



Universidad de Valladolid
Curso 2017-2018

**LAS CÉLULAS T REGULADORAS FOXP3
COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE LA
FUNCIÓN DEL INJERTO RENAL:
REVISIÓN SISTEMÁTICA MULTIETAPA**

Autora: Rosario Padilla Berdugo

Tutor: Francisco Herrera Gómez / Francisco Javier Álvarez González

Índice

Resumen	3
Introducción.....	5
Métodos.....	6
Resultados.....	7
Discusión.....	9
Conclusión.....	11
Abreviaturas.....	12
Bibliografía.....	13
Figuras.....	21

Resumen

Antecedentes

Las células inmunes circulantes podrían convertirse en predictores de la variación del efecto del tratamiento inmunosupresor, con un especial interés en la monitorización continua en los pacientes receptores de riñón.

Métodos

Presentamos una revisión sistemática multietapa europea de literatura publicada y no publicada. Se elaboró un mecanismo de supervisión multidisciplinar realizado por expertos en el trasplante de riñón, inmunofenotipificación por citometría de flujo y la variación farmacológica.

Se ha evaluado si el fenotipo inmune del trasplantado de riñón está relacionado con la tolerancia en el receptor después del trasplante, el objetivo es evaluar si este fenotipo permite la identificación de los receptores en riesgo de disfunción aguda del aloinjerto (DAA) en pacientes tratados con inmunosupresores. Se ha realizado un metaanálisis de los resultados dicotómicos y continuos. La finalidad es conseguir evidenciar la existencia de unos predictores o biomarcadores que midan la función del injerto renal trasplantado.

Resultados

En 4 estudios se produjo un aumento en la población de células T reguladoras (Treg) de FoxP3 y varias poblaciones de células B reguladoras después del trasplante renal. Sin embargo, en el grupo de tratados con Rapamicina/Sirolimus (inhibidores de mTOR) con / sin Belatacept, solo aumentaron las células Tregs y esto se asoció con una menor probabilidad de desarrollar DAA [Odds Ratio (OR) / intervalo de confianza del 95% (IC 95%) / I2: 0,31 / 0,10-0,93 / 0%]. Seis ensayos controlados aleatoriamente (diseño: estratificado de biomarcadores retrospectivos) evaluaron los cambios en el número de células Treg y la función del injerto renal entre grupos tratados con los inhibidores de mTOR con / sin belatacept y los inhibidores de la calcineurina

o belatacept como tratamiento único. Estos ensayos proporcionan un nivel bajo de evidencia para proponer el número de células Treg como un biomarcador predictor de la función del injerto renal.

Conclusiones

La cuantificación de las células Tregs por citometría de flujo podría ser propuesta como una prueba "complementaria" para evaluar el efecto del tratamiento inmunosupresor o la respuesta a los inhibidores de mTOR con / sin Belatacept en los receptores de riñón, siendo interesante para el control de la tolerancia del injerto en los pacientes trasplantados de riñón.

Introducción

El trasplante de órganos sólidos es el tratamiento de elección para diversas enfermedades de órganos en su etapa terminal. Sin embargo, la necesidad del tratamiento de por vida con inmunosupresores constituye una enorme carga para los pacientes. El mayor riesgo para infecciones [1], neoplasias [2], así como los efectos metabólicos [3, 4] y toxicidades [5] bien conocidas, obligan a realizar ajustes en las dosis de los inmunosupresores.

Por lo tanto, la retirada de la inmunosupresión sigue siendo un objetivo fundamental. La comunidad de trasplante se encuentra muy motivada por definir los biomarcadores de la tolerancia al injerto, un estado excepcional de ausencia de respuesta inmunológica hacia el órgano trasplantado, para seleccionar pacientes en quienes se pueda llevar a cabo estrategias de minimización de la inmunosupresión [6, 7, 8, 9].

No obstante, la utilidad clínica real de los marcadores propuestos hasta ahora no es clara, y sólo permiten entender el fenómeno de inmuno-tolerancia [6, 10, 11, 12, 13].

