

**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**FENOTIPAJE Y EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS T EN  
PACIENTES DIABÉTICOS Y NO DIABÉTICOS CON  
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN UN CENTRO PRIVADO DE  
HEMODIÁLISIS**

**TESIS**

**PARA OPTAR**

**EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INMUNOLOGÍA CON MENCIÓN  
EN INFECTOLOGÍA Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

**PRESENTADA POR**

**ANA CECILIA GRANDA ALACOTE**

**ASESOR**

**JOEL DE LEON DELGADO**

**LIMA- PERÚ**

**2023**



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada  
CC BY-NC-ND**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**FENOTIPAJE Y EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS T EN  
PACIENTES DIABÉTICOS Y NO DIABÉTICOS CON  
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN UN CENTRO PRIVADO  
DE HEMODIÁLISIS**

**TESIS**

**PARA OPTAR**

**EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INMUNOLOGÍA CON  
MENCIÓN EN INFECTOLOGÍA Y ENFERMEDADES  
AUTOINMUNES**

**PRESENTADA POR**

**ANA CECILIA GRANDA ALACOTE**

**ASESOR**

**DR. JOEL DE LEON DELGADO**

**LIMA, PERÚ**

**2023**

## JURADOS

**Presidente:** Arturo Pareja Cruz, doctor en Medicina.

**Miembro:** Edward Valencia Ayala, doctor en Ciencias.

**Miembro:** Caroline Malamud Kessler, máster en Fisiología y medicina.

A mis padres, por su apoyo constante y mostrarme el camino a la superación.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los asesores de tesis Víctor Arrunátegui Correa, doctor en ciencias y Joel De León Delgado, doctor en ciencias biológicas, por su gran apoyo en la asesoría y seguimiento del proyecto.

A César Liendo Liendo, médico cirujano, especialista de Nefrología, quien me brindó la oportunidad de desarrollar esta investigación en el Centro Nefrológico S.A. Cenesa.

A Alberto Yuen Morán, Médico cirujano especialista de Hematología por su apoyo en el uso de las instalaciones del Laboratorio Médico Alberto Yuen y Guillermo Ríos SCRL. YUENLAB.

## ÍNDICE

|                               | <b>Págs.</b> |
|-------------------------------|--------------|
| <b>Portada</b>                | i            |
| <b>Jurado</b>                 | ii           |
| <b>Dedicatoria</b>            | iii          |
| <b>Agradecimientos</b>        | iv           |
| <b>Índice</b>                 | v            |
| <b>Resumen</b>                | vi           |
| <b>Abstract</b>               | vii          |
| <br>                          |              |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>        | 1            |
| <b>II. MARCO TEÓRICO</b>      | 6            |
| <b>III. METODOLOGÍA</b>       | 26           |
| <b>IV. RESULTADOS</b>         | 34           |
| <b>V. DISCUSIÓN</b>           | 41           |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b>       | 48           |
| <b>RECOMENDACIONES</b>        | 49           |
| <b>FUENTES DE INFORMACIÓN</b> | 50           |
| <b>ANEXOS</b>                 | 60           |

## RESUMEN

El objetivo del estudio es comparar, a partir del uso complementario de las técnicas citometría de flujo y PCR cuantitativo, las características fenotípicas y genotípicas de los linfocitos T de pacientes de Enfermedad Renal Crónica (ERC), que padecen o no diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Se seleccionaron pacientes en hemodiálisis por ERC con DM2 (n= 11) y sin DM2 (n=11). Se determinó en estos la frecuencia de los linfocitos T de memoria, las células Treg y la expresión génica de los factores de transcripción T-bet, GATA3, RORYT y FoxP3. A partir de las muestras de sangre, se observó que las células T CD8 vírgenes y TCM tuvieron una frecuencia menor de recuento celular y las células TEM y TEMRA tenían conteos elevados de células en ambos grupos. Se pudo evidenciar un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células Treg CD4+ CD25+ CD127-, en pacientes con ERC y DM2 ( $5,1 \pm 2,6$  %) con respecto a los no diabéticos ( $2,8 \pm 3,1$  %;  $p < 0,05$ ). Con respecto a la expresión de ARNm no se observaron diferencias significativas, sin embargo, se evidenció el incremento en la expresión de T-bet y GATA3, y la disminución de Foxp3 en la población evaluada de pacientes renales con y sin DM2. Aunque la proporción de RORYT/Foxp3, fue mayor en los pacientes diabéticos, en comparación con los no diabéticos, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. El incremento de células T efectoras de memoria y disminución de células T vírgenes y Treg se ha asociado a un estado inflamatorio en los pacientes con ERC con y sin DM2. El estudio evidenció que la citometría de flujo y qPCR en tiempo real son herramientas poderosas para descubrir e implementar biomarcadores que sirven para integrar el mecanismo biológico con la respuesta clínica y la progresión de la enfermedad.

**Palabras clave:** Enfermedad renal crónica, citometría de flujo, qPCR en tiempo real, diabetes *mellitus* tipo 2, células T, factores de transcripción.



## ABSTRACT

The objective of the study is to compare, based on the complementary use of flow cytometry and quantitative PCR techniques, phenotypic and genotypic characteristics of T lymphocytes isolated from Chronic Kidney Disease (CKD) patients, with or without type 2 diabetes *mellitus* (DM2). The frequency of memory T lymphocytes, Treg cells and the expression of the transcription factors T-bet, GATA3, RORYT and FoxP3 (n=11) were determined. Blood samples obtained before dialysis indicate that naïve CD8+ T cells and TCM had lower cell count frequencies and TEM and TEMRA cells had elevated cell counts in both groups. It was detected a statistically significant increase in the percentage of CD4+ CD25+ CD127- Treg cells in patients with CKD and DM2 ( $5.1 \pm 2.6\%$ ) compared to non-diabetics ( $2.8 \pm 3.1\%$ ;  $p < 0.05$ ). Regarding mRNA expression, no significant differences were observed; however, there was evidence of an increase in the expression of T-bet and GATA3, and a decrease in Foxp3 in the evaluated population of renal patients with and without DM2. Although the ratio of RORYT/Foxp3 was higher in diabetic patients compared to non-diabetics, this difference was not statistically significant. The increase in memory effector T cells and the decrease in naïve T cells and Tregs has been associated with an inflammatory state in CKD patients with and without DM2. Flow cytometry and real-time qPCR are powerful tools to discover and implement biomarkers allowing to integrate the biological mechanism with clinical response and disease progression.

**Keywords:** Chronic kidney disease, flow cytometry, real-time qPCR, type 2 diabetes *mellitus*, T cells, transcription factors.

NOMBRE DEL TRABAJO

**FENOTIPAJE Y EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS T EN PACIENTES DIABÉTICOS Y NO DIABÉTICOS CON ENFERMEDAD RE**

AUTOR

**ANA CECILIA GRANDA ALACOTE**

RECuento de palabras

**17280 Words**

RECuento de caracteres

**91765 Characters**

RECuento de páginas

**68 Pages**

Tamaño del archivo

**1.0MB**

Fecha de entrega

**Dec 6, 2023 3:12 PM GMT-5**

Fecha del informe

**Dec 6, 2023 3:13 PM GMT-5**

● **10% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base

- 10% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Cross

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Base de datos de trabajos entregados
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)
- Material bibliográfico
- Material citado

## I. INTRODUCCIÓN

Se estima que en el mundo se producen más de un millón de muertes a causa de la enfermedad renal crónica (ERC), la cual afecta aproximadamente a un séptimo de la población adulta (1,2). Los enfermos renales pueden presentar diferentes comorbilidades, y una de las más prevalentes es la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Esto conlleva a una serie de complicaciones adicionales como retinopatía, enfermedades cardiovasculares y amputación de miembros inferiores (3).

La prevalencia de la DM2 representa entre el 7,2 y el 11,3 % de la población mundial (4). Esta enfermedad es un gran reto para la salud pública. Sus complicaciones son la principal causa de muerte, incrementando el costo del tratamiento hasta en un 80 % (5), lo cual representa una carga económica para los sistemas de salud (6).

La pérdida de la función renal no presenta síntomas en la etapa inicial. Por ello, es muy importante validar el apoyo diagnóstico de tecnologías como la citometría de flujo y biología molecular para estudio de marcadores biológicos, lo cual podría reducir el tiempo para su detección, estratificar riesgos asociados, como las complicaciones que incrementan la tasa de mortalidad (7, 8), o que impliquen terapia de sustitución por diálisis o un trasplante de riñón (9).

El sistema inmune tiene un rol importante en el progreso de diversas enfermedades, por lo que no es ajeno que los pacientes renales tengan una respuesta alterada de ciertas moléculas y células. Por un lado, las células T desempeñan un rol fundamental en la regulación y respuesta citotóxica, en consecuencia, se han desarrollado estudios en diferentes enfermedades como tumores sólidos, leucemias, desequilibrios autoinmunes y trastornos metabólicos. (10, 11, 12, 13, 14) La diversidad de las células T auxiliares es muy diversa y pueden proliferar a Th1, Th2, Th17 y Treg mediante la expresión de factores de transcripción maestros T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ T y FoxP3, los cuales juegan un papel importante en los equilibrios Th1/Th2 y Th17/Treg de la patogénesis (15)

La investigación respecto a las células T y los factores de transcripción maestros que regulan las células T auxiliares es escasa en la comparación de pacientes con ERC con y sin DM2. A la fecha, se conoce que los pacientes con DM2 y complicaciones cardiovasculares, presentan un aumento en la proporción de células T de memoria efectora (TEM, del inglés *T effector memory*), sugiriendo a esta población celular como biomarcador pronóstico (16). Por otro lado, se observó que el incremento en el porcentaje de linfocitos Treg está relacionado a la progresión de la ERC (17). Los estudios relacionados a la medición de los factores de transcripción de las células T auxiliares por PCR en tiempo real son escasos aun, siendo mejor estudiados en otras patologías como cáncer (18).

Aunque se han realizado investigaciones, con técnicas como citometría de flujo y citoquinas, para caracterizar las subpoblaciones de linfocitos Th, este trabajo pretende realizar una cuantificación relativa de la expresión de los reguladores maestros por la técnica de PCR en tiempo real para complementar la caracterización de las células Th y determinar la frecuencia de los linfocitos T de memoria y Treg mediante el diseño de un panel por citometría de flujo con la finalidad de aportar al conocimiento de las técnicas como citometría de flujo entre pacientes que se encuentran en HD por ERC, con y sin DM2. Lo anterior, respalda la relevancia de describir nuevos inmunomarcadores con valor pronóstico-predictivo para la identificación de comorbilidades o complicaciones de la ERC, que permitan disminuir la tasa de mortalidad de los pacientes con DM2. Obtener esta información nos permitirá conocer la influencia de la respuesta inmunológica y el papel de las células T en pacientes con ERC.

## **1.1 Formulación del problema**

¿El uso complementario de las técnicas citometría de flujo y PCR cuantitativo permite caracterizar el fenotipo y la expresión genética de los reguladores maestros de linfocitos T de pacientes de ERC, que padecen o no DM2?

## **1.2 Objetivos de la investigación**

### **1.2.1 Objetivo general**

Comparar, a partir del uso complementario de las técnicas citometría de flujo y PCR cuantitativo, las características fenotípicas y expresión genética de los

reguladores maestros de los linfocitos T de pacientes de ERC, que padecen o no DM2.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

Comparar las características demográficas, la etiología de la ERC y el tiempo de HD, de los pacientes incluidos en el estudio.

Utilizar la citometría de flujo para determinar la frecuencia de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de memoria, y los linfocitos T reguladores, en pacientes de ERC, con o sin DM2.

Determinar, a través de la técnica PCR cuantitativo, la expresión génica relativa de los factores de transcripción T-bet, GATA3, RORyT y FoxP3 en pacientes de ERC, con y sin DM2

## **1.3 Justificación de la investigación**

### **1.3.1 Importancia**

La ERC es una causa de mortalidad en pacientes con DM2 que requiere tratamiento sustitutivo renal en su estadio terminal (19). Siendo más prevalente principalmente por el aumento de la DM2 asociada con la obesidad (20). Aproximadamente 500 millones de personas están afectadas por DM2 en todo el mundo y se espera que este número aumente a 693 millones para 2045, donde el 30-40 % de los pacientes con DM2 desarrollarán ERC en alguna etapa de su vida. (21)

La principal estrategia terapéutica contra el desarrollo de la ERC sigue estando dirigida a optimizar el control de los principales factores de riesgo, como la hipertensión, la hiperglucemia y la dislipidemia (22). Sin embargo, estudios recientes indican la importancia de determinar la relación de la proteinuria y citoquinas inflamatorias, como IL6, y TNF $\alpha$  que contribuyen con la hipertrofia renal (20, 22). En este sentido, las células T de memoria, T reguladoras y moléculas del sistema inmunológico como los factores de transcripción T-bet, GATA3, RORyT y FoxP3 tienen un papel fundamental en la regulación de respuesta inmune y la patogenia en la ERC y la DM2 (23,24). La mayoría de las investigaciones se han enfocado en describir a pacientes con DM2 con

comorbilidades cardiovasculares y tuberculosis, o comparar a los pacientes con ERC con individuos sanos (17, 25, 26, 27). Por lo que, los mecanismos asociados a la progresión de la lesión renal no están del todo claro en pacientes no diabéticos y diabéticos, siendo esta última una patogenia multifactorial que presenta diversas complicaciones adicionales que pueden complicar el tratamiento (25).

Este trabajo, pretende comparar la frecuencia de células T de memoria, T reguladoras mediante el diseño de paneles de citometría de flujo y la expresión de factores de transcripción maestros de células T auxiliares por PCR en tiempo real utilizando Syber green. Estos conocimientos nos permitirán contribuir al conocimiento actual, ya que se conoce muy poco de la frecuencia de poblaciones celulares T de memoria y Treg en pacientes con ERC, y así mismo conocer si existe un impacto de la DM2 como comorbilidad de la ERC. En cuanto al uso de la PCR en tiempo real para determinar la expresión génica de los reguladores maestros T-bet, GATA3, RORyT y FoxP3, se desarrollará un protocolo con el uso de Syber green para la cuantificación relativa de estas células, ya que a menudo para determinar esto se usan técnicas como citometría y medición de citoquinas. Esto nos permitirá conocer una nueva forma de medir la frecuencia y el ratio de las células Th1/Th2 y Th17/Treg en los pacientes con ERC que podría servir como marcador biológico de la enfermedad y hacer uso de estos conocimientos para que en futuro puedan servir en la aplicación de inmunoterapia con la finalidad de mantener el equilibrio de estas poblaciones celulares.

### **1.3.2 Viabilidad**

Este proyecto de investigación ha contado con los recursos humanos, materiales y financieros que hacen viable su ejecución. Adicionalmente, se contó con la autorización formal del Director Médico del Centro Nefrológico S.A (Cenesa) para acceder a los registros, entrevistas para la obtención de los consentimientos informados y toma de muestras sanguíneas de los pacientes del centro, que fueron incluidos en este estudio. La experiencia del investigador ha permitido desarrollar la tecnología empleada para el procesamiento de las muestras.

### **1.4 Limitaciones de estudio**

En esta investigación el universo poblacional se limita a los pacientes que reciben tratamiento de HD en el Centro Nefrológico S.A (Genesa), lo que nos conduce a un tamaño muestral limitado. Además, el diseño experimental propuesto no considera realizar el seguimiento a los pacientes, lo cual limita la posibilidad de relacionar la información generada de las técnicas citometría de flujo y PCR cuantitativo con el curso de la enfermedad.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

En un estudio de tipo cuantitativo y diseño descriptivo, donde se incluyeron 25 pacientes con ND y 23 sujetos no diabéticos como grupo control y además se excluyeron a personas con infecciones, enfermedades autoinmunes y diálisis. Se determinó por citometría de flujo el fenotipo y la función de las células Treg CD3+, CD4+, CD25hi, y FOXP3+, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, albúmina sérica, proteinuria, la exclusión de sedimentos activos y la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR). Solo dos pacientes con ND tenían un recuento absoluto de células Treg estadísticamente más alto que el control, sin embargo, no hubo una asociación estadísticamente significativa entre las variables Treg, la duración de la DM y la proteinuria, y el análisis multivariado mostró que el recuento de Treg era un predictor independiente de eGFR con una significación estadística límite. Se recomendó la necesidad de probar la expresión de otros tipos de células T como Th1, Th2 y Th17 y los niveles de citocinas como el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 y IL-17 (17).

