

# Diálisis y Trasplante

## Correlaciones Clínicas de los Recuentos en Sangre Periférica de Células T Reguladoras en el Post-Trasplante Renal

Herrera-Gómez, Francisco MD, PhD<sup>1,2\*</sup>; Nocito-Colón, Mercedes MD, PhD<sup>3</sup> ; Del Aguila, Waldo<sup>4</sup>; Martín-García, Débora<sup>5</sup> ; Herrera-Gómez, Ruth<sup>6</sup> ; González-López, Anunciación<sup>2</sup> ; Pascual-Núñez, Pilar<sup>7</sup> ; Grande-Villoria, Jesús<sup>2</sup> ; Ortiz de Lejarazu-Leonardo, Raúl<sup>3</sup> ; Bustamante-Bustamante, Jesús<sup>8</sup> ; Genin, Christian<sup>9</sup> ; Mendiluce-Herrero, Alicia<sup>7</sup> ; Lambert, Claude<sup>9,10</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid. Avenida Ramón y Cajal, 7 47005 Valladolid, España. <sup>2</sup>Servicio de Nefrología, Hospital Virgen de la Concha, Complejo Asistencial de Zamora-Sanidad de Castilla y León (Sacyl). Avda. Requejo, 35, 49022 Zamora, España. <sup>3</sup>Servicio de Microbiología e Inmunología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid-Sacyl. Avda. Ramón y Cajal, 3, 47005 Valladolid, España. <sup>4</sup>Innere Medizin-Kardiologie, Donau-Ries Klinik Nördlingen. Stoffelsberg 4, 86720 Nördlingen, Alemania. <sup>5</sup>Servicio de Nefrología, Unidad de Hipertensión e Investigación en Riesgo Cardiovascular, Hospital Clínico Universitario de Valladolid-Sacyl. Avda. Ramón y Cajal, 3, 47005 Valladolid, España.

### Palabras Clave

Linfocitos T Reguladores;  
Trasplante de Riñón;  
Rechazo de Injerto;  
Neoplasias;  
Infección.

### Resumen

**Antecedentes:** Los recuentos de células T reguladoras en sangre periférica podrían utilizarse para la toma de decisiones en el manejo de los trasplantados renales.

**Objetivo:** Evaluar la relaciones entre las células reguladoras y diversos resultados clínicos del post-trasplante renal.

**Métodos:** Se determinó el porcentaje de células reguladoras (CD4+CD25+CD127-) en 35 trasplantados estables tratados con anticalcineurínicos o inhibidores de la mammalian Target Of Rapamycin, y 11 trasplantados que presentaron cáncer o infecciones severas siguiendo tratamiento con sirolimus o everolimus. Estos porcentajes se interpretaron de acuerdo a las circunstancias clínicas asociadas a un mayor riesgo de presentar rechazo agudo, cáncer o infecciones severas en el post-trasplante, obtenidas por método Delphi.

**Resultados:** Se observaron elevados porcentajes de células reguladoras en los trasplantados estables tratados con sirolimus o everolimus, y en los pacientes con cáncer o infecciones severas. Estos elevados porcentajes no se asociaron a menos rechazo. El Delphi sugiere que las células reguladoras pueden ser insuficientes en los contextos de mayor inflamación y con el uso de inmunosupresores nefrotóxicos, pudiendo así contribuir a un mayor riesgo de presentar rechazo. Estas células pueden también asociarse a un mayor riesgo de cáncer o infecciones severas en el post-trasplante en los casos, respectivamente, de un cáncer previo para presentar un nuevo tumor, y de infecciones de repetición o tratamiento con sirolimus o everolimus para presentar infecciones severas.

**Conclusión:** Los recuentos de células T reguladoras deben interpretarse considerando el impacto de factores pro-inflamatorios y fármacos inmunosupresores. Respecto al cáncer, probablemente deban considerarse otros factores. Hay una relación entre las células reguladoras y las infecciones post-trasplante.

Francisco Herrera-Gómez, MD, PhD

Servicio de Nefrología. Complejo Asistencial de Zamora-Sacyl. Área de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid  
Avda. Ramón y Cajal, 7, 47005 Valladolid, España.

Teléfono: +34983403077 - Fax: +34983423022 - fherrera@med.uva.es

# Clinical Correlations of Peripheral Blood Regulatory T Cell Counts after Kidney Transplantation

## Keywords

T-lymphocytes, Regulatory;  
Kidney Transplantation;  
Graft Rejection;  
Neoplasms;  
Infection.

## Abstract

**Background:** Peripheral blood regulatory T cell counts might be used for decision-making in the clinical management of kidney transplant recipients.

**Objectives:** Evaluation of the relationships between regulatory T cells and various clinical kidney transplant outcomes.

**Methods:** The percentage of regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-) was determined in 35 stable kidney transplant patients treated with calcineurin inhibitors or mammalian Target Of Rapamycin inhibitors, and 11 kidney recipients developing cancer or severe infections under treatment with sirolimus or everolimus. These percentages were interpreted according to clinical circumstances associated with an increased risk of acute rejection, cancer and severe infections in the post-transplant period, that were assessed by the Delphi method.

**Results:** High regulatory T cell percentages were observed in stable patients under sirolimus or everolimus, and in patients with cancer and severe infections. These high percentages were not associated with rejection. The Delphi showed that these cells may be insufficient in the setting of an overwhelming inflammatory process and using nephrotoxic immunosuppressants, so that this may contribute to an increased risk of rejection. These cells may also be associated with an increased risk of cancer or severe infections in the post-transplant period in the cases of, respectively, a past cancer for a new tumor, and recurrent infections and treatment with sirolimus or everolimus for severe infections.

