

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Análisis del impacto de los niveles de fármacos
inmunosupresores sobre los parámetros inmunológicos y
bioquímicos y su asociación con infección y rechazo en
trasplante cardiaco**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

César Rodríguez Hernández

DIRECTORES

Javier Alberto Carbone Campoverde
Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**



“Análisis del impacto de los niveles de fármacos inmunosupresores sobre los parámetros inmunológicos y bioquímicos y su asociación con infección y rechazo en trasplante cardiaco”

TESIS DOCTORAL

César Rodríguez Hernández

MADRID, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**



“Análisis del impacto de los niveles de fármacos inmunosupresores sobre los parámetros inmunológicos y bioquímicos y su asociación con infección y rechazo en trasplante cardiaco”

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

César Rodríguez Hernández

Bajo la dirección de los doctores

Javier Alberto Carbone Campoverde
Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese

MADRID, 2017

La infección y el rechazo siguen siendo barreras importantes para la supervivencia a largo plazo de pacientes sometidos a trasplante cardiaco. La detección precoz de estas complicaciones es una asignatura pendiente y las herramientas disponibles en un laboratorio de rutina son muy limitadas. Está descrito que tras el trasplante se producirán alteraciones de parámetros bioquímicos e inmunológicos, pobremente evaluados como posibles biomarcadores de riesgo para dichas complicaciones. La idoneidad de la tesis comienza cuando se plantea la evaluación de estas cuestiones ante una problemática no resuelta, la detección del riesgo de infección y rechazo en trasplante cardiaco. La investigación es original, pues muchos de los biomarcadores incluidos no tienen antecedentes de publicaciones indexadas en trasplantados cardiacos. Se ha realizado un estudio longitudinal y prospectivo de 109 pacientes, evaluados en distintos momentos antes y después del trasplante cardiaco a lo largo de un año, cumpliendo con un tamaño muestral adecuado. Los estudios bioquímicos e inmunológicos realizados han incluido, niveles de fármacos inmunosupresores, ciclosporina, micofenolato y tacrolimus, valores séricos de bilirrubina total, transaminasas, aspartato aminotransferasa (GOT) y alanina aminotransferasa (GPT), gamma-glutamilttransferasa (GGT), proteínas totales, albúmina, creatinina, urea y proteína C reactiva, inmunoglobulina A, G y M, subclases de IgG, factores del complemento C3 y C4, factor B de properdina, valores leucocitarios totales, linfocitos y neutrófilos así como fenotipaje de las subpoblaciones de linfocitos T, B y células Natural Killer (NK). También se ha realizado un estudio transversal y retrospectivo original de los niveles de una serie de proteínas que podrían estar implicadas en rechazo alógeno incluyendo CD14, fetuína-B, galectina-3, apolipoproteína A1, NAP-2, CD44 y CD31. Se han identificado distintos parámetros bioquímicos e inmunológicos

INFORME DEL DIRECTOR

como posibles factores de riesgo. Se han confeccionado distintas escalas de riesgo que se asocian fuertemente a las variables de resultado. Se detectan niveles elevados de galectina 3 como posible marcador de rechazo celular agudo. La fortaleza de la información generada en la tesis se debe a que muchos de los parámetros analizados y las escalas confeccionadas que se asocian al riesgo de infección o rechazo están disponibles en rutina, por lo que una vez validados en estudios multicéntricos pueden pasar a práctica clínica sin limitaciones. Por todo ello, esta tesis es una aportación importante en el campo de la monitorización de laboratorio en el trasplante cardiaco.

INDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS

RELACIÓN DE TABLAS

RELACIÓN DE FIGURAS

RESUMEN.....1

SUMMARY.....5

I. INTRODUCCIÓN 9

 1.1 ACTIVIDAD DEL TRASPLANTE CARDIACO. 11

 1.2 INMUNOSUPRESORES. 18

 1.2.1 MICOFENOLATO. 23

 1.2.2 INHIBIDORES DE INMUNOFILINAS (ANTICALCINEURÍNICOS)..... 26

 1.2.3 ANTICUERPOS MONOCLONALES. DACLIZUMAB 30

 1.2.4 CORTICOSTEROIDES, PREDNISONA 32

 1.2.5 ANTIPROLIFERATIVOS O ANTAGONISTAS RECEPTOR IL2 O mTOR. EVEROLIMUS. 36

 1.3 PROBLEMAS DERIVADOS DE LA INMUNOSUPRESIÓN 39

 1.3.1 INFECCIÓN 40

 1.3.2 RECHAZO 43

 1.3.3 TOXICIDAD FARMACOLÓGICA, INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA 44

 1.3.3.1 DISFUNCIÓN RENAL..... 44

 1.3.3.2 MICROANGIOPATÍA TROMBÓTICA. 47

 1.3.3.3 COMPLICACIONES NEUROLÓGICAS. 48

 1.3.3.4 COMPLICACIONES METABÓLICAS 48

 1.3.3.5 FARMACOGENÉTICA DE LOS INMUNOSUPRESORES..... 49

 1.4 EVALUACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES COMO PREDICTORES DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO 51

 1.4.1 FETUÍNA B..... 52

 1.4.2 GALECTINA-3 54

 1.4.3 APOLIPOPROTEÍNA A1..... 57

 1.4.4 QUIMIOCINAS..... 58

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.4.4.1 CXCL4.....	59
1.4.4.2 PÉPTIDO ACTIVADOR DE NEUTRÓFILOS.....	59
1.4.4.3 CXCL9.....	59
1.4.5 CD14	60
1.4.6 CD31	61
1.4.7 CD44	63
II. JUSTIFICACIÓN.....	65
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
3.1 HIPÓTESIS	71
3.2 OBJETIVOS	71
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	75
4.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	77
4.3 PRINCIPIOS DE LA METODOLOGÍA	78
4.3.1 CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF)	78
4.3.2 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (EIA)	81
4.3.3 INMUNOENSAYO DE POLARIZACIÓN FLUORESCENTE	87
4.3.4 INMUNOENSAYO POR MICROPARTÍCULAS.....	91
4.3.5 ELISA	93
4.3.6 NEFELOMETRÍA	94
4.3.7 ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR	96
4.4 PARÁMETROS Y METODOLOGÍA	100
4.5 DEFINICIÓN DE EVENTOS INFECCIOSOS GRAVES.....	114
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	115
4.7 VALOR DE CORTE UTILIZADO PARA LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS.....	117
V. RESULTADOS	119
5.1 VALORES DESCRIPTIVOS DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.....	121
5.1.1 NORMALIDAD DE LAS VARIABLES	121
5.1.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL.....	123
5.2 CINÉTICA DE LOS BIOMARCADORES	123

5.3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE NIVELES DE FÁRMACOS Y BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS.....	135
5.4 ASOCIACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CON EVENTOS CLINICOS: INFECCIÓN Y RECHAZO CELULAR AGUDO. ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS.....	139
5.4.1 ASOCIACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CON EVENTOS DE INFECCIÓN. ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS	140
5.4.1.1 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN GRAVE DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO.	140
5.4.1.2 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN GRAVE DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO.....	140
5.4.1.3 TABLAS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN GRAVE DURANTE LOS PRIMEROS 90 DIAS POSTERIORES AL TRASPLANTE.....	141
5.4.2 ASOCIACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CON EVENTOS DE RECHAZO DEL INJERTO. ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS.	146
5.4.2.1 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO	146
5.4.2.2 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS BIOMARCDORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO CELULAR AGUDO DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO.....	146
5.4.2.3 TABLAS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS Y EL DESARROLLO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DURANTE LOS PRIMEROS 90 DIAS POSTERIORES AL TRASPLANTE.....	147
5.5 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES GRAVES O RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO.	152
5.5.1 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES GRAVES.....	153
5.5.1.1 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES DE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES GRAVES EN PACIENTES TRASPLANTADOS CARDIACOS.	154
5.5.1.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD DE NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES CON DESARROLLO DE INFECCIONES.....	155
5.5.1.3 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.	156

ÍNDICE DE CONTENIDOS

5.5.1.4 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS DE INMUNIDAD HUMORAL Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.....	157
5.5.1.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS CELULARES Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.....	159
5.5.1.6 TABLAS ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES GRAVES DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO.	159
5.5.1.7 ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE RIESGO DE INFECCIÓN GRAVE.....	164
5.5.1.8 TABLAS DEL ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE RIESGO DE INFECCIÓN GRAVE	165
5.5.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO AGUDO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.....	166
5.5.2.1 ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE UN EVENTO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.	166
5.5.2.2 ASOCIACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE UN EVENTO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.....	167
5.5.2.3 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y EL DESARROLLO DE UN PROCESO DE RECHAZO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.	168
5.5.2.4 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS QUE EVALUAN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y EL DESARROLLO DE UN PROCESO DE RECHAZO DEL IOJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.....	169
5.5.2.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS QUE EVALUAN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y EL DESARROLLO DE UN PROCESO DE RECHAZO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.....	169
5.5.2.6 TABLAS ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO.	170
5.5.2.7 ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE RIESGO DE INFECCIÓN GRAVE.....	175
5.5.2.8 TABLAS DEL ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE RIESGO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO.....	176
5.6 ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA	177

5.6.1 ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR DE LOS BIOMARCADORES ESTUDIADOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	177
5.6.1.1 ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR DE LOS NIVELES SERICOS DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.	178
5.6.1.2 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	178
5.6.1.3 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS DE INMUNIDAD HUMORAL PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	180
5.6.1.4 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS DE INMUNIDAD CELULAR PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	181
5.6.1.5 TABLAS DEL ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	182
5.6.2 ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR DE LOS BIOMARCADORES ESTUDIADOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE RECHAZO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	188
5.6.2.1 ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR DE LOS NIVELES SERICOS DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	188
5.6.2.2 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA VARIACIÓN DEL VALOR DE LOS NIVELES SERICOS DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS...	190
5.6.2.3 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	190
5.6.2.4 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS DE INMUNIDAD HUMORAL PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	191
5.6.2.5 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS DE INMUNIDAD CELULAR PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	191
5.6.2.6 TABLAS DEL ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO DE DESARROLLO DE UN EPISODIO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.....	192

ÍNDICE DE CONTENIDOS

5.7 ESTUDIO PARA IDENTIFICAR BIOMARCADORES ASOCIADOS A RIESGO DE INFECCIÓN Y DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DE FORMA INDEPENDIENTE. REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE.....	198
5.7.1 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE E INFECCIÓN GRAVE EN EL DIA 7 POST-TRASPLANTE.....	198
5.7.2 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE E INFECCIÓN GRAVE EN EL DIA 30 POST-TRASPLANTE.....	199
5.7.3 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE E INFECCIÓN EN EL DIA 90 POST-TRASPLANTE.....	200
5.7.4 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE Y RECHAZO DEL INJERTO EN EL DIA 7 POST-TRASPLANTE.....	201
5.8 ELABORACIÓN DE ESCALAS DE RIESGO EN EL DESARROLLO DE INFECCIÓN GRAVE Y DE RECHAZO DEL INJERTO.....	201
5.8.1 ESCALA DE RIESGO DE INFECCIÓN EN EL ESTUDIO PRE -TC.....	203
5.8.2 ESCALA DE RIESGO DE INFECCIÓN EN EL DÍA 7 POST-TC.....	204
5.8.3 ESCALA DE RIESGO DE INFECCIÓN EN EL DÍA 30 POST-TC.....	205
5.8.4 ESCALA DE RIESGO DE INFECCIÓN GRAVE EN EL DÍA 90 POST-TC.....	206
5.8.5 ESCALA DE RIESGO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN EL DÍA 90 POST-TC.....	207
5.8.6 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE OTRAS PROTEÍNAS COMO NUEVOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO CELULAR AGUDO.	208
VI. <i>DISCUSIÓN</i>	211
6.1 CINÉTICA Y VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES, DESDE EL MOMENTO DEL TRASPLANTE HASTA EL AÑO DESPUÉS DEL TRASPLANTE CARDIACO	215
6.2 CINÉTICA Y VARIABILIDAD DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DETERMINADOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD INMUNOLÓGICA, DESDE EL MOMENTO DEL TRASPLANTE HASTA UN AÑO DESPUÉS DEL INJERTO.....	217
6.3 CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS ANTICALCINEURÍNICOS Y MICOFENOLATO CON LOS DISTINTOS PARÁMETROS QUE EVALÚAN LA RESPUESTA CELULAR Y HUMORAL DEL PACIENTE TRASPLANTADO.....	226
6.4 ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES DE FÁRMACOS ANTICALCINEURÍNICOS Y MICOFENOLATO, OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS CON DISTINTAS COMPLICACIONES CLÍNICAS DEL TRASPLANTE	227
6.4.1 EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS ANTICALCINEURÍNICOS Y MICOFENOLATO Y OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS CON EL DESARROLLO DE PROCESOS INFECCIOSOS.....	228
6.4.2 ASOCIACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS ANTICALCINEURÍNICOS Y MICOFENOLATO Y OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS CON EL RECHAZO DEL ÓRGANO TRASPLANTADO	236

6.5 IDENTIFICACIÓN DE UNA ESCALA, MEDIANTE EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE VARIABLES BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS MÁS RELEVANTES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON UN MAYOR RIESGO DE SUFRIR UN EVENTO DE INFECCIÓN GRAVE O RECHAZO DEL INJERTO.....	242
6.6 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE OTRAS PROTEÍNAS COMO NUEVOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO CELULAR AGUDO.	245
VII. <i>CONCLUSIONES</i>	249
VIII. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	255
IX. <i>ANEXOS</i>	279

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Albúmina: ALB

ALG: globulinas antilinfocíticas.

ApoA1: Apolipoproteína A1.

ATC: globulinas antitímocíticas.

AUC: Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas.

BCG: Verde de bromocresol.

Bilirrubina total: BT

CDR: Regiones determinantes de la complementariedad.

CEIC: Comité de Ética e Investigación Clínica.

C_{max}: Concentración máxima.

CsA: Ciclosporina A

C2: Concentración a las dos horas de administrar el fármaco.

CMF: Citometría de flujo.

CREA: Creatinina

EIA: Inmunoensayo enzimático.

EDTA: Ácido etilen diamino-tetraacético.

ELISA: Ensayo, análisis inmunosorbente con la enzima ligada.

FB: Factor B de properdina.

FK: Tacrolimus.

FKBP-12: Proteína de unión a tacrolimus.

FPIA: Inmunoensayo de polarización fluorescente.

Gal-3: galectina-3.

GC: Glucocorticoides.

GLDH: Glutamato deshidrogenasa.

GGT: Gamma-glutamyltransferasa.

GM-CSF: Factor estimulante de granulocitos-macrófagos.

GODT: Global Observatory on Donation and Transplantation.

GOT: Aspartato aminotransferasa.

GPT: Alanina aminotransferasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

H.G.U.G.M: Hospital general universitario Gregorio marañón

GRE: Elementos de respuesta a glucocorticoides

HGR: Receptor de glucocorticoide humano

HREs: Elementos de la respuesta hormonal.

Ig: Inmunoglobulina.

IMPDH: Iosina 5 fosfato deshidrogenasa.

INF-γ: Interferón gamma.

IL-2: Interleucina 2

IL-2R: receptor de interleucina 2

I.S.H.L.T: Sociedad Internacional de Trasplante Cardíaco y Pulmonar.

IAM: Infarto agudo de miocardio.

IFCC: Federación Internacional de Química Clínica.

IV: Intravenosa.

KDa: kilodaltons.

ABREVIATURAS

L.B.G.M: Laboratorio de Bioquímica Gregorio Marañón.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LPS: Lipopolisacárido bacteriano.

MAT: Microangiopatía trombótica

MDH: Malato-deshidrogenasa.

MEIA: Inmunoensayo por micropartículas.

MIF: Factor inhibidor de migración de macrófagos.

MMP: Metaloproteasa.

MMF: Micofenolato.

MPA: Ácido micofenólico.

MPAG: Glucurónido fenólico del ácido micofenólico.

MUP: Fosfatasa 4-metil umbelliferona.

NAP2: Péptido activador de neutrófilos.

Natural killer: NK

NFAT: Factor nuclear de células T activadas.

NFkB: Factor nuclear kB.

Nm: Nanómetro.

ONT: Organización nacional de trasplante.

PCR: Proteína C reactiva.

Pm: Peso molecular.

p.m.p: Población por millón.

Post-TC: post-trasplante cardiaco.

Pre-TC: pre-trasplante cardiaco.

Proteínas totales: (PT)

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.

ROC: Curvas de operación característica del receptor.

SCA: Síndrome coronario agudo.

SRI: Síndrome de resistencia a insulina.

TC: Trasplante cardiaco.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta.

Tmax: Tiempos de concentración máxima.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

UV: Ultravioleta.

UV-V: Ultravioleta-visible.

VoID: Volumen de distribución.

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor predictivo positivo.

VSMC: Células de la musculatura lisa vascular.

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1: Actividad de trasplante cardiaco por Comunidad Autónoma y hospital. Años 2012 a 2015. (): Trasplantes infantiles < 16 años. Memoria actividad ONT 2015.	12
Tabla 2: Resumen fármacos utilizados en TC en nuestra cohorte de pacientes.....	39
Tabla 3: Características clínicas y demográficas de los pacientes trasplantados incluidos en el estudio prospectivo.....	76
Tabla 4: Detalle de los distintos anticuerpos monoclonales empleados en el fenotipado de las distintas subpoblaciones linfocitarias del estudio.	107
Tabla 5: Asociación entre fármacos inmunosupresores e infección. Comparación de medias.	141
Tabla 6: Asociación de la variabilidad a lo largo del tiempo del nivel de fármacos inmunosupresores e infección. Comparación de medias	142
Tabla 7: Asociación entre las variables bioquímicas en el punto Pre-TC e infección. Comparación de medias.....	142
Tabla 8: Asociación entre las variables de inmunidad humoral en el punto pre-TC e infección. Comparación de medias.....	142
Tabla 9: Asociación entre las variables de inmunidad celular en el punto pre-TC e infección. Comparación de medias.....	143
Tabla 10: Asociación entre las variables bioquímicas a los 7 días post-TC e infección. Comparación de medias.....	143
Tabla 11: Asociación entre las variables de inmunidad humoral a los 7 días post-TC e infección. Comparación de medias.....	143
Tabla 12: Asociación entre las variables de inmunidad celular a los 7 días post-TC e infección. Comparación de medias.....	144
Tabla 13: Asociación entre las variables bioquímicas a los 30 días post-TC e infección. Comparación de medias.....	144
Tabla 14: Asociación entre las variables de inmunidad humoral a los 30 días post-TC e infección. Comparación de medias.	144
Tabla 15: Asociación entre las variables de inmunidad celular a los 30 días post-TC e infección. Comparación de medias.....	145
Tabla 16: Asociación entre las variables bioquímicas a los 90 días post-TC e infección. Comparación de medias.....	145
Tabla 17: Asociación entre las variables de inmunidad humoral a los 90 días post-TC e infección. Comparación de medias.	145
Tabla 18: Asociación entre las variables de inmunidad celular a los 90 días post-TC e infección. Comparación de medias.....	146
Tabla 19: Asociación entre niveles de fármacos inmunosupresores y rechazo agudo del injerto Comparación de medias.....	148

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 20: Asociación entre la variabilidad a lo largo del tiempo del nivel de fármacos inmunosupresores y el rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	148
Tabla 21: Asociación entre las variables bioquímicas en el punto Pre-TC y el rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	148
Tabla 22: Asociación entre las variables de inmunidad humoral en el punto pre-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	149
Tabla 23: Asociación entre las variables de inmunidad celular en el punto pre-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	149
Tabla 24: Asociación entre las variables bioquímicas a los 7 días Post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	149
Tabla 25: Asociación entre las variables de la inmunidad humoral a los 7 días post-TC y el rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	150
Tabla 26: Asociación entre las variables de la inmunidad celular a los 7 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	150
Tabla 27: Asociación entre las variables bioquímicas a los 30 días post-TC y el rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	150
Tabla 28: Asociación entre las variables de la inmunidad humoral a los 30 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	151
Tabla 29: Asociación entre las variables de la inmunidad celular a los 30 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	151
Tabla 30: Asociación entre las variables bioquímicas a los 90 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	151
Tabla 31: Asociación entre las variables de la inmunidad humoral a los 90 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	152
Tabla 32: Asociación entre las variables de la inmunidad celular a los 90 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias.	152
Tabla 33: Asociación entre los niveles elevados de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de infección grave a los 7 días posteriores al trasplante.	155
Tabla 34: Asociación entre los niveles elevados de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de infección grave a los 30 días posteriores al trasplante.	155
Tabla 35: Asociación entre niveles de fármacos inmunosupresores en función del rango de efectividad y seguridad en el entorno del trasplante y el desarrollo de infección grave.	155
Tabla 36: Asociación de la variabilidad a lo largo del tiempo del nivel de fármacos inmunosupresores y desarrollo de infección.	156
Tabla 37: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos en el punto pre-TC y desarrollo de infección grave.	159
Tabla 38: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral en el punto pre-TC e desarrollo de infección grave.	160

Tabla 39: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular en el punto pre-TC y desarrollo de infección grave.....	160
Tabla 40: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 7 días post-TC y desarrollo de infección grave.....	160
Tabla 41: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 7 días post-TC y el desarrollo de infección grave.....	161
Tabla 42: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 7 días post-TC y el desarrollo de infección grave.	161
Tabla 43: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 30 días post-TC y el desarrollo de infección grave	162
Tabla 44: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 30 días post-TC y el desarrollo de infección grave.....	162
Tabla 45: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 30 días post-TC y el desarrollo de infección grave.....	162
Tabla 46: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 90 días post-TC y el desarrollo de infección grave	163
Tabla 47: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 90 días post-TC y el desarrollo de infección grave.....	163
Tabla 48: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 90 días post-TC y el desarrollo de infección grave.....	163
Tabla 49: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los biomarcadores de riesgo de infección grave en el punto pre-TC.....	165
Tabla 50: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los biomarcadores de riesgo de infección grave a los 7 días post-TC.....	165
Tabla 51: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los biomarcadores de riesgo de infección grave a los 30 días post-TC.....	166
Tabla 52: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los biomarcadores de riesgo de infección grave a los 90 días post-TC.....	166
Tabla 53: Asociación entre niveles elevados* de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de rechazo agudo del injerto.	170
Tabla 54: Asociación entre niveles bajos* de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de rechazo agudo del injerto.	170
Tabla 55: Asociación entre niveles de fármacos inmunosupresores en función del rango de efectividad y seguridad en el entorno del TC y el desarrollo de rechazo agudo del injerto.....	171
Tabla 56: Asociación de la variabilidad a lo largo del tiempo de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de un evento de rechazo agudo del injerto	171
Tabla 57: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos en el punto pre-TC y el desarrollo de rechazo del injerto	172

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 58: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral en el punto pre-TC y el desarrollo de rechazo del injerto	172
Tabla 59: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular en el punto pre-TC y el desarrollo de rechazo del injerto	172
Tabla 60: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 7 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto	173
Tabla 61: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 7 días post-TC y el desarrollo de rechazo grave del injerto.	173
Tabla 62: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 7 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.	173
Tabla 63: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 30 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.....	174
Tabla 64: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 30 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.	174
Tabla 65: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 30 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.	174
Tabla 66: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 90 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.....	175
Tabla 67: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 90 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.	175
Tabla 68: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 90 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.	175
Tabla 69: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los biomarcadores de riesgo de rechazo agudo en el punto pre-TC.....	176
Tabla 70: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los biomarcadores de riesgo de rechazo agudo a los 7 días post-TC.....	176
Tabla 71: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los biomarcadores de riesgo de rechazo agudo a los 30 días post-TC.....	176
Tabla 72: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los biomarcadores de riesgo de rechazo agudo a los 90 días post-TC.....	177
Tabla 73: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores elevados como factor de riesgo de desarrollo de infección grave.....	182
Tabla 74: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores bajos como factor de riesgo de desarrollo de infección grave.	183
Tabla 75: Análisis univariante de los niveles de fármacos anticalcineurínicos elevados en al menos dos mediciones en los 90 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave.....	183

Tabla 76: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos en el punto pre-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.....	183
Tabla 77: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral en el punto Pre-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.	184
Tabla 78: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular en el punto pre-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.	184
Tabla 79: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 7 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.....	184
Tabla 80: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 7 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.....	185
Tabla 81: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 7 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.....	185
Tabla 82: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 30 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.....	186
Tabla 83: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 30 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.....	186
Tabla 84: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 30 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave.	187
Tabla 85: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 90 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.....	187
Tabla 86: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 90 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave	188
Tabla 87: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 90 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.....	188
Tabla 88: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos en el punto pre-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo del injerto.	192
Tabla 89: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral en el punto pre-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo del injerto.....	193
Tabla 90: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular en el punto pre-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo del injerto.....	193
Tabla 91: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 7 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo del injerto.	193
Tabla 92: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 7 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo del injerto.....	194
Tabla 93: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 7 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo del injerto.....	194
Tabla 94: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 30 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.	194

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 95: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 30 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.....	195
Tabla 96: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 30 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.....	195
Tabla 97: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 90 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto	195
Tabla 98: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 90 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.....	196
Tabla 99: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 90 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.....	196
Tabla 100: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores elevados como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.	196
Tabla 101: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores bajos como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.....	197
Tabla 102: Análisis univariante de los niveles de fármacos anticalcineurínicos elevados en al menos dos mediciones en los 90 días Post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.....	197
Tabla 103: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores en función del rango de efectividad y seguridad en el entorno del TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.	197
Tabla 104: Análisis univariante de la variabilidad a lo largo del tiempo del nivel de fármacos inmunosupresores como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.....	197
Tabla 105: Factores clínicos de riesgo de desarrollo de infecciones tras el trasplante. Regresión Logística.....	198
Tabla 106: Regresión logística multivariante para identificar biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de infección grave a los 7 días post-TC.....	199
Tabla 107: Regresión logística multivariante para identificar biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de infección grave a los 30 días post-TC.....	199
Tabla 108: Regresión logística multivariante para identificar biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de infección grave a los 90 días post-TC.....	200
Tabla 109: Factores clínicos de riesgo de desarrollo de infecciones tras el trasplante. Regresión Logística.....	200
Tabla 110: Regresión logística multivariante para identificar biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de rechazo del injerto a los 7 días post-TC.....	201
Tabla 111: Asociación entre variables demográficas y clínicas y el desarrollo de rechazo agudo del injerto en pacientes sometidos a trasplante cardiaco.	209

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1: Actividad de trasplante cardiaco en España. 1989-2015. Números absolutos y trasplantes por millón de población. Memoria actividad ONT 2015.	11
Figura 2: Número de Trasplantes cardiacos según registro de la sociedad internacional de trasplantes de pulmón y corazón (ISHLT).....	13
Figura 3: Actividad de trasplante cardiaco pmp en diferentes países. 2008-2015. Memoria actividad ONT 2015.	14
Figura 4: Distribución por grupos de edad de los pacientes trasplantados cardíacos. España 2015. Memoria actividad ONT 2015.	15
Figura 5: Diagnostico de los pacientes trasplantados cardiacos en 2015. Memoria actividad ONT 2015.....	15
Figura 6: Curva de supervivencia general post-TC.	16
Figura 7: Causas de muerte según tiempo desde el trasplante.....	17
Figura 8: Fase de inducción en el trasplante cardiaco según ISHLT.....	19
Figura 9: Señales de activación de células T	21
Figura 10: Mecanismo de acción de fármacos inmunosupresores.....	22
Figura 11: Mecanismo de acción de micofenolato.	24
Figura 12: Mecanismo de acción ciclosporina y tacrolimus.....	28
Figura 13: Mecanismo de acción inmunosupresora glucocorticoides GRE.	35
Figura 14: Mecanismo nefrotóxico de los inhibidores de la calcineurina.....	46
Figura 15: Estructura familia de las Galectinas.	55
Figura 16: Estructura y función de CD31.....	62
Figura 17: Esquema señales de dispersión en citometría de flujo.....	79
Figura 18: Componentes de citómetro de flujo y separador de células.	81
Figura 19: Relación entre la señal y la concentración del analito en un inmunoensayo competitivo.	84
Figura 20: Relación entre la señal y la concentración del analito en un inmunoensayo no competitivo.	85
Figura 21: EIA homogeneo.	86
Figura 22: Relación entre la emisión de luz polarizada y la concentración del analito mediante inmunoensayo competitivo. FPIA.	89
Figura 23: Desarrollo de la técnica de inmunoensayo de luz polarizada.....	90
Figura 24: Desarrollo de la técnica de inmunoensayo de micropartículas.....	92

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 25: Organización óptica de la Nefelometría y turbidimetría.	96
Figura 26: Espectro Ultravioleta-Visible.....	97
Figura 27: Principio Coulter para el recuento de células sanguíneas.	106
Figura 28: Análisis de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo multiparamétrica.....	108
Figura 29: Cinética de las variables hematológicas, leucocitos y subpoblaciones leucocitarias.	128
Figura 30: Cinética de las variables de inmunidad celular en TC.	129
Figura 31: Cinética de las variables de inmunidad celular en TC.	130
Figura 32: Cinética de las variables de inmunidad humoral en TC.	131
Figura 33: Cinética de las variables de inmunidad humoral en TC.	132
Figura 34: Cinética de las variables bioquímicas en TC.....	133
Figura 35: Cinética de las variables bioquímicas y niveles de fármacos inmunosupresores en TC.	134
Figura 36: Asociación entre nuevos biomarcadores y rechazo agudo del injerto.	210
Figura 37: Asociación entre nuevos biomarcadores y rechazo agudo del injerto.	210

RESUMEN

Introducción: Las infecciones y el rechazo son las complicaciones más frecuentes después de un trasplante cardiaco. En el periodo post-trasplante es necesario mantener un elevado nivel de inmunosupresión para evitar eventos de rechazo, minimizando el riesgo del desarrollo de infección. La escasez de trabajos que estudien el impacto de la inmunosupresión sobre los biomarcadores de inmunocompetencia y que valoren sus consecuencias en la evolución clínica del trasplante, justifica la necesidad de ampliar el conocimiento de las variaciones de componentes de la respuesta inmune y el impacto negativo que ejerce sobre ellos la inmunosupresión.