Últimamente, se ha visto que el fenotipo inmune puede convertirse en una herramienta valiosa para discernir pacientes de alto y bajo riesgo en el rechazo. La citometría de flujo se convertiría en una técnica alternativa a la secuenciación de genes, de por sí compleja [6, 10, 11, 12, 13]. Se debe asumir la influencia de la inmunosupresión sobre la cinética linfocitaria, que se produce en paralelo al efecto del tratamiento: los esquemas inmunosupresores con inhibidores de mTOR (Rapamicina/Sirolimus) con / sin belatacept (anti CTLA-4 de segunda generación) favorecen la expansión de la población de células T reguladoras (Treg) FoxP3 [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23], lo que a su vez se relaciona con una mejora en la función del injerto renal atribuida al uso de estos fármacos [15, 16, 18, 19].

Si asumiéramos que las Tregs fueran un biomarcador predictivo, el número de estas células podría variar de acuerdo con el efecto que los inhibidores de mTOR sólo o combinados con Belatacept tienen sobre la función del injerto renal [24]. Se elige la función del injerto para referirnos a un desenlace clínico

con el que medir el efecto del tratamiento [24, 25]. La predictibilidad del biomarcador propuesto debe confirmarse [26].

Se ha elegido la disfunción aguda del aloinjerto (DAA) bajo los efectos de la inmunosupresión para medir el impacto del tratamiento sobre la función del injerto [27, 28]. Hemos contado con un grupo de asesores expertos para guiar a los revisores en todo el proceso de la revisión sistemática que presentamos [29], que intenta unir la eficacia de la inmunosupresión farmacológica con los cambios en los números de Tregs.

Métodos

Este estudio es una revisión sistemática multietapa de estudios publicados y no publicados llevada a cabo de acuerdo con las guías PRISMA [30]. Cuatro protocolos fueron registrados en el Registro Internacional Prospectivo de Revisiones Sistemáticas (PROSPERO): CRD42017057570, CRD4218084941, CRD4218085019, CRD4218085186. Un diseño de revisión sistemática de dos etapas (mapeo sistemático seguido de una revisión sistemática en profundidad) constituye el núcleo de nuestro enfoque multietapa. Los hallazgos de esta revisión se complementaron con otras dos revisiones sistemáticas de etapa única, que condujeron a una actualización para proponer el número de células Treg como un biomarcador predictivo en la función del injerto renal. Para contextualizar los hallazgos de la búsqueda, se estableció un mecanismo de supervisión multidisciplinario realizado por expertos en trasplante renal (JP y MP), citometría de flujo, inmunofenotipificación (CL, DSS y SH), y la variación farmacológica (FH-G y FJA).

Esta revisión sistemática implica a receptores adultos *de novo* de un trasplante renal (primer trasplante / retrasplante) así como pacientes trasplantados renales con al menos 12 meses desde el trasplante. Las células Tregs fueron definidas como la población de linfocitos CD4 + que presenta los niveles más altos de CD25 (receptor de interleucina-2 cadena α) [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21] en combinación con bajos niveles de CD127 (receptor de interleucina-7) [18, 19, 20, 21].

La baja frecuencia de eventos de DAA definió una función estable del injerto. Sólo fueron elegibles ensayos controlados aleatorios (ECA) y, en particular, los diseños de ensayos que evalúan adecuadamente el efecto del tratamiento comparativo en resultados de salud relevantes para el paciente según subgrupos delineados por el biomarcador (número de células Treg) [24, 31]. Previamente, se habían revisado estudios pronósticos (estudios de cohorte comparativos tanto prospectivos como retrospectivos [32]) para identificar todos los posibles biomarcadores predictivos de la función del injerto (células reguladoras de la sangre).

Se buscó en MEDLINE, EMBASE y Cochrane, así como en fuentes de literatura gris (repositorios de tesis doctorales, y de resúmenes de congreso). Se buscó también en las referencias de los estudios elegibles.

Después de evaluar el riesgo de sesgo, se llevó a cabo un resumen cualitativo según las recomendaciones del Centro de Revisiones y Disseminación de la Universidad de York [34]. Se hizo metaanálisis de desenlaces dicotómicos. Se calculó la Odds ratio global (OR) para todos los eventos de DAA (Modelo de efectos aleatorios de Mantel-Haenszel) entre esquemas con/sin inhibidores de mTOR con/sin belatacept. Se usó la versión 5.3 del software Review Manager (RevMan) (The Cochrane Collaboration), Se examinó la heterogeneidad de las estimaciones mediante la cuantificación de la inconsistencia (estadística I^2) y calculando el estadístico χ^2 . La presencia de sesgos de publicación se evaluó mediante la inspección visual de gráficos de embudo (funnel plot).