**Conclusions:** Regulatory T cell counts should be interpreted considering the impact of pro-inflammatory factors and immunosuppressants. Regarding cancer, probably other factors should be considered. There is a relationship between regulatory T cells and post-transplant infections.

## Introducción

Las células T reguladoras (Tregs), implicadas en la tolerancia de auto- y alo-antígenos,<sup>1</sup> podrían encontrar utilidad en el seguimiento de los pacientes trasplantados renales.<sup>2</sup> Los números en sangre de estas células pueden cambiar por efecto de la medicación inmunosupresora. Las Tregs aumentan con los inhibidores de la mammalian Target Of Rapamycin (mTOR),<sup>3,4</sup> tanto con el empleo de novo de estos fármacos,<sup>5,6</sup> como tras la conversión a estos después de un tiempo con inhibidores de la calcineurina (ICN).<sup>7,8,9</sup> Sin embargo, los elevados recuentos de estas células parecen asociarse a menos rechazo agudo (RA).<sup>4</sup> Una reciente revisión sistemática sugiere un efecto modificador del tratamiento por parte de los inhibidores de mTOR (I-mTOR) en los recuentos de Tregs, aunque asumiendo la no inferioridad de I-mTOR frente a ICN.<sup>4</sup> Estos resultados concuerdan con los de grandes metaanálisis que concluyen que ninguno de estos inmunosupresores es mejor previniendo el RA.<sup>10-13</sup> En todo caso, estos resultados pueden sugerir también que un defecto en la capacidad supresora de las Tregs puede contribuir al desarrollo de RA, subrayando la importancia del micro-ambiente inflamatorio.<sup>14-16</sup>

El efecto de los I-mTOR en las Tregs puede asociarse también a un aumento del riesgo de presentar un tumor en el post-trasplante.<sup>17</sup> No obstante, los elevados recuentos de estas células constituyen realmente un factor de riesgo tanto en pacientes con ICN e I-mTOR.<sup>18,19</sup> Por último, las Tregs pueden ejercer un efecto sinérgico con la inmunosupresión en la respuesta inmune frente a las infecciones,<sup>20</sup> siendo posible observar un aumento de estas células en aquellos trasplantados con infecciones severas y en tratamiento con I-mTOR.<sup>21</sup>

Las Tregs podrían encontrar uso como marcador pronóstico para el seguimiento post-trasplante renal. No obstante, los estudios no permiten emitir conclusiones firmes respecto al nexo entre estas células y los resultados clínicos que se mencionan líneas arriba, fundamentalmente por las limitaciones de estos trabajos (diseño observacional, pequeños tamaños muestrales, falta de estándares en la medición de Tregs). El método Delphi, cuyo nombre se inspira en el antiguo oráculo de Delphos, puede permitir resolver este problema. A través de éste se obtiene un consenso basado en la utilización sistemática de un juicio intuitivo emitido por un grupo de expertos. Las estimaciones de estos expertos se realizan en rondas sucesivas y anónimas, pero con la máxima autonomía por parte de los participantes. El método Delphi, que se clasifica dentro de los métodos pronósticos cualitativos o subjetivos, puede permitir identificar aquellas circunstancias clínicas que se asocian a un mayor riesgo de presentar RA, un tumor o una infección severa en el post-trasplante, para un número determinado de Tregs. Esto

constituye un estímulo para considerar la influencia de la inmunosupresión<sup>22</sup> y del micro-ambiente inflamatorio<sup>14</sup> en el nexo entre las Tregs y la clínica, que no se llega a entender del todo, pero que da luces para el traslado de este potencial marcador al clínico.

## Material y métodos

### Diseño y pacientes

Se analizaron retrospectivamente dos cohortes de trasplantados renales seguidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV), una vez aprobado el protocolo de estudio por el comité de ética de investigación, y tras la firma del consentimiento informado respectivo por parte de los pacientes participantes autorizando el tratamiento de datos y muestras biológicas. En estos pacientes se determinaron las Tregs circulantes, y los valores obtenidos se interpretaron en base a las circunstancias de riesgo para presentar RA, una neoplasia o una infección severa en el post-trasplante, obtenidos por método Delphi.

### Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para la primera cohorte fueron los siguientes: 1) primeros trasplantes, 2) Enfermedad Renal Crónica (ERC) de substrato no inmunológico (Hipertensión arterial, uropatía obstructiva, poliquistosis hepatorrenal y otras causas genético-hereditarias, y causa no filiada), 3) tiempo post-trasplante de 1 a 10 años, 4) función del injerto estable y sin datos de disfunción crónica del injerto, y 5) inmunosupresión primaria con anticalcineurínicos (ciclosporina o tacrolimus), micofenolato mofetil (MMF) o micofenolato sódico (MFS), con/sin corticoides, o conversión a I-mTOR (sirolimus, everolimus) después del año post-trasplante y con un mínimo de 6 meses con estos inmunosupresores. Los criterios de inclusión para la segunda cohorte fueron los siguientes: 1) pacientes diagnosticados en los últimos 2 años de alguna neoplasia o en el último año de alguna infección severa (enfermedad por citomegalovirus, sepsis, pielonefritis del injerto, infección respiratoria con necesidad de hospitalización, y cualquier otra infección con requerimiento de ingreso hospitalario), 2) en tratamiento con I-mTOR durante por lo menos 6 meses, que mantuvieron en el momento del diagnóstico del tumor o de la infección, y 3) ninguna exclusión por el tiempo post-trasplante o la función del injerto. Como controles se reclutaron 15 personas sanas de similar edad y sexo que los pacientes participantes.