Hipótesis: Las hipótesis de este estudio es la existencia de una correlación entre los niveles de fármacos inmunosupresores en sangre y los valores de distintos parámetros bioquímicos, inmunológicos y celulares que evalúan el estado de inmunocompetencia del trasplantado cardiaco, y como la alteración de estos parámetros se asocia con el desarrollo de infección o de rechazo.

Objetivos: Nuestro objetivo es describir la cinética y variabilidad de los niveles de fármacos inmunosupresores y parámetros inmunológicos y bioquímicos, determinar la existencia de correlación entre los fármacos con los niveles de los distintos parámetros que evalúan la respuesta celular y humoral del paciente trasplantado desde el inicio del trasplante hasta el año después del trasplante cardiaco. Además, se evalúa la asociación existente entre los niveles de fármacos y otros parámetros bioquímicos e inmunológicos con el desarrollo de infecciones y rechazo del injerto. Se evalúan biomarcadores y escalas (*Scores*) mediante el análisis estadístico de las variables

RESUMEN

bioquímicas e inmunológicas más relevantes para la identificación de los pacientes con un mayor riesgo de sufrir las complicaciones clínicas del trasplante antes mencionadas.

Materiales y métodos: Se estudió de forma prospectiva una cohorte de 109 pacientes con cardiopatía grave, los cuales fueron sometidos a trasplante en la Unidad de Trasplante Cardíaco del H.G.U.G.M (Hospital General Universitario Gregorio Marañón), de Madrid. Los estudios inmunológicos y bioquímicos, se realizaron sistemáticamente en distintos tiempos, en la entrada en lista de espera de trasplante o en el periodo inmediatamente antes del trasplante, a los 7 días de realizado el trasplante, a los 30 días, 90 días, 180 días y al año post trasplante.

Los parámetros bioquímicos se determinaron en suero sanguíneo y fueron proteínas totales, albúmina, urea, creatinina, bilirrubina total, GGT, GOT y GPT y proteína C reactiva mediante técnicas espectrofotométricas e inmunoturbidimétricas. Los niveles de ciclosporina A, tacrolimus y micofenolato se determinaron en sangre total y plasma mediante inmunoensayos específicos. Los niveles de los parámetros séricos de inmunocompetencia se determinaron mediante nefelometría, siendo estos las inmunoglobulinas G y sus subclases, Inmunoglobulina A y M, el factor del complemento C3, C4 y factor B de properdina. Las células sanguíneas nucleadas: leucocitos, linfocitos y neutrófilos se determinaron mediante técnicas de citometría de flujo y cámara de recuento. Las subpoblaciones linfocitarias TBNK se determinaron mediante citometría de flujo multiparamétrica con marcaje de moléculas de superficie mediante anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos.

Se enviaron muestras de suero congeladas al laboratorio de la Dra. Sarwal en la Universidad de Stanford, para determinar mediante ensayos de ELISA la presencia de los siguientes analitos: Fetuína-B humana, CXCL4, CXCL9 humano, NAP2 humano,

galectina-3, apolipoproteína A1, CD14, CD31 y CD44 humano y su relación con el rechazo.

Los análisis estadísticos se efectuaron con el programa informático SPSS versión 22.0 para Windows (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, Illinois, USA)

Resultados: El análisis cinético descrito por los fármacos inmunosupresores a lo largo del tiempo se ajusta de forma adecuada a las recomendaciones actuales en el entorno del trasplante cardiaco, determinando si los pacientes están en rango terapéutico o no a lo largo del estudio. La cinética mostrada por las proteínas totales y la albúmina no correlaciona en los tiempos de estudio con la cinética descrita por la IgG y el factor B de properdina. No se encontró correlación entre los niveles de fármacos inmunosupresores inhibidores de calcineurina ni micofenolato con el resto de parámetros estudiados utilizados en la evaluación del estado de inmunocompetencia de la cohorte analizada. Leucocitosis, neutrofilia y linfopenia se asocian con el desarrollo de infección durante los tres primeros meses posteriores al trasplante. La hipocomplementemia C4 y el descenso de los niveles de factor B de properdina durante los días próximos al trasplante junto con una hipogammaglobulinemia IgA durante los tres meses siguientes al trasplante, se revelaron como potentes biomarcadores de infección. El aumento de la variabilidad en más de un 34% de los niveles de FK a lo largo del año posterior al trasplante fue asociado con un aumento de las probabilidades de infección grave.

En este trabajo se describen distintas escalas de predisposición a la infección desde el punto previo al trasplante hasta los 90 días posteriores al mismo utilizando una combinación de los parámetros que se alteraban en estos puntos del estudio,

RESUMEN

obteniendo aumentos de la probabilidad de infección que oscilaban entre las 4 y las 7 veces cuando se cumplían las condiciones de la escala. En un subestudio de nuevos biomarcadores, se identificó que niveles elevados de galectina 3 podrían ser un factor de riesgo de rechazo.

Conclusiones: En esta tesis doctoral se describen la cinética y la variabilidad de los niveles sanguíneos de inmunosupresores, los parámetros bioquímicos, inmunológicos y hematológicos que valoran el estado de inmunocompetencia de una cohorte, desde el momento pre-trasplante y el año posterior al mismo. No se observaron correlaciones significativas entre niveles de fármacos y el resto de parámetros analizados que vinculasen el estado inmunológico de los pacientes con la evolución clínica de los mismos. Encontramos distintos factores de riesgo bioquímicos e inmunológicos entre los parámetros estudiados en asociación con distintas complicaciones clínicas del trasplante. Se han identificado posibles biomarcadores de uso en la rutina y se proponen escalas que podrían ser útiles en la evaluación de los pacientes con un mayor riesgo de sufrir eventos de infección grave o rechazo del injerto tras el trasplante cardiaco.

En esta tesis doctoral se presentan por primera vez datos que identifican a la molécula galectina -3 en sangre periférica como un posible marcador de rechazo en trasplante cardiaco.

Summary

Introduction: Infections and rejection are the most common adverse outcomes following a heart transplant. A high level of immunosuppression is necessary in the period after transplant in order to avoid rejection events while keeping infections as low as possible. The scarcity of studies about the impact of immunosuppression on immunocompetence biomarkers that simultaneously assess the consequences on the clinical evolution of the transplant, justifies the need to expand the knowledge of the different components of the immune response, their variations and the negative impact that immunosuppression exerts on them.

Hypothesis: We hypothesize the existence of a correlation between blood levels of immunosuppressive drugs and the values of the different biochemical, immune, and cellular parameters that evaluate the immunocompetence state of the patient undergoing a heart transplant, and likewise how changes in these parameters are associated with infections and rejection development.

Objective: Our objective is to describe the kinetics and variability of the immunosuppressive drugs and immune and biochemical parameters, determine the existence of correlation between these drugs and the different parameters that assess the transplanted patient's cellular and humoral response up to one year after transplantation. We also evaluate the association of drugs' levels and other biochemical and immune parameters with the development of infections and rejection. The Biomarkers and Clinical Scores are evaluated by means of statistical analysis of the most relevant biochemical and immune variables for the identification

SUMMARY

of the patients at greatest risk of the above mentioned clinical transplant complications.

Materials and methods: We studied a cohort of 109 patients with severe myocardial pathology, who underwent heart transplantation in the Heart Transplant Unit of H.G.U.G.M in Madrid. The immune and biochemical analysis were carried out systematically at different times: when the patient entered the transplant waiting list or in the period immediately before the transplant, and 7, 30, 90, 180 days, and a year after the transplant.

The biochemical parameters were determined in blood serum and included: total proteins, albumin, urea, creatinine, total bilirubin, GGT, AST and ALT, and C-reactive protein using spectrophotometric and immunoturbidimetric techniques. The levels of Cyclosporine A, tacrolimus, and mycophenolate were determined in whole blood and plasma by specific immunoassays. The levels of serum parameters of immunocompetence were determined by nephelometry, specifically the immunoglobulins G and subtypes, immunoglobulin A and M, complement factors C3, C4 and properdin factor B. The nucleated blood cells: leukocytes, lymphocytes and neutrophils were determined by flow cytometry and counting chamber techniques. The TBNK lymphocyte subpopulations were determined by multiparametric flow cytometry with surface molecule labelled by fluorochrome conjugation to monoclonal antibodies.

Frozen serum samples were sent to Dr. Sarwal's laboratory at Stanford University to determine by ELISA assays the presence of the following analytes: Human Fetuin-B, CXCL4, human CXCL9, human NAP2, galectin-3, apolipoprotein A1, CD14, CD31 and human CD44 and their relationship to rejection.

The statistical analysis were carried out with the version 22.0 SPSS program for Windows (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, Illinois, USA)

Results: The time course of the kinetic analysis described for the immunosuppressive drugs, adapts adequately to the current recommendations in the heart transplant setting, determining whether or not our patients are in the therapeutic range during the time of study. The kinetics shown by the total proteins and albumin does not correlate in the studied times with the kinetics described by the IgG and properdine B factor. We have not found correlation between the levels of the calcineurin inhibitors and mycophenolate immunosuppressive drugs with the rest of the studied parameters used in the immunocompetence state assessment of the analyzed cohort. Leucocytosis, neutrophilia and lymphopenia are associated with development of infection during the first three months after the transplant. C4 hypocomplementemia and decreased levels of properdine B factor during the days following the transplant together with hypogammaglobulinemia IgA during the three months after the transplant are ascertained as powerful infection biomarkers. We have observed the association of an increase of more than 34% in the FK levels during the year after the transplant with an increase of the risk of severe infection. In this work we describe different infection predisposition scales ranging from the days prior to transplantation until 90 days after, using a combination of parameters that were altered at those points in the study, obtaining increases in the probability of infection that oscillated between 4 and 7 times when the conditions of the scale were fulfilled. In a subset of new biomarkers, it was identified that elevated levels of galectin 3 could be a risk factor for rejection.

Conclusions: This doctoral thesis describes the kinetics and variability of blood levels of immunosuppressant, the biochemical, immune and hematological parameters that

SUMMARY

evaluate the immunocompetence state of our cohort, from the pre-transplant period until one year post-transplantation. There were no significant correlations between drug levels and the other parameters analyzed that could link the immune state of the patients with their clinical evolution. We found different biochemical and immunological risk factors between the analysed parameters in association with different clinical complications of transplants. We have identified biomarkers that could be used in a clinical setting and also clinical scales that could be useful in the assessment of those patients in greater risk of developing serious infection and rejection events after heart transplantation.

This is the first time that it has been demonstrated that circulating serum levels of the protein Galectin-3 could be proposed as a novel biomarker for rejection in heart transplantation.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 ACTIVIDAD DEL TRASPLANTE CARDIACO

El trasplante cardiaco (TC) continúa siendo una terapia consolidada y de uso rutinario en muchos de nuestros hospitales. Desde el inicio de este tipo de actividad en el año 1984 hasta la actualidad, han sido realizados 7.588 trasplantes en nuestro país, durante el año 2015 se han realizado 299 TC, lo que supone una actividad de un 6,4 trasplantes cardiacos por millón de población (p.m.p).

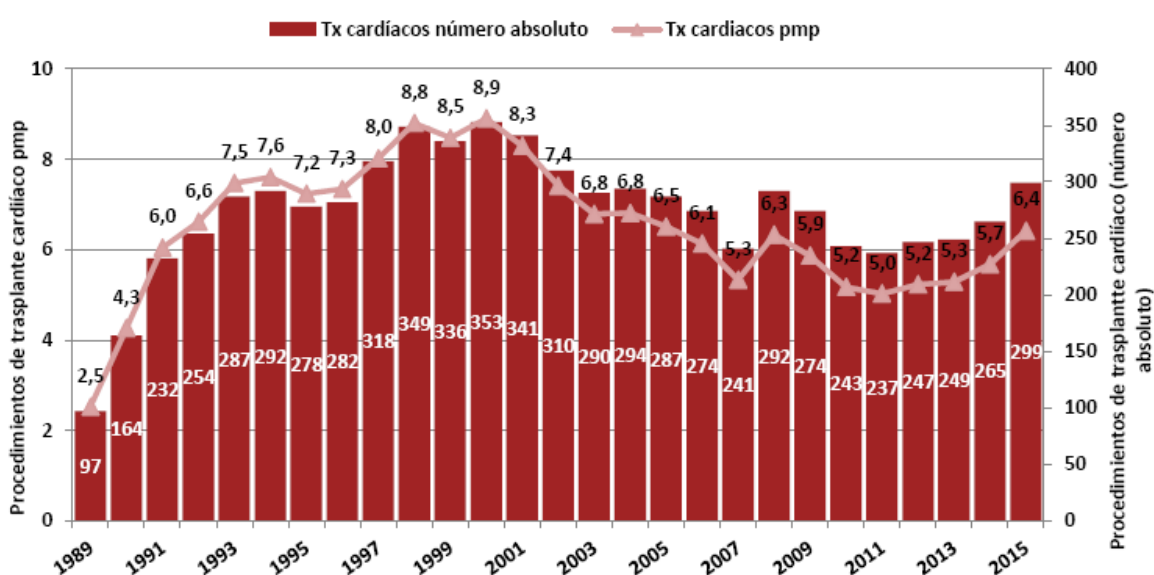


Figura 1: Actividad de trasplante cardiaco en España. 1989-2015. Números absolutos y trasplantes por millón de población (pmp). Memoria actividad ONT 2015.

La actividad de este tipo de procedimientos se mantiene estable en los últimos cuatro años, tras experimentar un descenso progresivo desde el máximo alcanzado en el año 2000, con 8,9 p.m.p. Este descenso es atribuido posiblemente a la disminución en el número de corazones disponibles de características idóneas, debido al cambio que los fenómenos epidemiológicos en nuestro entorno están determinando el perfil del donante de órganos.

INTRODUCCIÓN

Cabe destacar las diferencias entre centros y comunidades autónomas como muestra la Tabla 1, la actividad de trasplante cardiaco por comunidad y hospital entre los años 2012 y 2015.

Tabla 1: Actividad de trasplante cardiaco por Comunidad Autónoma y hospital. Años 2012 a 2015. ()
Trasplantes infantiles < 16 años. Memoria actividad ONT 2015.

Relación de Trasplantes Cardiacos									
CC.AA.	Hospital	2012		2013		2014		2015	
		Total	(Inf)	Total	(Inf)	Total	(Inf)	Total	(Inf)
Andalucía	H. Reina Sofia	15		12	(2)	12	(1)	24	(4)
	H. Virgen del Rocío	17		15		22		17	
Aragón	H. Miguel Servet	11		8		10		7	
Asturias	H. Central de Asturias	16		14		12		12	
Cantabria	H. M. de Valdecilla	20		25		27		21	(1)
Castilla y León	H. Clínico .Valladolid	5		4		10		10	
Cataluña	H. de la Sta Creu i St. Pau	13		14		18		18	
	H.de Bellvitge	18		14		18		24	
	H. Clínic i Provincial	18		19		18		17	
	H. Infantil Vall d'Hebrón	3	(3)	5	(5)	2	(2)	7	(7)
C. Valenciana	H. La Fé	26		22		23		27	(1)
Galicia	H. Universitario de A Coruña	25	(2)	20	(3)	20		25	
Madrid	H. Gregorio Marañón	17	(6)	24	(14)	23	(6)	22	(7)
	H. Puerta de Hierro	20		16		19		27	
	H. Doce de Octubre	15		16		15		21	
	H. Infantil La Paz	2	(2)	6	(6)	3	(2)	3	(2)
	H. Virgen de la Arrixaca	1		7		9		11	
Navarra	Clínica Univ. Navarra	5		8		4		6	
Total del Estado		247	(13)	249	(30)	265	(11)	299	(22)

Desde 1982 hasta la actualidad se han realizado 112.521 procedimientos en todo el mundo, según datos de la Sociedad Internacional de Trasplante Cardiaco y Pulmonar (ISHLT), convirtiéndose en una opción terapéutica muy consolidada **(1)**.

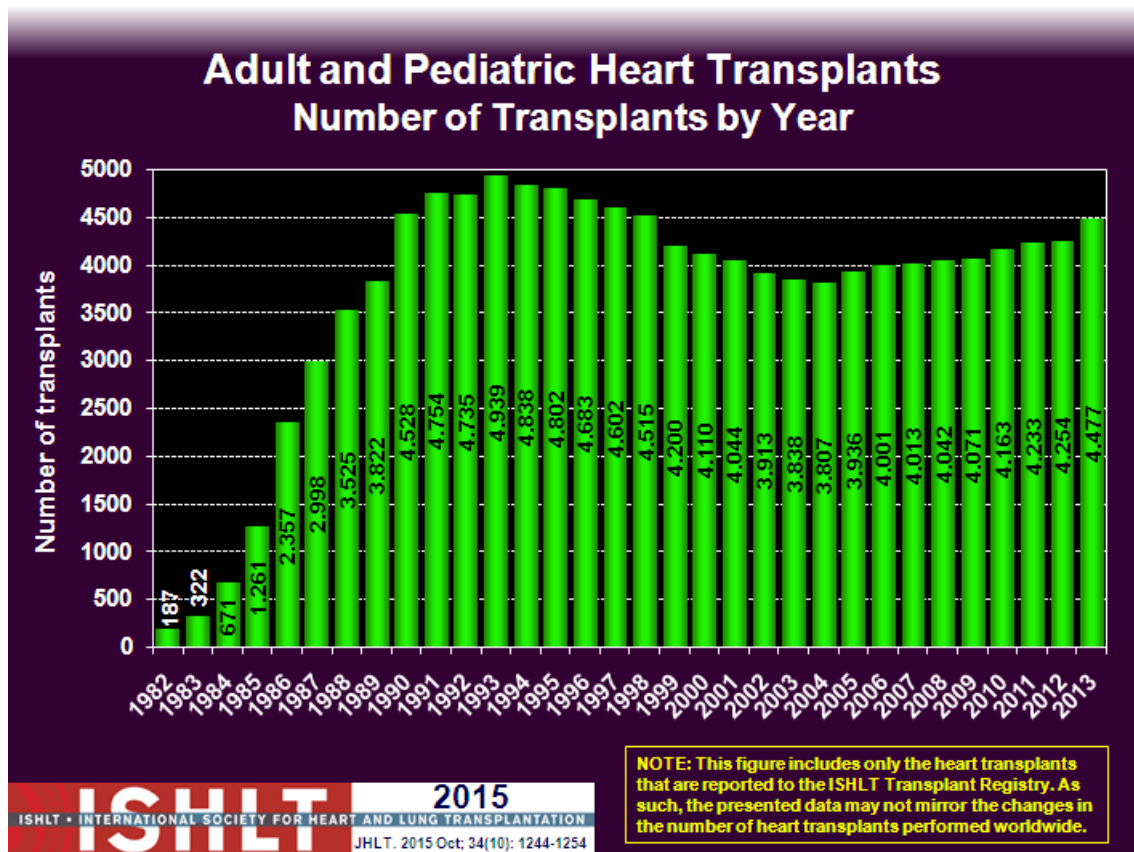


Figura 2: Número de Trasplantes cardiacos según registro de la sociedad internacional de trasplantes de pulmón y corazón (ISHLT).

De acuerdo con los datos emitidos por la GODT (Global Observatory on Donation and Transplantation) la actividad global en TC es de 5970 en 2014, con 594 procedimientos en países latinoamericanos, 2146 en la comunidad Europea y 3230 en el resto de países. Así pues España sigue encontrándose en una situación privilegiada a nivel mundial en lo que se refiere a la realización de este tipo de intervenciones.

INTRODUCCIÓN

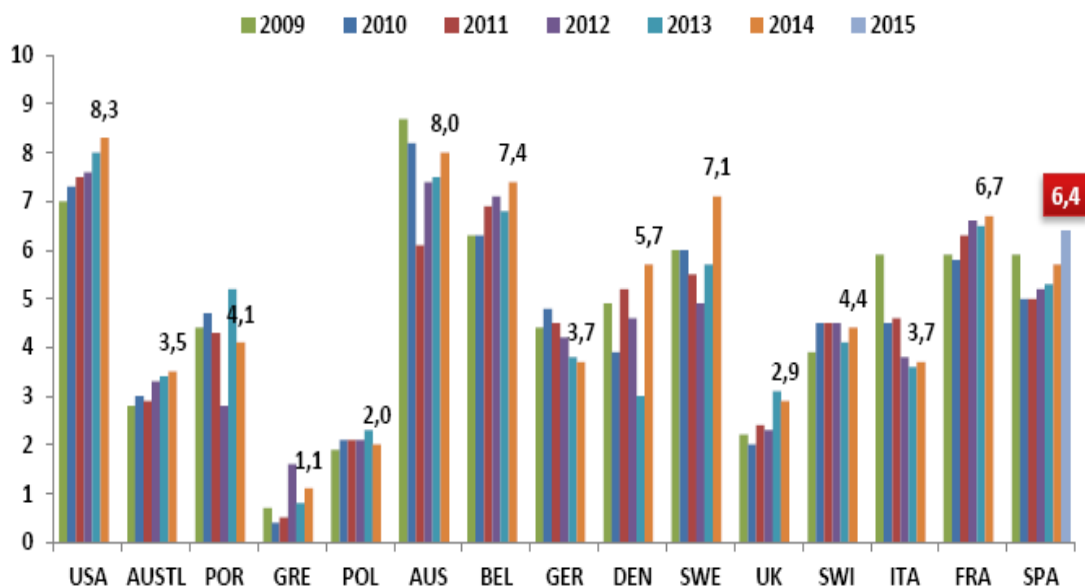


Figura 3: Actividad de trasplante cardiaco pmp en diferentes países. 2008-2015. Memoria actividad ONT 2015.

Según el documento que el Registro Español de Trasplante Cardiaco viene publicando anualmente desde 1991, que analiza las características clínicas y quirúrgicas así como los resultados globales de los procedimientos de TC en nuestro país, actualmente reportan datos 18 centros y en 2014 se realizaron 265 procedimientos siendo un 4,5% en pacientes pediátricos (<16 años) **(2)**. Los datos de actividad del año 2015 emitidos por la ONT (Organización Nacional de Trasplante), reportan un aumento de actividad en trasplante cardiaco de un 13% respecto al año anterior, contabilizando 299 procedimientos, 21 de ellos pediátricos, un 6,7%.

En la Figura 4 se representa la distribución por grupos de edad de los trasplantes realizados en 2015.

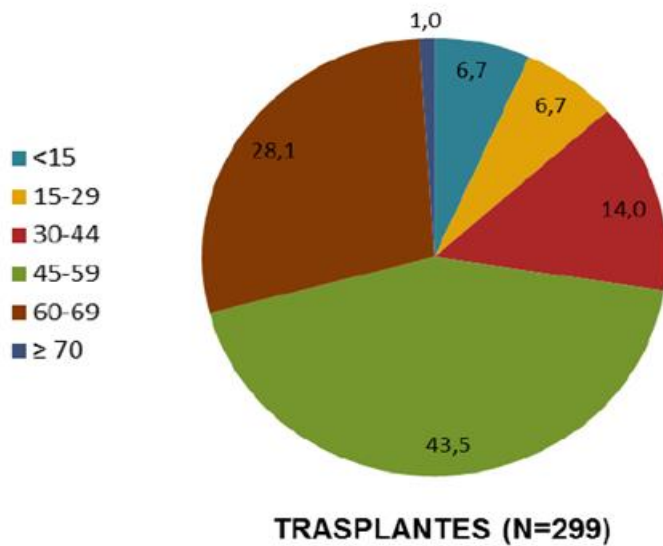


Figura 4: Distribución por grupos de edad (%) de los pacientes trasplantados cardíacos. España 2015. Memoria actividad ONT 2015.

Respecto a la patología por la que se estableció la indicación del TC, el diagnóstico principal mayoritario fue la miocardiopatía isquémica (38,1%), cardiopatía dilatada no isquémica (37,8%) y otras etiologías (24,1%). En la Figura 5 se representa la distribución por indicación de los TC realizados en 2015.

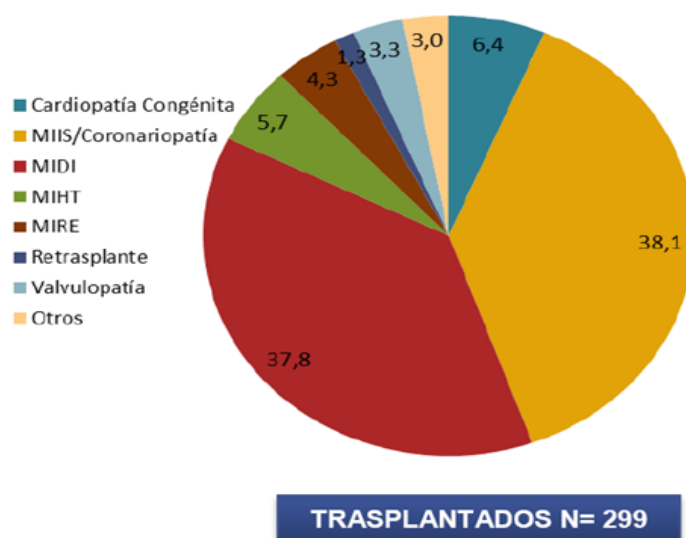


Figura 5: Diagnóstico de los pacientes trasplantados cardíacos en 2015. Memoria actividad ONT 2015.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia en el momento actual es muy elevada, con una mortalidad promedio de 2-3% año una vez superado el primer año post-trasplante cardiaco (post-TC), con una mediana de supervivencia de 10,9 años. La supervivencia ha permanecido estable desde 1995, siendo a 1, 5, 10 y 15 años es del 76, el 65, el 52 y el 38% respectivamente (2).

En la Figura 6, se muestra la gráfica de supervivencia post-trasplante.

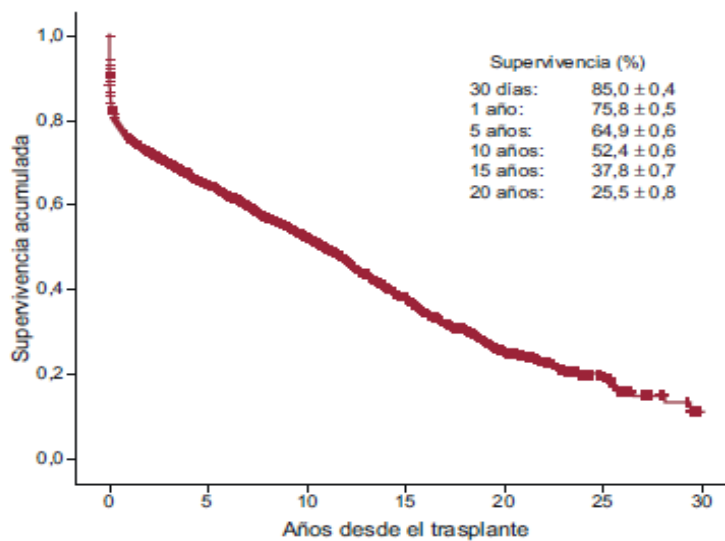


Figura 6: Curva de supervivencia general post-TC (2)

Respecto a las causas de fallecimiento, la más frecuente es la enfermedad vascular del injerto/muerte súbita (19,7%), seguida de las infecciones (16,5%), el fallo primario del injerto (14,3%) y las neoplasias (12,5%). Las causas de fallecimiento cambian según el tiempo post-trasplante que se considere, en el primer mes post-trasplante casi el 50% los fallecimientos se producen por fallo primario del injerto, después del primer mes y hasta cumplir el primer año, las principales causas son el rechazo agudo en un 15,6% y sobre todo las infecciones en un 35,4%. Después del primer año, la causa más

frecuente es la enfermedad vascular del injerto (29,5%) seguida de patología oncológica (21,3%) (2).