Resultados

Se identificaron 1465 citas después de todas las búsquedas. La Fig. 1 representa el diagrama de flujo PRISMA correspondiente a las cuatro revisiones sistemáticas y resultados de búsqueda en trasplante renal [35]. Once artículos correspondientes a 3 estudios de cohorte prospectivos [36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44] y un estudio de cohorte retrospectivo [45, 46] evaluaron la tolerancia en receptores de riñón. Todos estos estudios fueron patrocinados por organismos estatales involucrados en la investigación de

Europa continental [39, 40, 41, 42, 43, 44], Brasil [45, 46], EE. UU. [36, 37, 38], y Reino Unido [36], y se llevaron a cabo como estudios internacionales colaborativos multicentro. Estos estudios resultan también de 2 tesis de doctorado [47, 48] y 3 resúmenes de reuniones [49, 50, 51].

Limitado por factores de confusión, los datos de análisis del transcriptoma y del fenotipo inmune permitieron la identificación de pacientes con buen pronóstico. Sin embargo, solo el inmunofenotipo fue analizado con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento. Seis ECA de fase 2 o 3 de inhibidores de mTOR y / o Belatacept se centraron en la cinética de células Tregs y otros linfocitos circulantes y en la función del injerto renal [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21].

Sólo las células Tregs estuvieron bajo la influencia de la inmunosupresión. A pesar de las diferencias significativas existentes entre inhibidores de TORi con / sin Belatacept e ICN o Belatacept como tratamiento único, los detalles del trasplante y otras características de la muestra dificultaron la obtención de estimaciones cuantitativas del impacto que los medicamentos inmunosupresores pudieran tener [52, 53, 54]. El número de células Tregs aumentó tras 1-6 meses después del inicio del tratamiento con inhibidores de mTOR solos o combinado con Belatacept, y esto se asoció con menos eventos de DAA [15, 16, 18, 20, 21], o incluso con una mejora en TFGe en comparación con los datos obtenidos del tratamiento con ICN o Belatacept sólo [15, 16, 18, 21].

En 160 pacientes 4 de ellos con números altos de células Treg en tratamiento con Sirolimus solo o combinado con Belatacept (2.5%) presentaron casos de DAA, comparado con 13 pacientes de 131 con un número bajo de células Treg y en tratamiento con ICN o Belatacept sólo (9.9%). La figura 2 muestra el cálculo del OR combinado que fue 0,31 con IC del 95%: 0,10 a 0,93 ($p = 0,04$, $I^2 = 0\%$) [15, 16, 17, 18, 19, 20] El gráfico de embudo muestra asimetría (fig. 3), pero faltan estudios en áreas de mayor significación [55].

Aunque no se especificó claramente, los ensayos elegidos utilizaron un diseño retrospectivo y estratificado de biomarcadores, lo que proporciona pruebas

directas, aunque de bajo nivel, para proponer los números de células Treg, como un biomarcador predictor de la función del injerto renal [24, 31, 33].

Discusión

Nuestros resultados proporcionan pruebas detalladas sobre la idoneidad del inmunofenotipo como fuente de biomarcadores para receptores de órganos sólidos. Al usar inhibidores de mTOR con / sin Belatacept solo aumentaron las células Tregs, y esto se asoció con una menor probabilidad de desarrollar casos de DAA [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Los cambios en los números de células Treg y la función del injerto bajo el efecto de la inmunosupresión han sido el interés de ECA estratificados retrospectivos de biomarcadores, que constituyen el respaldo para proponer el número de células Tregs como un biomarcador predictivo o como un biomarcador de estratificación del tratamiento para la función del injerto renal.

Hasta la fecha, se podrían proponer varios biomarcadores de la función del injerto renal [27, 28]. Los marcadores podrían distinguir entre el daño del injerto inmune y no inmune [28]. Por ejemplo, las células B de transición pueden predecir el deterioro de la función del injerto agudo causado por rechazo agudo [56]. Las células Tregs pueden predecir la función retardada y lenta del injerto que ocurre en las primeras semanas de vida del injerto [57]. Es importante destacar que estos y otros posibles marcadores predictores solo han sido evaluados de manera observacional. Existen pocos estudios experimentales disponibles y, por primera vez se presenta un resumen de ellos para proponer al número de células Tregs como un predictor de función del injerto renal bajo inmunosupresión. Desde un el punto de vista del mecanismo celular, las células Tregs dependen de la interleuquina-2 como vía de señalización para su generación y expansión [58], y se reconoce que cambiar el equilibrio a favor de las células Tregs puede proteger el trasplante frente a la lesión inmune [59]. Existe una relación biológica plausible y además clínicamente tangible [60]. Curiosamente, el número de células Tregs aumentó y la función del injerto se

mantuvo estable solo en aquellos en tratamiento combinado con mTORi y Belatacept, pero no en los que recibieron belatacept como tratamiento único.

