de más pacientes con rechazo humoral sería promisorio.

En el seguimiento, solo observamos un paciente con lesión renal aguda por rechazo celular Banff 1A. En el conteo de micropartículas en sangre no observamos elevación, aunque en orina si se incrementó significativamente el conteo de micropartículas derivadas de linfocitos T CD3, monocitos CD14, linfocitos B CD19 y plaquetas CD 41A.

Cuando agrupamos a todos los pacientes con eventos de lesión parenquimatosa renal como rechazo humoral-celular y necrosis tubular aguda, observamos elevación de micropartículas derivadas de leucocitos en la orina de todos ellos. Con estos hallazgos podríamos inferir que en el paciente con daño intrínseco renal, el estudio de micropartículas en orina es probablemente más sensible que en plasma.

En dos pacientes con infección urinaria, los cambios séricos en micropartículas solo fueron notables en un paciente con incremento en los conteos de micropartículas de leucocitos. En orina ocurrieron elevaciones de linfocitos B CD19 y plaquetas CD41a en menor magnitud. Es necesario observar más eventos de infección urinaria para poder deducir que cambios ocurren en el conteo de micropartículas en este grupo.



12. LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Las limitantes de este estudio son las inherentes a su naturaleza piloto. El tamaño de la población, el limitado número de eventos de lesión renal y el corto periodo de seguimiento de los pacientes.

13. CONCLUSIONES

Se observaron hallazgos similares a los reportados por otros autores en el comportamiento de micropartículas derivadas de endotelio en pacientes trasplantados normo evolutivos.

En este pequeño grupo de pacientes con rechazo humoral y celular se observó elevación de micropartículas derivadas de leucocitos. El incremento ocurrió en suero y orina en pacientes con rechazo humoral y solamente en orina de un paciente con rechazo celular.

Cuando se agrupó a los pacientes con daño intrínseco renal por NTA, rechazo celular y humoral, observamos elevación de micropartículas derivadas de leucocitos en orina de todos ellos.

Aunque observamos tendencias interesantes en los conteos de micropartículas analizadas en orina de pacientes con lesión parenquimatosa renal y elevación de micropartículas de linfocitos B y endotelio en pacientes con rechazo humoral, será ideal un estudio más grande y con un tiempo de seguimiento suficiente para poder observar más eventos de interés y definir la utilidad de estos biomarcadores en la población con trasplante renal.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)* 2013; 124: 423-441 [PMID: 23249271 DOI: 10.1042/CS20120309]
2. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; 21:157-171 [PMID: 17118501 DOI: 10.1016/j.blre.2006.09.001]
3. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol* 2000; 65: 215-220 [PMID: 11073162 DOI: 10.1034/j.1600-0609.2000.065004215]
4. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 2009; 335: 143-151 [PMID: 18989704 DOI: 10.1007/s00441-008-0710-9]
5. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48: 180-186 [PMID: 16801490 DOI: 10.1161/01.HYP.0000231507.00962]
6. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 339-345 [PMID: 11283606 DOI: 10.1038/35070009]
7. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 168-175 [PMID: 12588755 DOI: 10.1161/01.
8. Amabile N, Guérin AP, Tedgui A, Boulanger CM, London GM. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1873-1880 [PMID: 22036944 DOI: 10.1093/ndt/gfr573]
9. Dursun I, Poyrazoglu HM, Gunduz Z, Ulger H, Yykylmaz A, Dusunsel R, Patyroglu T, Gurgoze M. The relationship between circulating endothelial microparticles and arterial stiffness and atherosclerosis in children with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2511-2518 [PMID: 19244228 DOI: 10.1093/ndt/gfp066]
10. Cerini C, Dou L, Anfosso F, Sabatier F, Moal V, Glorieux G, DeSmet R, Vanholder R, Dignat-George F, Sampol J, Berland Y, Brunet P. P-cresol, a uremic retention solute, alters the endothelial barrier function in vitro. *Thromb Haemost* 2004; 92: 140-150 [PMID: 15213855 DOI: 10.1160/TH03-07-0491]
11. Al-Massarani G, Vacher-Coponat H, Paul P, Arnaud L, Loundou A, Robert S, Moal V, Berland Y, Dignat-George F, Camoin-Jau L. Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles. *Am J Transplant* 2009; 9: 550-557 [PMID: 19260834 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02532.x]
12. Early posttransplant changes in circulating endothelial microparticles in patients with kidney transplantation *Transplant Immunology*, Volume 31, Issue 2, Pages 60-64 Zahida Qamri, Ronald Pelletier, Jamison Foster, Sunil Kumar, Hammam Momani, Kyle Ware, Jon Von Visger, Anjali Satoskar, Tibor Nadasdy, Sergey V. Brodsky
13. Qamri Z, Pelletier R, Foster J, Kumar S, Momani H, Ware K, Von Visger J, Satoskar A, Nadasdy T, Brodsky SV. Early posttransplant changes in circulating endothelial microparticles in patients with kidney transplantation. *Transpl Immunol* 2014; 31: 60-64 [PMID: 25008980 DOI: 10.1016/j.trim.2014.06.006]

14. Hogan MC, Johnson KL, Zenka RM, Cristine Charlesworth M, Madden BJ, et al. (2014) Subfractionation, characterization, and in-depth proteomic analysis of glomerular membrane vesicles in human urine. *Kidney Int* 85: 1225–37.
15. du Cheyron D, Daubin C, Poggioli J, Ramakers M, Houillier P, Charbonneau P, Paillard M. Urinary measurement of Na/H ex-changer isoform 3 (NHE3) protein as new marker of tubule injury incritically ill patients with ARF. *Am J Kidney Dis* 42: 497–506, 2003.
16. Marsden PA (2003) Predicting outcomes after renal transplantation—new tools and old tools. *N Engl J Med* 349: 182–184. Loverre A, Capobianco C, Ditunno P, Battaglia M, Grandaliano G, et al. (2008)
17. Increase of proliferating renal progenitor cells in acute tubular necrosis underlying delayed graft function. *Transplantation* 85: 1112–1119.
18. Dimuccio V, Ranghino A, Pratico Barbato L, Fop F, Biancone L, et al. (2014) Urinary CD133+ Extracellular Vesicles Are Decreased in Kidney Transplanted Patients with Slow Graft Function and Vascular Damage. *PLoS ONE* 9(8): e104490. doi:10.1371/journal.pone.0104490
19. Viñuela-Berni, Doníz-Padilla, Figueroa-Vega, Portillo-Salazar, Abud-Mendoza, Baranda L, González-Amaro R. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. *Clin Exp Immunol*. 2015 Jun;180(3):442-51. doi: 10.1111/cei.12598
20. Richard H. Browne. On the use of a pilot sample for sample size determination. *Statistics in medicine* Vol 14, 1933-1940 (1995).