En la figura 7 se muestran las causas de muerte más frecuentes según el tipo transcurrido desde el trasplante.

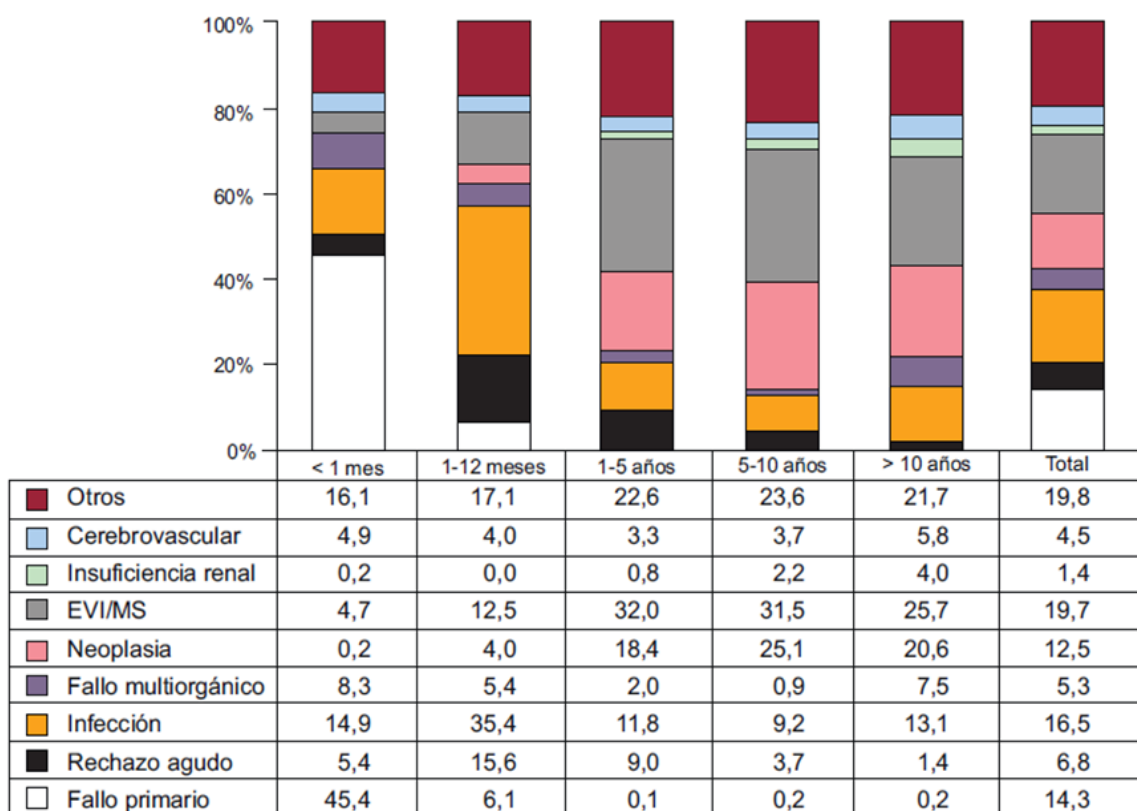


Figura 7: Causas de muerte según tiempo desde el trasplante. EVI: enfermedad vascular del injerto; MS: muerte súbita (2)

Durante 2015 se realizaron 22 TC en el Hospital Gregorio Marañón, de las cuales 7 de ellas fueron pediátricas (menores de 16 años).

1.2 INMUNOSUPRESORES

Los trasplantes de órganos requieren la utilización de fármacos inmunosupresores capaces de controlar la respuesta inmunitaria desencadenada por la presencia de antígenos ajenos al propio organismo **(3)**.

El diseño de las drogas inmunosupresoras está basado en el conocimiento de los caminos moleculares que llevan a la activación de estas células identificando señales coestimuladoras y sus receptores **(4)**. El desarrollo de este tipo de fármacos ha posibilitado el control de la respuesta inmunitaria desencadenada tras la exposición del injerto ante el organismo receptor. Los fármacos inmunosupresores actúan inhibiendo los mecanismos de activación de linfocitos T, actuando en distintos niveles **(5)**.

El objetivo de la terapia inmunosupresora es lograr un máximo de supervivencia del órgano trasplantado, evitando o en todo caso disminuyendo al máximo los procesos infecciosos y neoplásicos, que son efectos colaterales de este tipo de tratamientos **(6)**.

La terapia utilizada en el trasplante de órganos consta de dos fases principales:

Fase de inducción:

De administración intravenosa, se utiliza en el momento del trasplante para prevenir el rechazo inicial, es un régimen muy potente y de mantenimiento en el tiempo limitado por su gran efecto tóxico.

Se inicia con los fármacos que se utilizarán en la fase de mantenimiento, los corticoides se utilizan a dosis más altas en los primeros días sucesivos al trasplante, para

posteriormente ir reduciendo la dosis de forma progresiva hasta alcanzar la dosis de mantenimiento.

En cuanto a los anticalcineurínicos, debido a su efecto potencialmente nefrotóxico, se han buscado distintas estrategias para poder retrasar el inicio de su introducción sin aumentar la posibilidad de rechazo agudo, administrando anticuerpos antilinfocitarios durante la primera semana, pasando a formar parte del tratamiento de inducción, anticuerpos policlonales como las globulinas antilinfocíticas y antitimocíticas (ALG y ATG) o monoclonales como los anti-CD3 (OKT3) o los anti-CD25 como daclizumab o basiliximab que son antagonistas del receptor de interleucina 2 (IL-2R).

En el último informe de la ISHLT, comprobamos que aproximadamente el 50% de los pacientes reciben terapia de inducción, un 20% con anticuerpos policlonales y un 30% con anticuerpos monoclonales anti-IL-2R (7).

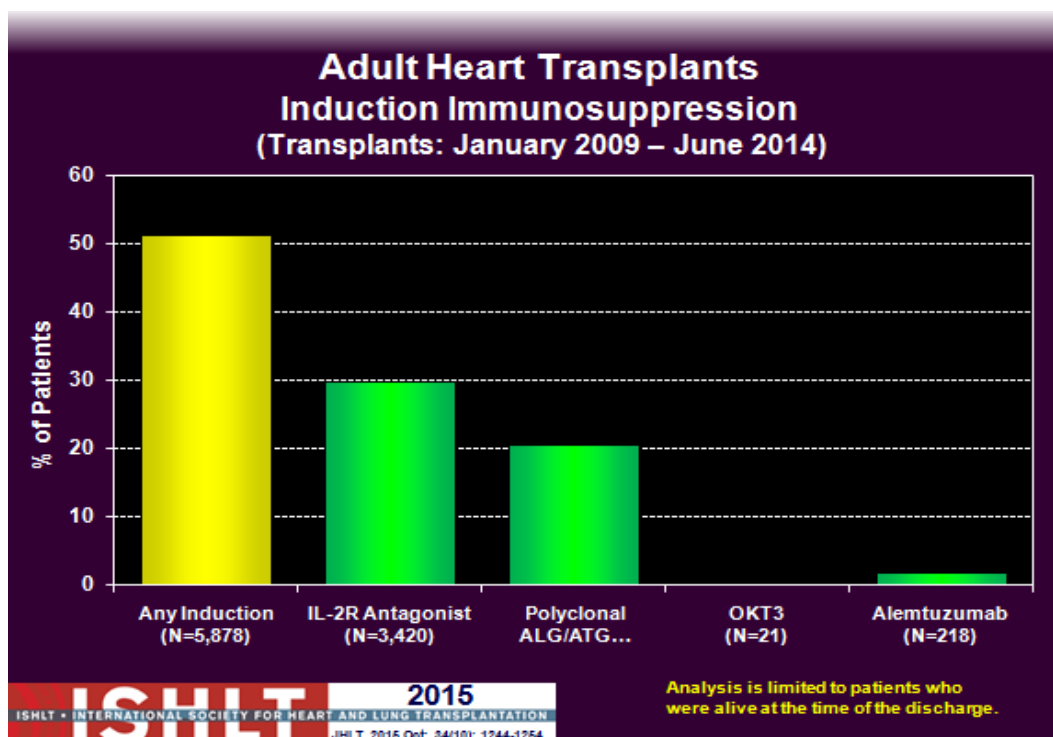


Figura 8: Fase de inducción en el trasplante cardiaco según ISHLT.

INTRODUCCIÓN

Fase de mantenimiento:

Lo más habitual es la terapia triple constituida por anticalcineurínico como la ciclosporina A (CsA) o el tacrolimus (FK), un antiproliferativo como el micofenolato (MMF) y corticoides. Será de administración oral y con muchos menos efectos secundarios presentes en la fase de inducción, permitiendo ser pautado de forma más regular y prolongada en el tiempo.

En la eventualidad de un evento de rechazo del injerto, hay una tercera fase denominada de rescate, similar a la fase de inducción **(8)**.

En general, la respuesta inmunitaria depende del reconocimiento del antígeno, por los linfocitos T. La respuesta inmune tras la exposición del huésped a los antígenos de histocompatibilidad presentes en el injerto, sigue un modelo de activación en el que se distinguen tres señales para desencadenar la activación y proliferación de células T **(9)**.

La señal 1 es provocada por la interacción de los complejos de histocompatibilidad en la superficie de las células dendríticas con el receptor CD3 de las células T CD4 (cooperadoras). Las propias células dendríticas promueven la señal 2 mediante la expresión de las moléculas CD80 y CD86, uniéndose al receptor CD28 en la célula T. Ambas señales activan las vías de transducción, calcio-calcineurina, NFkB (factor nuclear kB) y MAPs quinasas, que a su vez activan la transcripción génica de interleucina 2 (IL-2), CD154 y CD25. La unión de las IL-2 y IL-15 a su receptor CD25 sobre la superficie de la membrana de las células T, aportan la señal 3 , provocando la proliferación celular, la cual requiere de síntesis de purinas y pirimidinas, generando así un gran número de células T efectoras **(9,10)**.

La mayoría de los fármacos inmunosupresores, interfieren con los linfocitos T, elementos principales en la regulación de la respuesta inmunitaria.

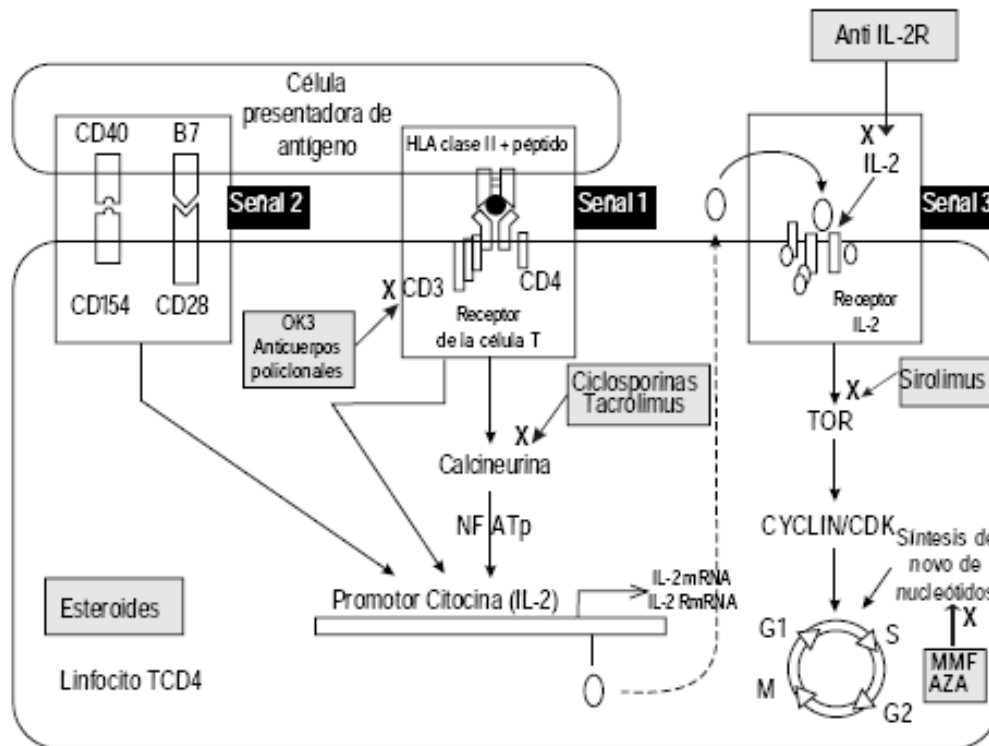


Figura 9: Señales de activación de células T CD4. Los fármacos inmunosupresores en uso clínico están en el cuadro de fondo gris y la X indica el lugar de acción correspondiente (9)

En función del mecanismo de acción, los inmunosupresores pueden dividirse en los siguientes grupos: **(3,11)**

1. Fármacos que interfieren en la transmisión del estímulo al núcleo celular, son fármacos que se fijan a inmunofilinas o anticalcineurínicos como la CsA y FK, bloqueando la síntesis del factor de transcripción del NFAT (Factor nuclear de células T activadas) que regula la síntesis de RNAm de IL2, entre otros.

INTRODUCCIÓN

2. Fármacos que interfieren en la división celular, como la azatioprina y el MMF, su mecanismo de acción es antiproliferativo inhibiendo la síntesis de nucleótidos, impidiendo así la síntesis de ADN e inhibiendo la proliferación celular.

3. Fármacos que interfieren sobre la acción del antígeno en el receptor de linfocitos T, como son los anticuerpos monoclonales, los cuales van dirigidos frente a moléculas específicas como OKT3 o anti-CD25 como daclizumab o basiliximab, o anticuerpos policlonales como ALG y ATG impidiendo la acción de los linfocitos T, bien destruyéndolos o bloqueando sus receptores.

4. Corticosteroides, como la prednisona o metil prednisolona.

5. Antiproliferativos o antagonistas del receptor IL2 o mTOR.

La figura número 10 muestra de forma esquemática los distintos mecanismos de acción de los fármacos inmunosupresores más utilizados en el entorno del TC.

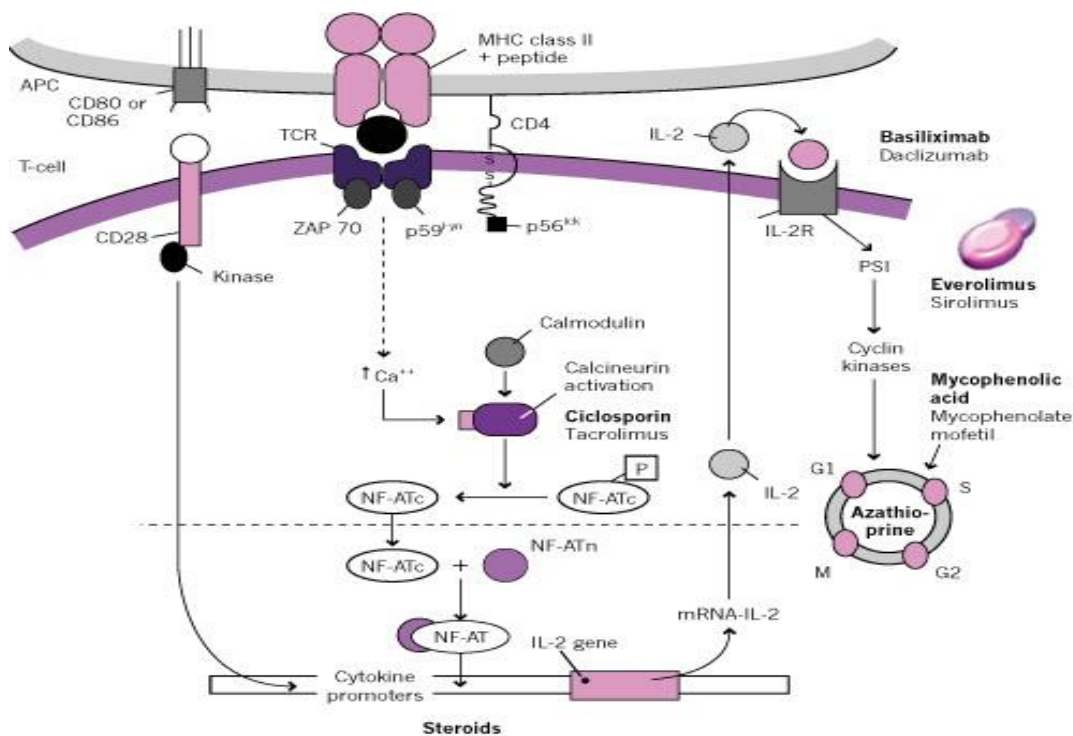


Figura 10: Mecanismo de acción de fármacos inmunosupresores. Fuente gráfica: Novartis pharma schweiz. Transplantation-schweiz

1.2.1 MICOFENOLATO

El MMF es un derivado semisintético de una especie de hongo de *Penicillium*, y su metabolito activo es el ácido micofenólico, inhibidor selectivo, no competitivo y reversible de la iosina 5 fosfato deshidrogenasa (IMPDH), enzima necesaria para la síntesis de purinas por la vía de Novo, indispensables para la formación de células B y T activadas. Otros tipos celulares satisfacen sus demandas de purinas a través de la vía alternativa, como los linfocitos B y T no poseen los mecanismos alternativos para reutilizar las purinas, ejerciendo un efecto citostático sobre los linfocitos mayor que sobre otro tipo de células, con lo cual, el ácido micofenólico es relativamente selectivo inhibiendo la proliferación de linfocitos T y B **(9)**.

Hay dos isoformas de la IMPDH, la I predominante en célula en reposo y la IMPDH II, enzima inducible y que se expresa predominantemente en sobre células activadas, el MMF actúa preferentemente sobre la isoforma II del enzima, inhibiendo de forma más potente la proliferación de los linfocitos activados **(4)**.

Así pues el efecto inhibitorio del MMF sobre la IMPDH provoca un agotamiento de los nucleótidos de guanina e inhibiendo su síntesis de Novo en linfocitos T y B, inhibiendo la proliferación de los mismos, impidiendo el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, suprimiendo la respuesta inmune celular y humoral, así pues, el MMF disminuye los niveles de auto anticuerpos al desarrollar su acción de forma gradual inhibiendo fases iniciales de la proliferación y diferenciación de linfocitos B en lugar de la producción de anticuerpos por las células plasmáticas, sus efectos a largo plazo son útiles para atenuar el rechazo por un proceso crónico del injerto.

INTRODUCCIÓN

Además inhibe la expresión de moléculas de adhesión y el reclutamiento de células inmunes en el foco de la inflamación, inhibiendo también la maduración de células dendríticas y la expresión de interleucinas.

No provoca daño en los túbulos renales, ya que no induce la producción de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que induce fibrosis, a diferencia de otros inmunosupresores **(12)**.

Sus principales efectos tóxicos son gastrointestinales, principalmente diarrea, hematológicos como la anemia y leucopenia y aumento de los procesos infecciosos de origen viral y fúngico **(11)**.

El análisis de los resultados de varios estudios multicéntricos internacionales evaluando la eficacia del MMF en combinación con CsA y esteroides, mostró una reducción significativa en la incidencia y severidad de episodios de rechazo agudo durante el primer año post-TC en los pacientes que recibieron MMF respecto a los que recibieron otro antiproliferativo como la azatioprina **(9)**.

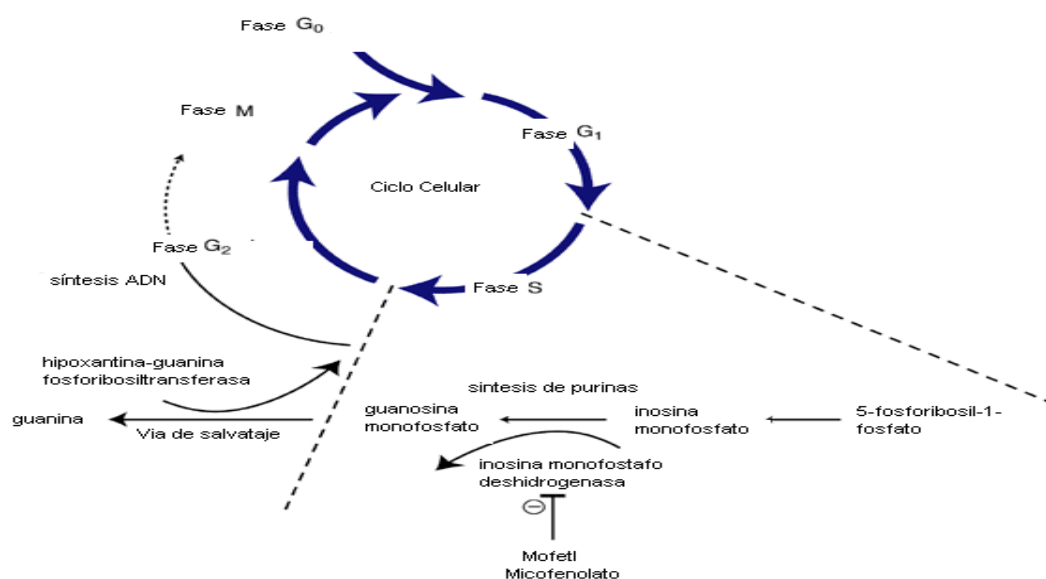


Figura 11: Mecanismo de acción del MMF. Adaptado de Stepkowski S.M et al. 2000.

Teniendo en cuenta su farmacocinética, tras su administración oral o intravenosa (IV), el MMF se absorbe rápida y ampliamente y sufre una metabolización presistémica completa a ácido micofenólico (MPA) su metabolito activo. La biodisponibilidad media del MMF tomado por vía oral, determinada a partir del AUC (área bajo la curva de concentraciones plasmáticas) del MPA, es del 94% con respecto a la alcanzada tras su administración por vía IV, el plasma es la matriz de elección dado que el MPA se encuentra casi exclusivamente en compartimento plasmático, la unión del MPA a la albúmina suele ser superior al 97% y se ha demostrado que varios de los fármacos que pueden administrarse concomitantemente, como la CsA, FK y la prednisona, no tienen efecto sobre la unión del MPA a las proteínas séricas humanas. Los alimentos no influían en el grado de absorción (AUC del MPA) del MMF administrado en dosis de 1,5 g dos veces al día a receptores de un trasplante renal. En cambio, la $C_{máx}$ de MPA disminuía en un 40% en presencia de alimentos. En el proceso de metabolización desarrollado en el hígado el MPA se une por conjugación principalmente a la glucuronil-transferasa para formar el glucurónido fenólico del MPA (MPAG), que carece de actividad farmacológica. *In vivo*, el MPAG se convierte en MPA libre durante la recirculación entero hepática pudiendo contribuir del 10 al 60% del total del AUC de concentración. La mayor parte (aproximadamente un 87%) de la dosis se elimina con la orina en forma de MPAG. La cantidad de fármaco excretada con la orina en forma de MPA es insignificante (< 1% de la dosis) **(13,14)**.

1.2.2 INHIBIDORES DE INMUNOFILINAS (ANTICALCINEURÍNICOS)

A este grupo de inmunosupresores pertenecen el FK y la CsA. Inducen inmunosupresión inhibiendo la primera fase de activación de células T. En esta fase se activa la transcripción de genes que codifican linfocinas e interleuquinas (IL) que son factores que permiten el paso de la fase G0 a G1 de dichas células, impidiendo así su proliferación. Dicho efecto depende de la formación de un complejo citoplasmático con su receptor proteico llamado ciclofilina, una vez formado el complejo se produce una inhibición selectiva de la calcineurina, enzima dependiente de calmodulina y calcio, que normalmente actúa como una fosfatasa que desfosforila ciertas proteínas nucleares reguladoras, una de las cuales es NFAT, que en condiciones normales, al ser desfosforilada atraviesa fácilmente la membrana nuclear. NFAT al no poder ingresar en el núcleo del linfocito no provoca la expresión de determinados genes involucrados en la activación de células T, donde cuyo papel en la expresión de citocinas IL-2, IL-4, e interferón gamma (INF- γ) en células T o de receptores de superficie como FasL o CD40L y factor de necrosis tumoral (TNF α) en células B y el factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) existiendo también evidencias de su implicación en la regulación de la expresión de IL-4 e IL-5 en células mastocitos **(9,15)**.

Los inhibidores de la calcineurina promueven la expresión de TGF- β , que también inhibe IL-2 con la consiguiente disminución en la generación de linfocitos T citotóxicos; sin embargo, también provoca el desarrollo de fibrosis intersticial, característica importante de nefrotoxicidad crónica inducida por los anticalcineurínicos.

La CsA es un undecapéptido cíclico lipofílico obtenido de los productos de fermentación del hongo *Tolypocladium inflatum Gams* **(4)**.

Los efectos adversos de la de la CsA, los cuales se relacionan con las concentraciones de la droga, incluyen nefrotoxicidad, hipertensión, hiperlipidemia, hiperplasia gingival, hirsutismo y temblores por toxicidad neurológica; también puede inducir síndrome urémico-hemolítico y diabetes mellitus post-TC **(16)**.

El FK es un macrólido aislado del *Streptomyces tsukubaensis*. FK se une a una proteína intracelular distinta a la proteína de unión de la CsA, la cual se denomina FKBP-12 (FK binding protein), sin embargo el mecanismo de acción es el mismo, inhibir a la calcineurina en la forma previamente descrita **(9)**.

Además FK provoca una disminución del reconocimiento antigénico y una regulación negativa de la cascada inflamatoria, inhibiendo la liberación de mediadores de mastocitos y disminuyendo la capacidad de adhesión y expresión de E-selectinas en los vasos sanguíneos **(17)**. También al inhibir la expresión de IL-2, inhibe la proliferación de células NK (*Natural Killer*) y su efecto citotóxico **(18)**.

Su efecto inmunosupresor es de 10 a 100 veces mayor que el de la CsA, actuando de forma muy efectiva ante un posible rechazo por resistencia al tratamiento con CsA y corticoides **(4)**.

Los efectos tóxicos son similares a los que genera la CsA, pero generando en mayor grado nefrotoxicidad, diabetes post-TC y alteraciones neurológicas.

Existen algunas consideraciones generales que atañen tanto a FK como a CsA, ambos se acumulan en la grasa, hígado páncreas, corazón, pulmón, bazo, nódulos linfáticos y sangre, pero no atraviesan la membrana placentaria. Se han encontrado cantidades significativas en leche materna, estando contraindicado la lactancia en madres con trasplante y recibiendo estos fármacos **(19)**.

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones del metabolismo lipídico, modifica su distribución y metabolismo. En pacientes con alteraciones hepáticas, la biodisponibilidad de ambos aumenta de forma importante, lo que obliga a una reducción de la dosis.

Interacciones farmacocinéticas por diversos fármacos son debidas frecuentemente a la modulación enzimática del citocromo. P450A3, alterándose el metabolismo y depuración de los anticalcineurínicos (9).