Esta revisión sistemática de múltiples etapas se ha llevado a cabo siguiendo protocolos de revisión planeados de antemano, y registrado en un registro internacional y de acceso público para revisiones [30]. Los protocolos se actualizaron prospectivamente [30], como una clara señal de transparencia en el proceso de revisión sistemática [61], previniendo los cambios que causan sesgos de información [62], y asegurando la no duplicidad de nuestro análisis [63, 64]. Nuestro enfoque hizo posible presentar un resumen consolidado de la evidencia experimental para interpretar los marcadores en la práctica clínica cotidiana. [65, 66, 67]. Aunque el alcance y el contexto son diferentes a los de una reciente revisión sistemática de múltiples etapas [68], nuestro diseño permite proporcionar toda la evidencia pertinente para justificar la existencia de un nuevo marcador predictor. La evidencia enriquecida y contextualizada proviene de fuentes de información amplias y de otras más concretas, de acuerdo con el método que se asemeja al descrito por Wortman de los "criterios mixtos" de evaluación de calidad [69], que constituye la base de la herramienta QUIPS.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Aunque las búsquedas en literatura publicada y no publicada garantizan que se han recuperado todos los estudios relevantes, es probable que haya sesgos de información y ser ésta la causa de la asimetría del gráfico de embudo [55]. Sin embargo, también deben tenerse en cuenta otros factores que justifican esta asimetría. Pueden estar implicadas asociaciones infladas en ensayos más pequeños [70] y la heterogeneidad [71]. Es importante destacar que se puede observar un beneficio sustancial sólo en pacientes de alto riesgo, y estos se incluyen preferentemente en ensayos más pequeños [72], que son generalmente de baja calidad metodológica [73]. Se observaron diferencias clínicas (detalles del trasplante y otras características de la muestra), y éstas sugieren que no fueron estudiados solo los pacientes de alto riesgo. Curiosamente, no se esperaba que las diferencias clínicas no se tradujeran en heterogeneidad estadística [52]. Finalmente, cuando se evalúan visualmente los gráficos embudo parece que en las áreas de mayor

significación faltan estudios [55], lo que puede estar a favor de cierta protección contra el sesgo de información [74]. El sesgo de publicación y los sesgos relacionados pueden llevar a conclusiones demasiado optimistas en revisiones sistemáticas. Por lo tanto, la inspección visual de los gráficos de embudo debería hacerse correctamente [71], e interpretarse teniendo en cuenta las circunstancias en las cuales la intervención fue llevada a cabo en estudios elegibles o en el contexto de susceptibilidad a sesgos [55].

Conclusión

Las Tregs pueden ser un biomarcador predictivo de la función del injerto renal en los tratados con inhibidores de mTOR.

Abreviaturas

BELA: Belatacept

ICN: Inhibidores de la calcineurina(Ciclosporina/Tracólimus)

CTLA-4: Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos

DAA: Disfunción aguda del aloinjerto

DSA: Anticuerpos específicos del donante

ECA: Ensayo controlado aleatorizado

IOT: Índices de tolerancia

ITN: Red de tolerancia inmunológica

mTOR: Diana terapéutica de la Rapamicina/Sirolimus

mTORi: inhibidores de mTOR

NK: Células “natural killer”