### Muestras y cuantificación de Tregs

Se extrajeron muestras de sangre periférica mediante venopunción, que se conservaron a temperatura ambiente con

anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), y que se destinaron para la determinación objetivo de este trabajo. Estas muestras se procesaron en las 6 horas siguientes a su extracción. La toma de dichas muestras coincidió con aquellas destinadas al control analítico de sangre y orina que correspondía a estos pacientes.

Se adquirió el monoclonal comercial BD Pharmingen™ Human Regulatory T Cell Cocktail (CD4/CD25/CD127) para la cuantificación en sangre de Tregs. Siguiendo las indicaciones del fabricante, las muestras se marcaron simultáneamente con anticuerpos anti-CD4 FITC (clona SK3), anti-CD25 PE-Cy™7 (clona 2A3) y anti-CD127 Alexa Fluor® 647 (hIL-7R-M21), que se agregaron directamente a la muestra de sangre total (50µL exactos con pipeta electrónica calibrada), y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, las muestras se trataron en un tiempo (eritrolisis tras adición manual de 500µL de solución FACS-lyzing®, BD Biosciences) y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCalibur™. Calibrado el citómetro y calculadas las compensaciones, se fijó el análisis a 10 000 linfocitos. La estrategia de identificación se realizó con la ayuda del programa BD CellQuest Pro (BD Biosciences). Se identificaron los linfocitos totales por sus parámetros físicos (tamaño versus complejidad), sin recurso al marcado CD3, para luego identificar sólo los linfocitos CD4 que marcaban intensamente para el receptor de interleuquina-2 (IL-2) o CD25. A diferencia de las células T efectoras, las Tregs no debían marcar para el receptor de la IL-7 (CD127).<sup>23</sup> La Figura 1 muestra un ejemplo de la estrategia de identificación seguida. Los resultados del recuento de estas células se expresaron sólo en porcentaje, como una proporción respecto al total de linfocitos CD4. Los valores absolutos no se calcularon.

### Método Delphi

Se elaboró un cuestionario (FH-G, RH-G y WDA) que fue contestado anónimamente por nefrólogos e inmunólogos con experiencia en trasplante renal, y oncólogos con experiencia en tumores en trasplantados de órganos sólidos de España, Francia, Bélgica y Alemania. Este cuestionario estuvo constituido de 6 preguntas e intentaba aclarar las relaciones entre las Tregs y el RA, las neoplasias, y las infecciones severas en el post-trasplante, tomando en consideración la influencia de la inmunosupresión<sup>22</sup> y del micro-ambiente inflamatorio.<sup>14</sup> Se propusieron 5 situaciones en las que un número determinado de Tregs podía interpretarse como insuficiente, y por lo tanto contribuyendo a un mayor riesgo para presentar RA. Se preguntó, además, por otras 2 circunstancias en que las Tregs podían asociarse a un mayor riesgo para presentar un tumor o

una infección severa en el post-trasplante. Cada pregunta se podía contestar afirmativa o negativamente, quedando un espacio para los comentarios y alternativas a la propuesta planteada. Las respuestas fueron recogidas por el coordinador del proceso (FH-G) para su análisis, modificación de las propuestas y elaboración del consenso con las conclusiones finales. La aprobación de una propuesta por más de 2/3 de los participantes se consideró como consenso provisional en cada ciclo de respuestas. Si no se alcanzaba el consenso, se modificaba la propuesta y se elaboraba una nueva pregunta basada en los comentarios y alternativas planteadas por los participantes. Tras alcanzar el consenso, las conclusiones finales se presentaron como aquellas circunstancias clínicas que pueden acarrear un mayor riesgo para presentar RA, una neoplasia, o infección severa en el post-trasplante, para un determinado número de Tregs.

No obstante, pensamos que era necesario cuantificar este riesgo, por lo que repetimos el proceso. Esta vez preguntamos por el impacto individual de cada una de estas situaciones, el peso que debía atribuirse, y el efecto de la suma de estos pesos. Tras las rondas necesarias, el consenso permitió elaborar un cuestionario con las circunstancias de riesgo para estos resultados clínicos, que ayudara a interpretar el número de Tregs circulantes.

### Variables de confusión

Por su posible influencia en la cinética de las Tregs en sangre periférica, consideramos como variables de confusión las siguientes: 1) la inducción con anticuerpos anti-CD2524 , 2) el tratamiento con derivados del ácido micofenólico y corticoides,<sup>24,25</sup> y 3) los factores de riesgo "clásicos" (hipertensión, dislipemia, diabetes)<sup>26,27,28</sup> y la enfermedad cardiovascular.<sup>29,30</sup>

### Análisis estadístico

Las variables cualitativas derivadas de las características clínicas y la valoración del riesgo de presentar alguno de los resultados clínicos considerados (empleo del cuestionario), se describieron por sus frecuencias absolutas y relativas (porcentajes). La media  $\pm$  desviación estándar (DE) de los porcentajes de Tregs se compararon entre todos los trasplantados que recibían ICN, I-mTOR y los controles sanos (prueba de Kruskal-Wallis), y entre trasplantados con función del injerto estable con y sin I-mTOR (prueba de Mann-Whitney). Fueron consideradas como estadísticamente significativas las diferencias con un  $p$ -valor  $\leq 0,05$ . Utilizamos el programa informático SPSS versión 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, EEUU).