En el año 2018 se desarrolló una investigación de tipo cuantitativo y diseño descriptivo, que incluyó como población de 198 diabéticos separados en grupos DM2 con o sin enfermedad cardiovascular (ECV), casos de ECV sin DM2 y controles sanos. La investigación determinó por citometría de flujo la asociación de linfocitos Tregs circulantes CD25 +FoxP3 + y CD127<sup>dim</sup>, linfocitos T vírgenes (T naive) CD4 + CD45RO – CD62L +, linfocitos efectores de memoria (TEM) CD4 + CD45RO+ CD62L- y linfocitos T de memoria central (TCM) CD4 + CD45RO + CD62L +. Se observó que el grupo con DM2 tenía porcentajes elevados de células TEM, TCM, mientras que la frecuencia de las células T vírgenes se redujo. La proporción de células TEM aumentó en los sujetos con DM2 con enfermedad cardiovascular, mientras que no se observaron diferencias



en las Tregs entre estos dos grupos. Se concluyó que las células TEM podrían ser un biomarcador celular para la enfermedad cardiovascular en sujetos con DM2 (16).

En este mismo año, se ejecutó una investigación de tipo cualitativo y diseño descriptivo, que incluyó como población 51 individuos recién diagnosticados con DM2 y 55 controlados. La investigación determinó las relaciones entre Treg, resistencia a insulina (RI), contenido de lípidos en la sangre y citoquinas. Además, se investigó la frecuencia de Treg CD4+CD25+Foxp3+ por citometría de flujo, así como los niveles de expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ . El porcentaje de Treg, IL-10 y TGF- $\beta$  en el grupo de DM2 fue menor que en el grupo control. Los niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ , fueron menores en el grupo de obesos. El porcentaje de Treg se correlacionó negativamente con la RI y positivamente con TGF- $\beta$ . El trabajo concluyó que, la expresión de Treg representa un importante mediador en el entorno proinflamatorio que puede mejorar la RI en pacientes obesos con DM2 (25).

En otro estudio de tipo cuantitativo y diseño experimental, donde se incluyeron 113 pacientes con DM2 y 28 sujetos normales, se determinó el efecto del tratamiento con insulina en células T en recién diagnosticados con DM2. Se observó que las proporciones de Th1 y Th2 aumentaron, mientras que la población Treg disminuyó en el grupo de DM2 por citometría de flujo. La proporción Th1/Th2 se correlacionó positivamente con hemoglobina glicosilada y negativamente con el colesterol de lipoproteínas de alta densidad. Después del tratamiento con insulina, la proporción de células Th1/Th2 disminuyó y las células Treg aumentaron. Este trabajo concluyó, que el tratamiento de insulina a corto plazo podría modular las subpoblaciones de células T circulantes en pacientes con DM2, y por lo tanto aliviar las respuestas inflamatorias causadas por la hiperglucemia (26).

También, en el 2018, se efectuó una investigación de tipo cualitativo y diseño descriptivo, que incluyó como población de estudio 46 pacientes con tuberculosis con y sin DM2. La investigación evaluó las células inmunitarias de estos dos grupos. Se midieron los subconjuntos de células Th, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 $\alpha$ , perforina y Granzima B. Se encontró que los porcentajes más altos de Th2 y Th17, estaban presentes en pacientes con DM2 como

comorbilidad, las células T citotóxicas (Tc) disminuyeron en comparación del grupo con tuberculosis sin DM2. El trabajo concluyó que la DM2 tiene un impacto en la regulación de la inmunidad contra la tuberculosis al aumentar Th2 y Th17 (27).

Un estudio de tipo cuantitativo comparativo y diseño descriptivo, en el 2018, incluyó a 19 participantes con DM2 y 21 sin diabetes. La investigación determinó por citometría de flujo la fluctuación de células T CD4+, CD8+ y Treg, después de la prueba de tolerancia a la glucosa. Se observó que después de la prueba de tolerancia a la glucosa, la proporción de CD8+ se redujo significativamente, mientras que CD4+ aumentó después de 120 minutos de cargar la glucosa, las células Treg no se afectaron. La investigación concluyó que la glucosa afecta el equilibrio de las células T en circulación independientemente de la tolerancia a glucosa (28).

En 2018 se realizó una investigación de tipo cualitativo y diseño descriptivo, que incluyó 19 pacientes con DM2 y controles sanos. La investigación determinó la medición de células Treg CD4+CD25+CD45RA+ y la IL-2, medidas por citometría de flujo, ELISA y Foxp3 por PCR en tiempo real. Se observó la supresión de células Treg CD4+CD25+CD45RA+ en el grupo con DM2. La fosforilación de STAT5 se redujo significativamente en células CD4+, los niveles de Foxp3 se redujeron en Treg. El trabajo concluyó que el efecto inmuno regulador en DM2 son causados por células Treg, que involucra la vía de señalización IL2 y STAT5, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para definir mejor la disfunción de Treg en DM2 y correlaciones con el cuadro clínico (29).

En 2017, se divulgó una investigación de tipo descriptivo y diseño experimental, que incluyó a 20 individuos con tuberculosis latente con prediabetes y sin prediabetes. La investigación determinó por citometría de flujo el papel de las citocinas de las células T CD4+ y CD8+ en tuberculosis latente con prediabetes. Se observó que existe una disminución de frecuencia de células CD4 + Th1 y Th17; los subtipos de las células citotóxicas CD8+: Tc1, Tc2 y Tc17, al inicio y después de la estimulación micobacteriana en pacientes con tuberculosis y prediabetes. Se concluyó que la prediabetes se caracteriza por la disminución de frecuencias Th1/Tc1 y Th17/Tc17 específicas del antígeno, lo que indica que

la prediabetes está asociada con alteraciones de la respuesta inmune latente asociada a células T CD4+ y CD8+ (30).

El año 2016, se realizó una investigación de tipo cuantitativo, meta análisis y diseño descriptivo, que incluyó la revisión de 91 artículos de 5642 casos y 7378 controles. La investigación determinó los cambios de las células Treg, IL6, IL10, TGF- $\beta$  y TNF $\alpha$ , en pacientes con DM2 y en individuos sanos. Se observó que los pacientes tenían valores séricos elevados de IL6, TGF- $\beta$  y TNF $\alpha$ , los porcentajes de Treg e IL-10 disminuyeron, y a su vez estos valores fueron menores en pacientes con complicaciones, los porcentajes de IL17 y Treg no fueron significativo para los diabéticos. El trabajo concluyó que los pacientes con DM2 disminuyen el porcentaje de Treg periférico y niveles de IL-10, mientras que se elevan los niveles de IL6, TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Las complicaciones de la diabetes influyen en la disminución del número de Treg (31).

En el 2015, a partir de un trabajo de tipo cuantitativo y de diseño descriptivo, se estudiaron 20 pacientes con cáncer de hígado y 20 controles. Se midieron los niveles de expresión de los factores de transcripción por RT-PCR en tiempo real para Treg, T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ T y Foxp3 por PCR en sangre periférica. Se determinó que los niveles de T-bet disminuyeron, mientras que el nivel de ARNm de Gata-3 se incrementó. Por lo tanto, la relación T-bet/GATA-3 se redujo significativamente. Mientras que ROR $\gamma$ T y Foxp3, aumentaron significativamente en el grupo con hepato carcinoma, lo que concluye la existencia de un fenómeno predominantemente Th17 y Treg (32).

En el año 2014, se reportó un trabajo de tipo cuantitativo y diseño analítico, que incluyó como población de 93 individuos con DM2. La investigación midió el paradigma de Th1/Th2/ Th17/Treg por citometría de flujo, niveles séricos de las citoquinas por ELISA y creatinina. Concluyeron que el paradigma Th1/Th2/Th17/Treg está orientado a las células Th1 y Th17 y se correlaciona de forma positiva con creatinina en orina. Los niveles séricos de IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-10 aumentaron en los pacientes con ND. El trabajo concluyó que el paradigma Th1/Th2/Th17/Treg contribuye a la activación inmunitaria, la inflamación, al desarrollo y progresión de ND (33).

Ese mismo año en el 2014, una investigación de tipo cualitativo y diseño descriptivo incluyó como población de 60 pacientes con DM2, 23 con enfermedad de arterias coronarias, 21 con comorbilidad y 61 sanos. La investigación determinó la expresión de citoquinas IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, e IL-13 con un múltiplex de perlas de citoquinas, índice de masa y parámetros bioquímicos. Se observó en los individuos con DM2, un perfil mixto de Th1 y Th2, los enfermos de arterias coronarias mostraron un perfil Th1 y supresión de Th2, mientras los sujetos con comorbilidad presentaron perfil Th1 y con supresión de Th2. El trabajo concluyó que la transición de DM2 a enfermedad coronaria está asociado a una baja regulación de Th2 y aumento de la respuesta Th1 (34).

También en el 2014 se efectuó un estudio de tipo cualitativo y diseño descriptivo, que incluyó 4 pacientes con DM1, 5 con DM2 y 9 controles. La investigación determinó la expresión de genes inflamatorios inducidos por glucosa en linfocitos para identificar los factores de transcripción involucradas en las vías de señalización de diabéticos y controles normales. Se observó que los resultados de Real Time-qPCR y RT-PCR relativo sugirieron activación de IL17 e IL 6 por el tratamiento de glucosa. El trabajo concluyó que la IL17 e IL 6 inducida por glucosa es clave en la activación de linfocitos y la adherencia en las células endoteliales promoviendo las complicaciones diabéticas como la aterosclerosis (35).

En el 2012, se ejecutó una investigación de tipo cuantitativo y diseño descriptivo, que incluyó como población de estudio 181 individuos con DM2 y 117 controles del hospital general de china. Se determinó por citometría de flujo la relación entre las células Treg CD4+CD25<sup>hi</sup> y los subgrupos pro inflamatorios Th17 y Th1 en los diabéticos con trastornos metabólicos y complicaciones. Se observó que disminuyó las proporciones de Treg/Th17 y Treg/Th1 en pacientes con DM2. La proporción de Bcl-2/Bax disminuyó en células Treg en el grupo de DM2 con complicaciones micro cardiovasculares comparado con los que tenían complicaciones macro cardiovasculares, aumentando la muerte celular. Las Treg se correlacionan significativamente con la IL6, mientras que las células IL17 se relacionan negativamente con lipoproteínas de alta densidad. El trabajo concluyó que la polarización de las células T en pacientes diabéticos esta modulada por

HDL. Estos hallazgos abrieron explicaciones de que las células inmunes pueden tener impacto en la prevención y tratamiento (36).

En el propio año 2012, se llevó a cabo un trabajo de tipo cualitativo y diseño descriptivo, que incluyó como población de estudio 29 pacientes con DM2 y 30 controles normales. La investigación determinó las concentraciones de IFN, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IL-22 y TNF e IL22, por citometría de flujo e inmunoensayos. Se encontró que los niveles séricos de IL22 fueron más bajos en pacientes diabéticos que en los pacientes normales. La IL22 se correlacionó positivamente con la duración de la enfermedad. El trabajo concluyó que las células Th22 tienen un posible rol en la retinopatía diabética, especialmente en la etapa proliferativa, esta molécula puede ser un importante objetivo para el desarrollo de fármacos (37).

En el 2011, se realizó una investigación de tipo cuantitativo-analítico y diseño experimental, se incluyó como población de estudios 79 individuos obesos sometidos a cirugía para perder grasa y modelos murinos. Se caracterizó el rol de las células Treg infiltradas en la resistencia a la insulina en tejido adiposo. Se observó que la resistencia a insulina mediante la medición de recuentos celulares por citometría de flujo disminuyó la proliferación de Treg naturales, y el aumento de Treg adaptativas en el tejido adiposo en comparación con los controles. La depleción de Treg con un anticuerpo anti-CD25 mejoró la resistencia a la insulina. La depleción de Treg en un modelo experimental en ratones incrementó los signos de ND, y por el contrario la transferencia adoptiva de Tregs CD4+FoxP3+ mejoró la sensibilidad a la insulina y la ND, como consecuencia se encontró una mayor expresión de ARNm Foxp3. El trabajo concluyó que las Treg tienen un valor terapéutico potencial para mejorar la resistencia a la insulina y al daño al riñón al limitar el entorno proinflamatorio (38).

El año 2009, se ejecutó un trabajo de tipo cualitativo y diseño descriptivo, que incluyó como población de estudio 60 pacientes con DM2 y 15 individuos normales. La investigación determinó la expresión de Treg CD4+CD25+Foxp3+ en pacientes con ND por citometría de flujo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de DM2 y controles, se observó una disminución de expresión de Treg en los pacientes con microalbuminuria y macroalbuminuria. Se observó correlación inversa entre la progresión de la

enfermedad, expresión de células Treg y entre la excreción de albumina y expresión de células Treg. El trabajo concluyó que las células Treg pueden desempeñar un rol importante en la aparición y el desarrollo de la ND (39).

En el año 2006, se elaboró un estudio de tipo cuantitativo y diseño descriptivo, que incluyó como población de estudios 21 pacientes con enfermedad renal terminal en HD con toma de muestras pre y post diálisis. La investigación determinó los porcentajes subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo, donde se identificaron células vírgenes, TCM, TEM y TEMRA, adicionalmente se midió la apoptosis de las células T. El recuento total de leucocitos, granulocitos y monocitos fueron significativamente mayores en los enfermos renal terminal en comparación el grupo de control. Así mismo, éstos mostraron una marcada reducción de los subconjuntos de células T vírgenes, las TCM se redujeron y los subconjuntos TEM (TEM y TEMRA) no fueron significativamente diferentes. El trabajo concluyó que los pacientes con enfermedad renal terminal exhiben una marcada reducción de los subconjuntos de células T vírgenes y TCM asociado a la apoptosis de estas células (40).

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1. Diabetes *mellitus***

Es un desorden metabólico caracterizado por la presencia de hiperglucemia crónica, acompañada por el deterioro del metabolismo de lípidos, y carbohidratos por defectos de la secreción de la insulina (41). Durante la diabetes *mellitus*, la glucemia se eleva a valores anormales hasta alcanzar concentraciones nocivas para los sistemas fisiológicos, provocando daño en el tejido nervioso (neuropatías), alteraciones en la retina (retinopatía), el riñón (nefropatía) y en prácticamente el organismo completo, con un pronóstico letal si no se controla (42). El desarrollo de la enfermedad está determinado por diferentes procesos fisiopatológicos, por la destrucción autoinmune de las células beta que conduce a un déficit de insulina o por una resistencia a la acción de la insulina (43).

### **2.2.2. Clasificación de la diabetes**

#### **Diabetes *mellitus* tipo 1**

La DM1 es una enfermedad autoinmune causada por la destrucción inmune de las células  $\beta$  de los islotes. La DM1 puede afectar a personas de cualquier edad,

pero se diagnostica preferentemente en niños, adolescentes y adultos jóvenes. El sistema inmunitario ataca las células  $\beta$ , lo que conduce a una deficiencia de la secreción de insulina. La inyección de insulina es la solución más común y efectiva para mantener el nivel de glucosa en sangre para pacientes con DM1 (44).

### **Diabetes *mellitus* tipo 2**

Es un trastorno metabólico, caracterizado por un nivel elevado de glucosa en sangre y una acción de insulina atenuada. Afecta principalmente a personas con sobrepeso mayor de 40 años, que puede atribuirse a factores genéticos, ambientales y de estilo de vida (45). La DM2 es una enfermedad crónica de evolución lenta y puede conducir a complicaciones micro o macro vasculares en los pacientes (46).

### **Diabetes gestacional**

Esta enfermedad es una complicación médica más común del embarazo, y es detectada por primera vez durante el embarazo, y conlleva un riesgo importante de desarrollar DM2 para la madre y el feto (47). El embarazo se asocia con resistencia a la insulina e hiperinsulinemia que pueden predisponer a algunas mujeres a desarrollar diabetes por el aumento de estrógenos, progesterona y cortisol. Las hormonas y adipocitos secretadas por la placenta, incluido el factor de necrosis tumoral, el lactógeno placentario humano y la hormona del crecimiento placentario humano son posibles causas de resistencia a insulina (48).

### **2.2.3 Complicaciones de la diabetes *mellitus* tipo 2**

Las afecciones adicionales, se dan por la producción de glucosilación avanzada, la creación de un microambiente proinflamatorio y la inducción de estrés oxidativo, que estimula la inflamación crónica y la hipertrofia glomerular (49). Estas complicaciones se han dividido en macro vasculares como enfermedades cardiovasculares y microvasculares como: complicaciones que afectan el riñón, la retina y el sistema nervioso. Los pacientes con diabetes *mellitus* de países en desarrollo tienen un riesgo mayor de desarrollar complicaciones renales y accidente cerebrovascular en comparación a los pacientes de países desarrollados (50).