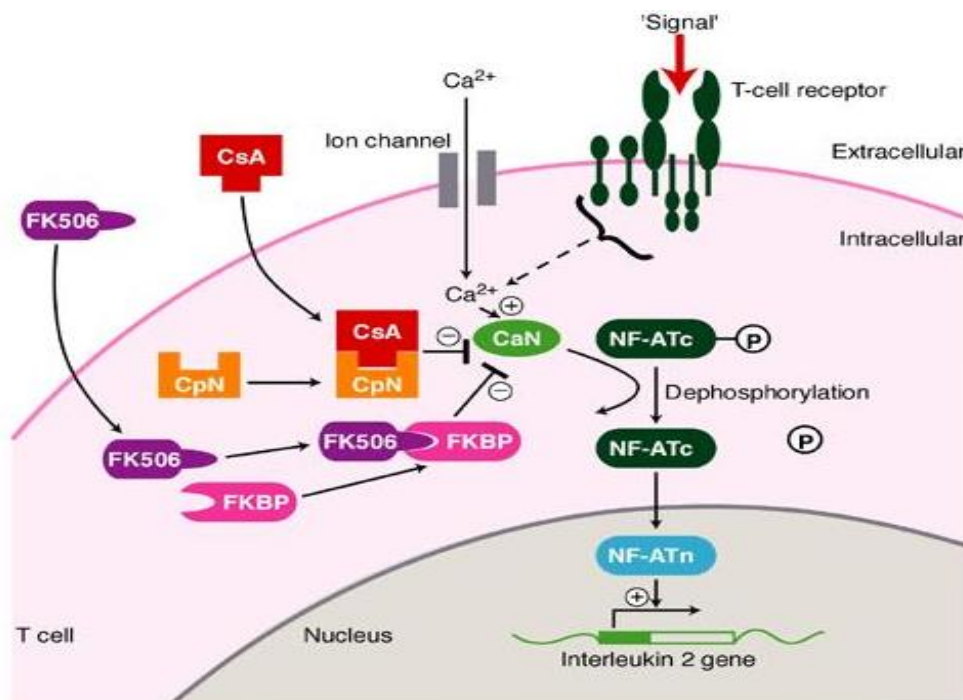


Figura 12: Mecanismo de acción CsA y tacrolimus. Expert Reviews in Molecular Medicine 2000 Cambridge University Press.

Teniendo en cuenta la farmacocinética de la CsA, su administración puede ser oral o intravenosa, la absorción a nivel gastrointestinal es variable, imprevisible e incompleta. La biodisponibilidad aumenta durante el tratamiento, por lo que la dosis oral ha de reducirse gradualmente para mantener concentraciones constantes del fármaco en sangre. Se metaboliza en gran parte por enzimas hepáticas del citocromo P-450. Hay

una serie de fármacos que influyen en la concentración sanguínea de la CsA provocando una disminución de su concentración por inducción de las isoenzimas del citocromo P-450, entre ellas la fenitoína, la rifampicina y el fenobarbital. Los ketoconazoles y la cimetidina provocan un aumento de su concentración a causa de la inhibición de su metabolismo y la eritromicina debido a una inhibición de su depuración **(20,21)**.

La terapia con CsA se inicia con una dosis oral de 5-6 mg/Kg cada 12 horas, los ajustes de dosis se efectúan con base en los niveles sanguíneos. La monitorización de niveles valle, 12 horas después de la administración es muy utilizada, pero la correlación con la exposición a la droga es pobre **(9)**. La medición de los niveles a las dos horas de la administración de dosis (C₂), correlaciona en forma más certera con el tiempo de concentración del área bajo la curva (AUC) **(22)**.

En relación con la farmacocinética de FK hay que tener en cuenta que la administración del fármaco con alimentos puede disminuir su absorción, por lo que es recomendable que su ingesta ocurra antes de la toma de alimentos. FK se metaboliza en el hígado y es excretado en la bilis; es un sustrato de CYP3A en su metabolismo y sus interacciones con otras drogas es similar al de la CsA, su vida media es de 8 a 11 horas **(9)**.

Su administración puede ser oral o intravenosa, la absorción de FK es variable e incompleta desde el tracto gastrointestinal. Existen grandes diferencias intra e interindividuales en su cinética así pues, la dosificación debe ser individualizada. La velocidad de absorción disminuye en presencia de alimentos, sin embargo la cantidad absorbida puede ser o no ser afectada, dependiendo del tipo de alimento ingerido. Los

INTRODUCCIÓN

pacientes pediátricos pueden exhibir una menor biodisponibilidad comparada con la de los adultos. El volumen de distribución (VoD), basado en plasma obtenido a 37°C es de 5 a 65 litros por kg de peso corporal (L/kg). El VoD basado en la concentración plasmática es mucho más alto que el VoD basado en concentraciones de sangre total. Dicha diferencia refleja la unión de FK a los glóbulos rojos, las concentraciones en sangre total pueden llegar a ser 12 a 67 veces mayores que las concentraciones plasmáticas, por tanto la sangre es más apropiada que el plasma para describir sus características farmacocinéticas. FK se une en alta proporción a las proteínas (75 a 99%) principalmente a albúmina y a la glicoproteína ácida- α . FK es metabolizado por vía hepática, principalmente por las enzimas del sistema citocromo P-450 3A. El FK es excretado en forma de metabolitos. Menos de un 1% se elimina como tal por la orina **(23,24)**.

1.2.3 ANTICUERPOS MONOCLONALES, DACLIZUMAB

Daclizumab es un anticuerpo monoclonal inmunoglobulina IgG₁ humanizado, obtenido mediante ingeniería genética, está constituido por dos partes una humana(90%) y otra murina (10%) formada por las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son las que interactúan específicamente con el antígeno. El mecanismo de acción se desarrolla mediante la unión específica a la subunidad α (Tac/CD25) del receptor de interleucina-2 (IL-2R) de la superficie de los linfocitos T activados **(25)**, impidiendo así la unión y actividad biológica de la IL-2, mediante un antagonismo competitivo, inhibiendo de esta forma la activación de los linfocitos, mecanismo determinante en la respuesta inmune celular implicada en el rechazo del injerto, tras el reconocimiento de antígenos extraños por las células T (CD4), secreción de IL-2 la cual induce la expansión

clonal de linfocitos T mediante la fijación a su receptor de alta afinidad sobre la superficie de las células T activadas por el antígeno.

El receptor de la IL-2, está constituido por tres cadenas de proteínas transmembrana; α (CD25), β (CD122) y γ (CD132). El nivel de expresión de CD25 es bajo en linfocitos T en reposo, pero se ve inducido por la estimulación alogénica del injerto, CD25 no traduce señal pero es la responsable de la asociación de IL-2 con las cadenas β y γ , lo que a su vez provoca que la célula T activada entre en mitosis provocando la proliferación celular **(25)**. Aunque la acción bloqueadora de daclizumab inhibe la vía jak/STAT, su acción antagonista puede ser revertida en presencia de dosis altas de IL-2, además daclizumab lleva a cabo su función inmunomoduladora interviniendo en otros mecanismos; endocitosis del complejo daclizumab/IL-2R, interfiriendo con la vía de señalización IL-15 e inhibiendo la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40L) y la síntesis de INF- γ **(26-28)**. Daclizumab tiene un perfil de toxicidad muy benigno al presentar poca inmunogenicidad y no inducir la síntesis de anticuerpos clínicamente relevantes, no incrementa el número de infecciones oportunistas ni trastornos linfoproliferativos, no se asocia a un porcentaje elevado de reacciones anafilácticas y no incrementa la incidencia de efectos adversos producidos por los glucocorticoides y los anticalcineurínicos y utilizándose en conjunto se reduce de forma significativa la incidencia de reacciones agudas de rechazo **(29,30)**.

Farmacocinética de daclizumab:

Una dosis de 1mg/Kg cada dos semanas hasta un total de cinco dosis, mantiene las concentraciones séricas suficientes para saturar los IL-2R durante más de 90 días posteriores al trasplante.

INTRODUCCIÓN

Tiene un pequeño volumen de distribución (5,3L) y un aclaramiento plasmático de 15,1 ml/h en un varón de 45 años y 80 kilos de peso. El aclaramiento depende del peso, aumentando 0,6 ml/h por cada 10 Kg de exceso y disminuyendo en 0,9 ml/h por cada 10 Kg de defecto, justificándose así la dosificación en mg/Kg de peso. También puede verse influido en menor medida por el sexo, raza, edad y la proteinuria. El tiempo de semi-vida medio es similar al de la inmunoglobulina G (IgG) humana, un promedio de 480 horas **(25)**.

1.2.4 CORTICOSTEROIDES, PREDNISONA

Su acción terapéutica se basa en su conocida eficacia antiinflamatoria e inmunosupresora. La prednisona es uno de los corticoides más utilizados en clínica, es un fármaco activo por vía oral, que se metaboliza en el hígado a prednisolona, alcanzando así la forma activa. De acuerdo al efecto terapéutico se clasifica como de acción intermedia, entre 12 y 36 horas **(31)**.

Se han descrito acciones rápidas no genómicas de los glucocorticoides (GC) de acción inmediata, mediados por receptores de membrana, por receptores citosólicos y mediante la interacción con la membrana plasmática alterando sus características propias. En definitiva, provocando alteraciones en los procesos de fosforilación, movilización del calcio, alterando las cascadas de señalización intracelular **(32,33)**.

También se han descrito acciones que dependen de la capacidad de activar su receptor intracelular y modificar la expresión génica. A través de estos cambios, los GC inhiben la síntesis, liberación y acción de citoquinas y otros mediadores que promueven la respuesta inflamatoria o inmune. Incluyendo citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6 y TNF- α , citoquinas de expansión clonal como IL-2, IL-12, IL-4, IL-5 e INF- γ , factores

estimulantes de colonias como (GM-CSF) y quimioquinas como RANTES, MIP- α o moléculas de adhesión como ICAM-1, ELAM-1 y E-Selectina, mediadores de la inflamación como bradiquinina, histamina, eicosanoides y óxido nítrico, así como moléculas involucradas en la presentación de antígenos como el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II **(34,35)**.

Dado su carácter no polar, los GC atraviesan libremente las membranas y se unen a un receptor específico citoplasmático, receptor de glucocorticoide humano (HGR). Pertenece a la súper familia de hormonas esteroideas con acción a nivel nuclear, actuando como factor de transcripción regulado por ligando, que le permite reconocer y unirse a secuencias específicas del ADN, conocidas como elementos de la respuesta hormonal (HREs). Tras interactuar con la cadena nucleotídica alteran el nivel de transcripción del gen asociado, controlando la expresión de genes involucrados en procesos inflamatorios, del metabolismo lipídico, glucídico y de respuesta a estrés **(36)**. Este receptor está codificado por el gen NR3C1, localizado en el brazo corto del cromosoma 9. Está constituido por 777 aminoácidos, organizados en tres dominios principales funcionalmente distintos. Dominio N terminal o inmunogénico, independiente de ligando que interactúa con las moléculas necesarias para el inicio de la transcripción, coactivadores, ARN polimerasa II, etc **(37)**.

El dominio C-terminal de unión a ligando, está constituido por 12 α hélices y 4 hojas β que generan la estructura de unión en forma de bolsillo y de anclaje al glucocorticoide, que una vez unido provoca un cambio conformacional del receptor. El dominio central o de unión al ADN contiene dos enlaces de Zinc a través de los cuales

INTRODUCCIÓN

se une a secuencias específicas de ADN, además contiene secuencias importantes para la dimerización del receptor y su translocación al núcleo **(38)**.

En ausencia de ligando, el HGR inactivo, se encuentra en el citoplasma formando un complejo proteico que incluye proteínas chaperonas como Hsp70 y Hsp90, inmunofilinas, MAP quinasas, unidas a través del extremo C-terminal **(39,40)**, formando un complejo heterodimérico que posee la secuencia necesaria para la migración del receptor activado hacia el núcleo. Una vez se une a su ligando el heterodímero se disocia, desenmascarando un dominio de localización nuclear que induce la translocación al núcleo **(4,41)**. Una vez en el núcleo, el HGR a través de su dominio central se une a los lugares de unión de ADN específicos, conocidos como elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), la interacción de los dímeros de HRG-GC con la doble hélice da lugar a dos mecanismos de acción; transactivación o inducción de la transcripción de genes antiinflamatorios y transrepresión o represión de la transcripción de genes proinflamatorios **(42)**.

La transrepresión puede acontecer de dos formas, directamente uniéndose a determinadas secuencias de ADN y compitiendo con factores de transcripción por el sitio de unión reprimiendo así la expresión de genes proinflamatorios como en el caso del promotor del Fas ligando (Fas L) **(43,44)** o impidiendo la acción de la enzima histona acetil-transferasa (HAT) **(45)** y de forma indirecta mediante interacciones proteína-proteína como en el caso de la interacción directa con factores de transcripción como NF- κ B evitando la unión a su sitio específico en el ADN y provocando un aumento del inhibidor I κ B α evitando la síntesis de IL-8, quimioquinas, moléculas de adhesión celular, evitando un efecto proinflamatorio,

bloqueando a T-bet o la proteína activadora 1 (AP1), NF-AT o STAT5 o incluso compitiendo contra ellos mediante el secuestro de sus coactivadores necesarios para su función (46,47).

Los mecanismos de transactivación de genes antiinflamatorios tienen lugar mediante la unión del heterodímero en la región GRE, aumentando la expresión de genes antiinflamatorios, la mayoría de las acciones de estos fármacos tienen lugar debido a este mecanismo, así como sus efectos secundarios. Inducen así la síntesis de anexina-1, lipocortina, I κ B α que bloquea la translocación al núcleo impidiendo la expresión génica, IL-10 o la MAPK fosfatasa1, que defosforila e inactiva la JUN quinasa bloqueando la cascada inflamatoria e inhibiendo la actividad de la fosfolipasa A2, que interviene en la síntesis de ácido araquidónico, provocando la disminución de leucotrienos y prostaglandinas, mediadores de la inflamación y por consiguiente alterando al capacidad de infiltración de los leucocitos (4,45).

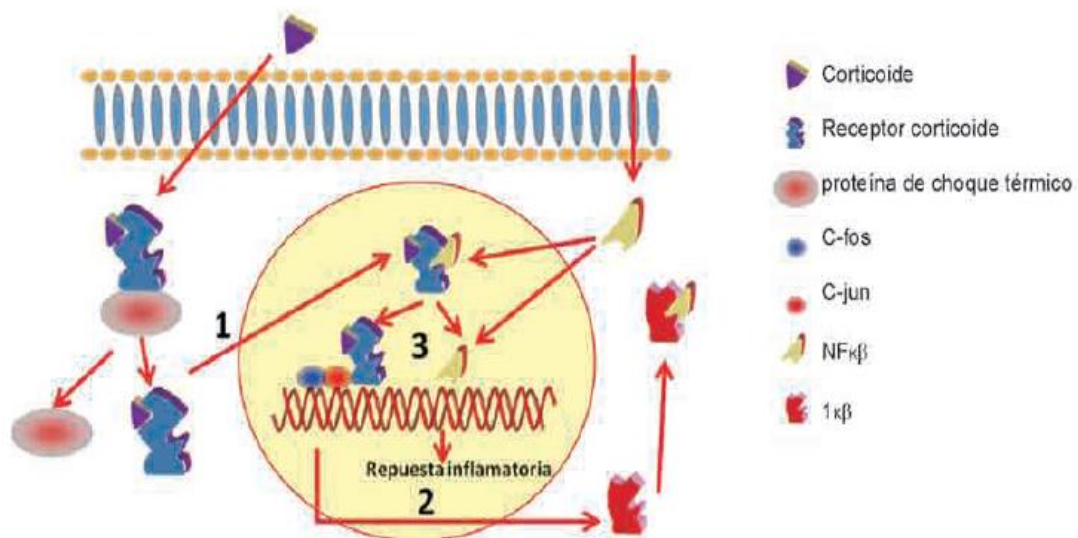


Figura 13: Mecanismo de acción inmunosupresora glucocorticoides GRE (47).

INTRODUCCIÓN

Los efectos adversos se deben a que estos fármacos afectan a casi todo el organismo provocando desde estimulación del SNC desencadenando cuadros psicóticos, hipercortisolismo iatrogénico como consecuencia de una terapia crónica o una insuficiencia adrenal al suspender de forma brusca la misma, hiperglobulia, hipercolesterolemia, intolerancia a la glucosa, miopatía esteroidea, trastornos digestivos, alteraciones cutáneas o edemas por retención de agua y sodio con riesgo de generar hipertensión e insuficiencia cardiaca **(31)**.

Farmacocinética de GC:

La prednisona es un glucocorticoide que por vía oral se absorbe casi por completo, los tiempos de concentración máxima (t_{max}) se alcanzan vía oral alrededor de los 90 minutos, se hallan ampliamente a la albúmina, sus volúmenes de distribución oscilan entre 0.5 y 2 l/Kg. Se metaboliza en el hígado y los metabolitos resultantes se conjugan con glucurónico o sulfato eliminándose vía biliar o renal. El tiempo de semi-vida media es menor que la duración de su efecto, siendo ambos de 1 hora y de 18 a 36 horas respectivamente, parámetros que se ven alterados ante una insuficiencia hepática o renal **(31)**.

1.2.5 ANTIPROLIFERATIVOS O ANTAGONISTAS RECEPTOR IL2 O mTOR,

EVEROLIMUS

Everolimus, es un inhibidor de la señal de proliferación, ejerce su efecto inmunosupresor inhibiendo la proliferación de las células T activadas por antígeno, y por consiguiente la expansión clonal, de las células T activadas por antígenos, lo cual está dirigido por las interleucinas IL-2 e IL-15.

Everolimus inhibe una vía de señalización intracelular que normalmente conduce a la proliferación celular cuando ha sido producida por la unión de estos factores del crecimiento de las células T a sus receptores respectivos. El bloqueo de esta señal detiene a las células en la etapa G₁ del ciclo celular. A nivel molecular, everolimus forma un complejo con la proteína citoplásmica FKBP-12, que se une e inhibe a m-TOR, quinasa clave en la regulación del ciclo celular. En presencia del everolimus, se inhibió la fosforilación de la proteína quinasa p70 S6 ribosomal, sustrato de m-TOR, estimulada por el factor de crecimiento. Como la fosforilación de la p70 S6 quinasa está bajo el control del FRAP (también llamado m-TOR), este hallazgo sugiere que el complejo everolimus - FKBP-12 se une y, por ello, interfiere con la función del FRAP. El FRAP es una proteína reguladora clave que gobierna el metabolismo celular, el crecimiento y la proliferación; la inhabilitación de la función del FRAP explica entonces la detención del ciclo celular causado por el everolimus **(48)**.

Farmacocinética de everolimus:

Las concentraciones pico de everolimus se alcanzan 1 a 2 horas después de la administración de una dosis oral. Las concentraciones sanguíneas de everolimus en pacientes trasplantados son proporcionales a la dosis en un rango de dosis de 0.25 a 15 mg.

El efecto de los alimentos se traduce de tal forma que la C_{max} y el AUC del fármaco, se reducen un 60 y un 16% respectivamente, cuando se administran con una dieta rica en grasas en comparación con la administración en ayunas.

En cuanto a su distribución, la relación sangre/plasma de everolimus, que es dependiente de la concentración en el rango de 5 a 5000 ng/ml es de 17% a 73%. La

INTRODUCCIÓN

unión a proteínas plasmáticas es aproximadamente de 74% en sujetos sanos y pacientes con daño hepático moderado.

El everolimus es un sustrato del CYP3A4 y de la glicoproteína P. Las principales vías metabólicas identificadas en el hombre fueron mono-hidroxilaciones y

O-dealquilaciones. Por hidrólisis de la lactona cíclica, se formaron dos metabolitos principales. El principal componente circulante en la sangre fue el everolimus. Probablemente ninguno de los metabolitos principales contribuye significativamente con la actividad inmunosupresora del everolimus.

Después de una dosis única de everolimus radio marcado a pacientes trasplantados que recibieron CsA, se recuperó la mayoría (80%) de la radioactividad de las heces y sólo una mínima cantidad (5%) se excretó en orina. No se detectó el fármaco original en orina o en heces **(49,50)**. Los efectos adversos de everolimus son varios, produce hipercolesterolemia, leucopenia, hipertrigliceridemia, trombocitopenia y anemia, efectos reversibles que desaparecen al reducir la dosis y la exposición al fármaco. Potencian la nefrotoxicidad de los anticalcineurínicos **(51)**.

En la tabla número 2 se detalla el mecanismo de acción, la toxicidad y la dosificación farmacológica utilizada en nuestro grupo de estudio en la unidad de TC del H.G.U.G.M.

Tabla 2: Resumen fármacos utilizados en TC en la cohorte estudiada.

FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	TOXICIDAD	DOSIFICACIÓN
Micofenolato	Inhibidor de la proliferación de linfocitos T y B, bloqueando la síntesis de purinas inhibiendo la losina monofosfato deshidrogenasa	Alteraciones gastrointestinales, anemia, leucopenia y aumento de infecciones fúngicas y víricas.	1000 mg IV en fase de inducción. Fase de mantenimiento, dosificación en función de niveles en sangre.
Ciclosporina A	Inhiben la activación de linfocitos T, inhibiendo la calcineurina impidiendo la expresión de genes activadores.	Nefrotoxicidad, hipertensión, diabetes y toxicidad neurológica, hirsutismo y síndrome urémico hemolítico.	Fase de mantenimiento dosificación en función de niveles en sangre.
Tacrolimus	Inhibición de la síntesis de IL-2	De 10 a 100 veces más potente, incrementando su toxicidad.	
Corticoides	Modifican la expresión génica, inhibiendo síntesis y liberación desencadenantes de la respuesta inmune.	Dislipemia, hipertensión, insuficiencia cardíaca, intolerancia a la glucosa. Trastornos digestivos, miopatía.	500 mg intravenosos fase de inducción. Fase de mantenimiento forma oral.
Daclizumab	Inhibe la activación de linfocitos T mediante unión específica a la subunidad CD25 del receptor de IL-2	Perfil de toxicidad muy benigno.	1 mg/kg (día 0 y 14)

1.3 PROBLEMAS DERIVADOS DE LA INMUNOSUPRESIÓN

El objetivo de la terapia inmunosupresora en el trasplante cardiaco, es proteger el injerto frente a la respuesta del sistema inmunitario del receptor y así evitar el rechazo del órgano trasplantado. La utilización de forma continuada, de este tipo de fármacos inmunosupresores favorece la aparición de procesos infecciosos y el desarrollo de distintos trastornos autoinmunes, así como procesos tumorales y enfermedades linfoproliferativas.

INTRODUCCIÓN

Debemos añadir a este tipo de trastornos, los asociados a la toxicidad propiamente dicha de los fármacos inmunosupresores sobre todo el efecto nefrotóxico que compromete en gran medida la calidad de vida del receptor **(52)**.

1.3.1 INFECCIÓN

A nivel global la incidencia del desarrollo de procesos infecciosos oscila entre el 30% y el 60%, siendo más frecuentemente éstos de origen bacteriano, seguido de las infecciones víricas, las fúngicas y las ocasionadas por protozoos, manifestándose con más frecuencia durante los primeros tres meses post-TC **(53)**.

Durante el periodo post-TC inferior al primer mes, la mayoría de las infecciones son bacterianas, debido a colonizaciones por patógenos nosocomiales, por resistencias generadas debido al uso de antibióticos y relacionadas con el proceso quirúrgico y durante el post-operatorio.

Durante el periodo comprendido entre el primer y el sexto mes post-trasplante abundan las infecciones víricas y fúngicas, debido a la activación de infecciones latentes tanto en el injerto como en el propio receptor.

A partir del sexto mes post-TC, el riesgo de infección persiste debido a la presencia de las denominadas infecciones comunitarias, que provocan procesos infecciosos crónicos muy dañinos para el injerto, como la neumonía de la comunidad, infecciones del tracto urinario, síndrome respiratorio agudo e infecciones virales tardías como citomegalovirus o hepatitis B y C **(54,55)**.

Para poder llegar a un equilibrio entre la profilaxis de rechazo y la respuesta inmune necesaria para evitar el desarrollo de procesos infecciosos, la determinación del estado

de inmunosupresión se realiza mediante la cuantificación de los niveles de fármacos inmunosupresores en sangre, se ha observado que la determinación de los niveles de fármaco en sangre no refleja por sí sola el efecto fisiológico real de la terapia inmunosupresora sobre los parámetros inmunológicos medidos **(56)**, viéndonos obligados a desarrollar otras estrategias de monitorización inmunológica para prevenir la infección y el rechazo.

Para evitar el rechazo del injerto y las complicaciones derivadas del tratamiento con fármacos inmunosupresores, es necesario monitorizar las alteraciones de la inmunidad celular y humoral del paciente trasplantado.

La medición de inmunoglobulinas séricas, subclases de inmunoglobulina G y la titulación de anticuerpos específicos, permite valorar el estado de la inmunidad humoral adquirida de nuestro grupo de estudio.

La hipogammaglobulinemia se clasifica en función de los valores medidos de IgG como, leve con valores que oscilan entre 500 y 700 mg/dL, moderada si los valores se encuentran entre 350-500 mg/dL o severa si hablamos de niveles de IgG menores de 350 mg/dL **(57)**. Estudios realizados en el entorno del trasplante cardiaco en el Hospital Gregorio Marañón, asociaron niveles de IgG pre-TC (pre-trasplante cardiaco) menores de 1055 mg/dL, IgG₁ pre-TC menores de 695 mg/dL y valores de IgG post-trasplante menores de 589 mg/dL con un aumento de riesgo a desarrollar infecciones **(58)**.

La determinación de los niveles de anticuerpos específicos como los anticuerpos antineumococo, nos dan información acerca de la capacidad de respuesta del organismo ante dicho patógeno, observándose en distintos estudios una asociación

INTRODUCCIÓN

entre el desarrollo de infecciones respiratorias y una respuesta inmune reducida frente al neumococo, observándose niveles de IgG anti-neumococo muy bajas, menores de 20 mg/dL **(59)**, pudiendo valorar así valores bajos de estos parámetros como marcador de riesgo de infección.

La determinación en suero de factores del complemento C₃ y C₄ nos proporcionan información sobre la respuesta humoral innata, la cual juega un papel importante en la defensa temprana contra agentes infecciosos. Se ha observado que los niveles de C₃ y C₄ disminuyen tras el trasplante y en aquellos casos en los que al mes post-trasplante los niveles de C₃ eran bajos presentaban más eventos infecciosos que aquellos en los que los niveles estaban dentro de los rangos de la normalidad **(60)**.

La monitorización de las subpoblaciones linfocitarias T CD4, T CD8 y de neutrófilos, como parámetros para evaluar la inmunidad celular, son muy útiles para detectar el riesgo de desarrollar infección, en este contexto se correlacionaron, niveles bajos de linfocitos T CD4 con riesgo a sufrir infección **(61)**.

La neutropenia se considera un riesgo asociado al desarrollo de procesos infecciosos en trasplantados de órgano sólido, sin embargo se ha podido relacionar el desarrollo de infecciones bacterianas y fúngicas en individuos con neutrofilia marcada empleando este parámetro como marcador de infecciones ocultas que predisponen al desarrollo activo de la infección **(62)**.

1.3.2 RECHAZO

La causa principal del rechazo del injerto y posterior pérdida del mismo, se debe principalmente a las reacciones inmunológicas del receptor frente a los antígenos celulares del donante. Así pues hay tres tipos distintos de rechazo:

Rechazo hiperagudo, causado por anticuerpos preexistentes, el cual acontece a las pocas horas o minutos tras la restitución de la circulación sanguínea el injerto. No es habitual, pues se llevan a cabo una serie de pruebas previas para valorar la compatibilidad del órgano trasplantado.

Rechazo agudo, se produce debido a una escasa inmunosupresión o a la presencia de enfermedades que afectan al órgano trasplantado, en este caso es bastante habitual y acontece durante los primeros meses post-TC.

Rechazo crónico, se debe a lesiones producidas sobre el órgano trasplantado por episodios de rechazos agudos, los cuales provocan la aparición de tejido cicatricial y pérdida de la función del injerto, evolucionando hasta la pérdida total del mismo **(63-65)**. En estos casos determinadas citocinas son los parámetros de inmunidad humoral que estudiados pueden prevenir de forma precoz el rechazo.

Se ha observado que niveles altos de IL-10 y niveles bajos de INF γ muestran un buen pronóstico tras el trasplante **(66)**.

Una disminución de la expresión génica por debajo del 30% tras la administración de fármacos inmunosupresores, de los genes de citocinas regulados por el factor nuclear NFAT, como son la IL-2, INF γ y GM-CSF, evolucionan de forma favorable sin mostrar episodios de rechazo **(67)**.

INTRODUCCIÓN

Las células T CD4, intervienen de forma activa en la activación y diferenciación de células T CD8 citotóxicas, activación del sistema del complemento y en el desencadenamiento de los distintos mecanismos proinflamatorios generando sobre el injerto distintos episodios de rechazo **(68)**, así pues, mediante el estudio de determinados parámetros pertenecientes a la inmunidad celular como pueden ser las frecuencias de células T CD8 y T CD4 de memoria, células reguladoras (CD4/CD25 + Fox P₃), la frecuencia de células T CD4 inmaduras y la distribución de las distintas subpoblaciones celulares y su grado de maduración y activación que caracterizan a los pacientes con rechazo **(69)**, podríamos hacer un diagnóstico precoz del rechazo del injerto.