## Resultados

### Características de los pacientes

**Tabla 1**  
Características clínicas de los trasplantados estables tratados con ICN o I-mTOR.

Características	ICN	I-mTOR
n	18	17
Edad (media ± DE)	67±3	63±2
Sexo (varón/mujer)	10/8	15/2
Años post-TX	5,0±1,8	4,3±0,5
Compatibilidad sexo, peso y talla con el donante (sí/no)	17/1	17/0
>3 incompatibilidades HLA (sí/no)	8/10	8/9
%PRA (media ± DE)	11,5±6,8	9,0±10,8
Horas de isquemia fría (media ± DE)	21,0±6,5	22,0±4,0
Retraso de la función del injerto (sí/no)	9/9	4/13
RA previos	2	1
Inducción con anti-CD25 (sí/no)	18/0	17/0
MMF o MFS (sí/no)	18/0	17/0
Corticoides (sí/no)	16/2	14/3

DE, desviación estándar; HLA, human leukocyte antigen; ICN, inhibidores de la calcineurina; I-mTOR, inhibidores de mTOR; MMF, micofenolato mofetil; MFS, micofenolato sódico; PRA, panel reactive antibodies; RA, rechazo agudo; TX, trasplante.

Se reclutaron un total de 46 trasplantados renales. Las **Tablas 1 y 2** muestran las características demográficas, inmunológicas y clínicas de estos pacientes en las cohortes a las que fueron asignados. La media de tiempo post-trasplante fue para la primera cohorte de 4,7 años, para los pacientes con cáncer de 7,5 años, y para los pacientes con infecciones severas de 1,8 años. En todos los casos menos uno se convirtió a los pacientes a I-mTOR por nefrotoxicidad. Dos pacientes de la primera cohorte presentaron RA cuando fueron vistos en consulta. Uno de estos seguía tratamiento con ciclosporina y el otro con everolimus. Ninguno de estos pacientes refería haber discontinuado la medicación y presentaban niveles de los inmunosupresores en rango. Estos RA se confirmaron por biopsia, tratándose de un rechazo celular y humoral respectivamente. Estos respondieron satisfactoriamente al tratamiento con 6-metil-prednisolona, no siendo necesarios ni anticuerpos anti-linfocitos para el RA celular, ni plasmaféresis o rituximab para el RA humoral.

Los tumores que vimos fueron los siguientes: rhabdomioma retroperitoneal, leucemia linfática crónica, leucemia promielocítica aguda, y recidiva de un carcinoma epidermoide cutáneo (CEC). Los episodios infecciosos severos que incluimos fueron los siguientes: enfermedad por CMV, reactivación de tuberculosis, sepsis de origen urinario, pielonefritis del injerto, parotiditis, herpes zoster, y varicela.

### Porcentajes de Tregs

La **Tabla 2** muestra que los trasplantados estables tratados con I-mTOR presentaron más Tregs ( $3,78 \pm 1,34\%$ ) que los pacientes tratados con ICN ( $1,89 \pm 0,43\%$ ). No obstante, los porcentajes de Tregs en todos los que recibieron I-mTOR (pacientes estables y con cáncer e infecciones) no fueron mayores que los obtenidos en los controles sanos.

### Interpretación del porcentaje de Tregs

Fueron necesarias 3 rondas sucesivas hasta alcanzar el consenso para las 7 propuestas planteadas en el Delphi. En la primera ronda se alcanzaba un consenso provisional para 5 (71%) de las 7 propuestas, en la segunda para 6 de 7 (86%), resolviéndose la restante en la tercera ronda. Sin embargo, en una sola ronda se alcanzó el consenso para atribuir el mismo peso a cada una de estas situaciones clínicas. Se estimó también que el efecto sumatorio de estas situaciones no podía corresponder a la serie aritmética de sus correspondientes pesos. Así, para un número determinado de Tregs, la presencia de una sola de estas situaciones debía considerarse como de riesgo para el correspondiente resultado clínico,

Existe un mayor riesgo de RA cuando un número determinado de Tregs se asocia a alguna de las siguientes circunstancias clínicas: 1) rechazos previos, 2) positividad de los marcadores analíticos de inflamación, 3) cualquier infección severa<sup>15,16</sup> o neoplasias del tipo que sea,<sup>31</sup> 4) microalbuminuria o macroalbuminuria,<sup>31</sup> y 5) esquemas inmunosupresores nefrotóxicos. Las Tregs pueden asociarse a un mayor riesgo de cáncer o infección severa post-trasplante en las siguientes situaciones: 1) tratamiento con I-mTOR para las infecciones severas,<sup>21</sup> y 2) tumores previos para un nuevo cáncer<sup>17,18,19</sup> o infecciones frecuentes para una infección severa.

Como se explica en la sección de Material y métodos, elaboramos un cuestionario con estas circunstancias de riesgo. Este cuestionario se utilizó para interpretar el porcentaje de Tregs circulantes en los pacientes de nuestro estudio.