## **Enfermedad renal crónica**

La enfermedad renal, se caracteriza por la presencia de albumina en la orina, asociado con el deterioro del endotelio glomerular, que conduce a una elevación de la filtración de proteínas en la orina. La tasa de filtración glomerular (TFG) puede ser estimada usando la fórmula del estudio "Modification of Diet in Renal Disease" (MDRD) la cual nos permitirá clasificar a la enfermedad renal crónica (51). La enfermedad renal crónica (ERC) es una de las complicaciones microvasculares que afecta al 40 % de pacientes diabéticos (52). Aproximadamente el 10 % de las muertes en personas con DM2 son atribuibles a insuficiencia renal (50).

### **2.2.4 Linfocitos T**

Los linfocitos T son células del sistema inmune adaptativo que maduran en el timo a partir de progenitores linfoides comunes provenientes de la médula ósea. Las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ salen del timo y migran hacia los órganos linfoides secundarios (53).

#### **2.2.4.1 Subpoblaciones de linfocitos T**

##### **Linfocitos T vírgenes**

Las células T vírgenes o *naive*, son células que han superado la selección en el timo, pero no han tenido contacto con el antígeno. Estos linfocitos expresan CD45RA, así como la molécula de adhesión CD62L y el receptor de quimiocinas CCR7 (54).

##### **Linfocitos T de memoria**

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ memoria son heterogéneos y pueden subdividirse en subgrupos. Los linfocitos T memoria centrales (TCM), con fenotipo: CD45RO+ CD62L+ CCR7+ expresan el receptor para quimiocina CCR7 y la molécula de adhesión selectina L, se alojan en los ganglios linfáticos y producen respuesta proliferativa rápida. Los linfocitos T memoria efectores (TEM) con fenotipo: CD45RO+CD62L-CCR7-, no expresan CCR7 ni la selectina L, y se alojan en las zonas periféricas, ante el estímulo antigénico, los linfocitos T memoria efectores producen citocinas efectoras como el IFN- $\gamma$  y se convierten rápidamente en citotóxicos, el fenotipo CCR7-CD45RA+ (TEMRA), en general



son células efectoras diferenciadas terminalmente apoyadas por baja secreción de IL-2 y alta de IFN $\gamma$  (53, 55).

### **Linfocitos T reguladores y T auxiliares (Th)**

Las células T CD4<sup>+</sup> se dividen en dos linajes distintos: células Treg y células Th (56). Las células Th convencionales participan en la regulación de la inmunidad al modular la actividad de las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>, células B y macrófagos (57). Las células Th cooperan con las células B en diferentes etapas, como: proliferación, supervivencia, diferenciación de células plasmáticas, hipermutación somática, cambio de clase, recombinación, adhesión y atracción (58).

La identificación de las células Treg sigue siendo problemática. Actualmente se utilizan diversos marcadores como: CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3, CD127 y el factor de transcripción Foxp3 (56). Las células Treg son un componente esencial de la respuesta inmune celular, ocupan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y presentan un objetivo terapéutico atractivo en una variedad de inmunopatologías (59).

#### **2.2.4.2 Factores de transcripción maestros en los linfocitos Th**

Las células T CD4<sup>+</sup> se clasifican en 4 subtipos principales: Th1, Th2, Th17 y Treg (60). Cada uno de estos subtipos de linfocitos T, expresan factores de transcripción maestros que regulan la actividad de estas células de manera global (61). Estos factores de transcripción son críticos para la diferenciación de células Th y la producción de citoquinas. Se requiere al menos un par de factores de transcripción para cada subpoblación, uno que participa en la transducción de la señal hacia el núcleo (del tipo STAT) y uno que participa en la transcripción de los genes específicos de cada subpoblación. Los pares de factores de transcripción esenciales de los linajes Th son: T-bet/STAT4 (Th1), GATA-3/STAT6 (Th2), ROR $\gamma$ t/STAT3 (Th17) y Foxp3/STAT5 (Treg inducibles), siendo los reguladores maestros T-bet, Gata-3, Ror $\gamma$ T y Foxp3; y STAT4, STAT6, STAT3 y STAT6 activadores de los anteriores (62,63).

#### **T-bet**

T-bet es un factor de transcripción crítico para la diferenciación de células Th1 (62) T-bet es un miembro de la familia T box (64) que actúa como un potente

regulador de la expresión del gen IFN $\gamma$  (65). La expresión de T-bet está mediada por la IL-12 y el activador de transcripción 4 (STAT4) (66). T-bet es responsable de la programación genética para el inicio del desarrollo del linaje Th1 a partir de células Th vírgenes y actúa tanto, iniciando la programación genética de Th1 como represión de las Th2 (65).

### **GATA3**

El factor de transcripción GATA3 desempeña un papel esencial en el desarrollo y la diferenciación celular de las células Th2. (62). La transducción de GATA3 esta mediada por la señalización IL-4 y el activador de transcripción 6 (STAT6) (67). Los miembros de la familia GATA se unen a una secuencia de consenso (A/T) GATA (A/G) en los promotores de genes para activar directamente o reprimir la expresión de genes diana (68).

GATA1 y GATA2 se expresan principalmente en células hematopoyéticas, mientras que GATA4, GATA5 y GATA6 se expresan en tejidos como el corazón, el hígado y los intestinos. GATA3 está presente tanto en tejidos hematopoyéticos, riñón, piel y glándula mamaria (69, 70, 71).

### **Foxp3**

FOXP3 pertenece a la familia del factor de transcripción del forkhead, implicado en la regulación, activación y diferenciación de las células T (72). La transducción de FOXP3 es mediada por IL2 y STAT5 (73).

La familia de FOXP3 incluye: 1) FOXP1 (gen supresor de tumores, está asociado a trastornos linfoproliferativos, y otros tipos de cáncer como: pulmón, mama y estómago); 2) FOXP2 (asociada a trastornos cognitivos neuronales); 3) FOXP3 (gen relacionado a la expresión de células reguladoras CD4+CD25+); 4) FOXP4 (asociado al desarrollo de la corteza cerebral) (74).

### **ROR $\gamma$ t**

La transducción de ROR $\gamma$ t esta mediada por STAT3, tiene la función de regular el desarrollo de las células Th17. La subfamilia ROR tiene tres homólogos en mamíferos: ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  y ROR $\gamma$ . Entre estos, ROR $\beta$  no se expresa en células inmunes, pero la expresión de ROR $\alpha$  es alta en las células Th17. La inhibición

de ROR $\gamma$ t es suficiente para bloquear completamente la diferenciación de células Th17 (75)

A diferencia de ROR $\gamma$ t, que se expresa únicamente en células de linaje linfóide del sistema inmune, ROR $\gamma$  se expresa a bajos niveles en la mayoría de los tejidos, incluyendo el cerebro, el hígado, el músculo y los tejidos adiposos (76).

### 2.2.5. Citometría de flujo

En las últimas décadas la citometría de flujo ha cambiado mucho, desde la medición de un solo parámetro de fluorescencia a fines de la década de 1960 (77) a citómetros de flujo multiláser que tienen cinco láseres, lo cual permite la detección exitosa de hasta 28 parámetros fluorescentes (78).

Esta tecnología es utilizada para realizar mediciones en células completas, así como en constituyentes celulares preparados, como núcleos y orgánulos, permite analizar y cuantificar de manera simultánea múltiples características celulares (79). La citometría de flujo nos permite diagnosticar, caracterizar las etapas de la enfermedad, detectar cambios asociados con la enfermedad o las terapias (80), seguimiento de la recuperación inmune tras el trasplante de médula ósea, en la identificación precoz del rechazo en pacientes que han recibido un trasplante alogénico (81)

Un citómetro de flujo se encuentra compuesto por tres principales sistemas: el de fluidos, el óptico, y el electrónico (Figura. 1).

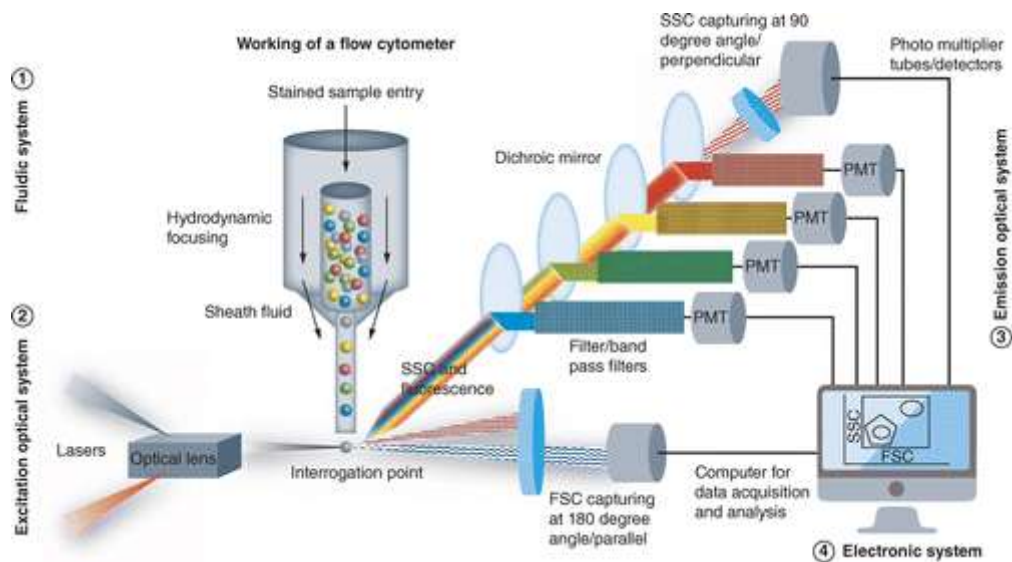
**Sistema de fluidos:** su función es alinear y transportar las células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz, la cual tiene una propiedad hidrodinámica, de inyección de la muestra en el centro de una corriente de fluido de agua o un buffer de fosfatos, las células se alinean en fila y el haz de luz incide sobre una célula a la vez (82).

**Sistema óptico:** está compuesto por láseres y filtros, que se encargan de iluminar a las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados. Cada partícula se analiza para determinar la dispersión de la luz visible en dos direcciones diferentes, la dirección hacia adelante (Fresh Scatter o FSC) que puede indicar el tamaño relativo de la célula y a 90° (Side Scatter o SSC) que indica la complejidad interna o granularidad de la célula. (83) Las

células, al ser incididas por el láser, tendrán la capacidad de dispersar la luz de acuerdo con su tamaño y su granularidad. Los láseres más comunes utilizados en los citómetros de flujo tradicionales son 488 nm (azul), 405 nm (violeta), 532 nm (verde), 552 nm (verde), 561 nm (verde-amarillo), 640 nm (rojo) y 355 nm (ultravioleta) (84). En la citometría de flujo se utiliza una variedad de reactivos fluorescentes. Estos incluyen anticuerpos conjugados con fluorescencia, colorantes de unión al ADN, colorantes de viabilidad, colorantes indicadores de iones y proteínas de expresión fluorescentes (83).

**Sistema electrónico:** Una vez que la señal luminosa es generada cuando el haz de luz incide en la célula, consta de sensores luminosos como fotodiodos y fotomultiplicadores, que tienen la finalidad de convertir los fotones en electrones en corriente eléctrica. De este modo, la señal eléctrica es recibida por la computadora y traducida en gráficos e histogramas (85).

A pesar de que la citometría de flujo ha aumentado la flexibilidad de los fluoróforos, las consideraciones sobre el diseño del panel de la citometría de flujo convencional requieren conocimiento previo de la biología del ensayo, la instrumentación, los niveles de expresión de los marcadores de interés, el brillo de los fluoróforos seleccionados y la optimización cuidadosa del panel de anticuerpos (86)



**Figura 1.** Sistema de citometría de flujo. Tomado de <https://thesciencenotes.com/flow-cytometry-introduction-principle-applications-limitations/>

**Diseño de experimentos de citometría de flujo**

El inmunofenotipado citométrico es una herramienta poderosa para descubrir e implementar biomarcadores, por ello la necesidad de conocer el diseño de experimentos es muy importante para la implementación de paneles. En la siguiente tabla se muestran los pasos para diseñar experimentos.

**Tabla 1.** Pasos para el diseño de experimentos, modificado de (Holmberg-Thyden et al 2012) (80)

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Elección de marcadores     | Se definen las subpoblaciones celulares y los marcadores funcionales, se deben considerar la densidad de antígeno y las subpoblaciones que expresan los mismos marcadores. Los colores se emparejan con los marcadores y los clones de anticuerpos seleccionados, se verifica la unión antígeno-anticuerpo para determinar la concentración a la que se obtiene la mejor separación posible.  |
| Configuración de citómetro | Se debe conocer la máquina FACS, los colores se pueden usar con la configuración del láser y filtro.<br><br>Registrar perlas teñidas individuales para crear una matriz de dispersión de desbordamiento (SSM).<br><br>El SSM calculado muestra cómo se superponen los colores y cuantifica su brillo o índice de manchas.   |
| Unir colores y marcadores  | Se tiene que colocar los marcadores junto a los colores en el SSM en una hoja de cálculo, de modo que los marcadores co expresados no estén representados por colores con una gran superposición espectral. Los colores brillantes con índice de tinción alto se reservan para antígenos poco expresados y viceversa.   |
| Probar y optimizar         | Decidir qué clones usar para los anticuerpos y titular la concentración que genera mayor dispersión con la menor cantidad de ruido. Teñir las células con el panel completo y evaluar si requiere algún cambio. Se debe configurar los valores o voltajes del tubo fotomultiplicador para los detectores asignados a los fluorocromos utilizados. Estos valores a menudo se optimizan automáticamente cuando se determinan los ajustes de referencia, pero deben confirmarse durante la compensación. |
| Uso de los paneles         | Crear una compensación con microesferas o células teñidas individuales para la configuración de la aplicación. Con la activación secuencial manual para analizar los datos de citometría de flujo o métodos de agrupamiento no supervisados con fines exploratorios.  |

### **2.2.6. PCR en tiempo real**

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Kary Mullis en 1984 fue considerada como una revolución en la ciencia. (87) La PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta común para detectar y cuantificar genes, las principales ventajas de qPCR son su alto rendimiento, sensibilidad, precisión y versatilidad a partir de una reacción enzimática *in vitro* que amplifica varias copias de una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos (88).

El instrumento utilizado para realizar la técnica PCR en tiempo real es el termociclador, el cual consta de una fuente de luz de excitación integrada, que puede ser una lámpara láser o LED, un sistema de detección de fluorescencia y un software que muestra los datos de fluorescencia registrados a partir de una mezcla de la muestra con la reacción de un colorante intercalante de dsDNA o una sonda marcada con fluoróforo (89)

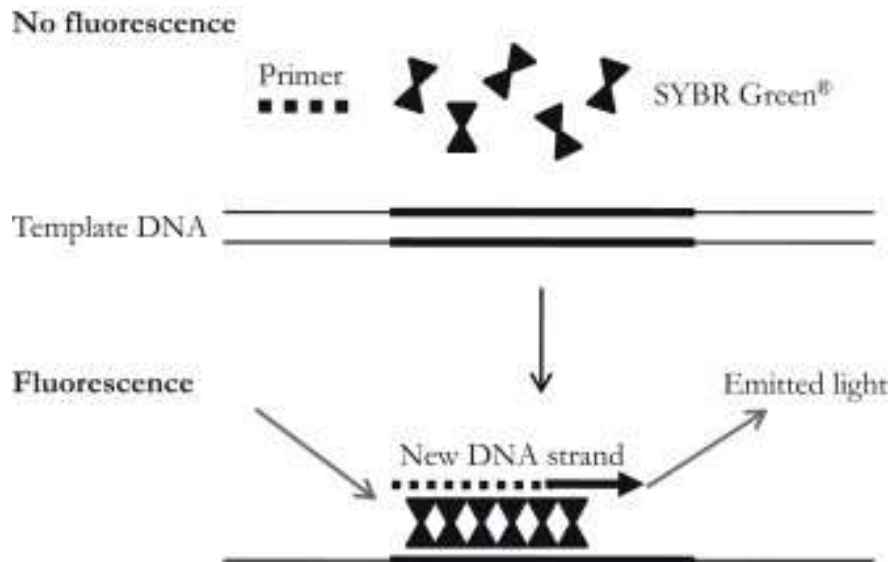
La reacción consta de una serie de ciclos de replicación de tres fases sucesivas: (1) desnaturalización del dsDNA original en dos moléculas complementarias monocatenarias (ssDNA) a una temperatura de 95°C las cadenas se separan; (2) hibridación de dos cebadores de ssDNA cortos con su respectiva región complementaria de cada ssDNA a una temperatura de fusión ( $T_m$ ) entre 50-60 °C.; y (3) elongación o la replicación del ADN de cada ssDNA unida al cebador por la ADN polimerasa, produciendo dos moléculas de dsDNA idénticas a una temperatura de 72 °C. Los ciclos de amplificación exponencial se repiten de 30 a 40 veces, lo que da como resultado una amplificación de más de un millón de veces del material inicial (90)

El análisis de la expresión génica se puede realizar por dos métodos: 1) El uso de sondas de hidrólisis unidas a oligonucleótidos por medio de la actividad exonucleasa 5' de la enzima Taq polimerasa y la liberación de la señal de fluorescencia; 2) El uso de agentes de intercalación de ADN de doble cadena (dsDNA) como SYBRGreen I y EvaGreen, lo que lleva a la detección de productos de amplificación tanto específicos como no específicos (91,92, 93).