1.3.3 TOXICIDAD FARMACOLÓGICA, INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA

1.3.3.1 DISFUNCIÓN RENAL

La relación entre enfermedad renal y toxicidad por fármacos es doble, por un lado está el efecto tóxico que ejerce directamente el fármaco sobre el riñón y por otro lado la enfermedad renal, la cual puede afectar a la eliminación de sustancias cuya acumulación puede provocar toxicidad.

Los receptores de trasplante cardiaco, con frecuencia presentan disfunción renal, como resultado de años de insuficiencia cardiaca crónica, además en este tipo de trasplante se mantienen los niveles valle para CsA hasta un 30% mayores que en otros trasplante de órgano sólido.

La nefrotoxicidad por la utilización de estos fármacos puede ser aguda, en estos casos, es de origen funcional, reversible y dependiente de dosis, respondiendo bien a la suspensión del tratamiento. Afecta fundamentalmente a vasos sanguíneos y a túbulo

ocasionando disfunción endotelial provocada por vasoconstricción de la arteriola aferente y eferente como consecuencia de un desequilibrio entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras generando un aumento del tono vasomotor que reduce el flujo plasmático renal y el filtrado glomerular. La disminución de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico por inhibición de la óxido nítrico sintetasa y la liberación de prostaglandinas, un aumento de agentes vasoconstrictores como tromboxanos, endotelina-1 y la alteración del sistema renina-angiotensina junto con un aumento de la actividad simpática intrarenal, generan una disfunción glomerular aguda **(70,71)**.

Esta alteración renal a la que conduce esta situación se traduce clínicamente en un aumento de la retención del sodio y agua, aumento de la secreción de potasio y disminución de la reabsorción de magnesio y bicarbonato y de la secreción de ácido úrico generando acidosis metabólica por efecto tóxico tubular **(70)**.

La nefrotoxicidad crónica producida por los anticalcineurínicos se manifiesta en forma de disfunción renal crónica, debido a daño vascular y glomerular, anomalías en la función tubular y aumento de la presión arterial **(72)**.

La toxicidad tubular puede comenzar con el inicio del tratamiento, posteriormente se observa lesión vascular e intersticial y finalmente fibrosis intersticial.

El marcador histológico principal es la hialinosis arteriolar, es una necrosis miointimal y depósito proteico a nivel de la túnica media de la arteriola eferente, estos daños isquémicos con vasculopatía y la toxicidad tubular generan atrofia tubular y fibrosis intersticial **(73)**.

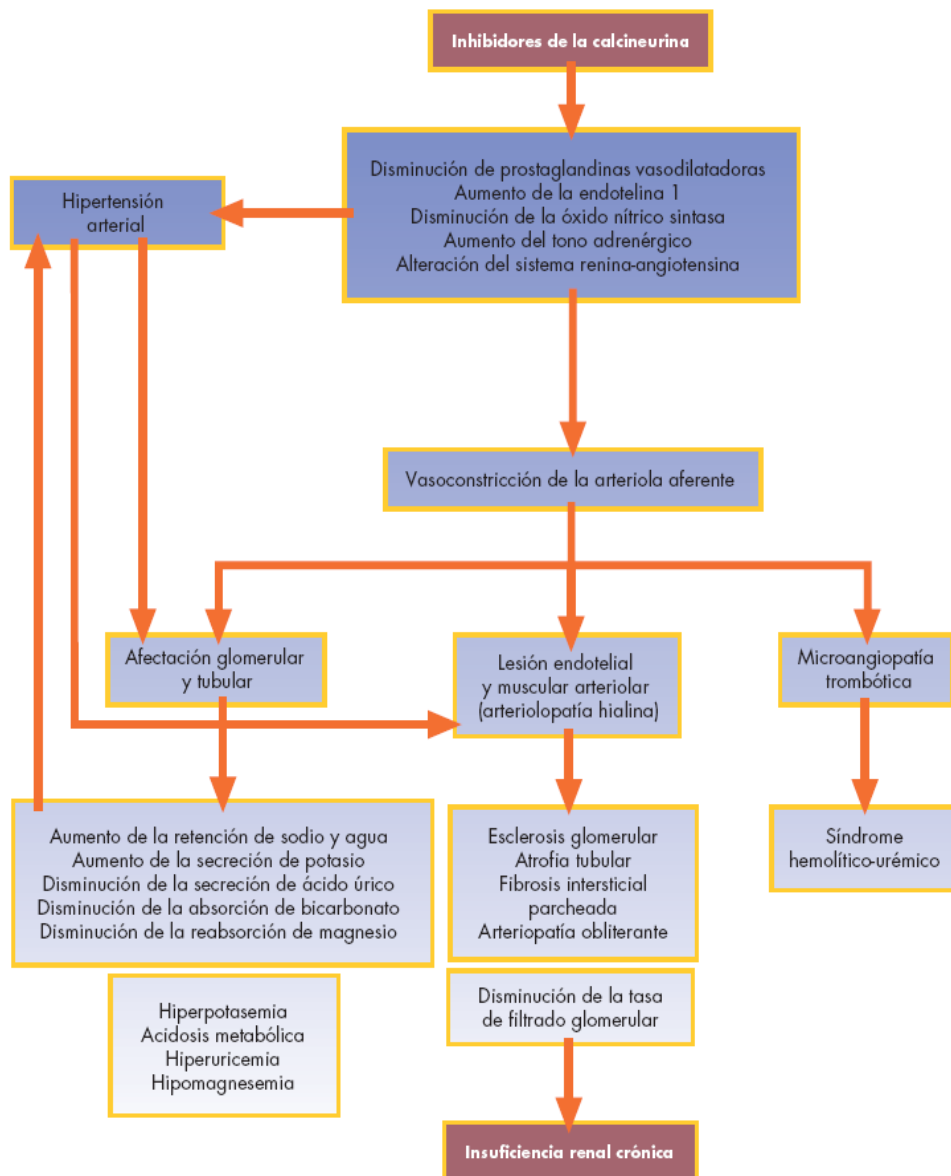


Figura 14: Mecanismo nefrotóxico de los inhibidores de la calcineurina (70).

La CsA, favorece la entrada de calcio a nivel intracelular provocando un aumento de la contracción de las células mesangiales, reduciendo el filtrado glomerular, la disminución de la síntesis de prostaglandina E₂ contribuye a la vasoconstricción intensa, administrando bloqueantes del calcio y una infusión de prostaglandinas, revierte el efecto tóxico del inmunosupresor. Además estimula la síntesis de endotelina-1 por las células epiteliales tubulares y mesangiales e interfiere en la acción

vasodilatadora del óxido nítrico, potenciando aún más el efecto vasoconstrictor. El tromboxano A₂ y su metabolito tromboxano B₂ mediante su efecto vasoconstrictor favorecen los fenómenos de glomerulosclerosis, induciendo la proliferación de células mesangiales que junto con la estimulación de la función de los fibroblastos, macrófagos y neutrófilos, provocan un aumento de tejido fibroso en el foco inflamatorio **(74)**.

Las lesiones vasculares consisten en, depósitos del complemento, inmunoglobulina M (IgM) y fibrina, depositado sobre la pared arteriolar obstruyendo la luz vascular. A nivel tubular pueden detectarse cuerpos de inclusión, vacuolización y micro calcificaciones. Las lesiones glomerulares son inducidas por la reducción de la perfusión renal. Este patrón de isquemia renal suele ser focal, apareciendo de forma alterna, áreas dañadas con otras bien preservadas en su arquitectura, generando un patrón de fibrosis intersticial típico denominado patrón “en bandas” **(73,74)**.

1.3.3.2 MICROANGIOPATÍA TROMBÓTICA (MAT)

En ocasiones los anticalcineurínicos pueden inducir un cuadro de S.U.H de tipo idiosincrásico, con los hallazgos característicos de la anemia microangiopática, con disminución de la hemoglobina, trombocitopenia, aumento de la bilirrubina indirecta, del enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y presencia de esquistocitos en sangre periférica **(70)**.

La MAT compromete pequeños vasos y se caracteriza por trombos plaquetarios provocando plaquetopenia, isquemia y anemia hemolítica, debido a la fragmentación de eritrocitos en la microcirculación, por la acción tóxica que ejerce de forma directa el

INTRODUCCIÓN

inmunosupresor sobre las células endoteliales, al inducir la vasoconstricción de la musculatura vascular **(75)**.

Es una complicación infrecuente, independiente del tiempo de trasplante y en muchas ocasiones concomitante con infección, lo que tiende a ocultar el diagnóstico. La MAT asociada al uso de inmunosupresores anticalcineurínicos en trasplante de órgano sólido se estima presente con una incidencia del 1-4,7%. El diagnóstico se obtiene mediante biopsia renal que evidencie la presencia de trombos en las asas capilares glomerulares. Pueden obviarse la biopsia si aparecen esquistocitos en sangre periférica y una disminución de la haptoglobina sérica.

1.3.3.3 COMPLICACIONES NEUROLÓGICAS

La utilización de inhibidores de la calcineurina se ha asociado también a complicaciones neurológicas en un 15-40% de los pacientes tratados **(76)** y las complicaciones más frecuentemente descritas son la convulsión, compromiso de conciencia y temblores. Se ha descrito con relativa frecuencia la aparición del síndrome de hiperperfusión cerebral, consistente en cuadros reversibles de cefalea, alteración visual, somnolencia y convulsiones, asociadas a leucoencefalopatía en lóbulos occipitales, en pacientes tratados con anticalcineurínicos en los cuales los niveles plasmáticos eran más elevados **(77)**. La toxicidad del fármaco es reversible, pues desaparecían los síntomas al retirar o disminuir la dosis del mismo **(78)**.

1.3.3.4 COMPLICACIONES METABÓLICAS

El uso terapéutico de los anticalcineurínicos también está asociado a la aparición de trastornos metabólicos como el síndrome de resistencia a insulina (SRI) o la hiperuricemia.

Fármacos como CsA y el FK se pueden relacionar con la aparición del SRI mediante la inhibición de la actividad de la calmodulina unida al calcio, provocando una disminución de la activación de la protein-quinasa AMP-dependiente, que a su vez inhibe a la enzima malonil-CoA, que regula la síntesis de ácidos grasos libres y triglicéridos. El aumento de esta enzima, la hipomagnesemia, el déficit secretor de insulina y la gran afinidad que presentan estos fármacos por las moléculas transportadoras de lipoproteínas, favorecen la diabetes post-trasplante y la dislipemia, componentes de la SRI **(79)**.

La hiperuricemia post-trasplante es una complicación que aparece entre el 20-50% de los trasplantados, y está vinculada al uso de anticalcineurínicos. Estos fármacos producen disminución de la secreción tubular distal del ácido úrico, traduciéndose en el incremento de los niveles séricos del mismo **(80)**. Los depósitos de uratos a nivel del intersticio renal facilitan la respuesta inflamatoria local con reclutamiento de células inmunes, activación del complemento, liberación de citoquinas pro-inflamatorias y daño estructural final. Además este trastorno metabólico contribuye a la aparición de arteriopatía aferente, glomeruloesclerosis e hipertensión pre-glomerular **(81,82)**.

1.3.3.5 FARMACOGENÉTICA DE LOS INMUNOSUPRESORES

Existe una gran variedad interindividual entre las dosis necesarias para alcanzar los niveles sanguíneos terapéuticos y de seguridad de estos fármacos. La variación en los genes que codifican las proteínas implicadas en la absorción y metabolización de los fármacos pueden condicionar la concentración sanguínea del principio farmacológico activo, actuando a nivel de su absorción condicionando la cantidad de fármaco que

INTRODUCCIÓN

pasa a la sangre o en el hígado generando moléculas terapéuticamente activas o no, e incluso modificando al fármaco o a sus metabolitos para facilitar su eliminación.

El principal determinante de la variabilidad interindividual en la dosis de FK es la actividad del citocromo P450-3A5, codificado por el gen CYP3A5, de todos los polimorfismos de este gen, un cambio de un solo nucleótido conocido como CYP3A5*3, el principal regulador de la dosis óptima **(86-87)**. El RNAm resultante tendrá una secuencia anómala, será eliminado por la célula y no se sintetizará la proteína correspondiente. La presencia de una copia o dos copias del polimorfismo, permiten clasificar a cada paciente como metabolizador lento, aquellos que presentan dos copias iguales del polimorfismo, metabolizador intermedio aquellos que al menos presentan una copia del gen normal y metabolizadores rápidos en los que ambas copias del gen son normales, estos últimos necesitan más dosis de fármaco para alcanzar niveles terapéuticos **(88-92)**. El 80% de los caucásicos son metabolizadores lentos, es decir, homocigotos para el alelo CYP3A5*3 y la mayoría de sujetos de raza negra son metabolizadores rápidos **(93,94)**.

La presencia de distintos tipos de polimorfismos y distintas isoformas de citocromo P450 implicadas en la metabolización del fármaco, como CYP3A4, dificultan la clasificación de los distintos fenotipos de metabolizador **(95,96)**.

El gen ABCB1 codifica para *Pgp*, una proteína que se expresa en muchos tipos celulares y regularía la absorción intestinal de muchos fármacos. Se ha descrito una relación entre un polimorfismo en el exón 26 de este gen y la expresión intestinal de esta proteína, por lo que podría condicionar los requerimientos de dosis de varios fármacos

(94,97). La expresión de *PgP* en células renales podría condicionar la cantidad de FK que accede al interior de las células y así su nivel de toxicidad.

No podemos dejar de comentar el aspecto del uso concomitante de este tipo de fármacos con otros que potencian el efecto nefrotóxico, como aquellos que inhiban la acción de CYP3A que reducen el metabolismo de los anticalcineurínicos potenciando su efecto tóxico como el ketoconazol, los bloqueantes del canal del calcio no dihidropiridínicos, utilizados como antihipertensivos o los aminoglucósidos y algunos fármacos antidepresivos. Igualmente, la interacción con fármacos que estimulan la expresión de CYP3A provoca la caída de los niveles plasmáticos de anticalcineurínicos aumentando el riesgo de rechazo. Un ejemplo claro son los anticonvulsivantes como la fenitoína y el fenobarbital que disminuyen al 50% la biodisponibilidad de CsA **(98)**.

1.4 EVALUACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES COMO PREDICTORES DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO

Mediante este estudio, pretendemos evaluar la relación entre los niveles de distintas moléculas de naturaleza proteica en el periodo post-TC y el fenómeno de rechazo, intentando adquirir un mayor conocimiento del desarrollo de procesos de rechazo agudo del injerto.

Además intentaremos identificar nuevos biomarcadores que nos ayuden a monitorizar el estado del injerto mejorando la capacidad de detectar el riesgo de rechazo y poder valorar su estado funcional sin necesidad de realizar pruebas invasivas como la obtención de biopsias del injerto, práctica en vigor en la actualidad.

INTRODUCCIÓN

Basándonos en trabajos previos mediante la utilización de microarrays de expresión de RNAm de distintos genes sobre muestras de biopsias de trasplantes de riñón y corazón que sufrieron procesos de rechazo agudo del injerto, fueron identificados el producto de 45 genes que se vieron sobre expresados y detectados en sangre en comparación con muestras control procedente de injertos estables **(99)**.

Mediante la cuantificación en suero de las proteínas derivadas de dichos RNAm, se han seleccionado 9 proteínas para estudiar su posible implicación en el rechazo cardiaco y su valor predictivo como biomarcadores en este contexto.

1.4.1 FETUÍNA B

Junto con la fetuína A, forma parte de la superfamilia tipo 3 de las cistatinas **(100)**, son proteínas principalmente de síntesis hepática, constituidas por una cadena polipeptídica de 382 aminoácidos y un peso molecular (pm) de 43 kilodaltons (KDa) **(101)**. La fetuína B y la fetuína A, comparten gran similitud en su estructura, hasta un 28%, suponiendo así que también compartirían funcionalidad **(102,103)**. La fetuína A es considerada un inhibidor endógeno de la calcificación vascular, **(104)** proteína circulante de síntesis hepática que constituye la mayor parte de la banda α -2 del espectro electroforético de las proteínas séricas, la cual formando esferas transitorias coloidales de fetuína, calcio y fosfato, inhiben la precipitación de fosfato cálcico en los tejidos **(105,106)**. Niveles elevados de fetuína A, se asocian con calcificación vascular menos severa, **(107-109)** con una mayor supervivencia y menor incidencia de muerte en individuos con enfermedad vascular por procesos de calcificación **(110-114)**. En estudios realizados con ratones modificados genéticamente, deficientes en fetuína A, aumentaba la expresión de TGF- β , causante del proceso de fibrogénesis, observándose

disfunción cardíaca severa por aumento del remodelado ventricular, inducido por calcificación y fibrosis **(115)**. Además participa en la desactivación de macrófagos como mediador antiinflamatorio y es regulada como reactante negativo de fase aguda **(116)**.

Sin embargo, fetuína B tiene menos capacidad de inhibición de los procesos de calcificación, pues al analizar la estructura proteica, se observó que el dominio de unión al calcio parecía no ser funcional, **(117)** pero está implicada en el metabolismo lipídico y en los procesos de apoptosis **(118,119)**. Investigando la expresión de proteínas en suero mediante un análisis proteómico, en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) y angina de pecho estable, una de las proteínas que se expresaban en gran cantidad en pacientes con IAM en comparación con el resto de pacientes fue la fetuína B **(120)**. La migración de células inmunes hacia la placa de ateroma la predisponen a su rotura formando trombotocitos, **(121,122)** el tratamiento con fetuína B recombinante aumenta la migración de monocitos y macrófagos hacia la placa de ateroma, también eleva la activación de metaloproteasa 2 (MMP-2) en monocitos y la producción de TNF- α e IL-6 por los macrófagos de forma dosis- dependiente con la concentración de fetuína B **(120)**. La adición de fetuína B recombinante sobre la placa de ateroma en la arteria coronaria provocaba aumento de macrófagos y una disminución del colágeno **(120)**. Hay suficientes evidencias que indican que los procesos de calcificación de la placa, pueden contribuir en cierta medida a su estabilización, protegiéndole de su ruptura y formación de trombotocitos **(123-125)**. La administración de fetuína B sobre las arterias de ratón con placa en formación, inducía la ruptura y disminuía la cantidad de colágeno en formación en las células de la musculatura lisa vascular (VSMC), **(120)** la infiltración de células inmunes, monocitos, macrófagos y células T, juegan un papel esencial en el proceso de la formación de la

INTRODUCCIÓN

placa arterioesclerótica. Los monocitos actúan directamente, a través de las MMPs desestabilizando la placa, **(120,126-128)** las MMP-2 implicadas en el proceso de remodelación de la zona lesionada degradando matriz extracelular **(129,130)** y regulando la angiogénesis relacionándose con el espesor de la placa reduciéndole y favoreciendo su ruptura, **(131,132)** también se les relacionó con la diabetes y la hipertensión, factores de riesgo de arteriosclerosis **(133,134)**.

La fetuína B también está implicada en el aumento de la expresión del factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) sobre VSCM, promoviendo la migración quimiotáctica de monocitos y macrófagos e inhibiendo la apoptosis, **(135)** junto con la capacidad de la fetuína B de incrementar el depósito de lípidos y la producción de citocinas proinflamatorias IL-6 y FNT- α en macrófagos debilitando la placa, **(136)** podemos considerar a la fetuína B como biomarcador de inestabilidad de la placa de ateroma y fallo cardíaco **(120)**.

1.4.2 GALECTINA-3

La galectina-3 (Gal-3), pertenece a la familia de las galectinas, proteínas involucradas en numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos, como la inflamación y la fibrosis, principales eventos de contribución al desarrollo y progresión de la patología cardíaca **(137)**. Se observa sobre-regulación de Gal-3 en pacientes con hipertrofia cardíaca y estenosis aórtica, también en individuos con patología cardíaca tanto crónica como aguda, **(138,139-141)** así como en procesos fibróticos en riñón, hígado y corazón **(138,142-145)**. Las galectinas forman parte de una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución, capaces de descifrar glicocódigos específicos en macromoléculas complejas en las membranas celulares y

en la matriz extracelular, **(146-148)** a través de un dominio carboxi-terminal de 130 aminoácidos denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos, y a través de su dominio amino-terminal, rico en prolina, glicina y tirosina interacciona con polipéptidos y polinucleótidos, tales como receptores de superficie en macrófagos y moléculas extracelulares como el colágeno **(137, 149)**.

Gal-3 se clasifica en el subgrupo de las galectinas conocidas como *chimera-type*, en función de su estructura, es el único miembro de este grupo, con un pm de 29 a 35 KDa **(137, 150)**.

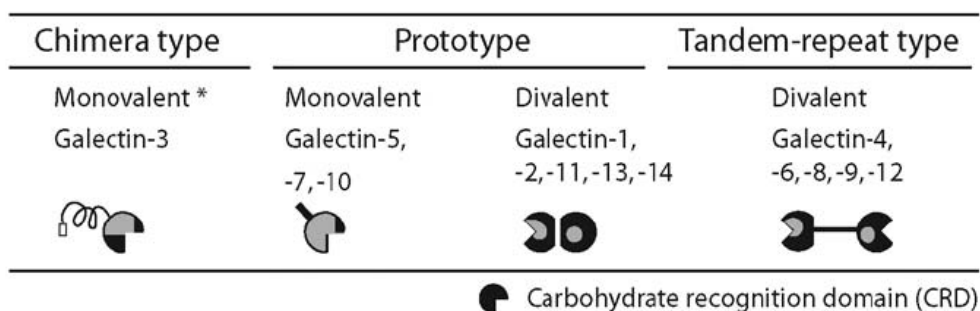


Figura 15: Estructura familia de las Galectinas. European journal of Heart. 2009; 11: 811-17

Esta galectina está presente en gran cantidad de tipos celulares y tejidos, **(137)** se localiza principalmente en el citoplasma y de forma ocasional en el núcleo y en la mitocondria, también está presente en la matriz extracelular al ser secretada por los macrófagos **(145)**.

En las células cardíacas, en condiciones normales su representación es muy baja, mediante técnicas de microscopía e inmunohistoquímica, es localizada en miocardio hipertrófico de ratón, en macrófagos cardíacos activados y en matriz extracelular **(138, 151)**. En los macrófagos ha sido localizada en los fagosomas, siendo necesaria para desarrollar la actividad fagocítica, la maduración y la migración de los macrófagos al

INTRODUCCIÓN

tejido dañado de forma correcta, el aumento de su expresión en dichas células favorecen su infiltración en el tejido cardiaco hipertrófico **(138, 143, 152, 153)**. Gal-3 interacciona con ligandos localizados en la matriz extracelular, incluyendo laminina y colágeno, utilizando como vía de comunicación la integrina- β_1 entre el citoplasma y la matriz extracelular **(154, 155)**. El aumento de Gal-3 en macrófagos es anterior al fallo cardiaco, ya que, la infusión de Gal-3 recombinante induce el aumento de la activación de macrófagos productores de más Gal-3 **(156)**. Además, interaccionando con el receptor de membrana CD32, tiene la capacidad de inhibir la transcripción de ciertas interleucinas en las células T, promoviendo una desviación hacia una respuesta citotóxica Th1, **(157)** además de tener propiedades mitógenas y antiapoptóticas **(158, 159)**. Se han encontrado niveles elevados de Gal-3 en nódulos murinos de fibrosis hepática, localizada en fibroblastos en proliferación **(144)**, la adicción de Gal-3 recombinante provoca un aumento del colágeno, propiciando el proceso fibrótico, **(138)** esta inducción de la fibrósisis a través del aumento del depósito de colágeno se desarrolla mediante la activación de la vía de la ciclina D1 **(138, 155)**. La secreción de Gal-3 en la membrana extracelular provoca un aumento de la expresión de proteínas del citoesqueleto como la actina del músculo liso, marcador de fibrosis intracelular y de colágeno tipo I, marcador extracelular de fibrosis, **(143-145, 160)** participando en el proceso de remodelado cardiaco, observándose que el bloqueo de Gal-3 revierte de forma efectiva el proceso de remodelado cardiaco erróneo y que infra-regula el proceso de destrucción de matriz extracelular vía MMPs favoreciendo la fibrosis **(161)**.

Así pues, podríamos considerar a Gal-3 como un potencial biomarcador asociado a la inflamación y a la fibrosis que predice una evolución adversa relacionada con la renovación de matriz extracelular en los procesos de insuficiencia cardiaca **(162)**.

1.4.3 APOLIPOPROTEÍNA A1 (APOA1)

Se sintetiza principalmente en el hígado, es el principal componente de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y participa en la eliminación de los lípidos de los tejidos. Tiene propiedades ateroprotectoras **(163)**. También tiene efectos antiinflamatorios, antitrombóticas y vasodilatadoras **(164)**. Constituye el 70% del HDL, con un pm de 28 kDa y está constituida por 243 aminoácidos. En el extremo carboxi-terminal se observa una configuración proteica de α -hélice anfipática que le confiere la capacidad de unir moléculas lipídicas de forma intercambiable **(165,166)**. Está implicada en la eliminación de fosfolípidos y colesterol a través de ABCA1, transportador de membrana que interviene en la transferencia de lípidos desde las células, y que se expresa en macrófagos y CMLV, previniendo la formación de células espumosas **(167,168)**. HDL activa a Lcat que esterifica el colesterol libre sobre HDL y lo transporta hacia el hígado para su eliminación **(169)**.

La modificación de la HDL ApoA1, con alteración de su función sobre la placa, podría hacerle perder su capacidad antiaterogénica, impidiendo así su función de estabilización de la placa de ateroma y de inhibir la actividad pro-inflamatoria de los macrófagos **(170)**, convirtiéndose en inmunogénica creando nuevos epítomos induciendo respuesta inmune y síntesis de anticuerpos anti ApoA1 **(171)**.

Se ha observado un aumento de anticuerpos anti anti ApoA1, correlacionándolo con mayores niveles de inflamación en pacientes con IAM y mayor oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) **(172,173)**. En pacientes con estenosis carotídea grave, el aumento de anti ApoA1 se correlacionaron con el recuento de macrófagos y neutrófilos intraplaca y MMP-9 e

inversamente proporcional con el contenido de colágeno en la placa carotídea, desestabilizándola y generando efectos proaterogénicos y pro-inflamatorios **(174)**.

Podríamos considerar que el aumento en la titulación de anticuerpos anti ApoA1 podía predecir eventos cardiovasculares como el infarto de miocardio **(175,176)**.

1.4.4 QUIMIOCINAS

Son una familia de citocinas quimiotácticas de bajo pm, entre 8-17 KDa, que provocan respuesta de migración celular dirigida, inducidas a su vez por citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y patógenos. Se agrupan en 4 subfamilias en función de la posición de las dos primeras cisteínas próximas al extremo amino-terminal **(177,178)**.

En función de estas características los distintos grupos son: CXC, CC, CX3C y XC, se conocen hasta 50 quimiocinas distintas que reconocen 19 receptores celulares, ya que, un mismo receptor puede reconocer distinta quimiocina. Cualquier tipo celular puede expresar quimiocinas o sus receptores **(179)**. La expresión de estos receptores depende del tipo celular, de la presencia de hipoxia local, de citocinas inflamatorias y de la fase de diferenciación de la célula en cuestión **(178)**. La unión de las quimiocinas a sus receptores sobre la superficie celular, implica la activación de varias vías de señalización y reorganización del citoesqueleto favoreciendo la formación de pseudópodos que permiten el movimiento de la célula **(180)**.

En relación con la angiogénesis, la mayoría de las quimiocinas CXC con dominios “glu-leu-arg” en su secuencia, poseen efecto angiogénico, no obstante, CXCL4 y CXCL9 cuyo receptor es CXCR3 tienen acción antiangiogénica **(177)**. En cuanto a la respuesta inmune, CXCL4 mediante la interacción sobre su receptor CXCR3B (Variante del

receptor genérico CXCR3) induce la producción por células T de citocinas TH2 como IL-2, IL-5 o IL-13 **(181)**.

1.4.4.1 CXCL4

Es una quimiocina sintetizada en los megacariocitos y almacenada en los gránulos- α de las plaquetas y liberada tras la activación de las mismas. Posee una gran actividad antiangiogénica, tanto in vitro como in vivo. En el proceso de la angiogénesis, las integrinas son las moléculas de adhesión más representativas, y CXCL4 se une a las $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ integrinas presentes en la superficie de las células endoteliales y altamente expresadas durante la angiogénesis, esta interacción postula a CXCL4 como inhibidor de la angiogénesis **(182)**.