### Resultados clínicos

Las **Tablas 3 y 4** muestran aquellas circunstancias de riesgo para el correspondiente resultado clínico que cumplían los pacientes, los números de Tregs obtenidos, y el tratamiento inmunosupresor con los correspondientes niveles de estos fármacos en sangre. Aunque no hayamos podido calcular el riesgo con que contribuye cada una de estas situaciones, se puede ver que los pacientes que presentaron RA cumplieron con todas las circunstancias de riesgo para presentar



Tabla 2.  
Características de los trasplantados con cáncer e infecciones

Paciente	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11
Edad	41	55	73	66	63	78	45	57	21	40	35
Sexo	M	V	M	V	M	V	V	V	V	M	M
1° TX	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No
Años post-TX	3	4	10	13	1	1	2	10m	4	2	2
ERC	No	No	Sí	Sí	No	No	No	No	No	No	No
inmunológica											
PRA <20%	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No
Incompat. HLA	3	3	4	3	4	2	3	4	1	3	2
RA previos	No	No	Sí	Sí	No	No	No	No	No	No	No
Infección por											
CMV	No	No	No	Sí	No	No	No	No	No	No	Sí
Otras	No	VHS	VEB	No	No	IRA	ITU	ITU	No	IRA	No
infecciones											
Años con ICN	2	3	8	9	6m	8m	6m	6m	2	1	1
Uso de AZA	No	No	No	Sí	No	No	No	No	No	No	No
Motivo de	NFTX	NFTX	NFTX	tumor	NFTX	NFTX	NFTX	NFTX	NFTX	NFTX	NFTX
conversión											
Tumor o	RSRP	LPMA	LLC	CEC	CMV	TBC	Sepsis	PNI	Parotiditis	Zoster	Varicela
infección											

AZA, azatioprina; CEC, carcinoma epidermoide cutáneo; CMV, citomegalovirus; ERC, enfermedad renal crónica; IRA, infección respiratoria aguda; ITU, infección del tracto urinario; LLC, leucemia linfática crónica; LPMA, leucemia promielocítica aguda; NFTX, nefrotoxicidad; PNI, pielonefritis del injerto; RSRP, rabdomiosarcoma retroperitoneal; TBC, tuberculosis; VHS, virus herpes simple; VEB, virus de Epstein-Barr.

un evento de rechazo (a excepción del paciente con everolimus que no recibía un esquema nefrotóxico). Debe destacarse que estos pacientes presentaban porcentajes de Tregs dentro de lo esperable.

La situación es diferente con los trasplantados con cáncer. Salvo uno, el resto de los pacientes que había presentado un tumor siguiendo una inmunosupresión con I-mTOR, no presentaba el antecedente de un tumor previo. Es importante mencionar, sin embargo, que el paciente que había presentado un cáncer previamente, llevaba más tiempo trasplantado que el resto (13 años), y había estado expuesto durante un mayor tiempo a los ICN. Este paciente presentó como primer tumor un carcinoma epidermoide cutáneo (CEC), que fue el motivo de su conversión a sirolimus. Mencionar, además, que en este paciente se obtuvo el mayor número de Tregs (6,08%) de todos los trasplantados con cáncer e infecciones.

El tratamiento con I-mTOR, asociado a más riesgo para infecciones severas en el post-trasplante, es una situación que cumplieron todos los trasplantados que presentaron una infección severa. Algunos de estos presentaban también infecciones de repetición.

## Discusión

### Principales hallazgos

Nuestro trabajo muestra la relación entre las Tregs circulantes y diversos resultados clínicos en el post-trasplante renal, que con-

firman la participación de estas células en el control de las respuestas alo-inmune, anti-tumoral y anti-infecciosa. Nuestros resultados proponen el concepto de "número de células funcionales" en lugar de "número de células" para entender mejor la implicación clínica de las Tregs en el post-trasplante renal. Ciertamente, este concepto deriva del examen por técnicas metodológicas de determinadas situaciones o circunstancias que se han observado en estudios con animales y humanos, y que pueden ayudar a interpretar como insuficientes los números de Tregs (considerando que todas estas células son plenamente funcionales). Esto plantea una alternativa al laborioso trabajo de evaluar la capacidad supresora de estas células<sup>32</sup> y los cambios de ésta por efecto de la inmunosupresión.<sup>33</sup> Estas circunstancias, que se asocian a un mayor riesgo de RA, pueden ayudar a entender la fisiopatología de la insuficiencia del compartimento T regulador en el control de la respuesta alo-inmune<sup>14,15,16</sup> en los contextos de mayor inflamación. Sin embargo, estas circunstancias resaltan a su vez el concepto de nivel adecuado de inmunosupresión,<sup>34,35</sup> y la necesidad de emplear medicaciones no nefrotóxicas.<sup>31</sup> En este sentido, la minimización de ICN (tratamiento combinado y conversión a I-mTOR) puede constituir una opción interesante que asocia un eficiente control de la alorreactividad, con menores nefrotoxicidad e inflamación. No obstante, serán necesarios estudios prospectivos para confirmar que estos esquemas no nefrotóxicos y el control de la inflamación mejorarían realmente la incidencia de RA. De momento, insistimos en que sólo es posi-