TFGe: Tasa estimada de filtración glomerular

Treg: Células T reguladoras FoxP3

Bibliografía

1. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med.* 2007;357:2601-14.
2. Krynitz B, Edgren G, Lindelöf B, Baecklund E, Brattström C, Wilczek H, et al. Risk of skin cancer and other malignancies in kidney, liver, heart and lung transplant recipients 1970 to 2008--a Swedish population-based study. *Int J Cancer.* 2013;132:1429-38.
3. Gosmanov AR, Dagogo-Jack S. Predicting, managing and preventing new-onset diabetes after transplantation. *Minerva Endocrinol.* 2012;37:233-46.
4. Kurdi A, Martinet W, De Meyer GR. mTOR Inhibition & Cardiovascular Diseases: Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Transplantation.* 2017 Feb 23.
5. Ojo AO. Renal disease in recipients of nonrenal solid organ transplantation. *Semin Nephrol.* 2007;27:498-507.
6. Baron D, Ramstein G, Chesneau M, Echasserieau Y, Pallier A, Paul C, et al. A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney Int.* 2015;87:984-95.
7. Danger R, Chesneau M, Paul C, Guérif P, Durand M, Newell KA, et al. A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 2017;91:1473-81.
8. Ashton-Chess J, Giral M, Brouard S, Souillou JP. Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation.* 2007;84:1215-9.
9. Auchincloss H Jr. In search of the elusive Holy Grail: the mechanisms and prospects for achieving clinical transplantation tolerance. *Am J Transplant.* 2001;1:6-12.
10. Lozano JJ, Pallier A, Martinez-Llordella M, Danger R, López M, Giral M, et al. Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *Am J Transplant.* 2011;11:1916-26.

11. Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007;7:309-19.
12. Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest.* 2008;118:2845-57.
13. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant.* 2006;6:150-60.
14. Diekmann F. Immunosuppressive minimization with mTOR inhibitors and belatacept. *Transpl Int.* 2015;28:921-7. <http://dx.doi.org/10.1111/tri.12603>
15. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1007-18.
16. Ruggenti P, Perico N, Gotti E, Cravedi P, D'Agati V, Gagliardini E, et al. Sirolimus versus cyclosporine therapy increases circulating regulatory T cells, but does not protect renal transplant patients given alemtuzumab induction from chronic allograft injury. *Transplantation.* 2007;84:956-64.
17. Morelon E, Lefrançois N, Besson C, Prévautel J, Brunet M, Touraine JL, et al. Preferential increase in memory and regulatory subsets during T-lymphocyte immune reconstitution after Thymoglobulin induction therapy with maintenance sirolimus vs cyclosporine. *Transpl Immunol.* 2010;23:53-8.
18. Bansal D, Yadav AK, Kumar V, Minz M, Sakhuja V, Jha V. Deferred pre-emptive switch from calcineurin inhibitor to sirolimus leads to improvement in GFR and expansion of T regulatory cell population: a randomized, controlled trial. *PLoS One.* 2013;8:e75591. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075591>
19. Stallone G, Pontrelli P, Infante B, Gigante M, Netti GS, Ranieri E, et al. Rapamycin induces ILT3(high)ILT4(high) dendritic cells promoting a new immunoregulatory pathway. *Kidney Int.* 2014;85:888-97.

20. Libetta C, Esposito P, Gregorini M, Margiotta E, Martinelli C, Boretta I, et al. Sirolimus vs cyclosporine after induction with basiliximab does not promote regulatory T cell expansion in de novo kidney transplantation: Results from a single-center randomized trial. *Transpl Immunol.* 2015;33:117-24.
21. Ferguson R, Grinyó J, Vincenti F, Kaufman DB, Woodle ES, Marder BA, et al. Immunosuppression with Belatacept-Based, Corticosteroid-Avoiding Regimens in De Novo Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2011;11:66-76.
22. Kirk AD, Guasch A, Xu H, Cheeseman J, Mead SI, Ghali A, et al. Renal transplantation using belatacept without maintenance steroids or calcineurin inhibitors. *Am J Transplant.* 2014;14:1142-51.
23. Xu H, Samy KP, Guasch A, Mead SI, Ghali A, Mehta A, et al. Postdepletion Lymphocyte Reconstitution During Belatacept and Rapamycin Treatment in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2016;16:550-64.
24. Merlin T, Farah C, Schubert C, Mitchell A, Hiller JE, Ryan P. Assessing personalized medicines in Australia: a national framework for reviewing codependent technologies. *Med Decis Making.* 2013;33:333-42.
25. Scartozzi M, Bearzi I, Mandolesi A, Pierantoni C, Loupakis F, Zaniboni A, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gene copy number (GCN) correlates with clinical activity of irinotecan-cetuximab in K-RAS wild-type colorectal cancer: a fluorescence in situ (FISH) and chromogenic in situ hybridization (CISH) analysis. *BMC Cancer.* 2009;9:303.
26. Lachenbruch PA, Rosenberg AS, Bonvini E, Cavallé-Coll MW, Colvin RB. Biomarkers and surrogate endpoints in renal transplantation: present status and considerations for clinical trial design. *Am J Transplant.* 2004;4:451-7.
27. Goldberg RJ, Weng FL, Kandula P. Acute and Chronic Allograft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. *Med Clin North Am.* 2016;100:487-503.
28. Halawa A. The early diagnosis of acute renal graft dysfunction: a challenge we face. The role of novel biomarkers. *Ann Transplant.* 2011;16:90-8.