1.4.4.2 PÉPTIDO ACTIVADOR DE NEUTRÓFILOS (NAP-2)

Quimiocina presente en los gránulos- α de las plaquetas con un papel muy importante en la regulación de la inflamación también conocido como tromboglobulina- β **(183,184)**. Se ha observado que NAP-2 se comporta como un inductor quimiotáctico de monocitos y neutrófilos, y activa los procesos de degranulación neutrofílica en pacientes con enfermedad coronaria aguda **(185,186)**. Según estudios realizados, niveles elevados de NAP-2 y de CXCL4 aumentan entre 2 y 3 veces el riesgo de sufrir un IAM **(187)**.

1.4.4.3 CXCL9

Quimiocina con propiedades quimiotácticas que juega un papel importante en el reclutamiento de células NK y células T cooperadoras Th1.

También participa de forma activa como inhibidor de la angiogénesis **(188,189)**. Este efecto ha sido demostrado en distintos estudios realizados con células tumorales

INTRODUCCIÓN

donde se observaba una correlación entre el descenso de la expresión de CXCL9 y un aumento notable de la agresividad tumoral en forma de la aparición de procesos metastásicos **(190-192)**. La expresión de CXCL9 es inducida por INF- γ de forma específica, así pues, la disminución de la expresión de esta quimiocina aumenta la resistencia tumoral ante una respuesta inmune mediada por células T **(193-195)**.

1.4.5 CD14

Glicoproteína de aproximadamente 55 KDa con múltiples repeticiones ricas en leucina, se une a la membrana celular de monocitos y macrófagos a través de un anclaje de glicosil-fosfatidil-inositol y debido a su abundancia en monocitos es utilizada como marcador inmunohistoquímico de éstos. CD14 es un receptor de patrón de inmunidad innata y de lipopolisacárido (LPS) bacteriano, también se expresa en células endoteliales **(196-198)**.

Los monocitos migran desde la sangre hacia los tejidos dañados y una vez allí producen citocinas inflamatorias y fagocitan células apoptóticas y moléculas tóxicas diferenciándose en macrófagos **(199, 200)**. Además son el nexo de unión entre la respuesta inflamatoria innata y la adquirida, en la que intervienen las células T, también constituyen uno de los mediadores inmunológicos más importantes del remodelado vascular, tanto a nivel fisiológico como patológico **(201, 202)**. Las distintas subpoblaciones de monocitos se han caracterizado por la expresión en superficie de distintos marcadores, uno de ellos es CD14, receptor de LPS entre otros **(201)**. Estas células CD14⁺ representan entre el 90 y 95% de los monocitos periféricos en individuos sanos, encargándose de eliminar neutrófilos apoptóticos **(202)**, una vez activados adquieren la expresión del marcador CD16⁺ aumentando su capacidad de liberar

citocinas y presentar antígenos **(203-205)**. En los últimos años diversos estudios han descrito el papel crucial de los monocitos infiltrados en la progresión del proceso fibrótico **(206-211)**. La población de macrófagos residentes en los tejidos se renueva constantemente por la aportación de monocitos de sangre periférica **(210,212)**. Durante la progresión de la fibrosis en un modelo murino, los macrófagos derivados de monocitos producen citocinas que favorecen la cronificación del proceso inflamatorio y activan la proliferación y diferenciación a miofibroblastos productores de colágeno **(208, 209, 211)**.

Los monocitos son considerados como las células que juegan un papel clave en el proceso de aterogénesis, y la transición a macrófago el paso inicial del proceso **(213)**, siendo el tipo de células inmunes más abundante en la placa de ateroma dirigiendo la inflamación en la arteriosclerosis **(214)**. Los monocitos CD14⁺ circulantes se han relacionado con la arteropatía coronaria y su progresión, infiltrándose y diferenciándose a macrófagos en las capas endoteliales y produciendo calcificación **(215,216)**. Se han reportado informes en los que se correlaciona el número de monocitos CD14⁺ circulantes con estenosis aórtica y una relación inversa de monocitos apoptóticos y el área de la válvula aórtica **(217)**, el alto número de monocitos / macrófagos encontrados en la válvula estenótica, sugiere su contribución al proceso de estenosis y calcificación, independientemente de la edad, también hay estudios recientes que vinculan a los monocitos CD14⁺ con el SCA **(217,218)**.

1.4.6 CD31

Es una molécula de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas (Ig) identificada en plaquetas, leucocitos y células endoteliales. Formada por un extremo-amino terminal

INTRODUCCIÓN

constituido por 22 aminoácidos, seguido de 6 dominios tipo Ig, 19 aminoácidos transmembrana y una cola intracitoplasmática con dos motivos tirosin-quinasa inhibitorios (**219,220**) que juega un papel importante en la inmunomodulación de la respuesta inmune innata y adaptativa (**221,222**).

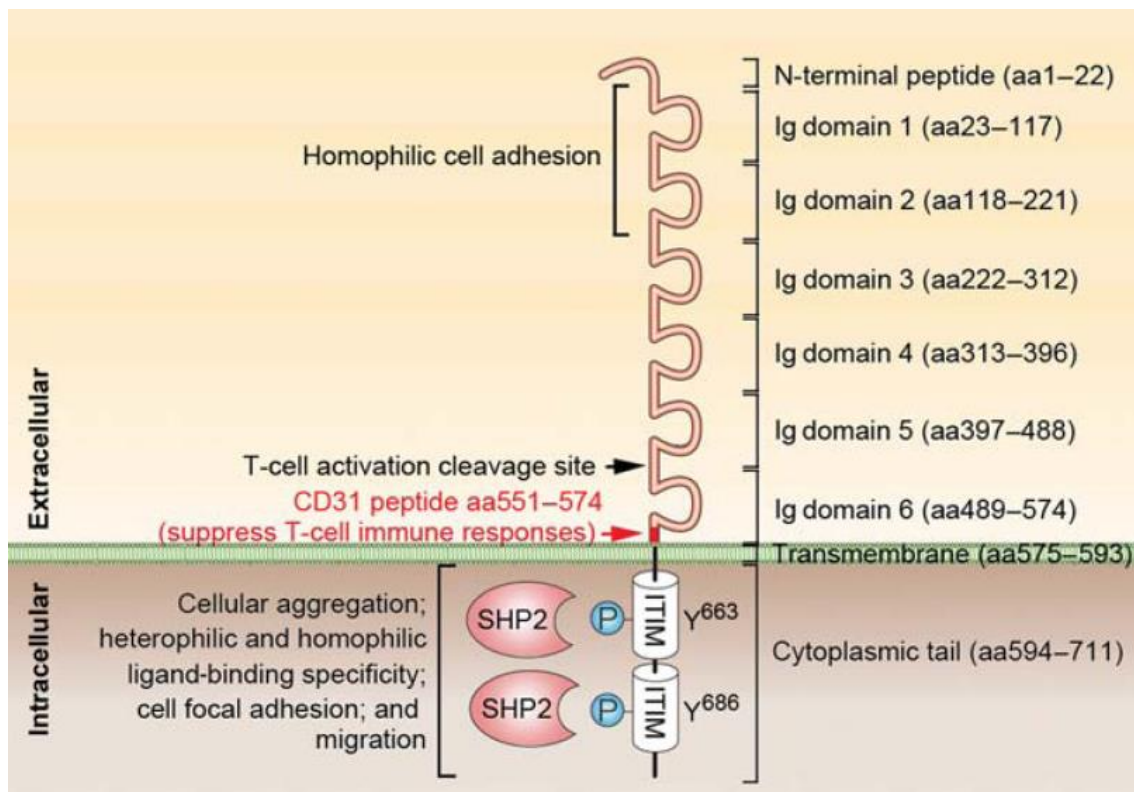


Figura 16: Estructura y función de CD31 (220).

CD31 se comporta como un inhibidor de la activación de células T, plaquetas y de la angiogénesis. La ausencia de señalización por parte de esta molécula intensifica la actividad de las células T favoreciendo su infiltración en las arterias ateroscleróticas contribuyendo al desarrollo de la placa (**223**), la ausencia de expresión sobre la superficie de las células T les hace hiperreactivas (**224**). La pérdida con la edad de CD31 en la superficie de las células T, aumenta el riesgo de trombosis, observándose también esta pérdida en pacientes con aneurisma de aorta (**225,226**).

Se ha observado también una reducción de la expresión de CD31 sobre monocitos activados en pacientes en fase aguda de SCA, relacionando este hallazgo con la inestabilidad de la placa de ateroma. Así pues, CD31 podría ser considerado como un biomarcador de subpoblaciones celulares en pacientes con SCA, en los cuales el proceso inflamatorio juega un papel primordial en este proceso patológico **(224)**.

1.4.7 CD44

Glicoproteína de membrana presente en gran cantidad de tejidos y con múltiples funciones, perteneciente al grupo de las moléculas de adhesión. Tiene un pm aproximado entre 80-100 KDa. En función del patrón de glicosilación que siga en su procesamiento se generan distintas isoformas. El dominio carboxi-terminal es intracitoplasmático y está interaccionando con el citoesqueleto celular, el dominio amino-terminal, de localización extracitoplasmática cuyos principales ligandos son hialuronato, laminina, fibronectina y colágeno participando en la migración celular **(227)**. Está ampliamente distribuido en linfocitos, monocitos y granulocitos, participando en distintos procesos como el reconocimiento de citocinas, procesos de proliferación, diferenciación y migración celular y en la angiogénesis **(228)**. En estudios realizados sobre modelos de ratón, se observa un aumento de la expresión de CD44 en presencia de estímulos de hipoxia celular **(229)**.

Está presente en monocitos y en células del endotelio vascular, cuyo aumento indica formación y regeneración de vasos sanguíneos en tejido miocárdico tras un IAM **(230,231)**. CD44 interacciona con el factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), sintetizado de forma constitutiva por células B, T, monocitos, macrófagos y neutrófilos, y almacenado en su interior presentando una gran actividad pro inflamatoria

INTRODUCCIÓN

(232,233). Así pues, CD44 como co-receptor de MIF es capaz de transmitir señal, generando una respuesta pro-inflamatoria y anti-apoptótica **(234,235)**, se ha observado en numerosos estudios que el bloqueo de CD44 produce una disminución de células inflamatorias en la lesión, entre ellas los macrófagos y se promueve los procesos apoptóticos **(236-238)**.

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad según el registro de la ISHLT, en el mundo se realizan alrededor de 6000 intervenciones quirúrgicas de TC con una contribución española en 299 trasplantes en 2015. La infección es la segunda causa de muerte en estos pacientes, seguido del rechazo del injerto. Si estratificamos en función del tiempo transcurrido desde la operación, el fallo agudo del injerto supone el 50% de las causas de muerte a lo largo del primer mes, y la infección la causa más frecuente de mortalidad durante el primer año del TC **(2)**.

Suponiendo que el paciente, previamente al trasplante no manifiesta alteraciones significativas de su sistema inmunológico, debemos pensar que la alteración del estado de inmunocompetencia de estos sujetos se debe en gran medida a la terapia inmunosupresora que se realiza en el TC y por el propio procedimiento del trasplante. Aunque resulte extraño, hay muy pocos trabajos que estudien el estado de competencia inmunológica de estos sujetos y no es habitual encontrar en la literatura científica trabajos que vinculen la alteración de los parámetros inmunológicos y bioquímicos estudiados en esta tesis con el estado clínico del tipo de pacientes propuestos en este estudio que permitan una monitorización más adecuada del estado de inmunocompetencia o inmunosupresión de los mismos.

Dado que la infección y el rechazo, son considerados factores de riesgo independientes en el TC, el estudio de la variabilidad de los parámetros estudiados a lo largo del tiempo en el entorno clínico del TC, podría ser clave para encontrar asociación entre la variación del valor de parámetros que son determinados de forma habitual y de rutina en los laboratorios de la red pública de hospitales, con un aumento del riesgo de desarrollo de un episodio de infección grave o rechazo del injerto. De esta forma sería

JUSTIFICACIÓN

posible identificar biomarcadores potencialmente útiles para predecir la aparición de estos eventos, lo que nos permitiría actuar con anterioridad al desarrollo de alguno de ellos de la forma más oportuna disminuyendo así la morbimortalidad en este tipo de pacientes.

Por otro lado es de especial interés la valoración de parámetros altamente reproducibles, de bajo coste y ampliamente disponibles para garantizar el aspecto traslacional de la investigación.

Esta tesis propone distintos parámetros como biomarcadores de riesgo de infección y rechazo, junto con varias escalas de riesgo que podrían ser evaluadas posteriormente en estudios multicéntricos para su validación antes de su propuesta definitiva para uso clínico a la cabecera del paciente.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

“Los niveles de fármacos inmunosupresores se correlacionan con los valores en sangre periférica de los parámetros inmunológicos y bioquímicos determinados en los pacientes de trasplante cardiaco.”

“Las alteraciones bioquímicas e inmunológicas halladas en el contexto del trasplante cardiaco se pueden asociar al riesgo de desarrollo de infección y rechazo.”

3.2 OBJETIVOS

1. Descripción en la cohorte analizada de la cinética y variabilidad de los niveles de fármacos inmunosupresores, desde el momento del trasplante hasta el año después del trasplante cardiaco.
2. Descripción de la cinética y variabilidad de los parámetros inmunológicos y bioquímicos, determinados para evaluar la capacidad inmunológica desde el momento del trasplante hasta un año después del mismo.
3. Evaluación de la correlación existente entre los niveles de fármacos anticalcineurínicos y micofenolato con los niveles de los distintos parámetros que evalúan la respuesta celular y humoral del paciente trasplantado.
4. Evaluación de la asociación existente entre los niveles de fármacos anticalcineurínicos y micofenolato, con otros parámetros bioquímicos e inmunológicos con distintas complicaciones clínicas del trasplante, como el desarrollo de infecciones y rechazo del injerto.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. Identificación de escalas (*Score*), mediante el análisis estadístico de variables bioquímicas e inmunológicas más relevantes para la identificación de los pacientes con un mayor riesgo de sufrir un evento de infección grave o rechazo del injerto.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los aspectos ético-legales planteados por el presente estudio fueron sometidos a la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital

General Universitario Gregorio Marañón (H.G.U.G.M), que aprobaron su participación.

De igual forma, a todos los pacientes se les solicitó un consentimiento informado para participar en el estudio y publicar los datos obtenidos.

El proyecto se plantea como un estudio observacional prospectivo, para la determinación de biomarcadores, analizando el comportamiento de distintos parámetros bioquímicos y los parámetros que monitorizan la respuesta inmune celular y humoral, así como, su asociación con un mayor riesgo de sufrir eventos infecciosos graves y de rechazo del injerto, en pacientes trasplantados de corazón.

Para ello se estudió de forma prospectiva una cohorte de 109 pacientes con cardiopatía grave que entran en lista de espera para TC, los cuales finalmente fueron sometidos a trasplante entre los años 2003 y 2009 en la Unidad de Trasplante Cardíaco del H.G.U.G.M, Madrid, hospital de tercer nivel. El equipo médico estaba constituido por un grupo multidisciplinar compuesto por 2 cardiólogos con más de 10 años de experiencia en TC, anestesiología, microbiología e inmunología, con experiencia en TC desde 1988 y 320 intervenciones llevadas a cabo.

Se excluyeron del estudio los pacientes con inmunodeficiencia primaria conocida, con infecciones activas, con patología que cursa con pérdida de componente proteico o que hayan recibido terapia inmunosupresora durante los seis meses previos al trasplante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios inmunológicos y bioquímicos, se realizaron sistemáticamente en los siguientes tiempos:

Pre- trasplante cardiaco (pre-TC), las muestras fueron obtenidas cuando el paciente entró en lista de espera de trasplante o en el periodo inmediatamente antes del trasplante, a los 7 días de realizado el trasplante, a los 30 días, 90 días, 180 días y al año post-trasplante cardiaco. La monitorización de los fármacos inmunosupresores se realizó en C₀ (12 horas tras la toma del fármaco).

En la tabla 3 se muestran las características clínicas y demográficas de los pacientes trasplantados incluidos en el estudio prospectivo.

Tabla 3: Características clínicas y demográficas de los pacientes trasplantados incluidos en el estudio prospectivo.

Sexo masculino (n, %)	79, (72.4%)
Edad (años)	53.06 +/- 10.89
Infección previa (n, %)	9 (8,3%)
Pacientes con infección en el año del TC (n, %)	46, (42.2%)
Pacientes con infección en los 90 días del TC (n, %)	40, (36.6%)
Virales (n, %)	11, (10.0%)
Fúngicas (n, %)	9, (8.2%)
Parasitarias (n, %)	2, (1.8%)
Bacterianas (n, %)	18, (15.5%)
Pacientes con rechazo celular agudo en el año del TC (n, %)	20, (18.3%)
Pacientes con rechazo celular agudo en los 90 días del TC (n, %)	14 (12.8%)
Retrasplante cardiaco (n, %)	7 (6.4%)
Mortalidad (n, %)	13 (11.9%)
Disfunción renal (n, %)	16 (14.7%)
Diabetes (n, %)	8 (7.5%)
Hipercolesterolemia (n, %)	46 (42.2%)
Hiperbilirrubinemia (n, %)	24 (22%)
Tratamiento de inducción	103 (95.4%)
TC urgente (n, %)	77 (71.3%)
Fallo primario del injerto (n, %)	37, (33.9%)

La terapia inmunosupresora utilizada en el TC en nuestro centro, administrada a todos los pacientes incluidos en el estudio, consta de dos fases:

Fase de inducción, de administración intravenosa que consta de dos dosis de daclizumab (anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD25, cadena alfa receptor de la interleuquina-2 (1mg/Kg a día cero y a día 14), metilprednisolona (500 mg IV) y micofenolato (1000 mg IV).

Fase de mantenimiento, de administración oral, administrada a las 48 horas del trasplante, que incluye, prednisona, micofenolato y un inhibidor de la calcineurina, ciclosporina A (n=33) o tacrolimus(n=66).

Como tratamiento profiláctico, en periodo post-TC inmediato se administró ganciclovir IV 5mg/Kg c/12h durante 14 días, cefazolina 2gr IV c/8h el primer día post-TC trimetoprim-sulfametoxazol 160/800 mg vía oral(VO) /12h dos veces por semana durante el primer año, nistatina 500.000 U VO /8h y norfloxacin 400mg VO /12h a lo largo del primer mes posterior al trasplante e itraconazol en aquellos individuos con riesgo de aspergilosis

4.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

De cada participante en el estudio, se recogieron muestras de sangre periférica en cada uno de los puntos de estudio propuestos.

Se obtuvieron 10 mL de sangre total, tratados con ácido etilen diamino-tetraacético (EDTA) de Greiner bio-one, como agente anticoagulante, para realizar la titulación de las células sanguíneas: leucocitos totales y sus sub poblaciones, neutrófilos y linfocitos, de forma absoluta y porcentual. También se determinaron los niveles de fármacos inmunosupresores, CsA, FK y MMF.

Se recogen 10 mL en tubos con heparina de sodio (Greiner bio-one) a partir de los cuales se obtiene el suero de la muestra mediante técnicas de centrifugación (3500

MATERIALES Y MÉTODOS

revoluciones por minuto durante cinco minutos), para la determinación de los distintos parámetros séricos bioquímicos e inmunológicos.

En un tubo de 5 mL se recoge sangre total en tubos anticoagulados con EDTA para el marcaje de moléculas de superficie con distintos anticuerpos monoclonales específicos y conjugados con fluorocromos para la caracterización fenotípica de las subpoblaciones linfocitarias.

4.3 PRINCIPIOS DE LA METODOLOGÍA

4.3.1 CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF)

La CMF es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en pulsos electrónicos que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Estos parámetros son:

- Parámetros relacionados con características intrínsecas de la célula, como su tamaño (FSC) y la complejidad de su núcleo y citoplasma (SSC).

- Parámetros relacionados con características antigénicas de cada célula, generalmente estudiando la expresión en membrana de marcadores de diferenciación linfocitaria conjugados con un fluorocromo que emite una longitud de onda conocida cuando es excitado por el haz de láser. La combinación de marcadores linfocitarios recibe el nombre de inmunofenotipo.

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos:

a) Señales de dispersión: La dispersión resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad. En los citómetros de flujo se miden dos fracciones de dispersión:

-La luz dispersada en ángulo cónico pequeño ($0-10^\circ$) que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.

-La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula.

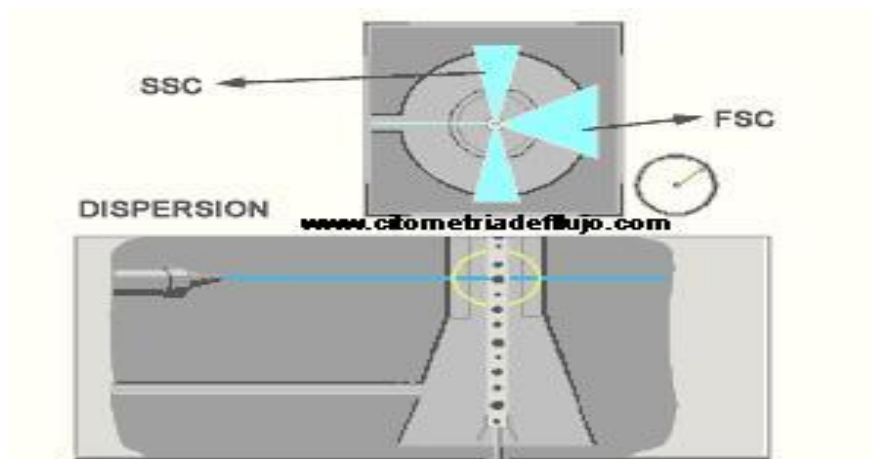


Figura 17: Esquema señales de dispersión en citometría de flujo. Fuente gráfica, Becton Dickinson

MATERIALES Y MÉTODOS

b) Señales de Fluorescencia: Un fluorocromo es una molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda (energía) y emite a una longitud superior (menor energía). El espectro de absorción o excitación es el rango sobre el que un fluorocromo absorbe luz, y el espectro de emisión es el rango sobre el que un fluorocromo emite luz. Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante. Debido a que parte de la energía se utiliza para la absorción, la luz emitida es de menor energía que la luz de excitación, es decir la longitud de onda emitida es mayor. La diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión se denomina *Stokes shift*. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos antígeno-anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula **(239,240)**.

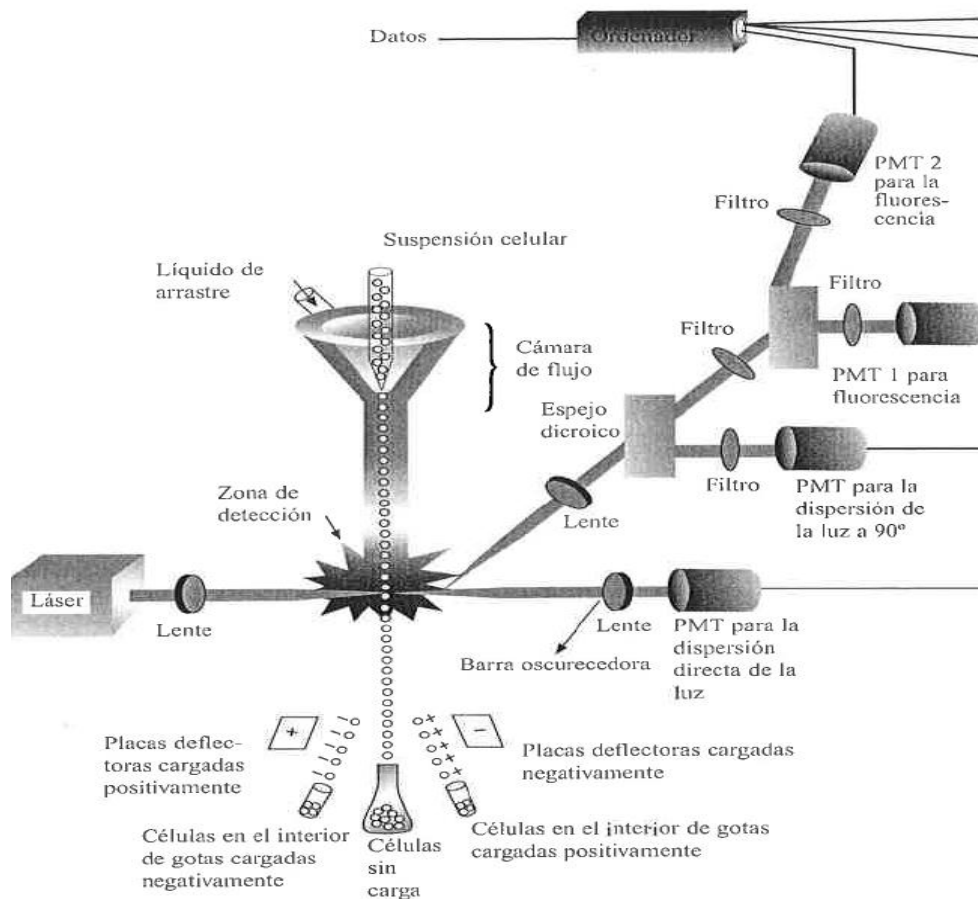


Figura 18: Componentes de citómetro de flujo y separador de células. Ward KM, Lehmann CA, Leiken AM: Clinical Laboratory Instrumentation and Automation; Principles, Applications, and Selection. Filadelfia, WB Saunders Company 1994.

4.3.2 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (EIA)

Son técnicas inmunoquímicas cuantitativas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo utilizando las propiedades catalíticas de las enzimas para detectar y cuantificar las reacciones inmunológicas, midiendo así la actividad del enzima marcador. Son susceptibles de marcar tanto antígenos como anticuerpos. Tras la formación del inmunocomplejo, se añade un sustrato que es catalizado por el enzima transformándose en un compuesto coloreado lo que permite la medida de la actividad enzimática con un espectrofotómetro (239).

MATERIALES Y MÉTODOS

Una sola molécula de enzima puede catalizar la conversión de millones de moléculas de sustrato en producto, esta capacidad de amplificación hace posible detectar la presencia de una pequeña cantidad de enzima y de inmunocomplejos formados.

La señal generada por la enzima puede ser la aparición de un producto o la desaparición de un sustrato de la reacción catalizada. Estas enzimas deben de tener unas características para poderse usar como marcador en un inmunoanálisis:

Fáciles de obtener con un alto grado de pureza y a bajo coste, poseer un alto recambio enzimático (mucho sustrato transformado por unidad de tiempo), ser solubles, tener actividad específica elevada, estabilidad en las condiciones del ensayo, ser de medición rápida, sensible y sencilla, no perder actividad con la conjugación y no encontrarse en el medio en que se va a medir su actividad, ni ser inhibida por sustancias presentes en los líquidos biológicos.

Las principales enzimas utilizadas en los EIA son la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la α -galactosidasa.

Las enzimas se conjugan con el antígeno o el anticuerpo mediante distintos tipos de estrategias, en cualquier caso al acoplar el enzima debe tenerse especial cuidado para no destruirla o hacer que pierda actividad, suele realizarse en un lugar separado del lugar inmunogénico.

Para la determinación de la actividad del enzima marcador se utilizan distintos sustratos, aquellos que producían productos fácilmente medibles por espectroscopia de absorción molecular o mediante sustratos que se transforman en compuestos fluorescentes o luminiscentes, aumentando la sensibilidad del ensayo.

La actividad enzimática puede determinarse por métodos de punto final o métodos cinéticos. En los primeros una vez producida la inmunoreacción se añade el sustrato y se realiza una incubación durante un tiempo constante, se detiene la reacción y se mide la absorbancia, que es equivalente a la cantidad de producto formado, dicha cantidad es directamente proporcional a la de enzima.

En los métodos cinéticos, una vez producida la inmunoreacción se añade el sustrato y se va determinando la variación de la absorbancia con el tiempo, que está relacionada con la cantidad de enzima presente. La sensibilidad del enzimoimmunoensayo puede aumentarse mucho amplificando la actividad enzimática, haciendo que el producto de la enzima marcadora sea el sustrato de una segunda enzima que genere a su vez gran cantidad de producto. Un ejemplo es el sistema formado por la fosfatasa alcalina y la lactato deshidrogenasa o el sistema biotina-streptoavidina **(240)**.

La medición del analito en un inmunoensayo se logra usando tanto un formato competitivo como uno no competitivo.