Tabla 3.  
Tregs y situaciones de riesgo para RA en los trasplantados estables

	(ng/ml)				analíticos de inflamación	concomitante			
1-1	1,66	CsA	89,6	-					X
1-2	1,96	TAC	4,0	-					X
1-3	2,70	TAC	4,5	-					X
1-4	4,49	SIR	6,0	-	X		X		
1-5	1,91	SIR	7,5	-			X		
1-6	2,74	TAC	5,0	-					X
1-7	6,15	SIR	5,4	-					
1-8	5,37	EVE	7,0	-			X		
1-9	3,78	SIR	5,0	-	X		X		
1-10	2,02	TAC	4,8	-					X
1-11	2,00	TAC	3,1	-	X	X	X	X	X
1-12	5,44	SIR	4,8	-					
1-13	5,24	EVE	6,5	-			X		
1-14	4,62	EVE	7,0	-			X		
1-15	2,44	SIR	4,0	-			X		
1-16	1,88	TAC	4,3	-					X
1-17	1,80	CsA	80,5	RA	X	X	X	X	X
1-18	2,36	TAC	4,5	-					X
1-19	2,15	SIR	3,0	-					
1-20	2,10	CsA	105,0	-					X
1-21	2,73	SIR	5,0	-					
1-22	1,69	TAC	6,5	-					X
1-23	2,62	EVE	4,4	RA	X	X	X	X	
1-24	2,26	EVE	4,1	-					
1-25	2,07	TAC	3,5	-	X				X
1-26	1,88	TAC	6,5	-					X
1-27	1,34	TAC	7,0	-					X
1-28	4,93	SIR	5,5	-					
1-29	3,66	EVE	4,9	-	X		X		
1-30	1,0	TAC	6,0	-					X
1-31	1,45	TAC	5,0	-			X		X
1-32	3,90	EVE	5,0	-			X		
1-33	1,45	TAC	5,5	-					X
1-34	4,93	EVE	5,5	-			X		

CsA, ciclosporina A; EVE, everolimus; IS, inmunosupresor; MAL, microalbuminuria; SIR, sirolimus; TAC, tacrolimus.

ble sospechar de un número insuficiente de Tregs en las circunstancias clínicas mencionadas en la sección de resultados, que pueden sugerir un mayor riesgo de RA.

Nuestro trabajo muestra que elevadas Tregs no se asociaron a menos rechazo. Así lo demuestran los dos RA que tuvimos, uno con ICN y el otro con I-mTOR. Estos resultados no parecen ir en contra de las conclusiones de varios metaanálisis, que demostraron la igualdad de ICN e I-mTOR previniendo el RA.<sup>10-13</sup> Nuevamente, estos hallazgos resaltan la importancia de aquellos

factores que se asocian a un déficit funcional del compartimento T regulador, que probablemente se tengan más en cuenta ahora con la lectura de este trabajo.

Hemos observado elevados recuentos de Tregs en trasplantados renales que presentaron tumores siguiendo un tratamiento con I-mTOR. Estos resultados concuerdan con un reciente ensayo controlado aleatorizado que comparó ICN con la conversión a I-mTOR.<sup>17</sup> En este estudio los pacientes habían padecido de un cáncer previo, y se encontró que los I-mTOR

**Tabla 4.**  
Tregs y situaciones de riesgo para cáncer o infecciones severas en los trasplantados con estos resultados clínicos

Paciente	Tregs (%)	IS	Niveles IS (ng/ml)	Resultado clínico	I-mTOR	Tumor previo o infecciones de repetición
2-1	5,65	EVE	4,0	Tumor		
2-2	4,59	EVE	6,0	Tumor		
2-3	4,20	SIR	5,0	Tumor		
2-4	6,08	SIR	5,5	Tumor		X
2-5	5,68	SIR	5,5	Infección severa	X	
2-6	0,89	EVE	4,5	Infección severa	X	
2-7	5,00	SIR	4,0	Infección severa	X	X
2-8	4,00	EVE	5,4	Infección severa	X	X
2-9	2,90	SIR	6,2	Infección severa	X	
2-10	4,32	EVE	5,7	Infección severa	X	
2-11	3,45	SIR	6,0	Infección severa	X	

Los niveles del inmunosupresor se expresan en C0 para ciclosporina y C2 para el resto.

podían aumentar el riesgo para un nuevo tumor.<sup>17</sup> Los cuatro trasplantados con cáncer de nuestro estudio habían sido convertidos a I-mTOR por lo menos hacía 6 meses. Sin embargo, sólo uno de estos había presentado un tumor previamente (situación de riesgo para cáncer según nuestro cuestionario). Como lo sugieren otros trabajos,<sup>18,19</sup> probablemente deban considerarse otros factores en el desarrollo de tumores en los pacientes trasplantados (tipo de tratamiento de inducción, ICN durante tiempo prolongado, predisposición individual, etc).

Hemos observado también elevados porcentajes de Tregs en trasplantados renales que presentaron una infección severa siguiendo un tratamiento con I-mTOR. La implicación de estos fármacos en el mantenimiento de un estado proinflamatorio dependiente de la exposición a agentes patógenos es por demás conocida,<sup>21</sup> pero nuestros resultados constituyen otra prueba de cómo puede afectarse el control de la respuesta inmune dependiente de las Tregs a través de la inflamación.

### Comparación con otros trabajos

Los pacientes de nuestro estudio no fueron diferentes de los que se describen en otros trabajos. Todos fueron receptores de un injerto renal procedente de donante cadáver, mostraban una adecuada compatibilidad inmunológica y clínica (sexo, peso y talla), y ninguno presentaba anticuerpos donante específicos cuando fueron vistos en consulta. Estos pacientes habían recibido, además, una inducción con basiliximab, y mantenían una función del injerto estable con ICN, o con I-mTOR después

de un tiempo con ICN. La incidencia de RA fue también parecida a la descrita en otros trabajos. Finalmente, nuestros resultados también concuerdan en cuanto al tiempo post-trasplante prolongado de los pacientes con cáncer.