#### **SYBR Green I**

SYBR Green I es un colorante de cianina asimétrico específico de dsDNA que se une al surco menor de dsDNA (Figura 2). La afinidad de unión es más de 100 veces mayor que la del bromuro de etidio, puede excitarse con luz azul con una longitud de onda de 480 nm. Su espectro de emisión es comparable al de la fluoresceína con un máximo de 520 nm. Los productos de la PCR se saturan con el colorante 1000 veces más dando como resultado aumento de la señal de fluorescencia cuando se monitorea en tiempo real (94).

Este método evita la necesidad de sondas de qPCR, lo que hace que su uso sea menos costoso. Su principal desventaja es que la especificidad está determinada completamente por los cebadores y, por lo tanto, se debe considerar el riesgo de amplificar productos de PCR no específicos durante la optimización, como los dímeros de cebadores (95).



**Figura 2.** Principio de la detección por Sybr Green

### 2.2.6.2. Real time PCR cuantitativa

La PCR en tiempo real cuantitativa es una técnica clasificada en dos tipos según el propósito. La cuantificación absoluta es usada en el campo de la microbiología, tecnología de alimentos y biotecnología para cuantificar microorganismos a partir de una curva de calibración donde se amplifican diluciones seriadas de un estándar de concentración conocida, mientras la cuantificación relativa es usada en el campo de la genómica y transcriptómica funcional, expresión génica de experimentos biológicos (96, 97)

#### Cuantificación relativa

La aplicación más utilizada de la cuantificación relativa es la comparación de los niveles de expresión génica RNA mensajero entre diferentes tejidos o diferentes tratamientos a partir de la comparación con un gen control como b-actina,  $\beta$ -2-microglobulin o GAPDH, la inclusión de estos controles endógenos en el ensayo sirve para corregir las variaciones de muestra a muestra con la finalidad de mejorar la confiabilidad de los experimentos relativos de RT-qPCR (98).

No es necesario establecer modelos de cuantificación complejos basados en curvas de calibración para determinar la expresión relativa de un gen, convirtiéndose en una herramienta ideal y de bajo costo sin necesidad de construcción de plásmidos o material de referencia para llevar a cabo una curva de calibración con Syber green (99).

El método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  es una forma de analizar cambios relativos en la expresión génica a partir de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real (100). Un método sensible para evaluar si esta regla se cumple es calcular la  $\Delta C_t$  para diferentes diluciones de la muestra y del gen normalizador (96).

### 2.3 Definición de términos

**Diabetes mellitus tipo 2:** Conocida como diabetes no insulino-dependiente o del adulto, tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina, lo que a menudo es consecuencia del exceso de peso o la inactividad física.

**Enfermedad renal crónica:** disminución de la función del riñón o falla renal, que interfiere en el equilibrio de electrolitos, se pierde la capacidad de concentrar la orina, y excretar un exceso de fosfato, ácido y potasio.

#### **Nefropatía diabética**

Es una complicación común de la diabetes tipo 1 y tipo 2. Con el tiempo, la diabetes mal controlada puede causar daño a los grupos de vasos sanguíneos en los riñones que filtran los desechos de la sangre.

**Hemodiálisis:** procedimiento que consiste en eliminar de la sangre residuos que el riñón no puede eliminar en pacientes con insuficiencia renal.

**Células T cooperadoras:** Las células T auxiliares son necesarias para casi todas las respuestas inmunes adaptativas, ayudan a activar las células B para



secretar anticuerpos y macrófagos, ayudan a activar las células T citotóxicas para matar las células infectadas.

**Células T reguladoras:** Son un grupo de linfocitos T que regulan o suprimen la actividad y proliferación de otras células del sistema inmunitario. Las células Treg evitan que las células inmunes ataquen al propio cuerpo, tienen la función de controlar la respuesta inmunitaria o tolerancia para prevenir enfermedades autoinmunes.

**Células T de memoria:** Las células T de memoria surgen con la activación de los linfocitos T vírgenes, y generan una respuesta secundaria cuantitativa y cualitativamente superior respecto a la respuesta primaria.

**Factores de transcripción:** Son proteínas que tienen la función de regular o activar la expresión de un gen. En el caso de los linfocitos Th, estos se expresan y activan por las señales de diferenciación que reciben las células Th0, y conducen a diferentes linajes, como: Th1, Th2, Th17 o T reguladoras. Estas tienen como sus reguladores maestros a T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t y Foxp3, respectivamente.

**Citometría de flujo:** técnica que permite la clasificación y recuento de células en base a marcadores moleculares superficiales o intracelulares, que son detectados a partir de la detección de fluorescencia inducida por, al menos, un láser.

**Células mononucleares en sangre periférica:** poblaciones celulares que incluyen leucocitos mononucleares (linfocitos T, B, NK) y los monocitos/macrófagos

**ARNm:** El ARN mensajero (ARNm) es una molécula de cadena simple de ácido ribonucleico que tiene la función de transportar la información genética del núcleo hacia el citoplasma, para ser traducida como una proteína.

**ADNc:** El ADN complementario (ADNc) es el ADN producto de la transcripción inversa de un molde de ARN mensajero que codifica una proteína.

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa en tiempo real (RT-PCR, de sus siglas en inglés): Es una técnica que permite la

detección de ADNc mediante fluorescencia, a partir de una transcripción reversa de ARNm.

**Termociclador:** Instrumento que permite realizar de forma automatizada y secuencial repetir varios ciclos de temperaturas para realizar la técnica de amplificación de ADN por reacción de cadena de la polimerasa (PCR)

**qPCR:** Técnica que se utiliza para cuantificar ácidos nucleicos para numerosas aplicaciones a partir de una curva de calibración o un estándar.

**Sondas Taqman:** Oligonucleótidos complementarios a la secuencia comprendida entre los dos primers, contiene un fluoróforo emisor y un quencher.

**Taq polimerasa:** Es una enzima ADN polimerasa termoestable, producida por la bacteria *Thermus aquaticus*.

**Retro transcriptasa:** Es una enzima de tipo ADN polimerasa, codificada por retrovirus, cuya función es sintetizar ADN de doble cadena a partir de una copia de ARN.

**Cebador:** Es una secuencia corta de ADN utilizada en una reacción en cadena de la polimerasa, se une en forma complementaria específica a una cadena única de ácido nucleico e inicia la síntesis de esa cadena en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos en una reacción de PCR.

**Citómetro de flujo:** Aparato mediante el que se realiza la citometría de flujo, consta una cámara por la que pasa la suspensión celular, el láser que incide sobre la cámara y un sistema de detectores que recogen la luz emitida por los fluorocromos que llevan asociados las células.

**Anticuerpo conjugado:** Anticuerpos con moléculas fluorescentes que permite la detección y cuantificación de numerosos antígenos de superficie celular. Se definen mediante un prefijo CD los cuales son definidos como marcadores de cada linaje celular.

**CD (del inglés cluster of differentiation):** El sistema CD es una nomenclatura comúnmente usada para diferenciar marcadores celulares que están asociadas a funciones y propiedades inmunes. El uso de las moléculas CD define las poblaciones celulares.

**Marcador biológico:** Característica bioquímica o biológica medible, que es útil para el diagnóstico y estimación pronóstico de una enfermedad.

#### **2.4. Hipótesis de investigación**

Existen diferencias significativas en las características fenotípicas y la expresión genética de los reguladores maestros de linfocitos T, aislados de pacientes de ERC, con y sin DM2, determinadas a partir de uso complementario de las técnicas citometría de flujo y PCR cuantitativo.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Diseño metodológico**

El presente es un estudio de tipo, observacional, descriptivo transversal, y prospectivo. Según la intervención del investigador es observacional, porque se evaluará el fenotipo y la expresión de ARNm sin modificar la intervención clínica habitual de hemodiálisis que reciben los pacientes. Según su alcance es descriptivo porque describirá la frecuencia, tipos de células T y la expresión de ARNm en pacientes con DM2 y sin diabetes con ERC. Según el número de mediciones de las variables de estudio es transversal, ya que se realizará una sola medición antes de realizar su procedimiento habitual de hemodiálisis. Según el momento de la recolección de datos, es de tipo prospectivo porque se recolecta datos mientras se da la ejecución del estudio.

En esta investigación se evaluaron pacientes con ERC sometidos a HD, que recibieron tratamiento en el Centro de Nefrológico Privado CENESA S.A durante el 2019-2020. Se consideró incluir solo a pacientes que realizan terapia de HD en el centro Nefrológico CENESA con historia clínica completa los cuales detallan (genero, edad, etiología, tiempo de HD, tiempo de uremia, Índice de masa corporal IMC, tipo de acceso vascular de catéter y comorbilidades y el hemograma del día de toma de muestra). El diseño experimental propuesto no considera realizar el seguimiento a los pacientes.

#### **3.2 Diseño muestral**

##### **Población universo**

Pacientes con ERC sometidos a HD.

##### **Población de estudio**

Pacientes con y sin DM2 sometidos a HD por ERC atendidos en el Centro Nefrológico SA (CENESA).

### **Criterios de elegibilidad**

#### **Inclusión**

Pacientes

- con diagnóstico ERC, con y sin DM2,
- mayores de 18 años,
- con historia clínica completa con hemograma.

#### **Exclusión**

Pacientes

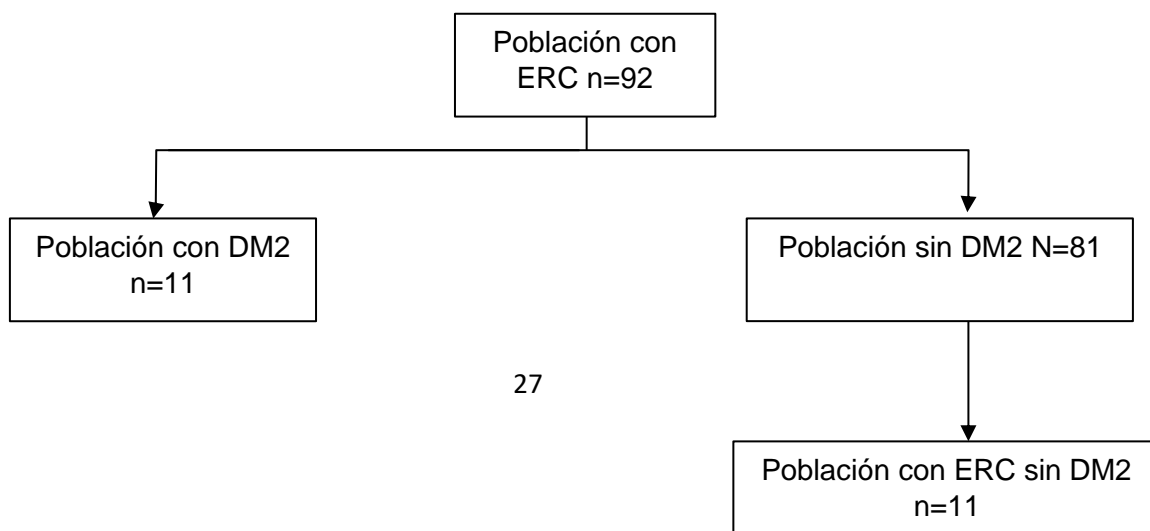
- con patológicas hematológicas, oncológicas y autoinmunes,
- con diagnóstico clínico o sospecha de DM1,
- embarazadas.

### **Selección y tamaño de la muestra**

En el Centro de hemodiálisis CENESA se identificaron a los pacientes con ERC (n:92). Se seleccionaron los pacientes con DM2 (n:11) y a partir de la otra población de pacientes sin DM2 (n:81) se seleccionaron el mismo número de pacientes de los pacientes con DM2 (n:11) los cuales fueron pareados, teniendo en cuenta la edad para evitar el sesgo por la senescencia (Figura 4).

A todos los pacientes del estudio se les invitó a participar voluntariamente y se les solicitó firmar su autorización con el respectivo consentimiento informado.

Se registraron las historias de los pacientes, de los cuales se obtuvieron los datos etiológicos, clínicos y parámetros hematológicos de los pacientes estudiados.



**Figura 4.** Procedimiento para la selección de la muestra. Los pacientes se eligieron en base a los criterios de inclusión y exclusión definidos en el estudio.

### **3.3 Técnicas y procedimientos de recolección de datos**

#### **3.3.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

Las muestras de sangre se colectaron en 2 tubos con EDTA para obtener un volumen total de 8 ml de sangre, extraída al momento de la canulación. A partir de esta muestra se realizó los siguientes procedimientos:

Se colocó la muestra de sangre periférica (3 mL) en un tubo cónico de 15 mL y se completó con igual volumen de PBS. En otro tubo se agregó 3 mL de Ficoll Hypaque (Histopaque®-1077). Con una pipeta de transferencia se pasó la muestra de sangre diluida del tubo cónico al tubo con Ficoll, de tal manera de no perturbar la interfase. Este tubo se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente y sin freno en la centrifuga. Posteriormente, se retiró el plasma de la parte superior y luego el paquete celular ubicado sobre el Ficoll (anillo color blanco) y se pasó a un nuevo tubo cónico de 15 mL para ser lavado dos veces por centrifugación (2000 rpm por 5 minutos) con solución salina tamponada con fosfato PBS 1x (Sigma-Aldrich®), se eliminó el sobrenadante y el paquete de células mononucleares periféricas (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) se resuspendió en 200 µL de PBS.

#### **3.3.2 Conteo de células**

Para contar las PBMC se tomó la proporción: 25 µL de medio de cultivo RPMI-1640, 12,5 µL de azul de tripán y 12,5 µL de la muestra. Después de mezclar, se tomó 10 µL y se colocó en la cámara de Neubauer o hemo citómetro para contar el número de células viables (vistas como células brillantes) y no viables (teñidas de azul). El recuento de células viables se obtendrá de la siguiente formula, según las recomendaciones de Trypan blue (Sigma-Aldrich®).

$$\frac{N^{\circ} \text{ conteo de celulas vivas}}{N^{\circ} \text{ de cuadrados contados}} \times \text{factor de dilucion} \times 10000$$

Para poder desarrollar la citometría debemos obtener un conteo entre 2- 4 x10<sup>6</sup> células en 200 uL.

### 3.3.3 Citometría de flujo

Se re-suspendieron 1-2 x 10<sup>6</sup> PBMC en solución FACS (0.1X PBS, 2-5 % BSA, 2mM EDTA, 2mM NaN<sub>3</sub>) y se adicionó 5 µL de los anticuerpos FITC-CCR7, PE-CD45RA, PercP Cy5.5-CD8, PECy7-CD3 y APC-CD4 (para la caracterización de células T de memoria), FITC-CD4, PE-CD25 y APC anti-human CD127 (para la caracterización de células T reguladoras) (Tabla 2). Se incubó los tubos a 4°C de 15 a 20 minutos. Luego, las células se lavaron 2 veces con 2 mL de solución FACS a 2000 RPM por 5 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 0,3 mL de solución FACS, la cual se incubó 5 minutos para proceder a la lectura en el citómetro de flujo BD FACSLytic™ Clinical Flow Cytometry System y su análisis respectivo con el software Infinicyt™

**Tabla 2.** Fluorocromos utilizados en los procedimientos de citometría

| Fluorocromo | Color de emisión | Ex. Max (nm) | Em. Max (nm) |
|-------------|------------------|--------------|--------------|
| FITC        | Green            | 494          | 519          |
| PE          | Yellow           | 496;564      | 578          |
| PercP Cy5.5 | Far red          | 482          | 695          |
| PECy7       | InfraRed         | 496;564      | 488;532      |
| APC         | Red              | 650          | 785          |

El procesamiento de datos de la citometría se llevó a cabo a partir del recuento de leucocitos por mm<sup>3</sup> del hemograma como un total de 100 %, para la obtención del recuento de los linfocitos, se obtuvo a partir del porcentaje de Linfocitos descrito en el hemograma.