29. Trivedi D, Goodman C, Dickinson A, Gage H, McLaughlin J, Manthorpe J, et al. A protocol for a systematic review of research on managing behavioural and psychological symptoms in dementia for community-dwelling older people: evidence mapping and syntheses. *Syst Rev.* 2013;2:70.
30. Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ.* 2015;349:g7647.
31. Product type 4 – Codependent technologies. In: Guidelines for preparing a submission to the Pharmaceutical Benefits Advisory Committee (Version 5.0). Department of Health; 2016. p. 144-79
32. Moons KG, Royston P, Vergouwe Y, Grobbee DE, Altman DG. Prognosis and prognostic research: what, why, and how? *BMJ.* 2009;338:b375.
33. Assessment of co-dependent technologies. In: Kissler A, Zechmeister-Koss I. Procedural guidance for the systematic evaluation of biomarker tests. Decision Support Document Nr. 77. Vienna: Ludwig Boltzmann Institute for Health Technology Assessment; 2014. p. 37-9.
34. Systematic reviews: Centre for Reviews and Dissemination's (CRD) guidance for undertaking reviews in health care. Centre for Reviews and Dissemination, University of York; 2008.
35. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009 6, e1000097.
36. Moraes-Vieira PM, Silva HM, Takenaka MC, Monteiro SM, Lemos F, Saitovitch D, et al. Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Hum Immunol.* 2010;71:442-50.
37. Silva HM, Takenaka MC, Moraes-Vieira PM, Monteiro SM, Hernandez MO, Chaara W, et al. Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol Med.* 2012;18:733-43.

38. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010;120:1848-61.
39. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010;120:1836-47.
40. Newell KA, Asare A, Sanz I, Wei C, Rosenberg A, Gao Z, et al. Longitudinal studies of a B cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2015;15:2908-20.
41. Baeten D, Louis S, Braud C, Braudeau C, Ballet C, Moizant F, et al. Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:294-304.
42. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation.* 2006;81:398-407.
43. Braudeau C, Racape M, Giral M, Louis S, Moreau A, Berthelot L, et al. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immunoregulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int.* 2007;20:845-55.
44. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M, Degauque N, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 2010;78:503-13.
45. Chesneau M, Pallier A, Braza F, Lacombe G, Le Gallou S, Baron D, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant.* 2014;14:144-55.
46. Braza F, Dugast E, Panov I, Paul C, Vogt K, Pallier A, et al. Central Role of CD45RAFoxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:1795-805.

47. Louis S. Etudes d'un protocole clinique de minimisation des corticostéroïdes et de la tolérance opérationnelle chez des patients transplantés rénaux [dissertation]. Nantes: University of Nantes (French); 2005.
48. Braudeau C. Étude du phenotype et de la fonction des cellules regulatrices CD4+ CD25+ dans le sang des patients tolérants spontanément un greffe de rein [dissertation]. Nantes: University of Nantes (French); 2006.
49. Abstract# 489: Baeten D, Louis S, Braud C, Braudeau C, Pallier A, Giral M, et al. phenotypically and functionally distinct CD8+ cell populations in long-term drug-free tolerance in human kidney graft recipients. American Transplant Congress 2005: 6th Annual Joint Meeting of the American Society of Transplant Surgeons and the American Society of Transplantation; 2005 May 21 - 25; Seattle, Washington, USA. Am J Transplant. 2005;5 Suppl 11:155-576.
50. Abstract# 999: Hernandez-Fuentes M, Sawitzski B, Sagoo P, Rovis F, Jimenez E, Perucha E, et al. Indices of tolerance: interim report. World Transplant Congress 2006; 2006 July 22 - 27; Boston, Massachusetts, USA. Am J Transplant. 2006; 6 Suppl 2:65-472.
51. Silva H, Takenaka M, Vieira P, Monteiro S, Lemos F, Saitovitch D, et al. Operationally tolerant kidney recipients exhibit higher numbers of suppressive CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} b cells in relation to chronic rejection (169.25). IMMUNOLOGY 2011™ 98th Annual Meeting of the American Association of Immunologists; 2011 May 13-17; San Francisco, California, USA. J Immunol. 2011;186 1 Suppl:169.25.
52. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ et al. Measuring inconsistency in meta-analyses. BMJ. 2003;327:557-60.
53. Rothwell PM. Treating individuals 2. Subgroup analysis in randomised controlled trials: importance, indications, and interpretation. Lancet. 2005;365:176-86.
54. Thompson SG. Why sources of heterogeneity in meta-analysis should be investigated. BMJ. 1994;309:1351-5