### Puntos fuertes y limitaciones

Nuestro trabajo es el primero en responder metodológicamente a las dudas que se plantean en el nexo entre las Tregs y la clínica. Nuestros resultados invitan a interpretar los números de estas células en el contexto clínico

de cada paciente trasplantado, constituyendo un estímulo para el empleo de la cuantificación en sangre de estas células en el manejo del paciente trasplantado renal. No obstante, nuestra principal limitación ha sido el número de pacientes. Esto ha permitido sólo un análisis por contraste de grupos de pacientes (por esquema inmunosupresor, resultado clínico), habiendo sido un obstáculo para el cálculo por regresión logística de la probabilidad de presentar RA, cáncer, o una infección severa a través de la suma de las circunstancias de riesgo consideradas por nuestro cuestionario.

### Conclusiones

Los números de Tregs deben interpretarse considerando la influencia de factores pro-inflamatorios y el uso de fármacos inmunosupresores. Los trasplantados renales estables en tratamiento con I-mTOR y los trasplantados que presentaron cáncer o infecciones severas siguiendo tratamiento con este tipo de inmunosupresor, presentaron elevados números de Tregs. No obstante, elevadas Tregs no se asociaron a menos rechazo. La nefrotoxicidad y la inflamación deben tenerse particularmente en cuenta para juzgar de insuficientes los elevados recuentos de estas células, y por tanto contribuyendo a un mayor riesgo para presentar RA. Respecto a la relación entre las Tregs y el cáncer, probablemente otros factores estén involucrados (además del antecedente de un tumor previo). Los elevados números de Tregs en los trasplantados con infecciones severas son otra prueba de cómo puede afectarse el control de la respuesta inmune por las Tregs a través de la inflamación.



## Financiación

Este estudio contó con el apoyo de Astellas Pharma España.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a Cécile Boyer (Centre Ingénierie et Santé, École nationale supérieure des mines de Saint-Étienne) por su ayuda en la coordinación del Delphi.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores: AG-L, CL, FH-G y RODL-L iniciaron y diseñaron el estudio. FH-G obtuvo la financiación. CL, FH-G y MN-C pusieron a punto la determinación de Tregs. FH-G, RH-G y WDA llevaron a cabo el Delphi. DM-G y FH-G se encargaron de la recopilación y el tratamiento de los datos de los pacientes. FH-G y WDA llevaron a cabo el análisis. AG-L, FH-G escribieron el manuscrito. Todos los autores han añadido sus comentarios críticos y revisiones a los borradores anteriores. Todos los autores aprobaron la versión final del trabajo. AM-H y CL son los investigadores senior de este trabajo.

## Bibliografía

- 1 Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2007; 17(2): 120-129.
- 2 Abadja F, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C, Genin C, Lambert C. Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation* 2010; 89(3): 366-368.
- 3 Zhang C, Shan J, Feng L, Lu J, Xiao Z, Luo L et al. The effects of immunosuppressive drugs on CD4(+) CD25(+) regulatory T cells: a systematic review of clinical and basic research. *J Evid Based Med* 2010; 3(2): 117-129.
- 4 Herrera-Gómez F, Vázquez-Seoane M, Del Aguila W, Martín-García D, Maurtua-Briseño Meiggs A, González-López A et al. Are Peripheral Blood Regulatory T Cell Counts a Predictive and Prognostic Biomarker For Improving Kidney Transplant Outcomes? A Systematic Review. *Dial Traspl* 2017 in press.
- 5 Morelon E, Lefrançois N, Besson C, Prévautel J, Brunet M, Touraine JL et al. Preferential increase in memory and regulatory subsets during T-lymphocyte immune reconstitution after Thymoglobulin induction therapy with maintenance sirolimus vs cyclosporine. *Transpl Immunol* 2010; 23(1-2): 53-58.
- 6 Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(3): 1007-1018.
- 7 Libetta C, Esposito P, Gregorini M, Margiotta E, Martinelli C, Boretta I et al. Sirolimus vs cyclosporine after induction with basiliximab does not promote regulatory T cell expansion in de novo kidney transplantation: Results from a single-center randomized trial. *Transpl Immunol* 2015; 33(2): 117-124.
- 8 Bansal D, Yadav AK, Kumar V, Minz M, Sakhuja V, Jha V. Deferred preemptive switch from calcineurin inhibitor to sirolimus leads to improvement in GFR and expansion of T regulatory cell population: a randomized, controlled trial. *PLoS One* 2013; 8(10): e75591.
- 9 Stallone G, Pontrelli P, Infante B, Gigante M, Netti GS, Ranieri E et al. Rapamycin induces ILT3(high)ILT4(high) dendritic cells promoting a new immunoregulatory pathway. *Kidney Int* 2014; 85(4): 888-897.
- 10 Sawinski D, Trofe-Clark J, Leas B, Uhl S, Tuteja S, Kaczmarek JL et al. Calcineurin Inhibitor Minimization, Conversion, Withdrawal, and Avoidance Strategies in Renal Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Transplant* 2016 in press.
- 11 Yan HL, Zong HT, Cui YS, Li N, Zhang Y. Calcineurin Inhibitor Avoidance and Withdrawal for Kidney Transplantation: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Transplant Proc* 2014; 46(5): 1302-1313.
- 12 Su L, Tam N, Deng R, Chen P, Li H, Wu L. Everolimus-based calcineurin-inhibitor sparing regimens for kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol* 2014; 46(10): 2035-2044.
- 13 Lim WH, Eris J, Kanellis J, Pussell B, Wiid Z, Witcombe D et al. A systematic review of conversion from calcineurin inhibitor to mammalian target of rapamycin inhibitors for maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2014; 14(9): 2106-2119.
- 14 Zuber J, Grimbert P, Blanco G, Thauat O, Durrbach A, Baron C et al. Prognostic significance of graft Foxp3 expression in renal transplant recipients: a critical review and attempt to reconcile discrepancies. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(5): 1100-1111.
- 15 Martin-Gandul C, Mueller NJ, Pascual M, Manuel O. The Impact of Infection on Chronic Allograft Dysfunction and Allograft Survival After Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant* 2015; 15(12): 3024-3040.
- 16 Lee JR, Bang H, Dadhania D, Hartono C, Aull MJ, Satlin M et al. Independent risk factors for urinary tract infection and for subsequent bacteremia or acute cellular rejection: a single-center report of 1166 kidney allograft recipients. *Transplantation* 2013; 96(8): 732-738.
- 17 Carroll RP, Hester J, Wood KJ, Harden PN. Conversion to sirolimus in kidney transplant recipients with squamous cell cancer and changes in immune phenotype. *Nephrol Dial transplant* 2013; 28(2): 462-465.
- 18 Carroll RP, Segundo DS, Hollowood K, Marafioti T, Clark TG, Harden PN et al. Immune phenotype predicts risk for posttransplantation squamous cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(4): 713-722.
- 19 Hope CM, Grace BS, Pilkington KR, Coates PT, Bergmann IP, Carroll RP. The immune phenotype may relate to cancer development in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 2014; 86(1): 175-183.
- 20 Presser D, Sester U, Mohrbach J, Janssen M, Köhler H, Sester M. Differential kinetics of effector and regulatory T cells in patients on calcineurin inhibitor-based drug regimens. *Kidney Int* 2009; 76(5): 557-566.
- 21 Zuber J, Hermine O, Chatenoud L, Legendre C. Harnessing regulatory T cells for transplant tolerance in the clinic through mTOR inhibition: myth or reality? *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16(6): 606-613.