En el primer análisis de citometría, se obtuvo los porcentajes de los linfocitos T, B y NK. El recuento de los linfocitos T, se calculó a partir del recuento obtenido del hemograma. Los análisis de los porcentajes para recuento de células T de

memoria y células T reguladoras, se tomó el valor de recuento de linfocitos T previamente calculado.

### **3.3.4 Expresión de los factores de transcripción T-bet, GATA3, FoxP3 y RORyT**

#### **Extracción del ARN**

A partir del paquete celular obtenido del aislamiento de PBMC, se homogenizó la muestra en TRIzol™ Reagent (según las recomendaciones del fabricante). Con la ayuda de una jeringa y aguja hipodérmica estéril, se mezcló con 200 µL de cloroformo (Sigma-Aldrich®) y se incubó la mezcla por toda la noche a -20°C para luego ser centrifugada a 12000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. Se retiró el sobrenadante acuoso transparente y se mezcló con 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich®) para incubar toda la noche a -20 °C. Al siguiente día, se centrifugó a 12000 rpm x 30 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, y se lavó con 1 mL de etanol de grado molecular al 75 % (PanReac AppliChem ITW Reagents). Finalmente, se centrifugó 12000 rpm x 10 minutos y se eliminó el sobrenadante dejando secar a temperatura ambiente, por 15-20 minutos, para re-suspender el pellet en un volumen adecuado de agua ultra pura (PanReac AppliChem ITW Reagents)

#### **Síntesis del ADNc**

Previamente a la síntesis de ADNc, la concentración de la muestra de ARN se ajustó a la concentración de 800- 1200 ng/µL con el fluorómetro Qubit con el kit Qubit™ RNA High Sensitivity (HS), se utilizará 1 uL de muestra y 199 uL de solución de trabajo (10 µL of Qubit™ reagent y 1990 µL of Qubit™ buffer)). La síntesis de ADNc se realizó según las indicaciones del kit MAXIMA 1STR CDNA SYNTH KIT (Thermo Scientific™) (Tabla 3). La programación del termociclador según las recomendaciones de la casa comercial fue 10 minutos a 25°C, seguido de 15 minutos a 50°C y finalmente 5 minutos a 85°C.



**Tabla 3.** Protocolo de síntesis de cDNA con el kit MAXIMA 1STR CDNA SYNTH KIT

| Componentes            | Volumen ( uL)          |
|------------------------|------------------------|
| 5X Reaction Mix        | 4 uL                   |
| Maxima Enzyme Mix      | 2 uL                   |
| Muestra de RNA         | 800 - 1200 ng/ $\mu$ L |
| Agua libre de nuceasas | Completar hasta 20 uL. |
| Volumen total          | 20 uL                  |

### Cuantificación por RT-PCR

Para los experimentos se utilizaron las secuencias de los primers descritos por Lin et al. 2015 (32). Se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados, en la Tabla 4. Estos fueron verificados en la base de datos de National Center for Biotechnology Information NCBI para ser utilizados.

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos de los factores de transcripción

| GEN             | Pb  | Secuencia   |
|-----------------|-----|---|
| T-bet           | 107 | CGG CTG CAT ATC GTT GAG GT<br>GTC CCC ATT GGC ATT CCT C   |
| GATA 3          | 107 | TCA TTA AGCCCA AGC GAA GG<br>GTC CCC ATT GGC ATT CCT C    |
| RORyt           | 111 | GCA GCG CTC CAA CAT CTT CT<br>ACG TAC TGAATG GCC TCG GT   |
| Foxp3           | 63  | CACCTG GCT GGG AAA ATG G<br>GGA GCC CTT GTC GGA TGA       |
| $\beta$ -actina | 106 | GCA TGG GTC AGA AGG ATT CCT<br>TCG TCC CAG TTG GTG ACG AT |

Se utilizó el termociclador en tiempo real Light Cycler 480, con el siguiente protocolo para el kit The Maxima™ SYBR® Green qPCR Máster Mix (2X) (Thermo Scientific™): desnaturalización 95°C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C, 15 s, 60°C, 30 s, 72°C, 30 s y un ciclo final de melting de 60 a 95 °C (Tabla 5).

**Tabla 5.** Componentes incluidos en el protocolo de amplificación del kit The Maxima™ SYBR® Green qPCR Master Mix (2X).

| Componentes                            | Volumen ( uL)         |
|--|-----------------------|
| Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) | 12,5 uL               |
| Forward Primer (10 uM)                 | 0.25 uL               |
| Reverse Primer (10 uM)                 | 0.25 uL               |
| Cdna                                   | 800- 1200 ng/μL       |
| Agua libre de nucleasas                | Hasta completar 25 uL |
| <b>Total</b>                           | <b>25 uL</b>          |

Se verificó que las muestras cumplieran con la curva de disociación respecto al control positivo y se registró los valores de Ct para cada uno de los genes evaluados.

La cuantificación relativa de la expresión génica se calculó en relación con el gen β-actina usado como control interno por su estabilidad con la finalidad de la normalización de los datos de expresión génica (101).

Se tomó el modelo Delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, CA). Se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (99)

Donde:

$$\Delta\Delta Ct = (C_{T,Target} - C_{T,Actina})_{Time x} - (C_{T,Target} - C_{T,Actina})_{Time 0}$$

### 3.4 Procesamiento y análisis de los datos

Se utilizó el paquete estadístico STATA versión 12, para determinar si hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los resultados para los pacientes diabéticos y no diabéticos, en HD. Se utilizó el T-test para datos que cumplen

una distribución normal, o la prueba U de Mann-Withney si no hay distribución normal.

### **3.5 Aspectos éticos**

El presente estudio fue sometido, evaluado y autorizado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Los pacientes reclutados en el presente estudio contaron con un consentimiento informado que describe detalladamente las características del estudio, el cual fue firmado por todos los pacientes enrolados.

#### IV. RESULTADOS

##### Características demográficas y etiología de los pacientes con ERC

Se obtuvieron un total de 22 pacientes con ERC (Tabla 6), los cuales tenían una edad promedio de 67 años. El 11% de los pacientes fueron diabéticos. El 54,6 % (N=12) pacientes tuvieron un tiempo de uremia mayor a 7 años.

**Tabla 6.** Características demográficas y etiológicas de los pacientes con ERC

| Variables                           | N = 22       |
|-------------------------------------|--------------|
| Género                              |              |
| Masculino                           | 13 (40,9 %)  |
| Femenino                            | 9 (59,1 %)   |
| Edad (años)*                        | 67,6 ± 10,3* |
| Etiología de IRCT                   |              |
| Glomerulonefritis                   | 3 (13,6 %)   |
| Nefropatía hipertensiva             | 4 (18,2 %)   |
| Nefropatía diabética                | 11 (50 %)    |
| Disfunción crónica Injerto renal    | 2 (9,1 %)    |
| Enfermedad poliquística hepatorenal | 1 (4,6 %)    |
| Litiasis renal                      | 1 (4,6 %)    |
| Tiempo de hemodiálisis (años)*      | 7 ± 8†       |
| Tiempo de uremia (categoría años)   |              |
| (1-3)                               | 4 (18,2 %)   |
| (4-6)                               | 6 (27,3 %)   |
| (> 7)                               | 12 (54,6 %)  |
| Índice de masa corporal (IMC)       |              |
| Insuficiencia ponderada (< 18.5)    | 1 (5 %)      |
| Normal (18.5 -24.9)                 | 12 (60 %)    |
| Sobrepeso (25 - 29.9)               | 7 (35 %)     |
| Obesidad (>=30)                     | 0 (0 %)      |
| No se tallaron                      | 2            |

|                 |                                   |             |
|-----------------|-----------------------------------|-------------|
| Acceso vascular | CVC (catéteres venosos centrales) | 10 (45,5 %) |
|                 | FAV (Fístula arteriovenosa)       | 13 (54,5 %) |
| Comorbilidades  | Hipertensión                      | 12 (54,6 %) |
|                 | Hepatitis C                       | 7 (31,8 %)  |
|                 | Otras                             | 8 (36,4 %)  |

†mediana±rango intercuartil

\*media ± desviación estándar

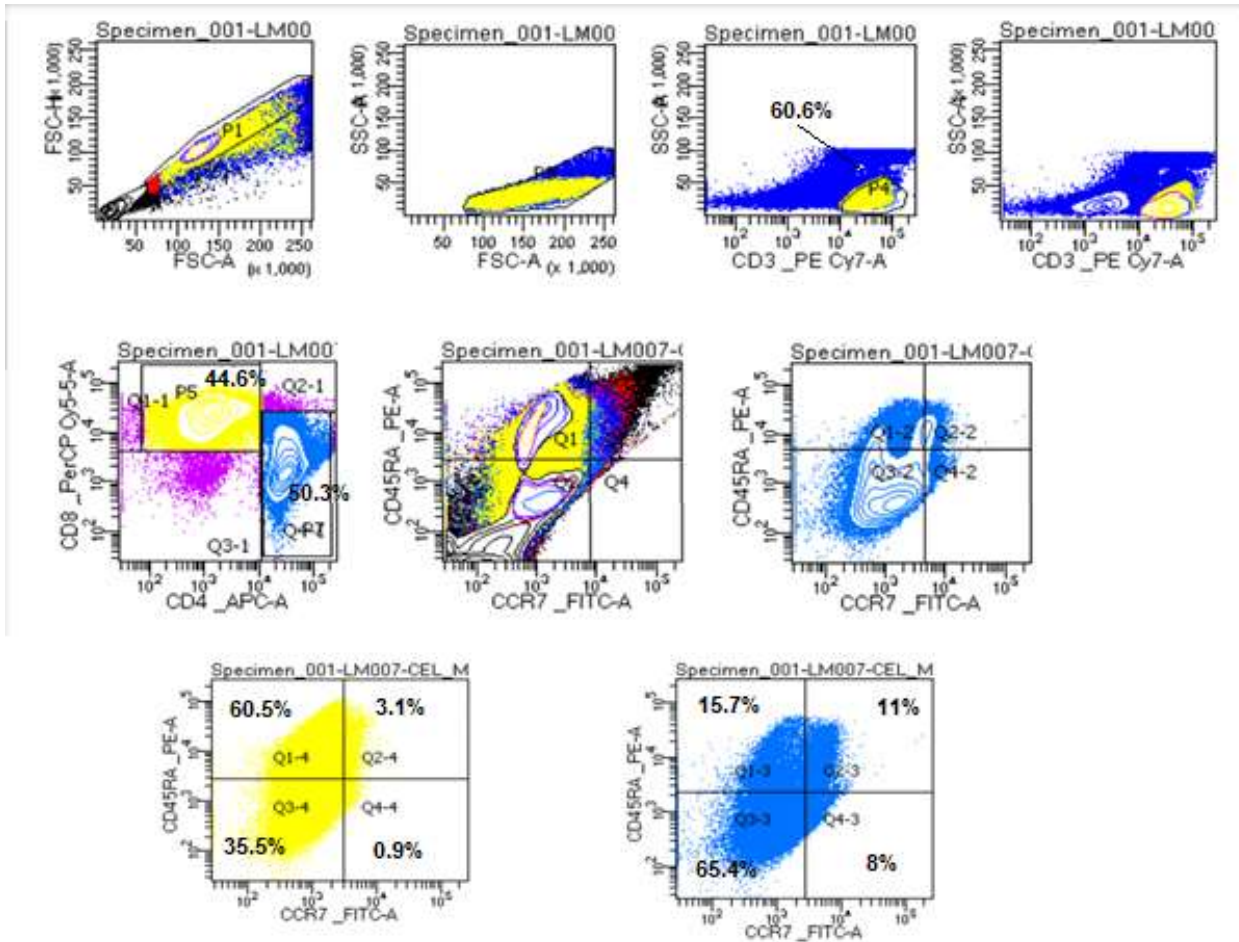
### Frecuencia de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de memoria, y los linfocitos T reguladores

En el análisis comparativo del porcentaje de los linfocitos T auxiliares y citotóxicos, entre ambas poblaciones de estudio, no se detectaron diferencias significativas. Así mismo, al calcular la media de los recuentos de células T de memoria, en sangre periférica, tampoco se detectaron diferencias significativas entre los pacientes diabéticos y no diabéticos (Tabla 7). En la Figura 5, se muestra el análisis de las poblaciones de linfocitos T de memoria de un paciente representativo del grupo no diabético.

**Tabla 7.** Recuento de linfocitos T CD4+ y T CD8+ de memoria calculado en base al porcentaje de cada población, determinado por citometría de flujo

| Población linfocitaria | Diabético<br>(n=11) | No Diabético<br>(n=11) | Valor p |
|------------------------|---------------------|------------------------|---------|
| Linfocito T CD4        | 650,6 ± 300,4       | 622,8 ± 277,9          | 0,829*  |
| Linfocito T CD8        | 422,8 ± 207,9       | 416,9 ± 126,6          | 0,939*  |
| CD4 TEMRA              | 28,6 ± 24,2         | 29,7 ± 52,2            | 0,888†  |
| CD4 T naive            | 102,2 ± 193,4       | 116,5 ± 75,1           | 0,725†  |
| CD4 TEM                | 360 ± 196,6         | 331,6 ± 146,2          | 0,714*  |
| CD4 TCM                | 85,7 ± 103,4        | 72,5 ± 57,0            | 0,778†  |
| CD8 TEMRA              | 185,7 ± 141,2       | 236,8 ± 60,9           | 0,439†  |
| CD8 T naive            | 49,9 ± 6,68         | 61,9 ± 12,5            | 0,401*  |
| CD8 TEM                | 113,6 ± 132,2       | 132,9 ± 84,21          | 1,000†  |
| CD8 TCM                | 7,6 ± 7,6           | 6,9 ± 5,9              | 0,833†  |

\* Prueba de Mann-Wihtney † Prueba de T de Student



**Figura 5.** Análisis de la frecuencia linfocitos de T de memoria en el paciente LM007 (no diabético)

La estrategia de agrupamiento para el panel de células T de memoria fue la siguiente: la población de linfocitos se selecciona en un diagrama de puntos FSC/SSC; luego se seleccionaron las células CD3+ en la ventana P4, para discriminar las poblaciones T CD4+ (P7) y T CD8+ (P5). En el caso de los linfocitos T CD8+, las células se agrupan de la siguiente manera: linfocitos vírgenes (CCR7+CD45RA+) en Q2-4, linfocitos de memoria central TCM (CCR7+CD45RA-) en Q4-4, los linfocitos de memoria efectora TEM (CCR7-CD45RA-) en Q3-4 y linfocitos efectores TEMRA (CCR7-CD45RA+) en Q1-4. En el caso de los linfocitos T CD4+, las células se agrupan de la siguiente manera: linfocitos vírgenes (CCR7+CD45RA+) en Q2-3, linfocitos de memoria central TCM (CCR7+CD45RA-) en Q4-3, los linfocitos de memoria efectora TEM (CCR7-CD45RA-) en Q3-3 y linfocitos efectores TEMRA (CCR7-CD45RA+) en Q1-3. Analizado en BD FACSLyric™ Clinical Flow Cytometry System.