En los formatos competitivos, el analito sin marcar (generalmente antígeno) en la muestra se mide por su capacidad para competir con un antígeno marcado en el inmunoensayo. El antígeno sin marcar bloquea la capacidad del antígeno marcado de unirse puesto que ese punto de unión en el anticuerpo ya se encuentra ocupado, en un inmunoensayo competitivo, el hecho de que se mida menos señal en el ensayo significa que hay más antígeno presente. La concentración de antígeno en la muestra es inversamente proporcional a la concentración de señal que se mide en el formato competitivo. Tanto el antígeno marcado, como el antígeno sin marcar presente en la muestra compiten por una cantidad limitada de anticuerpo.

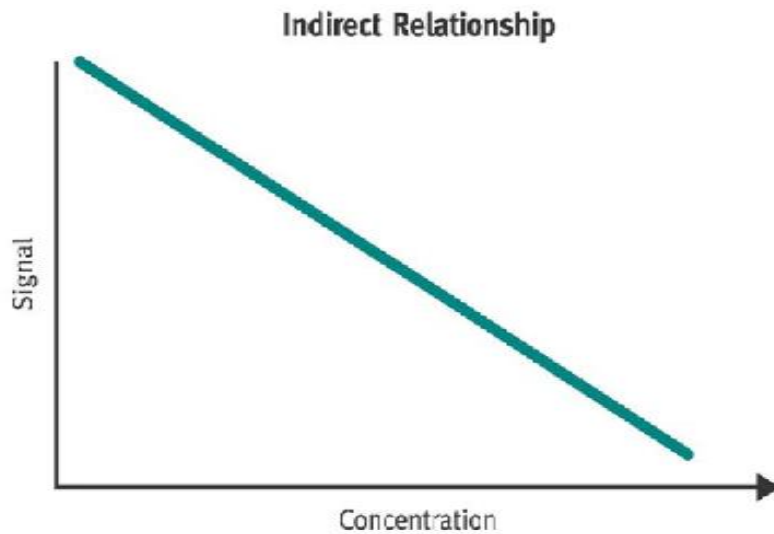


Figura 19: Relación entre la señal y la concentración del analito en un inmunoensayo competitivo.

Los formatos de ensayo no competitivos, se lo conoce como ensayo *sándwich*, ya que el analito está unido entre dos reactivos de anticuerpo muy específicos. Se utilizan dos anticuerpos distintos contra determinantes específicos distintos para el mismo antígeno, permitiendo que ambos se puedan unir al mismo antígeno por distinto sitio. Tenemos un anticuerpo ligado a una fase sólida que se encuentra en exceso de forma que todo nuestro antígeno, (molécula a medir) reaccione con ellos quedando inmobilizada, se lava para eliminar moléculas sin interés no unidas y se añade un exceso de anticuerpos marcados con enzima los cuales se unen al antígeno del complejo inmobilizado por otro determinante antigénico distinto, tras un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo marcado no unido, se añade el sustrato y se cuantifica la reacción. La formación de producto en este caso es directamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra. Los formatos de ensayo no competitivos generalmente proporcionan el nivel más alto de sensibilidad y especificidad del ensayo **(239,240)**.

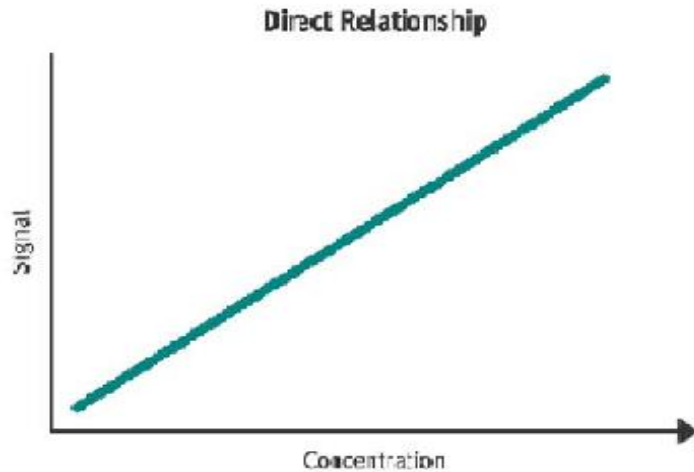


Figura 20: Relación entre la señal y la concentración del analito en un inmunoensayo no competitivo.

Los EIA se dividen en dos tipos en función del procesamiento previo a la medición de la actividad enzimática.

EIA homogéneos, no requieren la separación de las fracciones ligadas y libre resultantes de la reacción inmunológica, la incubación y la medida pueden tener lugar en la misma cubeta de reacción. En este tipo de ensayos el antígeno (hapteno) se acopla a la enzima y se utiliza la interacción anticuerpo-antígeno para inhibir, impidiendo el acceso del sustrato al centro activo anulando la actividad enzimática. A mayor concentración de la molécula problema, menor cantidad de antígeno marcado se unirá al anticuerpo, quedando mayor cantidad de antígeno marcado libre con el enzima activo midiéndose mayor actividad, sin necesidad de separar fracciones.

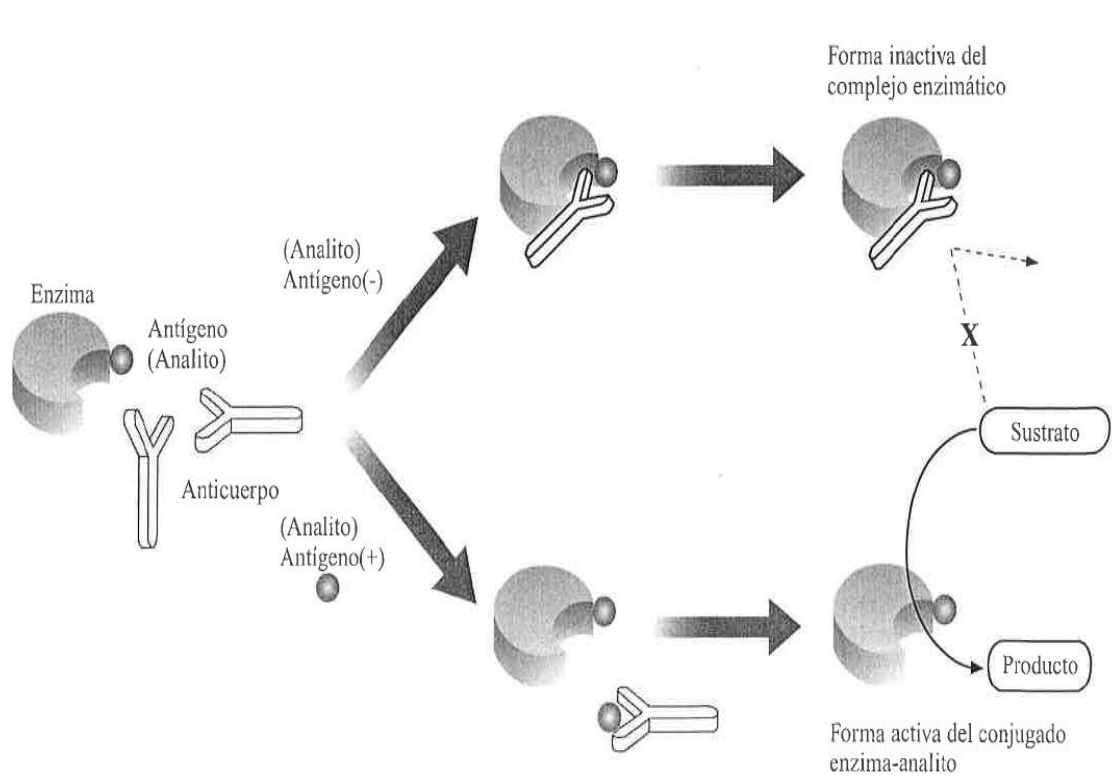


Figura 21: EIA homogéneo. Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA: *Immunochemical Assay and Biosensor Technology for the 1990s*. Washington, DC, American Society for Microbiology, ASM Press, 1992.

EIA heterogéneo, se requiere la separación de las fracciones libre y ligada tras la reacción inmunológica antes de determinar la actividad enzimática, pues la enzima se comporta análogamente en ambas fracciones. El antígeno de la muestra problema y el marcado compiten por el anticuerpo, cuanto mayor sea la cantidad de antígeno presente en la muestra, mayor cantidad de antígeno marcado se quedará sin unirse al anticuerpo. Se separan los complejos antígeno marcado-anticuerpo y antígeno sin marcar-anticuerpo y se añade el sustrato del enzima. La actividad será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

Las principales técnicas utilizadas para separar las fracciones ligada y libre son, la precipitación química, utiliza compuestos como etanol o sulfato de amonio, los cuales

alteran la solubilidad de las proteínas, provocando la precipitación de los complejos ligados, tras una centrifugación queda la fracción libre en el sobrenadante y se elimina.

También se utiliza la precipitación inmunológica que utiliza un segundo anticuerpo frente al primero generando un complejo de gran tamaño insoluble y fácilmente precipitable. Tras centrifugar desecharmos la fracción libre del sobrenadante. Otro método es la adsorción, utilizando materiales como el carbón activado que se une específicamente a la fase libre y no a los complejos que quedan en solución. Tras centrifugación la fase ligada quedará en el sobrenadante. En la actualidad la mayoría de los inmunoanálisis heterogeneos utilizan los soportes sólidos para separar ambas fracciones, que consisten en inmovilizar el anticuerpo a un soporte sólido como bolas de vidrio, micropartículas magnéticas o sobre la propia pared del tubo, en este caso la separación se consigue simplemente aspirando el medio de incubación **(240)**.

4.3.3 INMUNOENSAYO DE POLARIZACIÓN FLUORESCENTE (FPIA)

El origen de este ensayo radica en la emisión de luz a distintas longitudes de onda con distintas orientaciones espaciales al azar, desde una lámpara de tungsteno. Dicha radiación se filtra y solo atraviesan radiaciones de longitud de onda de 490 nanómetros (nm), la cual a su vez atraviesa un polarizador de cristal líquido para producir un rayo de luz polarizada plana que será el que incida sobre la muestra.

Se basa en la cantidad de luz fluorescente polarizada que se detecta cuando el trazador o sustancia unida a un compuesto fluorescente (fluoróforo), se ilumina con luz polarizada plana. El grado de polarización de la fluorescencia depende del giro del complejo fluoróforo-ligando en solución. Las moléculas pequeñas giran libremente y por tanto la luz fluorescente que emiten cuando se iluminan está polarizada. Por otro

MATERIALES Y MÉTODOS

lado las moléculas grandes, como las proteínas, giran más lentamente, lo que origina un mayor grado de polarización de la fluorescencia emitida al iluminarse. Cuando el trazador se une al anticuerpo, el giro del complejo es lento y la polarización de la fluorescencia grande.

Es un inmunoensayo competitivo en el que un antígeno marcado con trazador (fluoróforo) se disputa con el antígeno presente en la muestra, sustancia que queremos medir, la unión con el anticuerpo específico por un número limitado de lugares de unión. Cuanto mayor sea la cantidad de la sustancia en el espécimen, menor será la cantidad de trazador unido al anticuerpo y el valor de la polarización de la fluorescencia será bajo **(240)**.

Al incidir la luz emitida sobre el trazador, lo eleva a un estado de excitación, tras el cual dicho trazador vuelve al estado de equilibrio emitiendo luz a una longitud de onda de 520 nm. Cuando el fluoróforo está ligado a una molécula de anticuerpo de gran tamaño, su rotación en el seno de la muestra disminuye y permite que la emisión de luz sea en el mismo plano de la polarización que la radiación recibida, mientras que si dicho fluoróforo está unido a un antígeno (de pequeño tamaño) la rotación es rápida y cuando emite luz lo hace en otro plano de polarización.

Cuanto mayor sea la concentración del antígeno a medir en la muestra, menor será la polarización detectada debido a que existirán menos uniones anticuerpo-antígeno-trazador (figura 22), así pues los resultados se muestran como una relación inversamente proporcional, dando como resultado un ensayo muy sensible **(239)**.

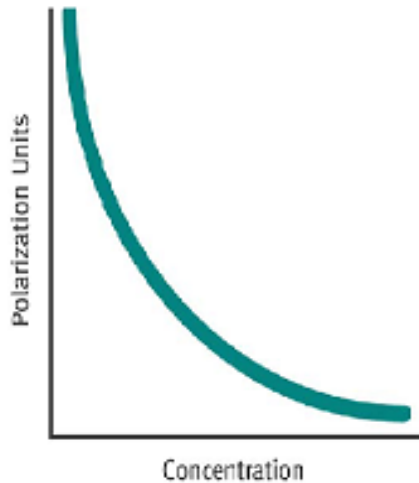


Figura 22: Relación entre la emisión de luz polarizada y la concentración del analito mediante inmunoensayo competitivo FPIA.

Para evitar el problema de la albúmina y otros complejos proteicos que aumentan la polarización de forma inespecífica, se diluye el espécimen o se trata previamente con enzimas proteolíticas precipitantes de proteínas o disolventes. Son técnicas muy utilizadas en la medición de fármacos de seguimiento terapéutico **(240)**.

En la figura 23 se muestran los distintos pasos del desarrollo de la técnica de FPIA.

MATERIALES Y MÉTODOS

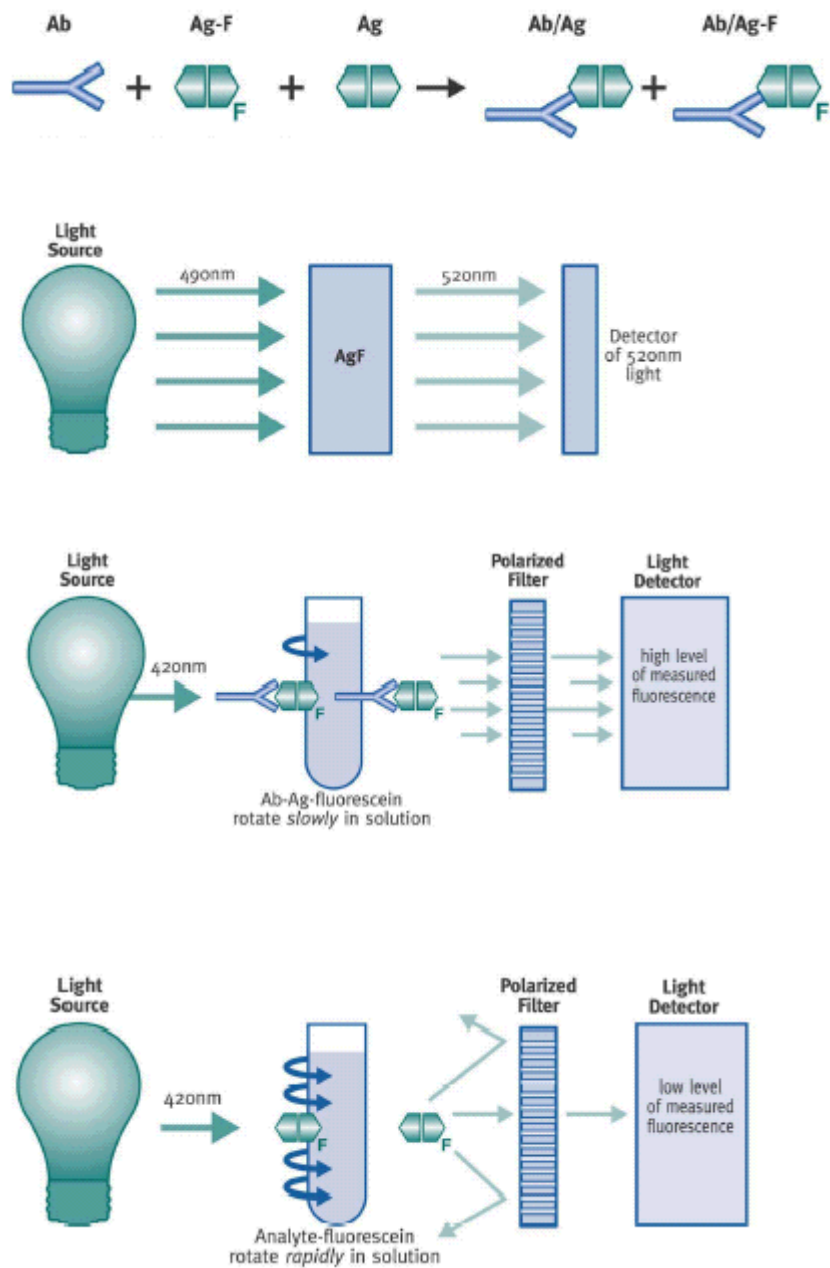


Figura 23: Desarrollo de la técnica de inmunoensayo de luz polarizada. Imágenes tomadas de, Immunochemistry Diagnostics. Introducción a los inmunoensayos. Abbott División Diagnostico

4.3.4 INMUNOENSAYO POR MICROPARTÍCULAS (MEIA)

Técnica de inmunoensayo no competitivo que utiliza el aislamiento de complejos antígeno/anticuerpo en una superficie de fase sólida de pequeñas esferas denominadas micropartículas.

Los componentes del MEIA incluyen en suspensión en un buffer específico optimizado para el ensayo:

- Fase sólida micropartícula-anticuerpo: micropartículas de látex recubiertas del anticuerpo que se une específicamente al analito que se está midiendo.
- Conjugado anticuerpo enzima: fosfatasa alcalina unida al anticuerpo.
- Sustrato del enzima: fosfatasa 4-metil umbelliferona (MUP) fluorescente en solución, disponible para una reacción con la enzima en el anticuerpo.

Se incuban las micropartículas con la muestra, posteriormente se añade la fosfatasa alcalina unida al anticuerpo formando un complejo micropartícula-antígeno-enzima **(239)**. Se lleva a cabo la separación del antígeno libre y del unido mediante la utilización de una matriz de fibra de vidrio que retiene el segundo, las micropartículas se adhieren a las fibras de vidrio irreversiblemente y el material no unido se elimina mediante un lavado **(240)**.

Finalmente se añade el sustrato de la enzima (MUP) que se desfosforila y se mide el producto fluorescente metil umbelliferona. La relación entre la emisión de fluorescencia y la concentración del analito a medir es directamente proporcional **(239)**. En la figura 24 se muestra en detalle el desarrollo de la tecnología MEIA.

MATERIALES Y MÉTODOS

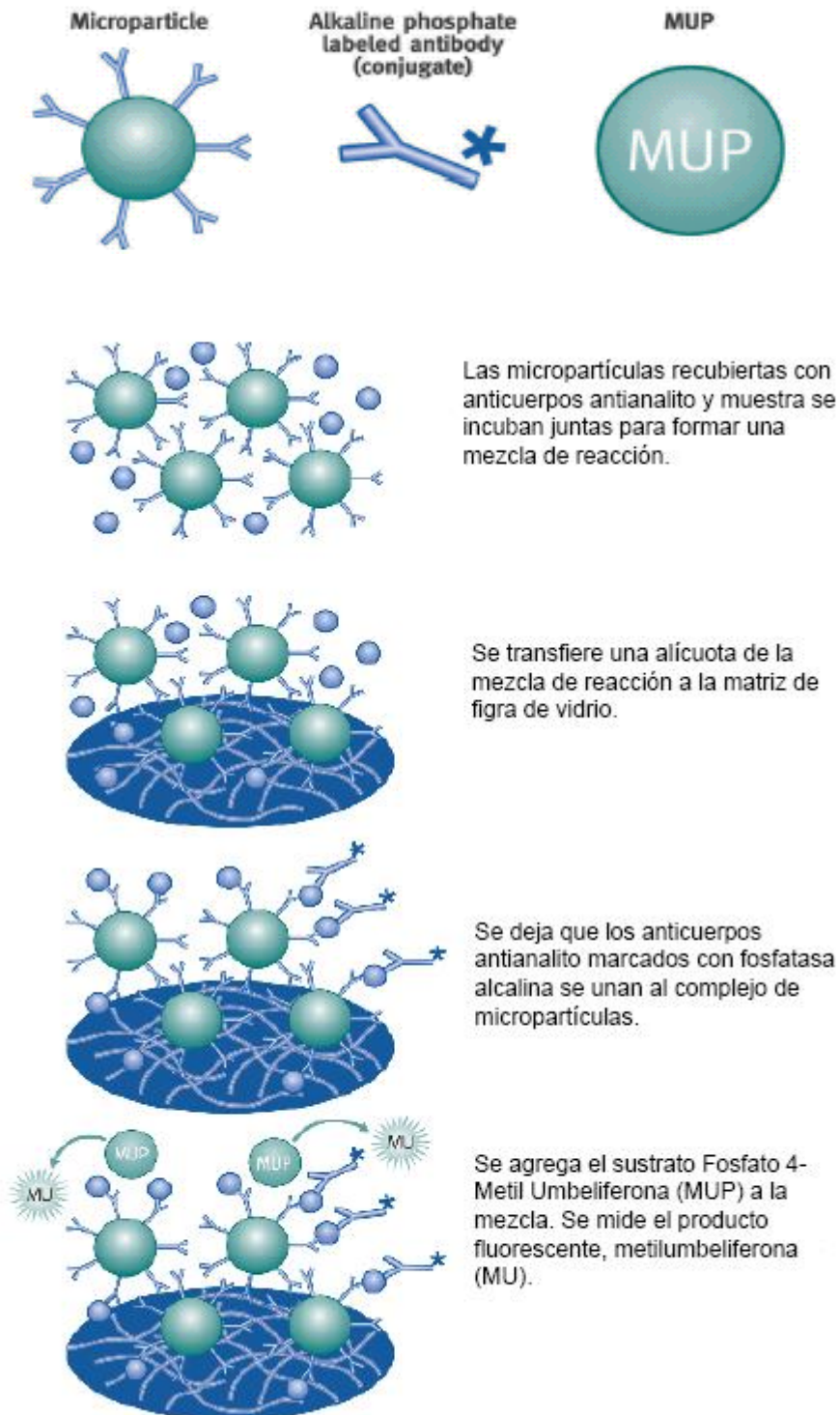


Figura 24: Desarrollo de la técnica de inmunoensayo de micropartículas (MEIA) Imágenes tomadas de Immunochemistry Diagnostics. Introducción a los inmunoensayos. Abbott División Diagnostico

4.3.5 ELISA

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. ELISA, son las siglas por las que se conoce al ensayo, análisis inmunoabsorbente con la enzima ligada (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Se trata de una técnica de laboratorio que fue diseñada por científicos suecos y holandeses en 1971 (241). Son enzimoanálisis heterogéneos que requieren separar las fracciones ligada y libre tras la reacción inmunológica.

En este tipo de pruebas, uno de los componentes de la reacción se adsorbe de forma inespecífica sobre la superficie de una fase sólida. Esta forma de unión facilita la separación de las fracciones ligada y libre.

Los ELISA pueden ser competitivos y no competitivos o tipo *sándwich*.

En los competitivos, los anticuerpos contra la molécula a analizar ligados a la fase sólida pueden unir tanto el antígeno de la muestra como el marcado con la enzima del reactivo, compitiendo el antígeno del espécimen por los lugares de unión con el antígeno marcado del reactivo. Cuanto menor sea la concentración de la molécula a analizar en el espécimen, mayor será la cantidad de antígeno marcado con la enzima que se une. La actividad enzimática es inversamente proporcional a la concentración de la molécula a determinar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ELISA tipo *sándwich*, se realiza con exceso de reactivo, y puede realizarse en un paso o en dos. Si se realiza en un solo paso, se incuban juntos el espécimen con el segundo anticuerpo marcado, mientras que en el de dos pasos, en la primera fase se une la cantidad total de la molécula en el espécimen al anticuerpo que está en exceso y, en el segundo paso, se añade el segundo anticuerpo marcado, que se une a un segundo determinante antigénico en la molécula a analizar unida al primer anticuerpo. La actividad enzimática unida en el complejo antígeno-anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de la molécula a cuantificar **(240)**.

4.3.6 NEFELOMETRÍA

La inmunonefelometría tiene su base en una reacción inmunológica, y la dinámica de formación de dicho complejo será la clave para la valoración de la concentración del parámetro a determinar. Esta técnica mide el aumento de la intensidad de la luz dispersada por los inmunocomplejos generados. Como fuentes de luz se utilizan lámparas de halógenos, xenón o láser de 670 nm, y la detección de la dispersión se realiza a 90° respecto a la emisión. Los sistemas que seleccionan la longitud de onda son filtros de interferencia o rejillas de difracción, y los detectores son tubos fotomultiplicadores. El sistema monitoriza dicha dispersión en la reacción inmunológica, al final de la cual se realiza un cálculo matemático de la velocidad de cambio de la señal de dispersión.

El empleo de una fuente de radiación emitida en una longitud de onda única que minimiza interferencias, y la determinación cinética (en nuestro caso) de la radiación dispersada que monitoriza la reacción, hacen de esta técnica una referencia para la determinación de proteínas séricas.

El principal problema para aplicar esta tecnología a los sistemas biológicos es la presencia de moléculas endógenas que dispersan la luz. Además los reactivos deben de estar libres de polvo, ya que las partículas grandes de este tipo dispersan mucho la luz y el fondo o dispersión de blanco que resulta limita la sensibilidad de la técnica.

Estos problemas se han solucionado diseñando instrumentos muy sensibles y mejorando la calidad de los anticuerpos.

Los nefelómetros están formados por varios componentes: una fuente de luz, un filtro de selección de la longitud de onda de emisión, una cubeta para el espécimen a medir, un filtro de selección de onda de detección, un detector y un registro. Los detectores se sitúan a 90 grados respecto a la emisión. Estos equipos que miden dispersión de luz para cuantificar las reacciones antígeno-anticuerpo deben detectar el exceso de antígeno de las otras dos fases de la cinética de formación de complejos inmunitarios, que son el exceso de anticuerpo y la equivalencia, así mediante algoritmos matemáticos podemos detectar automáticamente el exceso de antígeno.

Las técnicas nefelométricas se suelen emplear para la medición de pequeñas concentraciones de partículas dispersadoras de luz, que dan poca turbidez.

La relación entre la intensidad de la radiación dispersada (I_s) y la concentración de las partículas viene dada por la siguiente ecuación:

$$I_s = k_s I_0 C$$

Donde k_s es una constante empírica del sistema obtenido a partir de una curva de calibración usando estándares de concentración conocida e I_0 es la intensidad de la fuente de radiación incidente **(240)**. La figura 25 muestra esquemáticamente la técnica nefelométrica.

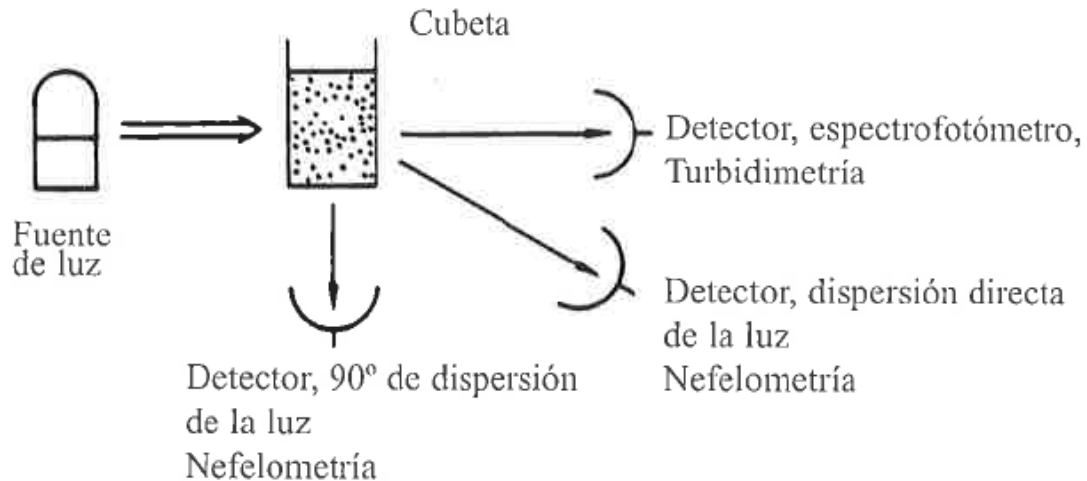


Figura 25: Organización óptica de la Nefelometría y turbidimetría. Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP: Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations. Filadelfia, JB Lippincott Company, 1992.

4.3.7 ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR

Uno de los métodos más sencillos, accesibles y utilizados para la determinación y cuantificación de moléculas en solución y en muestras biológicas es la espectroscopia ultravioleta-visible (UV-V), mediante el empleo de reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar formando un producto coloreado que permite detectarlo en muestras complejas. El fundamento se basa en la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones del espectro UV-V. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber dependen de la estructura molecular y de las condiciones del medio (pH, temperatura, etc).