55. Sterne JA, Sutton AJ, Ioannidis JP, Terrin N, Jones DR, Lau J, et al. Recommendations for examining and interpreting funnel plot asymmetry in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ*. 2011;343:d4002.
56. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, Kaul B, Smith H, Daga S et al. Transitional Blymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *Am J Transplant*. 2015;15:1384-91.
57. Nguyen MT, Fryml E, Sahakian SK, Liu S, Cantarovich M, Lipman M et al. Pretransplant Recipient Circulating CD4+CD127lo/- Tumor Necrosis Factor Receptor 2+ Regulatory T Cells: A Surrogate of Regulatory T Cell-Suppressive Function and Predictor of Delayed and Slow Graft Function After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2016;100:314-324.
58. Zuber J, Hermine O, Chatenoud L, Legendre C. Harnessing regulatory T cells for transplant tolerance in the clinic through mTOR inhibition: myth or reality? *Curr Opin Organ Transplant*. 2011;16:606-13.
59. Issa F, Wood KJ. CD4+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:757-64.
60. Herrera-Gómez F, Vásquez-Seoane M, Del Aguila W, Martín-García D, MaurtuaBriseño-Meiggs Á, González-López A, et al. Peripheral blood regulatory T cell counts as a predictive biomarker for the outcome of kidney transplant: A systematic review. *Med Clin (Barc)*. 2017 Dec 20;149(12):523-35.
61. Stewart L, Moher D, Shekelle P. Why prospective registration of systematic reviews makes sense. *Syst Rev*. 2012;1:7. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-4053-1-7>
62. Kirkham JJ, Altman DG, Williamson PR. Bias due to changes in specified outcomes during the systematic review process. *PLoS One*. 2010;5:e9810.
63. Siontis KC, Hernandez-Boussard T, Ioannidis JP. Overlapping meta-analyses on the same topic: survey of published studies. *BMJ*. 2013;347:f4501.
64. Moher D. The problem of duplicate systematic reviews. *BMJ*. 2013;347:f5040.

65. Trochim W, Kane C, Graham MJ, Pincus HA. Evaluating translational research: a process marker model. *Clin Transl Sci.* 2011;4:153-62.
66. Sung NS, Crowley WF Jr, Genel M, Salber P, Sandy L, Sherwood LM, et al. Central challenges facing the national clinical research enterprise. *JAMA.* 2003;289:1278-87.
67. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA.* 2008;299:211-3.
68. Degenhardt L, Peacock A, Colledge S, Leung J, Grebely J, Vickerman P, et al. Global prevalence of injecting drug use and sociodemographic characteristics and prevalence of HIV, HBV, and HCV in people who inject drugs: a multistage systematic review. *Lancet Glob Health.* 2017;5:e1192-e1207.
69. Wortman PM. Judging research quality. In: Cooper H, Hedges LV, editors. *The Handbook of Research Synthesis.* New York: Russell Sage Foundation; 1994. p. 97-110.
70. Ioannidis JP. Why most discovered true associations are inflated. *Epidemiology.* 2008;19:640-8.
71. Terrin N, Schmid CH, Lau J. In an empirical evaluation of the funnel plot, researchers could not visually identify publication bias. *J Clin Epidemiol.* 2005;58:894-901.
72. Smith GD, Egger M. Who benefits from medical interventions? *BMJ.* 1994;308:72-4.
73. Egger M, Juni P, Bartlett C, Holenstein F, Sterne J. How important are comprehensive literature searches and the assessment of trial quality in systematic reviews? Empirical study. *Health Technol Assess.* 2003;7:1-76.
74. Peters JL, Sutton AJ, Jones DR, Abrams KR, Rushton L. Contour-enhanced metaanalysis funnel plots help distinguish publication bias from other causes of asymmetry. *J Clin Epidemiol.* 2008;61:991-6.