### Determinación de las células T reg

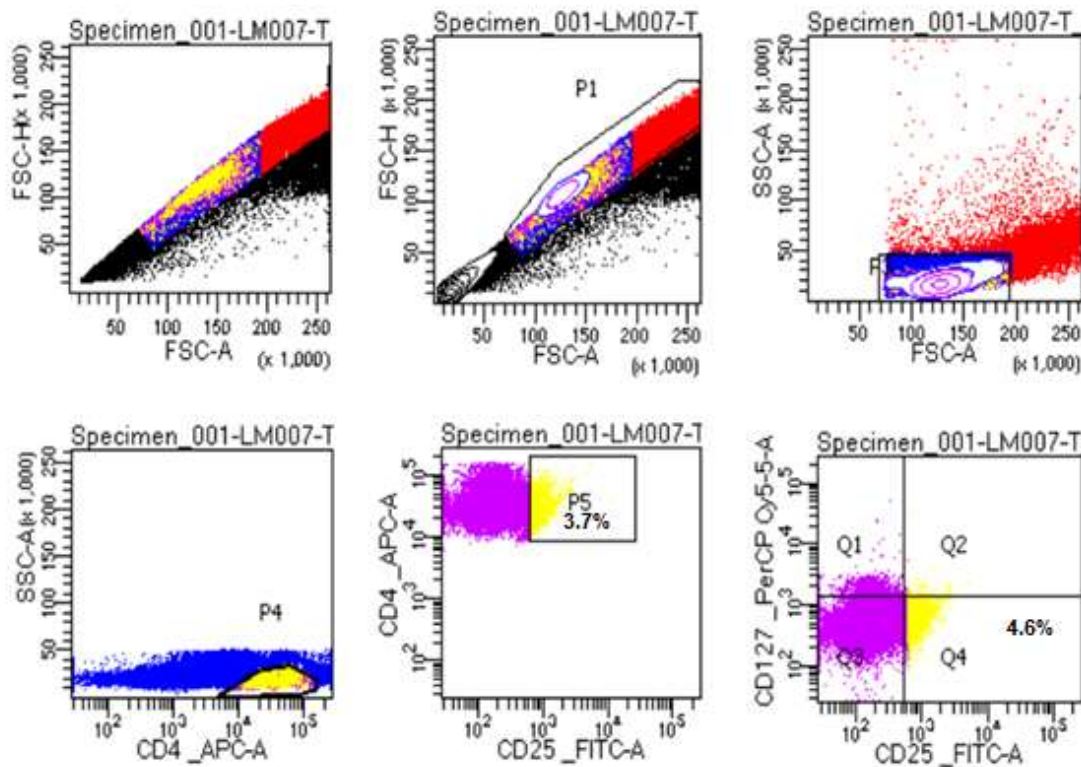
Para cada muestra, se determinó el recuento absoluto de células de la población de CD4+CD25+CD127- y su porcentaje en la población de células T en relación con el número de linfocitos CD3+. En la Tabla 8 se observa que la media de los recuentos de células Treg CD4+CD25+CD127- de sangre periférica no evidenció diferencias significativas entre el grupo de paciente diabéticos y no diabéticos. Sin embargo, si se observó una diferencia significativa cuando se evaluaron los porcentajes de T reg ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 8.** Frecuencia de células Treg en pacientes con y sin DM2 con ERC

| Población linfocitaria      | Diabético<br>(n=11) | No diabético<br>(n=11) | Valor p |
|-----------------------------|---------------------|------------------------|---------|
| Treg CD4+ CD25+ CD127-      | 14,4 ± 15,8         | 8,9 ± 12,03            | 0,091†  |
| % de Treg CD4+ CD25+ CD127- | 5,1 ± 2,6 %         | 2,8 ± 3,1 %            | 0,023†  |
| CD4+ CD25 <sup>high</sup>   | 11,7 ± 13,8         | 6,0 ± 9,4              | 0,139†  |
| % de Treg CD4+ CD25+        | 4,3 ± 2,5 %         | 2,3 ± 2,4 %            | 0,045†  |

† Prueba de Mann-Whitney; se utilizó el rango intercuartílico ± iqr, ya que en análisis se realizó con la mediana.

En la Figura 6, se muestra el análisis de los linfocitos Treg de un paciente representativo del grupo no diabético.



**Figura 6.** Análisis de la frecuencia de células Treg en el paciente LM007 (no diabético)

Estrategia de agrupamiento para el panel de células Treg: la población de linfocitos se selecciona en un diagrama de puntos FS/SS, luego se seleccionan las células CD4+CD25+ en un diagrama de puntos P5 y las células Treg (Treg CD4+ CD25+ CD127-) se identifican en un diagrama de puntos en el cuadrante Q4

### **Expresión génica relativa de los factores de transcripción T-bet, GATA3, RORyT y FoxP3 en pacientes de ERC, con y sin DM2**

Los factores de transcripción reguladores maestros de la diferenciación linfocitaria se determinaron en un PCR en tiempo real, a partir del cADN de los pacientes. Para confirmar si los *primers* utilizados en la determinación de los reguladores maestros detectan la amplificación de la diana correspondiente, se evaluó la temperatura de disociación de los amplicones (Figura 8). Las muestras evaluadas tienen un promedio de Tm de: T-bet ( $84.85 \pm 0.05$ ), Gata3 ( $83.01 \pm 0.12$ ), Foxp3 ( $79.37 \pm 0.06$ ), Roryt ( $82.43 \pm 0.26$ ), y actina ( $82.97 \pm 0.26$ ). Estos valores están en correspondencia con lo reportado por Lin et al, 2015.

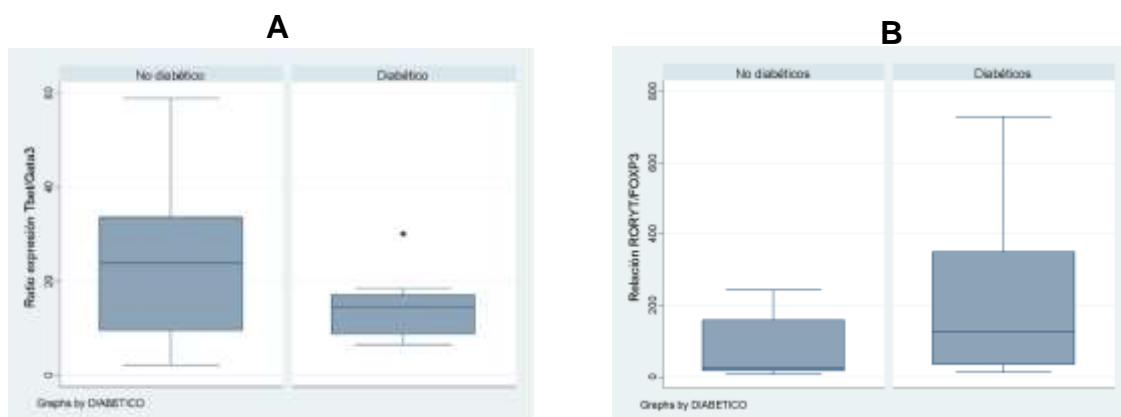


Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en la expresión de los reguladores maestros de la diferenciación linfocitaria, entre los pacientes con o sin diabetes (Tabla 9). En general, los valores relativos de T-bet fueron los mayores, mientras que Foxp3 obtuvo el menor valor de la cuantificación relativa.

**Tabla 9.** Diferencias en la expresión génica de los factores de transcripción de los linfocitos Th. Valor p: Prueba de U de Mann-Whitney. La expresión génica se encuentra en base  $10^{-4}$

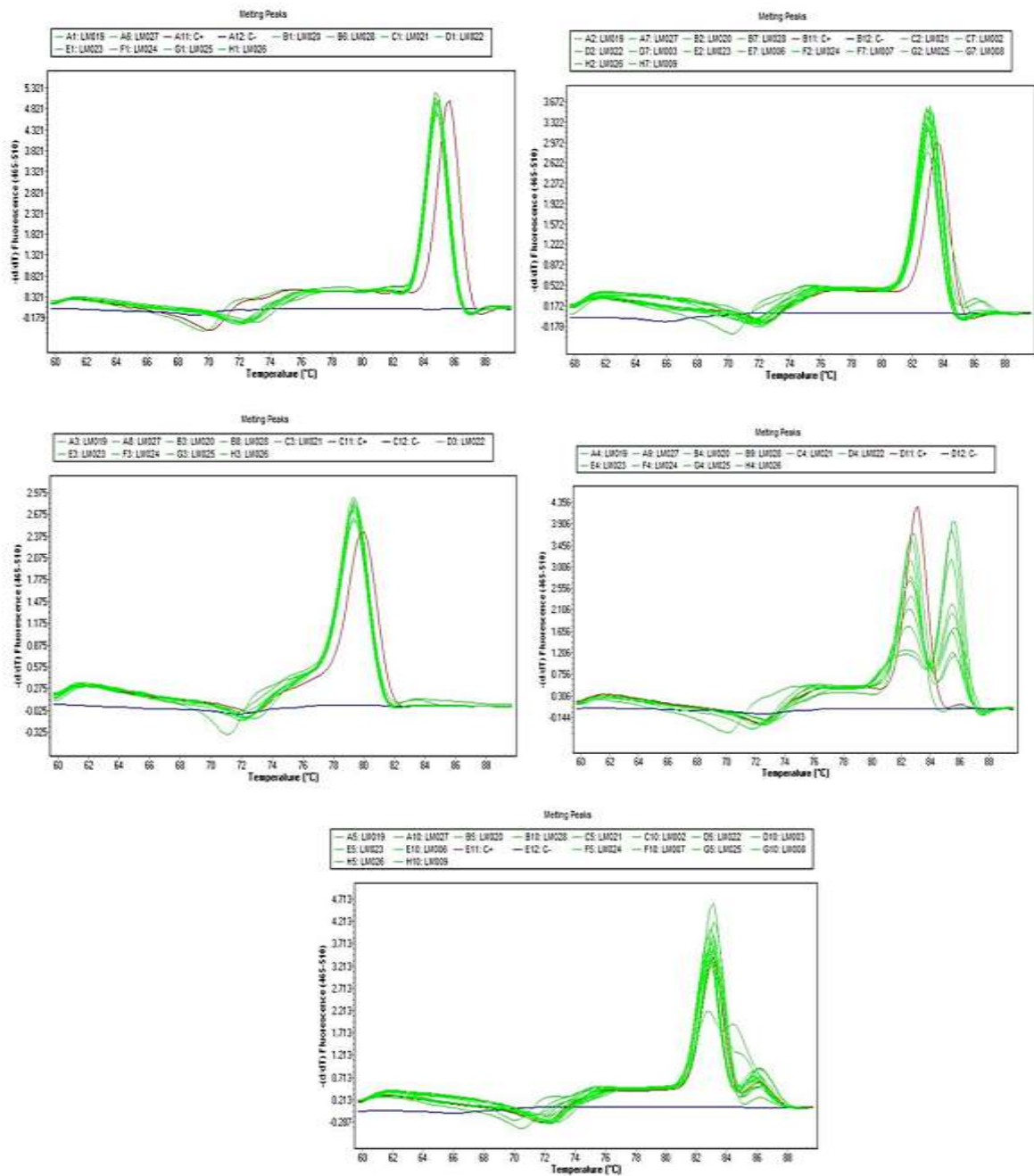
| Expresión génica  | Diabéticos (n=11) | No Diabéticos (n=11) | Valor p |
|-------------------|-------------------|----------------------|---------|
| GATA-3* $10^{-4}$ | 2,61 ± 3,30       | 1,89 ± 4,57          | 0,622*  |
| FOXP-3* $10^{-4}$ | 0,017 ± 0,029     | 0,032 ± 0,039        | 0,673*  |
| RORYT* $10^{-4}$  | 1,75 ± 6,04       | 1,13 ± 5,39          | 0,491*  |
| T-bet* $10^{-4}$  | 49,44 ± 55,18     | 59,21 ± 109,22       | 0,412*  |

La relación entre la expresión de T-bet/Gata3 y Foxp3/Roryt, se muestra en la Figura 7. Aunque se observan diferencias entre pacientes diabéticos y no diabéticos (T-bet/GATA3:  $14.5 \pm 8.3$  vs.  $23.8 \pm 24.1$ ; RORYT/FOXP3:  $126,2 \pm 315,6$  vs.  $25,8 \pm 141,8$ ), estas no resultan estadísticamente significativas.



**Figura 7.** Expresión relativa de los reguladores maestros de la diferenciación de los linfocitos T auxiliares. **A**

T-bet/Gata3; **B.** RORYT/FOXP3. Según el test de Mann-Whitney, la diferencia observada entre los grupos de estudio no es estadísticamente significativa (**A:**  $p=0,171$ ; **B:**  $p= 0,181$ ).



**Figura 8.** Gráfico de las temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) para evaluar la disociación de los amplicones de los factores de transcripción T-bet, GATA3, Foxp3 y Ror $\gamma$ t. Las muestras en color verde y el control positivo en color rojo

## V. DISCUSIÓN

Las características de nuestros pacientes con ERC analizados padecían como comorbilidad a la hipertensión de 55%. El 54,6 % de los pacientes presentaban más de 7 años en tratamiento con hemodiálisis, producto de las complicaciones propias de la enfermedad, donde el paciente requiere sustitución renal, especialmente en pacientes diabéticos ya que la tasa de mortalidad es más elevada en comparación con los ERC sin DM2(9).

### **Frecuencia de linfocitos T CD4+ y T CD8+ de memoria, y los linfocitos T reguladores**

Los subconjuntos de células T (TEM, TEMRA TCM, T vírgenes) en pacientes que padecen ERC, con y sin diabetes evaluados en este estudio no presentaron diferencias significativas mediante la citometría de flujo. La frecuencia de las células T CD8 vírgenes y T CD8 TCM fue menor y las células T CD8 TEM y T CD8 TEMRA mostraron conteos elevados en los pacientes de ERC con y sin DM2. Por otro lado, la cantidad de células T CD4 TEMRA y T CD4 TCM disminuyeron, mientras que las células T CD4 vírgenes y T CD4 TEM incrementaron en número. En ambos casos la frecuencia de células se comparó respecto a conteos en pacientes sanos publicados por Freitas y colaboradores (102).

Estudios relacionados al envejecimiento en adultos y pacientes con ERC terminal han mostrado una disminución de recuentos de linfocitos, la disminución prematura de función tímica tiene cambios notorios en las células de memoria. Las poblaciones de células TEM (164.4 células/mm<sup>3</sup>) son las que se encuentran con mayor frecuencia, mientras que los recuentos absolutos de T vírgenes (89 células/mm<sup>3</sup>), TCM (35 células/mm<sup>3</sup>) TEMRA (120 células/mm<sup>3</sup>) son más bajos (102).

En evaluaciones realizadas en pacientes con DM2 se han registrado porcentajes elevados de células TEM (21,8 %) y TCM (38 %) en comparación con los no diabéticos, en los cuales TEM (17 %) y TCM (36 %). Además, la frecuencia de las células T vírgenes se reduce (35 %) en comparación con los no diabéticos (42,9 %) (12). Otro estudio con un menor número de población observó que pacientes con ERC tenían una marcada reducción de células T vírgenes y TCM

asociado a la apoptosis de estas células ( $n=12$ ;  $p<0.05$ ) (34). Se ha evidenciado, además, que existen diferencias de la frecuencia de células T influenciada por la modalidad de diálisis y edad, donde los pacientes con ERC en diálisis ( $n=220$ ) tienen una frecuencia menor de células CD8 TCM (2,4  $p<0,001$ ) y CD4 TCM (19,2  $p<0,001$ ), a diferencia de pacientes con HD parenteral, así como marcadores de inflamación como IL-6 y TNF- $\alpha$  (103). Por otro lado, la distribución de células T entre paciente con HD y pacientes con prediálisis no tienen diferencias, lo cual sugiere que la diálisis no puede corregir la desregulación inmunológica causada por la uremia, sin embargo, se ha podido observar que la cantidad de células T de memoria se incrementa con una elevada producción de IL-17 y disminución de células vírgenes (104).

La retención de moléculas urémicas y citocinas en pacientes en etapa terminal de ERC contribuyen a la generación de estrés oxidativo e inflamación, asociada a uremia que deteriora las células T produciendo el envejecimiento inmunológico prematuro. En pacientes trasplantados, no se ha encontrado un estado de normalización o reversión del envejecimiento inmunológico de las células T (105). Es por ello, que la medición y monitoreo de las células T en estos pacientes deberían ser fundamentales, ya que algunas evaluaciones en pacientes con ERC ( $n=977$ ) previa al trasplante y seguimiento de 5 años, han determinado que la actividad tímica con marcadores de células T periféricas vírgenes pueden predecir la supervivencia del paciente después del trasplante (4,22; IC del 95 %, 2,84–6,73 por cada disminución de 1 registro en el RTE;  $p < 0,001$ ) (106). Así mismo, se ha observado que en receptores de trasplante de riñón con alta frecuencia de células T CD8 TEMRA presentan un riesgo dos veces mayor de disfunción renal que aquellos con baja frecuencia de estas células (107).