- 22 Herrera-Gómez F, Nocito-Colón M, Martín-García D, Herrera-Bugnazet R, Nava-Rebollo A, Andrés-Martín B et al. Tolerancia inmunológica y trasplante renal. *NefroPlus* 2014; 6: 15-19.
- 23 Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203(7): 1701-1711.
- 24 Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol* 2012; 26(1): 1-10.
- 25 Demirkiran A, Hendriks TK, Baan CC, van der Laan LJ. Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation* 2008; 85(6): 783-789.
- 26 Schiffrin EL. T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19(2): 181-186.
- 27 Mausner-Fainberg K, Luboshits G, Mor A, Maysel-Auslender S, Rubinstein A, Keren G et al. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on naturally occurring CD4+CD25+ T cells. *Atherosclerosis* 2008; 197(2): 829-839.
- 28 Prasad N, Gurjer D, Bhadauria D, Gupta A, Srivastava A, Kaul A et al. Is basiliximab induction, a novel risk factor for new onset diabetes after transplantation for living donor renal allograft recipients? *Nephrology (Carlton)* 2014; 19(4): 244-250.
- 29 Ducloux D, Challier B, Saas P, Tiberghien P, Chalopin JM. CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(3): 767-772.
- 30 Ducloux D, Courivaud C, Bamouid J, Vivet B, Chabroux A, Deschamps M et al. Prolonged CD4 T cell lymphopenia increases morbidity and mortality after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(5): 868-875.
- 31 Halimi JM, Buchler M, Al-Najjar A, Laouad I, Chatelet V, Marière JF et al. Urinary albumin excretion and the risk of graft loss and death in proteinuric and non-proteinuric renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7(3): 618-625.
- 32 Schaier M, Seissler N, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Zeier M et al. DR(high+)CD45RA(-)-Tregs potentially affect the suppressive activity of the total Treg pool in renal transplant patients. *PLoS One* 2012; 7(3): e34208.
- 33 Hendriks TK, van Gurp EA, Sewgobind VD, Mol WM, Schoordijk W, Klepper M et al. Generation of donor-specific regulatory T-cell function in kidney transplant patients. *Transplantation* 2009; 87(3): 376-383.
- 34 Pascual J, Bloom D, Torrealba J, Brahmabhatt R, Chang Z, Sollinger HW et al. Calcineurin inhibitor withdrawal after renal transplantation with alemtuzumab: clinical outcomes and effect on T-regulatory cells. *Am J Transplant* 2008; 8(7): 1529-1536.
- 35 Dresske B, Haendschke F, Lenz P, Ungefroren H, Jenisch S, Exner B et al. WOFIE stimulates regulatory T cells: a 2-year follow-up of renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 81(11): 1549-1557.

## Fernando Casquero Fernández (1970-2017)

*Lamentable pérdida.*



*Incansable y valioso, lo inevitable sorprendió antes de tiempo a Fernando Casquero Fernández, Enfermero de la Unidad de Hemodiálisis del Hospital Virgen de la Concha de Zamora. Hacía poco había comenzado su inmersión en el mundo de la investigación, con un primer trabajo aceptado por la revista de esta casa (Diálisis y Trasplante. 2017;38:40-56.). Su sentido de la orientación a la hora de identificar las pruebas, y construir luego el armazón con las mismas, para responder a las preguntas de revisión planteadas en nuestra revisión sistemática sobre el interés de los recuentos de células T reguladoras como biomarcador del resultado del trasplante renal, lo convirtieron un un aventurero metodológico que daba muestras de fortaleza bajo las condiciones más inhóspitas.*

*El resto de investigadores y colaboradores del trabajo del que Fernando fue investigador expresan sus más sentidas condolencias a los compañeros médicos y enfermeros de Fernando, y a su apreciada familia por el irreparable vacío dejado.*