FIGURA 1

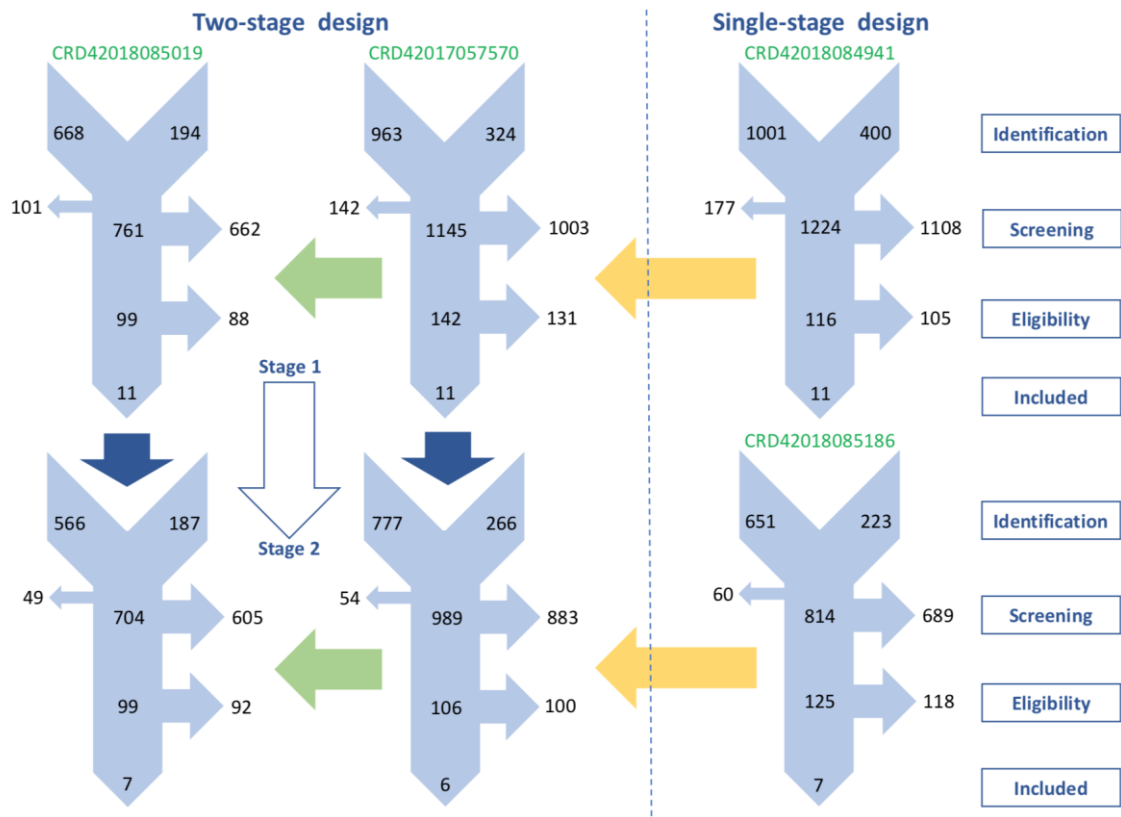


FIGURA 2

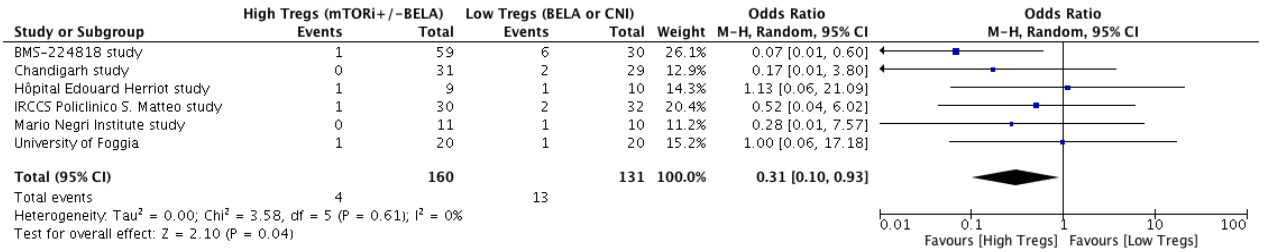


FIGURA 3