Se ha demostrado previamente con diferentes investigaciones (34, 16, 40) relacionadas a técnicas de citometría de flujo, que un incremento de células T efectoras de memoria y disminución de células T vírgenes se asocia a un estado de activación inmune, así como el aumento de inflamación para ambas poblaciones evaluadas, donde no existen diferencias significativas a la población evaluada, si bien es cierto la supervivencia del paciente diabético en diálisis es inferior a la del paciente no diabético, debido a un incremento de otras

comorbilidades como enfermedades cardiovasculares e infecciones, para ambos casos el trasplante de riñón sigue siendo la mejor opción para el tratamiento de pacientes renales crónicos, por lo que es necesario que se realice más investigación para conocer la interacción de los mecanismos moleculares e inmunológicos relacionados a la enfermedad.

En el presente estudio, los recuentos de las células Treg CD4+ CD25+ CD127- en pacientes con ERC diabéticos fue superior en comparación con los recuentos de células de los pacientes con ERC no diabéticos. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas. La evaluación de las poblaciones en base a sus porcentajes evidencia una diferencia estadística significativa, siendo la población de pacientes diabéticos con ERC mayor a los pacientes con ERC sin diabetes.

A la fecha, se han realizado estudios similares y se han encontrados algunos donde la cantidad de linfocitos Treg es superior en pacientes con DM2, como se muestra en el estudio realizado por Rattik et al. 2019, donde pacientes con DM2 con o sin enfermedad cardiovascular (n=198) tienen diferencias en la cuantificación de células Tregs (16). Otra investigación en pacientes con Nefropatía diabética (n=25) ( $1,8 \pm 1,5$ ) tenían un porcentaje de linfocitos Treg superior que los controles sanos (n=23) ( $0,5 \pm 0,3$ )  $p= 0,002$  (17). Este último autor discrepó de estos resultados debido a que el recuento de Treg no estuvo asociado al tiempo de diabetes, ya que se ha observado en otras investigaciones que el nivel de células Treg CD4+ CD25+ Foxp3+ disminuyen notablemente en pacientes con DM2, lo que puede contribuir al aumento de la activación inmunitaria, la inflamación y progresión de la DM2 (25).

En el presente trabajo, se debe tener en cuenta que los pacientes con diabetes de CENESA se encontraban en tratamiento y estaban controlados con una población linfocitaria controlada como se ha observado en un estudio con pacientes diabéticos realizado por Cheng et al. 2019, donde los pacientes con DM2 al recibir el tratamiento con insulina la respuesta inflamatoria se aliviaba (26). Por otro lado, Freitas et al. 2019 en una investigación de recuentos absolutos de Treg fue inferior en pacientes adultos con ERC en comparación con controles normales, sin embargo, no se encontró diferencias significativas (102). Estos resultados son similares a los recuentos de Treg obtenido en nuestra población de pacientes con ERC. Esta disminución de Treg no solo esta

potenciada solo por la enfermedad, sino por la edad, ya que ha medida que pasan los años estas poblaciones disminuyen ya sea en pacientes con ERC o controles sanos (102). Las poblaciones linfocitarias en este trabajo no presentan diferencias en cuanto a los conteos celulares, pero si tienen diferencias significativas en los porcentajes, siendo superior en los pacientes con ERC con DM2, este resultado coincidió con los resultados de otro trabajo (25), no obstante podemos observar que la cantidad de células Treg es baja en todos los pacientes evaluados lo cual está relacionado al progreso de los trastornos inflamatorios de la ERC.

La citometría de flujo es una herramienta poderosa para descubrir, describir e implementar biomarcadores de células T asociados con diabetes. Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de estos marcadores se ha adoptado ampliamente en la práctica estándar, por lo que existe una necesidad de armonizar el diseño de ensayos de con la finalidad de integrar los hallazgos de mecanismos inmunorreguladores y efectoras con la respuesta clínica y la progresión de la enfermedad.

### **Expresión génica relativa de los factores de transcripción T-bet, GATA3, RORyT y FoxP3**

Nuestros resultados han evidenciado una mayor expresión de ARNm de T-bet y GATA3, precursoras de las células Th1 y Th2 y una disminución de la expresión de Foxp3 en la población evaluada de pacientes con ERC, sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con y sin DM2.

Se observó que la proporción T-bet/Gata3 para diabéticos fue menor en comparación con los no diabéticos con ERC, debido a la predominancia de la expresión de T-bet como precursor de Th1. La proporción de RoryT/ Foxp3, por el contrario, fue más elevado en los pacientes diabéticos en comparación con los no diabéticos, lo cual se debe a una baja expresión de Foxp3.

El equilibrio en las proporciones de las poblaciones celulares Th1/Th2 y Th17/Treg es muy importante para mantener las funciones inmunológicas normales dentro del cuerpo, ya que el desequilibrio de estas juega un rol importante en diferentes enfermedades como cáncer, autoinmunes, alérgicas,

endocrinas, infecciosas, así como en la respuesta de implantes de órganos. En enfermedades como cáncer, su predominio está orientado como un mecanismo de escape inmunológico, haciendo el interés en su estudio como objetivo en inmunoterapia (32).

En pacientes con DM2 la reducción de las células Treg contribuye a la patogenia y al progreso de los trastornos inflamatorios, esto se ha visto en un estudio donde hubo una reducción de Foxp3 en pacientes con DM2 en comparación con los controles sanos, así como el desequilibrio de Th17/Th1/Tregs puede inducir el progreso de la DM2 (29). Así como el aumento de IL6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , y disminución del porcentaje de Tregs periférico e IL-10 (31).

La mayoría de los trabajos realizados sobre poblaciones Th1/Th2/Th17/Treg han sido estudiadas por citometría de flujo. Zhang et al. 2014, determinó en pacientes con DM2 (n=93) un entorno de células Th1 y Th17 y una correlación positiva con la creatinina y progresión de nefropatía diabética (33). Otro estudio encontró una correlación inversa entre la progresión de la enfermedad y expresión de células Treg (39). Madhumitha et al, 2019, observó que los pacientes con DM2 (n=60) mostraron un perfil mixto de Th1 y Th2, mientras los pacientes con comorbilidad de enfermedad coronaria presentaron aumento de la respuesta de Th1 y supresión de Th2 (34).

En pacientes con hepatocarcinoma (n=20), se midieron los factores de transcripción T-bet, Gata-3, Ror $\gamma$ T y Foxp3. Los niveles de T-bet ( $52,34 \pm 34,07$ ) disminuyeron, mientras que el nivel de ARNm de Gata-3 ( $1,38 \pm 1,15$ ) se incrementaron. La relación T-bet/Gata-3 ( $86,01 \pm 116,71$ ) se redujo significativamente. Mientras que Ror $\gamma$ T ( $72,32 \pm 32,82$ ) y Foxp3 ( $3,17 \pm 1,59$ ), aumentaron significativamente, lo que evidenció la existencia de un fenómeno predominantemente Th17 y Treg en estos pacientes (32). En pacientes con Leucemia linfática crónica se ha observado que la proporción de T-bet / Gata-3 y Ror $\gamma$ T /Foxp3 es menor que en los controles normales, cuanto más avanzada sea la etapa, menor será la relación de T-bet /Gata-3 y ROR $\gamma$ t /Foxp3 (107).

En los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que no hay diferencias significativas entre los pacientes de ERC con y sin DM2, lo que debe verse reflejado debido a que estos pacientes diabéticos tienen la hiperglucemia

controlada. Esto se ha registrado en un trabajo donde los pacientes que fueron tratados con insulina presentaron una proporción disminuida de células Th1/Th2 y aumento de células Treg, concluyendo que la insulina puede aliviar las respuestas inflamatorias causadas por la hiperglucemia (26), así como la expresión de Treg representa un importante mediador en el entorno proinflamatorio que puede mejorar la resistencia a la insulina en pacientes con DM2 recién diagnosticados (25).

La disminución de las proporciones de Treg/Th17 y Treg/Th1, pueden tener impacto en la prevención y tratamiento de pacientes con DM2 (36), como se ha visto en el desequilibrio de Treg/Th17 hacia un antiinflamatorio Treg como responsable del éxito en la conservación del aloinjerto luego del trasplante con niveles altos de IL-10 (108). En pacientes con DM2 post-transplantes y niveles reducidos de células Treg, la transferencia adoptiva de células Tregs ha tenido mejora a la sensibilidad a la insulina, así como incremento de la expresión de ARNm de Foxp3 (109). Así mismo, la proporción de T-bet/Gata-3 más elevado ha sido correlacionado con una mala respuesta al tratamiento con esteroides que podría usarse para individualizar el tratamiento, donde el predominio de la expresión de T-bet intraglomerular se correlaciona con el rechazo mediado por anticuerpos y la resistencia al tratamiento con esteroides (110).

El uso de la cuantificación relativa de una PCR en tiempo real con Syber green es una técnica de bajo costo, que no necesita controles o estándares para poder desarrollarse a diferencia del uso de sondas específicas, permitiendo de esta forma medir la expresión genética de múltiples marcadores de activación inmune, en paciente trasplantados se ha realizado ensayos con la finalidad de realizar seguimiento no invasivo de aloinjertos renales, a partir de muestras de orina, donde la cuantificación de perforina, granzima B, Fas-L y Treg han demostrado ser útiles para el seguimiento, además de permitir el tratamiento preventivo del rechazo agudo (26, 111).

Si bien es cierto que los pacientes con diabetes presentan un estado de activación inmune con aumento de inflamación debido a que estos pacientes presentan un mayor riesgo a infecciones, algo similar pasa en los pacientes con ERC por la degeneración de las células T y no necesariamente se puede considerar que existan diferencias en pacientes con ERC con y sin DM2, ya que



el tratamiento de diálisis también puede disminuir la capacidad de proliferación de las células T, exacerbar la apoptosis de las células T y reducir la producción tímica debido a que están sometidos a estimulaciones antigénicas por la HD a los que están sometidos. No se puede concluir la existencia de una diferencia entre las dos poblaciones evaluadas, debido a que el número de pacientes evaluados es pequeño.

## VI. CONCLUSIONES

1. No se detectó diferencias significativas las características fenotípicas y la expresión genética de los reguladores maestros de los linfocitos T de los pacientes con Enfermedad renal crónica que padecen o no DM2.
2. En ambos grupos de estudio, la frecuencia de las células T CD8+ vírgenes y TCM evidenciaron una menor frecuencia, y las células TEM y Temra mostraron conteos elevados, con respecto a lo reportado. Así mismo, los pacientes mostraron una menor cantidad de células T CD4+ Temra y TCM, mientras que las células T vírgenes y TEM incrementaron en número.
3. La citometría de flujo permitió detectar un incremento significativo en el porcentaje de las células Treg CD4+CD25+CD127- en pacientes con ERC diabéticos; sin embargo, el recuento de estas células no evidenció diferencias entre los grupos. Lo anterior confirma la importancia de complementar la información de la citometría de flujo y el hemograma para caracterizar funcionalmente a los linfocitos T en este tipo de pacientes.
4. La cuantificación relativa, a través de PCR cuantitativo, de la expresión de los reguladores maestros evidenció que T-bet y GATA3 son factores de transcripción que más se expresan, mientras que Foxp3 tiene una baja expresión, independientemente de que los pacientes padezcan o no DM2.
5. No se observaron diferencias significativas en la razón T-bet/GATA3 ni RORYT/FOXP3 en pacientes de ERC, diabéticos o no diabéticos, en hemodiálisis.

## **RECOMENDACIONES**

1. Extender el alcance de las conclusiones al desarrollar estudios que incluyan otras instituciones de salud donde se diagnostiquen y traten pacientes con ERC.
2. Considerar en futuros diseños metodológicos, un grupo control de personas sanas para discriminar el aporte de la ERC a las alteraciones inmunológicas detectadas en estos pacientes
3. Realizar estudios prospectivos de cohorte en pacientes de ERC, con o sin diabetes, que explore el uso de la citometría de flujo y el PCR cuantitativo para evaluar el valor pronóstico de biomarcadores inmunofenotípicos e inmunogenéticos.

## FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Neuen BL, Chadban SJ, Demaio AR, Johnson DW, Perkovic V. Chronic kidney disease and the global NCDs agenda. *BMJ Glob Health*. 2017; 2(2): e000380.
2. Sharaf El Din UA, Salem MM, Abdulazim DO. Stop chronic kidney disease progression: Time is approaching. *World J Nephrol*. 2016; 5(3):258–273.
3. Maffi P, Secchi A. The burden of diabetes: Emerging data. *Dev Ophthalmol*. 2017; 60:1-5.
4. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017; 128:40-50.
5. Lou J, Jing L, Yang H, Qin F, Long W, Shi R. Risk factors for diabetic nephropathy complications in community patients with type 2 diabetes *mellitus* in Shanghai: Logistic regression and classification tree model analysis. *Int J Health Plann Manage*. 2019;34(3):1013-1024.
6. Luyckx VA, Tonelli M, Stanifer JW. The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. *Bull World Health Organ*. 2018; 96(6):414–422D.
7. Satirapoj B. Tubulointerstitial biomarkers for diabetic nephropathy. *J Diabetes Res*. 2018; 2852398.
8. Fraser SD, Blakeman T. Chronic kidney disease: identification and management in primary care. *Pragmat Obs Res*. 2016 A; 7:21–32.
9. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*. 2005; 22-28;365(9456):331-340.
10. Evans CM, Jenner RG. Transcription factor interplay in T helper cell differentiation. *Brief Funct Genomics*. 2013; 12(6):499-511.
11. Niedźwiecki M, Budziło O, Adamkiewicz-Drożyńska E, et al., “CD4+CD25high CD127low/-FoxP3+ Regulatory T-Cell population in acute Leukemias: A review of the Literature,” *Journal of Immunology Research*. 2019; 2816498: 1-15.

12. Lau E, Carroll E, Callender L, Hood G, Berryman V, et al,. Type 2 diabetes is associated with the accumulation of senescent T cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2019; 197(2):131-261.
13. Kartika R, Wibowo H. Impaired Function of regulatory T cells in type 2 diabetes *mellitus*. *Mol Cell Biomed Sci*. 2020; 4(1): 1-9
14. Li J, Wang J, Song X, Li Z, Zhang Y, Lu H, et al,. Effect of type 2 diabetes *mellitus* and periodontitis on the Th1/Th2 and Th17/Treg paradigm. *Am J Dent*. 2022;35(1):55-60.
15. Feng P, Yan R, Dai X. et al. The Alteration and Clinical Significance of Th1/Th2/Th17/Treg Cells in patients with multiple myeloma. *Inflammation*. 2015; (38): 705–709.
16. Rattik S, Engelbertsen D, Wigren M, Ljungcrantz I, Östling G, et al. Elevated circulating effector memory T cells but similar levels of regulatory T cells in patients with type 2 diabetes *mellitus* and cardiovascular disease. *Diab Vasc Dis Res*. 2019;16(3):270-280.
17. Ibrahim HM, Aly MG, Ahmad AB, Sayed NG, Galal HS, Al-Maghraby MH. Regulatory T-cells dysregulation in type 2 diabetic nephropathy. *Journal of The Egyptian Society of Nephrology and Transplantation*. 2019; 19:19–23.
18. Dousdampanis P, Trigka K, Mouzaki A. Tregs and kidney: From diabetic nephropathy to renal transplantation. *World J Transplant*. 2016; 6(3):556–563.
19. Lim WH, Johnson DW, Hawley C, Lok C, Polkinghorne KR, et al. Type 2 diabetes in patients with end-stage kidney disease: influence on cardiovascular disease-related mortality risk. *Med J Aust*. 2018; 209 (10): 440-446
20. Pérez-Morales R, Del Pino M, Valdivielso J, Ortiz A, Mora-Fernández C, et al,. Inflammation in diabetic kidney disease. *Nephron*. 2019;143(1):12-16.
21. Bermejo S, García-Carro G, Soler M, Diabetes and renal disease—should we biopsy?, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2021; 36(8):1384–1386.
22. Donate-Correa J, Ferri C, Sánchez-Quintana F, Pérez-Castro A, González-Luis A, et al,. Inflammatory cytokines in diabetic kidney disease:

- Pathophysiologic and therapeutic implications. *Front Med (Lausanne)*. 2022; 7:628289.
23. Tang SC, Chan GC, Lai KN. Recent advances in managing and understanding diabetic nephropathy. *F1000Res*. 2016;5: F1000 Faculty Rev-1044.
  24. Xia C, Rao X, Zhong J. Role of T lymphocytes in type 2 diabetes and diabetes-associated Inflammation. *J Diabetes Res*. 2017;6494795.
  25. Yuan N, Zhang HF, Wei Q, Wang P, Guo WY. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells, interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$  in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018; 126(2):96-101.
  26. Cheng L, Yang Y, Cao X, Li G, Lu T, et al. The effect of short-term intensive insulin therapy on circulating T cell subpopulations in patients with newly diagnosed type 2 diabetes *mellitus*. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2019; 149:107-114,
  27. Wang X, Ma A, Han X, et al. T cell profile was altered in pulmonary tuberculosis patients with type 2 diabetes. *Med Sci Monit*. 2018; 24:636–642
  28. Miya A, Nakamura A, Miyoshi H, Takano Y, Sunagoya K, et al, Impact of glucose loading on variations in CD4+ and CD8+ T cells in japanese participants with or without type 2 diabetes. *Front. Endocrinol*. 2018; 9:81
  29. Sheikh V, Zamani A, Mahabadi-Ashtiyani E, Tarokhian H, Borzouei S, Alahgholi-Hajibehzad M. Decreased regulatory function of CD4+CD25+CD45RA+ T cells and impaired IL-2 signalling pathway in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *Scand J Immunol*. 2018; 88(4):e12711
  30. Kumar NP, Moideen K, Dolla C, Kumaran P, Babu S. Prediabetes is associated with the modulation of antigen-specific Th1/Tc1 and Th17/Tc17 responses in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One*. 2017;12(5): e0178000.
  31. Qiao YC, Shen J, He L, et al. Changes of regulatory T cells and of proinflammatory and immunosuppressive cytokines in patients with type 2 diabetes *mellitus*: A systematic review and Meta-analysis. *J Diabetes* 2016:3694957

32. Lin ZW, Wu LX, Xie Y, Ou X, Tian PK, Liu XP, et al,. The expression levels of transcription factors T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ t and FOXP3 in peripheral blood lymphocyte (PBL) of patients with liver cancer and their significance. *International Journal of Medical Sciences*. 2015; 12(1), 7–16.
33. Zhang C, Xiao C, Wang P, Xu W, Zhang A, Li Q, Xu X. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes *mellitus*: Relationship with diabetic nephropathy. *Hum Immunol*. 2014; 75(4):289-96.
34. Madhumitha H, Mohan V, Deepa M, Babu S, Aravindhan V. Increased Th1 and suppressed Th2 serum cytokine levels in subjects with diabetic coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol*. 2014; 3:13:1.
35. Kumar P, Natarajan K, Shanmugam N. High glucose driven expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine genes in lymphocytes: molecular mechanisms of IL-17 family gene expression. *Cell Signal*. 2014; 26(3):528-39.
36. Zeng C, Shi X, Zhang B, Liu H, Zhang L, et al,. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berl)*. 2012; 90(2):175-186
37. Chen H, Wen F, Zhang X, Su SB. Expression of T-helper-associated cytokines in patients with type 2 diabetes *mellitus* with retinopathy. *Mol Vis*. 2012; 18:219-226
38. Eller K, Kirsch A, Wolf AM, et al. Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2011;60(11):2954-2962.
39. Xu J, Su HL, Wang JH, Zhang CH. [Role of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in type 2 diabetic nephropathy]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009; 29(1):137-139.
40. Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND. Naïve and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2006; 70(2):371-376.
41. Baynest HW. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and management of diabetes *mellitus*. *J Diabetes Metab*. 2015; 6:5

42. Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2013;21(3) 98-106.
43. Naya DL, E. Álvarez D. Diabetes *mellitus*. Diagnostic criteria and classification. Epidemiology. Etiopathogenesis. Initial assessment of patients with diabetes. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2016; 17(12):935-946
44. Li L, Pan Z, Yang X. Identification of dynamic molecular networks in peripheral blood mononuclear cells in type 1 diabetes *mellitus*. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019; 12:969-982.
45. Stevens JW, Khunti K, Harvey R, Johnson M, Preston L, et al.,. Preventing the progression to Type 2 diabetes *mellitus* in adults at high risk: A systematic review and network meta-analysis of lifestyle, pharmacological and surgical interventions. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2015;107(3):320-331
46. Gonçalves ACO, Cazarim MS, Sanches C, et al. Cost-effectiveness analysis of a pharmacotherapeutic empowerment strategy for patients with type 2 diabetes *mellitus*. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2019;7(1):e000647.
47. Mirghani Dirar A, Doupis J. Gestational diabetes from A to Z. *World J Diabetes*. 2017;8(12):489–511.
48. Alfadhli EM. Gestational diabetes *mellitus*. *Saudi Med J*. 2015;36(4):399–406.
49. Papatheodorou K, Papanas N, Banach M, Papazoglou D, Edmonds M. Complications of Diabetes. *J Diabetes Res*. 2016: 6989453.
50. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes *mellitus* and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018; 14(2):88-98.
51. Ministerio de salud. Guía de práctica clínica para el diagnóstico, tratamiento y control de la diabetes *mellitus* tipo 2 en el primer nivel de atención RM N°719-2015/MINSA. Lima Perú 2018.
52. Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, et al.,. From pre-diabetes to diabetes: Diagnosis, treatments and translational research. *Medicina (Kaunas)*. 2019; 29,55(9):E546.



53. Parra-Ortega I, Salceda-Rangel KS, Nájera-Martínez N, López-Martínez B, Ortiz-Navarrete V, et al.,. Determinación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T y células natural killer en sangre periférica de individuos sanos por citometría de flujo. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2019;76(2):66-78.
54. Van den Broek T, Borghans JAM, van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(6):363-373.
55. Martin MD, Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol.* 2018;9:2692.
56. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol.* 2009;70(4):326–336.
57. Zeng D, Hoffmann P, Lan F, Huie P, Higgins J, Strober S. Unique patterns of surface receptors, cytokine secretion, and immune functions distinguish T cells in the bone marrow from those in the periphery: impact on allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2002; 15;99(4):1449-1457.
58. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):185–189.
59. Mason GM, Lowe K, Melchiotti R, Ellis R, de Rinaldis E, et al.,. Phenotypic complexity of the human regulatory T Cell compartment revealed by mass cytometry. *J Immunol.* 2015; 1500703.
60. Feng P, Yan R, Dai X, Xie X, Wen H, Yang S. The Alteration and Clinical Significance of Th1/Th2/Th17/Treg Cells in Patients with Multiple Myeloma. *Inflammation.* 2015; (38) 2.
61. Vahedi G, Poholek A, Hand TW, Laurence A, Kanno Y, O'Shea JJ, Hirahara K. Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes. *Immunol Rev.* 2013; 2(1):24-40.
62. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev.* 2010; 238(1):247-62.
63. Evans CM, Jenner RG. Transcription factor interplay in T helper cell differentiation. *Brief Funct Genomics.* 2013; 12(6):499-511.
64. Zhang WX and Yang SY. Cloning and characterization of a new member of the T-Box gene family. *Genomics* 2000; 70: 41-48.

65. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000; 100(6):655-669.
66. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(11):777-89.
67. Ouyang W, Löhning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity*. 2000; 12(1):27-37.
68. Chou J, Sylvain P, and Zena W. GATA3 in Development and Cancer Differentiation: Cells GATA Have It!. *J Cell Physiol*. 2010; 222(1): 42–49.
69. Grote D, Boualia SK, Souabni A, Merkel C, Chi X, et al.,. Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000316
70. Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, et al.,. GATA-3: An unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev*. 2003; 17:2108–2122
71. Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 2006; 127:1041–1055
72. Roncador G, Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas et al.,. FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia* 2005; 19(12):2247-2253.
73. Mahmud SA, Manlove LS, Farrar MA. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAKSTAT* 2013; 2(1): e23154
74. Fontenot JD, Rudensky AY. A well-adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor FOXP3. *Nat Immunol* 2005; 6:331-337.
75. Huh Jun R. y Littman, DR. Small molecule inhibitors of ROR $\gamma$ t: Targeting Th17 cells and other applications. *European Journal of Immunology*. 2012; 42 (9), 2232-2237.
76. Eberl G, Marmon S, Sunshine M-J, Rennert PD, Choi Y, Littman DR. An essential function for the nuclear receptor ROR $\gamma$ (t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol*. 2004;5(1):64-73.

77. Dittrich W, Göhde W. Impulsfluorometrie bei Einzelezellen in Suspensionen [Impulse fluorometry of single cells in suspension]. *Z Naturforsch B*. 1969; 24(3):360-361.
78. Brummelman J, Haftmann C, Núñez G, Alvisi G, Mazza C, et al. Development, application and computational analysis of high-dimensional fluorescent antibody panels for single-cell flow cytometry. *Nature Protocols*. 2019; 14:1946–1969.
79. Jaroszeski J, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Molecular Biotechnology*. 1999; 11(1): 37–53.
80. Holmberg-Thyden S, Grønbaek K, Ortved A, Fassi D, Reker S, A user's guide to multicolor flow cytometry panels for comprehensive immune profiling. *Analytical Biochemistry*. 2021; (627)114210: ISSN 0003-2697
81. Barrera L, Drago M, Pérez J, Sainz T, Zamora A, et al. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2004; 17(1), 42-55.
82. Hoffman A. Flow cytometry: Instrumentation, applications, future trends and limitations. In: Resch-Genger, U. (eds) *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*. Springer Series on Fluorescence. 2008; (6). ISBN: 978-3-540-70570-3
83. McKinnon M. Flow cytometry: An overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018; (21)120:5.1.1-5.1.11
84. Telford WG. Lasers in flow cytometry. *Methods Cell Biol*. 2011; 102:375-409.
85. Marti E, Stetler-Stevenson M, Bleesing J, Fleisher A. Introduction to flow cytometry. *Semin Hematol*. 200; 38(2):93-99
86. Ferrer-Font L, Pellefigues C, Mayer J, Small J, Jaimes C, et al. Panel design and optimization for high-dimensional immunophenotyping assays using spectral flow cytometry. *Current protocols in cytometry*. 2020; 92(1)
87. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155: 335-350
88. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, et al. Real-time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr Genomics*. 2007;8(4):234-251.

89. E. Navarro, G. Serrano-Heras, M.J. Castaño, J. Solera. Real-time PCR detection chemistry. *Clínica Chimica Acta*. 2015; (439):231-250.
90. Briones C. Reacción en cadena de la polimerasa. *Enciclopedia de Astrobiología*. Springer link. 2014: 1-2
91. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. 2014: 28 (3):85.
92. McChlery S, Clarke S. The use of hydrolysis and hairpin probes in Real-time PCR. *Molecular Biotechnology*. 2003; 25(3): 267–274.
93. Butler J. Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology. *Capítulo DNA Quantitation*, 2012:49-67
94. Wilhelm J, Pingoud A. Real-Time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*. 2003; 4(11):1120–1128.
95. Rodríguez-Lázaro D, Hernández M. Identification methods: Real-Time PCR. *Encyclopedia of Food Microbiology segunda edición*. Academic Press. 2014:344-350.
96. Harshitha R, Arunraj D. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49(5):800-812
97. Heid A, Stevens J, Livak J, Williams M. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 ;6(10):986-994.
98. Adeola F. Normalization of gene expression by quantitative RT-PCR in human Cell Line: comparison of 12 endogenous reference genes. *Ethiop J Health Sci*. 2018;28(6):741-748.
99. Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR, *Nucleic Acids Research*, 2001; 9(29): e45
100. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 2001; 25 (4): 402-408
101. Biederman J, Yee J, Cortes P. Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney International*. 2004; 66(6): 2308-2314
102. Freitas GRR, da Luz Fernandes M, Agena F, Jaluul O, Silva SC, Lemos FBC, Coelho V, Elias DN, Galante NZ. Aging and end stage renal disease

- cause a decrease in absolute circulating lymphocyte counts with a shift to a memory profile and diverge in Treg population. *Aging Dis.* 2019;10(1):49-61.
103. Xiaoyan J, Rongyi C, Xuesen C. et al. The difference of T cell phenotypes in end stage renal disease patients under different dialysis modality. *BMC Nephrol* 5;20(1):301
  104. Chung BH, Kim KW, Sun IO, Choi SR, Park HS, et al. Increased interleukin-17 producing effector memory T cells in the end-stage renal disease patients. *Immunology Letters.* 2012; 141(2)181–189
  105. Meijers RW, Litjens NH, de Wit EA, Langerak AW, Baan CC, Betjes MG. Uremia-associated immunological aging is stably imprinted in the T-cell system and not reversed by kidney transplantation. *Transpl Int.* 2014; 27(12):1272-84.
  106. Courivaud C, Bamoulid J, Crepin T, Gaiffe E, Laheurte C, Saas P and Ducloux D. Pre-transplant thymic function predicts is associated with patient death after kidney transplantation. *Front. Immunol.* 2020; 11:1653.
  107. Yu JJ, Chen G, Pang NN, Guo XH, Wang L, et al., [mRNA Expressions of T-bet, GATA-3, ROR  $\gamma$ t and Foxp3 in peripheral blood of patients with chronic lymphocytic leukemia in different stages]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2015;23(1):45-49.
  108. Mortazavi, H, Soltani-Zangbar MS, Eghbal-Fard, S, et al. Cytokine profile, Treg/Th17 cell frequency changes during different posttransplantational time points in patients undergoing renal transplantation. *J Cell Physiol.* 2019; 234: 20935– 20943.
  109. Alikhan MA, Huynh M, Kitching AR, Ooi JD. Regulatory T cells in renal disease. *Clin Transl Immunology.* 2018; 30;7(1):e1004.
  110. Sun Q, Cheng D, Zhang M, He Q, Chen Z, Liu Z. Predominance of intraglomerular T-bet or GATA3 may determine mechanism of transplant rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):246-252.
  111. Galante Z, Câmara O, Kallas G, Salomão R, Pacheco-Silva A, et al. Noninvasive immune monitoring assessed by flow cytometry and real time RT-PCR in urine of renal transplantation recipients. *Transpl Immunol.* 2006; 16(2):73-8

## ANEXOS

**Anexo 1.** Expresión de los valores de Ct de los genes FOXP3, RORYT, GATA 3, T-bet y actina como gen endógeno

| CÓDIGO | FOXP3 | RORYT | GATA3 | TBET  | ACTINA |
|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| LM003  | 0     | 39.86 | 40.54 | 32.58 | 27.92  |
| LM013  | 39.32 | 36.46 | 34.95 | 29.64 | 19.06  |
| LM007  | 39.8  | 35.72 | 32.66 | 28.09 | 21.82  |
| LM017  | 37.25 | 29.94 | 30.65 | 29.47 | 19.56  |
| LM012  | 42.85 | 34.92 | 34.55 | 28.67 | 21.08  |
| LM025  | 40.29 | 33.83 | 32.91 | 29.66 | 20.72  |
| LM028  | 32.64 | 28.36 | 27.13 | 22.89 | 17.67  |
| LM026  | 42.74 | 34.85 | 34.23 | 29.26 | 21.86  |
| LM027  | 29.33 | 24.51 | 24.09 | 21.06 | 14.54  |
| LM008  | 40.44 | 36.87 | 35.04 | 29.97 | 21.89  |
| LM010  | 39.61 | 35.07 | 40.61 | 28.79 | 21.78  |
| LM019  | 39.58 | 30.07 | 32.7  | 28.6  | 19.54  |
| LM016  | 35.82 | 28.84 | 28.7  | 25.56 | 18.84  |
| LM021  | 39.09 | 31.75 | 32.69 | 29.65 | 19.97  |
| LM006  | 41.11 | 35.72 | 0     | 30.95 | 21.96  |
| LM024  | 41.1  | 34.74 | 34.53 | 29.62 | 21.96  |
| LM015  | 35.5  | 31.82 | 27.33 | 23.87 | 18.08  |
| LM022  | 41.33 | 31.82 | 33.15 | 29.29 | 21.51  |
| LM011  | 40.78 | 35.69 | 38.36 | 28.62 | 21.14  |
| LM023  | 38.6  | 31.59 | 31.99 | 27.78 | 20.23  |
| LM020  | 35.88 | 32.26 | 28.99 | 25.04 | 17.96  |
| LM014  | 40.75 | 32.3  | 31.89 | 29.18 | 19.82  |
| LM001  | 42.63 | 35.74 | 35    | 28.77 | 22.52  |
| LM002  | 0     | 35.55 | 34.97 | 29.22 | 21.19  |
| LM018  | 38.82 | 33.68 | 29.59 | 26.8  | 19.55  |