Las moléculas absorben energía luminosa, cuando la luz es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, E_1 , a un estado de mayor energía o excitado, E_2 . Cada molécula solo tiene una serie de estados excitados o bandas que la distinguen del resto de las moléculas, por tanto la absorción que a

distintas longitudes de onda presenta una molécula, lo que se denomina espectro de absorción, constituye una señal de identidad de la misma (figura 26).

En espectroscopia de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta cercano, de 195-400 nm y el espectro visible que corresponde a longitudes de onda de entre 400-780 nm.

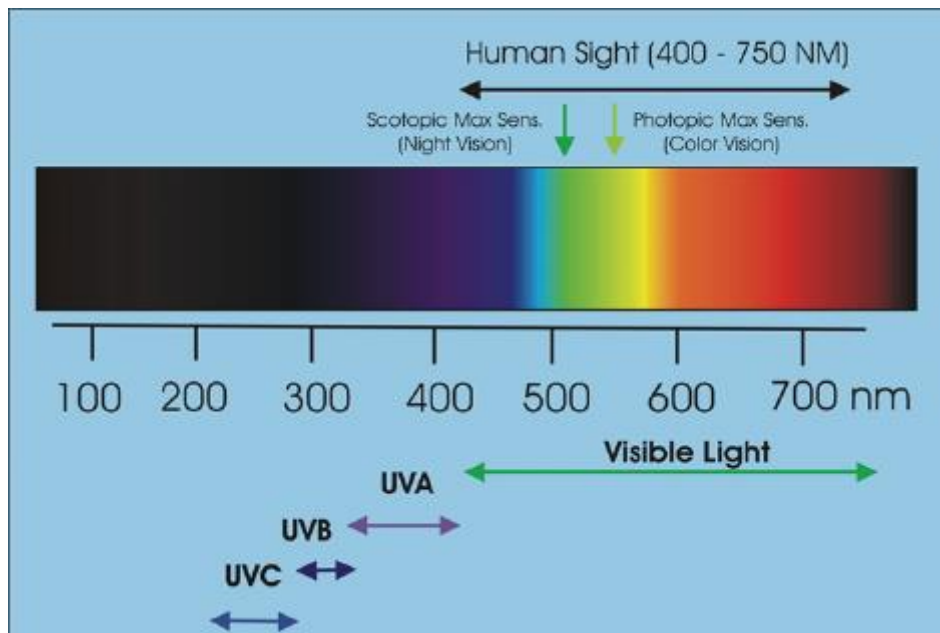


Figura 26: Espectro Ultravioleta-Visible: Fuente gráfica, Enrique O' Connor

La fuente de radiación ultravioleta es la lámpara de Deuterio y la fuente de radiación visible es la lámpara de Tungsteno.

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad (I_0) incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe la luz, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t).

La transmitancia (T) de una molécula en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez atravesada la muestra (I_t) y la cantidad de luz

MATERIALES Y MÉTODOS

que incidió sobre ella (I_0), representándose como $T = I_t / I_0 \times 100$, lo que nos da la medida física de la relación incidente y transmitida al pasar por la muestra.

La absorbancia (A) nos indica la cantidad de luz absorbida por la muestra y se define como el logaritmo de $1/T$, donde $A = \log 1/T = -\log I_t / I_0$.

Aplicando la ley de Lambert-Beer obtenemos la relación entre la absorbancia de luz monocromática y la concentración de un compuesto determinado en solución.

$$A = \log I_t / I_0 = \epsilon \times C \times l$$

La absorbancia de una molécula en solución es directamente proporcional a su concentración, a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas, también depende de la distancia que recorre la luz por la solución y por último depende del coeficiente de extinción, que es una constante de proporcionalidad (ϵ), específica de cada especie molecular.

La ley de Lambert-Beer tiene limitaciones, se cumple para soluciones diluidas, a concentraciones altas, ϵ varía debido a fenómenos de dispersión de la luz, fenómenos de agregación, etc.

Muchos compuestos orgánicos e inorgánicos tienen bandas intensas de absorción en las regiones UV-V del espectro electromagnético. Además las sustancias que no absorben radiación de este espectro o que lo hacen muy débilmente pueden transformarse en compuestos que lo absorban mediante su reacción con los reactivos adecuados o haciendo que formen parte de una reacción en la que otra sustancia experimenta un cambio de sus propiedades de absorción de luz. La reacción en la que se transforma la sustancia que se determina se llama "reacción auxiliar" y la reacción

utilizada para la medida se denomina "reacción indicadora". Ambas reacciones tiene lugar en la misma mezcla de análisis y están acopladas.

En los laboratorios clínicos se utilizan las técnicas espectroscópicas para la determinación cuantitativa de muchas sustancias en los medios biológicos, que pueden ser utilizados para diagnosticar y monitorizar el curso de la enfermedad.

Así pues los métodos de análisis de espectroscopia de absorción molecular miden la concentración de las sustancias en disolución por la absorción de luz que presentan éstas o sus derivados a determinadas longitudes de onda, aplicando la ley de Lambert-Beer.

La medida de estas concentraciones se puede llevar a cabo mediante dos tipos fundamentales de métodos.

Métodos de punto final, en los cuales se incuba la disolución reaccionante con el espécimen a medir y con un patrón de concentración conocida, el tiempo necesario para que se complete la reacción o se alcance el equilibrio.

También son utilizados los denominados métodos cinéticos, o de medida de la velocidad de reacción, en este caso la variación de la absorbancia se determina con el tiempo, que se relaciona con la concentración. Estos métodos de medida pueden ser enzimáticos si utilizan enzimas o no enzimáticos.

La medición de la absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos equipos denominados espectrofotómetros. Están constituidos por distintos componentes:

Una fuente de luz de energía radiante, las principales fuentes de luz que utilizan los analizadores automáticos de bioquímica clínica son lámparas de tungsteno, deuterio,

MATERIALES Y MÉTODOS

mercurio y xenón. Los espectros producidos por estas lámparas están comprendidos entre 300 y 700 nm de longitud de onda.

Otra parte importante del equipo es el monocromador, son dispositivos selectores de las radiaciones de longitud de onda de medida, los más sencillos son los filtros de interferencia, cuya amplitud de banda oscila entre los 5 y los 10 nm, en los analizadores que realizan varias pruebas distintas, los filtros se colocan en una rueda que dispone el filtro adecuado para cada medida. Hay otros sistemas que cuentan con rejillas de difracción, que proporcionan un espectro continuo de longitudes de onda.

También hay un compartimento donde se aloja la muestra y es por donde atraviesa la radiación atravesando el metabolito a medir.

Finalmente están dispuestos por un detector, suele ser un tubo fotomultiplicador, que convierte la energía luminosa que le llega en energía eléctrica y finalmente están equipados con un sistema de lectura de datos que transforma los pulsos eléctricos y los traduce mediante un ordenador, en lecturas de medida **(240)**.

4.4 PARÁMETROS Y METODOLOGÍA

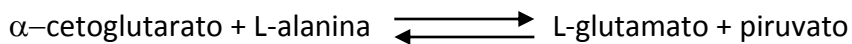
- Determinación en suero sanguíneo de bilirrubina total (BT), mediante ensayo cinético colorimétrico, siguiendo el método creado por Wahlefeld *et al* **(242)**. La bilirrubina reacciona con un ión de diazonio (tetrafluoroborato de 2,5-diclorofenildiazonio) a pH ácido formando azobilirrubina, pigmento rojo cuya intensidad medida es directamente proporcional a la cantidad de bilirrubina total en la muestra, la cuantificación se realiza mediante técnicas de espectrofotometría

de absorción molecular en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche).

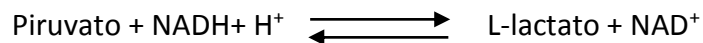
Se ha utilizado el test bilirrubina DPD de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

- Determinación en suero sanguíneo de alanina aminotransferasa (GPT), mediante ensayo cinético medido por espectrofotometría de ultravioleta (UV), según la formulación recomendada por la IFCC (Federación Internacional de Química Clínica) **(243,244)**.

La enzima GPT cataliza la reacción:

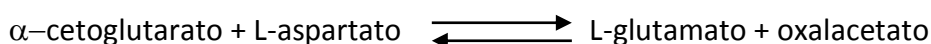


El aumento de piruvato se determina en la reacción indicadora que es catalizada por lactato-deshidrogenasa (LDH).



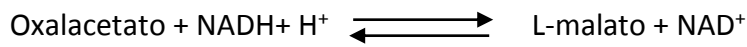
El NADH se oxida a NAD^+ . La velocidad de disminución de NADH es directamente proporcional a la velocidad de formación del piruvato y con ello a la actividad de la GPT. Mediante técnicas de espectrofotometría de absorción molecular en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche) ha sido cuantificada la concentración de GPT. Se ha utilizado el test ALT (ALAT/GPT) de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

- Determinación en suero sanguíneo de aspartato aminotransferasa (GOT), mediante ensayo cinético medido por espectrofotometría de UV, según la formulación recomendada por la IFCC **(245,246)**. La enzima GOT cataliza la reacción:



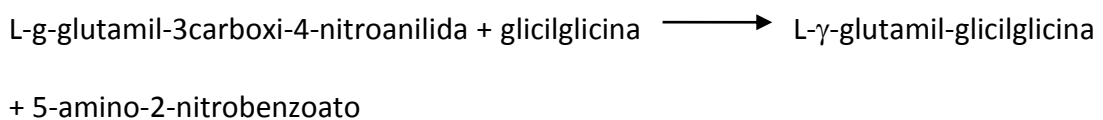
MATERIALES Y MÉTODOS

El aumento de oxalacetato se determina en la reacción indicadora que es catalizada por la enzima malato-deshidrogenasa (MDH).



El NADH se oxida a NAD⁺. La tasa de disminución de NADH es directamente proporcional a la tasa de formación del oxalacetato y con ello a la actividad de la GOT. Mediante técnicas de espectrofotometría de absorción molecular en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche) hemos determinado los niveles del encima en suero. Se ha utilizado el test AST (ASAT/GOT) de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

- Determinación en suero sanguíneo de gamma-glutamyltransferasa (GGT), mediante ensayo cinético colorimétrico, según la formulación recomendada por la IFCC **(247)**. La gamma-glutamyltransferasa transfiere el grupo g-glutamil de la L-γ-glutamyl-3carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina. La cantidad de 5-amino-2-nitrobenzoato liberada es proporcional a la actividad de la GGT presente en la muestra problema y es medido mediante técnicas de espectrofotometría de absorción molecular **(248)** en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche)



Se ha utilizado el test GGT de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

- Determinación en suero sanguíneo de proteínas totales (PT), mediante ensayo colorimétrico. En solución alcalina, el cobre bivalente reacciona con el enlace

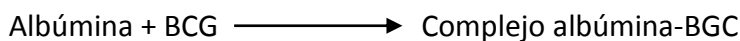
peptídico de las proteínas formando el característico complejo de Biuret purpúreo. Con tartrato sódico-potásico se impide la precipitación de hidróxido de cobre y con yoduro potásico se inhibe la autorreducción del cobre.



La intensidad cromática se mide fotométricamente y es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la muestra **(249)**, mediante técnicas de espectrofotometría de absorción molecular en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche).

Se ha utilizado el test TP de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany.

- Determinación en suero sanguíneo de albúmina (ALB), mediante ensayo colorimétrico con determinación a punto final. Con un pH de 4,1 la albúmina tiene un carácter lo suficientemente catiónico como para formar un compuesto con un colorante aniónico, verde de bromocresol (BCG) formando un complejo azul verdoso.



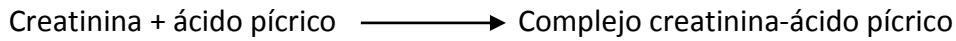
La intensidad del colorante azul verdoso es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra y es medido fotométricamente mediante técnicas de espectrofotometría de absorción molecular **(250)** en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche).

Se ha utilizado el test ALBU plus de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany.

- Determinación en suero sanguíneo de creatinina, mediante ensayo cinético colorimétrico.

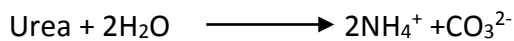
MATERIALES Y MÉTODOS

Este método se basa en la reacción de Jaffé descrita por Popper y col., Seeling y Wuest y modificada por Bartels. En una solución alcalina, la creatinina forma una complexona amarillo anaranjado con el picrato.

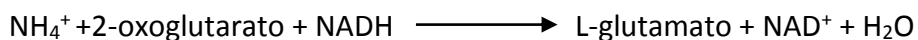


La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de creatinina, midiéndose fotométricamente, mediante técnicas de espectrofotometría de absorción molecular (**251, 252, 253**) en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche). Se ha utilizado el test CREA (Método jaffé) de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany.

- Determinación en suero sanguíneo de urea, mediante ensayo cinético con ureasa y glutamato deshidrogenasa (GLDH), medido por espectrofotometría de UV. La urea es hidrolizada por la ureasa a amonio y carbonato.



En una segunda reacción, el 2-oxoglutarato reacciona con amonio en presencia de GLDH y la coenzima NADH para producir L-glutamato. En esta reacción por cada mol de urea se oxidan dos moles de NADH a NAD⁺.



La tasa de reducción de NADH es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra determinando la concentración mediante técnicas de espectrofotometría de absorción molecular (**254**) en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche)

Se ha utilizado el test UREA/BUN de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

- Determinación en suero sanguíneo de proteína C reactiva (PCR), mediante ensayo inmunturbidimétrico potenciado con partículas. La PCR humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-PCR **(255)**. El precipitado se determina mediante turbidimetría en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche).

Se ha utilizado el test CRPL3 de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany.

- Determinación en sangre total de ciclosporina A mediante tecnología FPIA en un sistema TDX. Se ha utilizado el test “cyclosporine monoclonal whole Blood” de Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany.

- Determinación en sangre total de tacrolimus mediante tecnología MEIA en un sistema IMX. Se ha utilizado el test “IMx Tacrólimus II” de Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany.

- Determinación en plasma sanguíneo de micofenolato mediante ensayo EIA homogéneo. Se ha utilizado el test “Emit 2000 Mycophenolic Acid Assay” de Dade Behring Inc, Milton Keynes, United Kingdom.

- Recuento de leucocitos totales, linfocitos y neutrófilos en sangre total (tubos EDTA), mediante citometría de flujo y cámara de recuento STKS. Coulter LH 750 (Beckman-Coulter). Los principios sobre los que Coulter LH 750 realiza sus mediciones son dos:

MATERIALES Y MÉTODOS

Principio de impedancia (Coulter), cuenta y dimensiona las células por medio del cambio de resistividad en un campo eléctrico. El sistema tiene dos recipientes llenos de un líquido conductor. Ambos están en contacto a través de una apertura, y a cada lado de ella, un electrodo unido a una fuente de alimentación generándose una corriente continua constante y un osciloscopio detecta cualquier cambio que pueda haber en esta corriente. Si en uno de los recipientes se deposita una suspensión de células sanguíneas y en el otro se aplica una presión de vacío, las partículas pasan de un recipiente a otro a través de la apertura, cada vez que pasa una partícula, se produce una alteración de la medida de la corriente continua al variar la resistencia en la apertura, lo cual se traduce en el osciloscopio en pulsos de una amplitud proporcional al tamaño de la partícula, contando el número de pulsos y midiendo su amplitud, conoceremos el número de partículas y su tamaño realizando el conteo de leucocitos.

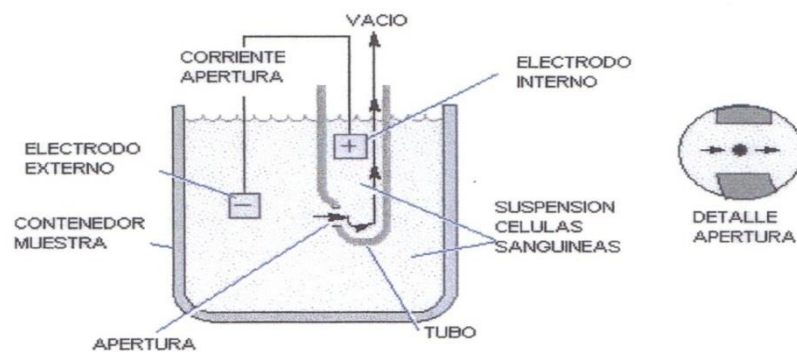


Figura 27: Principio Coulter para el recuento de células sanguíneas. Extraído de LH 700 Series, Tecnología de análisis y casos prácticos 1.1.

Mediante la tecnología VCS, basada en la medida del volumen (impedancia), conductividad celular (relación núcleo/citoplasma) y dispersión laser (Scatter) en función de la granulación celular, se lleva a cabo el diferencial Leucocitario.

Consiste en un citómetro de flujo que mediante la medida de estos tres parámetros identifica las distintas subpoblaciones leucocitarias de linfocitos y neutrófilos.

- Fenotipaje de las subpoblaciones de linfocitos T, B, Natural killer (NK), mediante citometría de flujo de 4 colores (Becton Dickinson FACScalibur). Marcadores de superficie linfocitaria estudiados mediante anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluorocromos: CD3, CD4, CD8, CD56/16, CD19 (Becton Dickinson). El marcaje de las moléculas de superficie de las subpoblaciones linfocitarias se realizó en muestra de sangre total anticoagulada con EDTA y los anticuerpos empleados en el ensayo para la determinación de las mismas se describen en la tabla 4.

Tabla 4: Detalle de los distintos anticuerpos monoclonales empleados en el fenotipado de las distintas subpoblaciones linfocitarias del estudio.

Fluorocromos				
Subpoblación	FITC	PE	PerCP	APC
Control Isotipo	IgG1 _k	IgG2 _{ak}	IgG1 _k	IgG1 _k
Linfocitos T	CD25	CD122	CD4	CD8
TBNK	CD56	CD16	CD3	CD19

FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: Proteína Clorofila Peridinina; APC: Alofocianina. Anticuerpos de Becton Dickinson, San José, CA.

MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis de las subpoblaciones linfocitarias fue desarrollado en un citómetro FACScalibur (*Becton Dickinson, San José, CA.*) y el programa CellQuest Pro.

En la figura 28 se muestra esquemáticamente la estrategia de análisis de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo multiparamétrica.

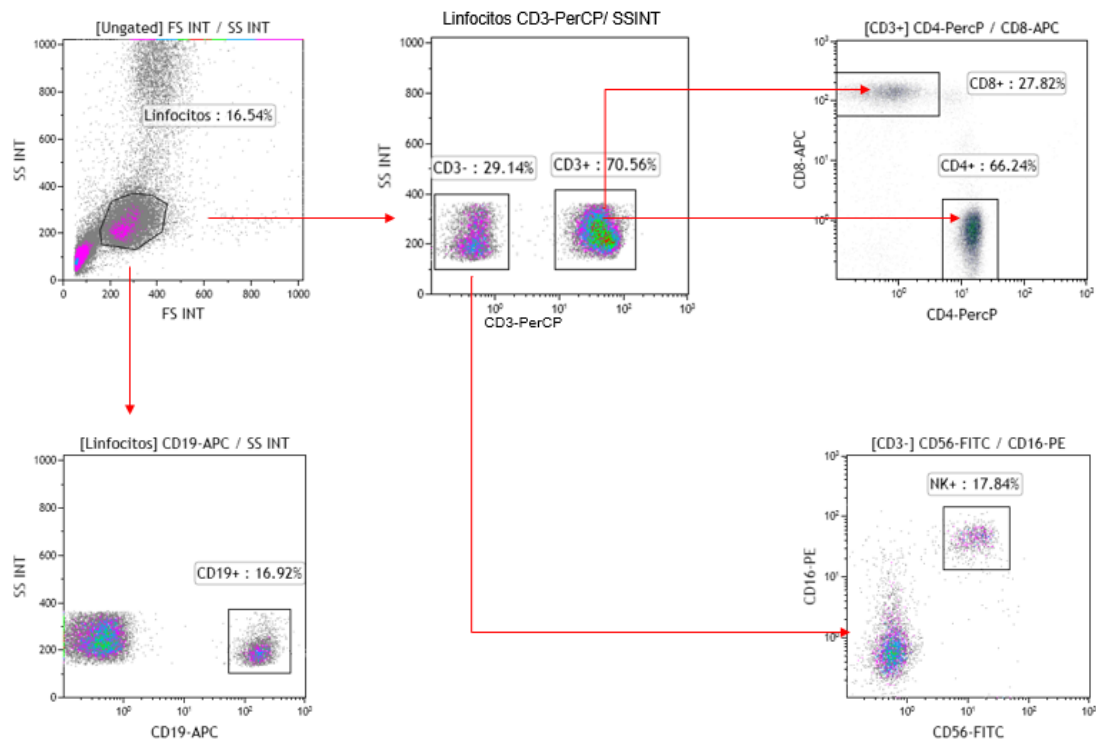


Figura 28: Análisis de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo multiparamétrica.

- Determinación cuantitativa en suero sanguíneo de factor del complemento C3 (C3) mediante ensayo nefelométrico cinético, midiendo la tasa de incremento de la dispersión de la luz de las partículas suspendidas en solución como resultado de la formación de complejos durante la reacción antígeno-anticuerpo.

Complemento C3 (muestra \longrightarrow Complemento C3 –Anticuerpo (agregados))

Se ha utilizado el test Sistemas inmunoquímicos IMMAGE® para C3 de Beckman Coulter Ireland, Inc., Mervue Business Park, Mervue, Galway, Ireland.

- Determinación cuantitativa en suero sanguíneo de factor del complemento C4 (C4) mediante ensayo nefelométrico cinético, midiendo la tasa de incremento de la dispersión de la luz de las partículas suspendidas en solución como resultado de la formación de complejos durante la reacción antígeno-anticuerpo.

Complemento C4 (muestra) → Complemento C4 –Anticuerpo (agregados)

Se ha utilizado el test Sistemas inmunoquímicos IMMAGE® para C4 de Beckman Coulter Ireland, Inc., Mervue Business Park, Mervue, Galway, Ireland

- Determinación cuantitativa en suero sanguíneo de factor B de Properdina (FB) mediante ensayo nefelométrico cinético, midiendo la tasa de incremento de la dispersión de la luz de las partículas suspendidas en solución como resultado de la formación de complejos durante la reacción antígeno-anticuerpo.

- Factor B Properdina(muestra) → Factor B Properdina –Anticuerpo (agregado)

Se ha utilizado el test Sistemas inmunoquímicos IMMAGE® para PFB de Beckman Coulter Ireland, Inc., Mervue Business Park, Mervue, Galway, Ireland.

- Determinación cuantitativa en suero sanguíneo de Inmunoglobulina G (IgG) mediante ensayo nefelométrico cinético, midiendo la tasa de incremento de la dispersión de la luz de las partículas suspendidas en solución como resultado de la formación de complejos durante la reacción antígeno-anticuerpo.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Inmunoglobulina G (muestra) → Inmunoglobulina G –Anticuerpo (agregados)
Se ha utilizado el test Sistemas inmunoquímicos IMAGE® para IgG de Beckman Coulter Ireland, Inc., Mervue Business Park, Mervue, Galway, Ireland.
- Determinación cuantitativa en suero sanguíneo de Inmunoglobulina A (IgA) mediante ensayo nefelométrico cinético, midiendo la tasa de incremento de la dispersión de la luz de las partículas suspendidas en solución como resultado de la formación de complejos durante la reacción antígeno-anticuerpo.
- Inmunoglobulina A (muestra) → Inmunoglobulina A –Anticuerpo (agregados)
Se ha utilizado el test Sistemas inmunoquímicos IMAGE® para IgA de Beckman Coulter Ireland, Inc., Mervue Business Park, Mervue, Galway, Ireland.
- Determinación cuantitativa en suero sanguíneo de Inmunoglobulina M (IgM) mediante ensayo nefelométrico cinético, midiendo la tasa de incremento de la dispersión de la luz de las partículas suspendidas en solución como resultado de la formación de complejos durante la reacción antígeno-anticuerpo.
- Inmunoglobulina M (muestra) → Inmunoglobulina –Anticuerpo (agregados)
Se ha utilizado el test Sistemas inmunoquímicos IMAGE® para IgM de Beckman Coulter Ireland, Inc., Mervue Business Park, Mervue, Galway, Ireland.
- Cuantificación en suero sanguíneo de las subclases de IgG mediante turbidimetría, utilizando anticuerpos monoespecíficos para IgG1 e IgG2, y anticuerpos

monoespecíficos policlona de oveja unido a látex poliestireno en el caso de IgG3 e IgG4. Una vez se desarrolle la reacción antígeno-anticuerpo y se formen los complejos insolubles se realizará la lectura turbidimétrica, siendo la cantidad de luz transmitida indirectamente proporcional a la cantidad de proteína específica en la muestra.

Se ha utilizado el test, Kits de reactivos líquidos de subclases de IgG de "The Binding Site Group Ltd", 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham, B15 1QT, U.K, en un autoanalizador SPAPLUS® de The Binding Site Group Limited (Birmingham, Reino Unido)

- Cuantificación de nuevos biomarcadores en el desarrollo de rechazo celular agudo. Se evaluaron 63 pacientes (52 varones, 53 ± 11 años). 32 de estos pacientes desarrollaron rechazo celular agudo tras el trasplante de acuerdo con los criterios revisados ISHLT y 31 no desarrollaron rechazo celular agudo en biopsias ni síntomas clínicos que sugiriesen rechazo humoral (controles). Las muestras de suero congeladas se enviaron al laboratorio de la Dra Sarwal en la Universidad de Stanford (Stanford, CA) para determinar la presencia de los siguientes analitos: Fetuina-B humano, CXCL4, CXCL9 humano, NAP2 humano, galectina-3, apolipoproteína A1, CD14, CD31 y CD44 humano.

Los ensayos de ELISA para 8 de estas proteínas (fetuína-B, CXCL4, CXCL9, galectina-3, CD14, CD31, CD44 y NAP2) se realizaron utilizando el protocolo de ELISA recomendado por Meso Scale Diagnostics (MSD Rockville, MD, EE.UU.) usando reactivos de DuoSets De los sistemas R & D (Minnneapolis, MN, EE.UU.): Human Fetuin-B, Human CXCL4, Human CXCL9, Human Galectin-3 y Human CD14, CD31 y

MATERIALES Y MÉTODOS

CD44. Para NAP2 humana, se utilizó anticuerpo anti-NAP2 de Abcam (Cambridge, MA, USA) como anticuerpo de captura, se utilizó como estándar la proteína NAP2 de Abcam (Cambridge, MA, USA) y anticuerpo anti-NAP2 biotina de Abcam (Cambridge, MA, USA) se utilizó como anticuerpo de detección. Para todos los ELISA, se añadieron 0,5µg por pocillo de anticuerpo de captura en las respectivas placas y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación, se retiró la solución de revestimiento, se secaron las placas y se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con un bloqueador A al 5% (MSD Rockville, MD, EE.UU.). Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado de TPBS (Tween-20 al 0,05% en PBS) y se secaron, se añadieron 50 µl de patrones y muestras (suero diluido a 1: 500) a las respectivas placas y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y media. Las placas se lavaron tres veces en 200 µl de tampón de lavado de TPBS y se añadió un volumen de 50 µl de concentración de trabajo (0,2 ng/µl de anticuerpo anti-NAP2, 4,0 µg /mL de fetuína B anti-humano biotinilado de ratón y Galectina-3 anti-humano biotinilado de ratón, 400 ng/ml de CXCL4 y CXCL9 anti-humano biotinilado de cabra y CD14, CD31 y CD44 anti humano biotinilado de oveja) del anticuerpo de detección en las respectivas placas y se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora y media. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado TPBS y se secaron con papel secante. Se añadieron 50 µL de streptavidina SULFO-TAG (MSD Rockville, MD, USA) (diluido 1: 1000 para los ensayos fetuína-B humano, CXCL4, CXCL9 humano, CD14, CD31, CD44 humano y 1: 2500 para los ensayos de NAP2 humano y Galectin-3) y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las placas se lavaron tres veces en un total de 200 µl de

tampón de lavado de TPBS y se secaron con papel secante. Las placas se leyeron inmediatamente en una cámara de imágenes MSD después de añadir 150 µl de solución de lectura T (MSD Rockville, MD, USA).

Para la determinación de apolipoproteína A1, se realizó un ELISA en sandwich de tal forma que, las placas de ELISA se revistieron con 30 µl de anticuerpo anti-apolipoproteína A1 y 2 µg/ml de anticuerpo de captura de Abcam (Cambridge, MA, USA) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Se eliminó la solución de revestimiento y las placas se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado de TPBS y se secaron con papel secante. Las placas se bloquearon con 300 µl de tampón de bloqueo de leche en polvo sin grasa al 2% y se incubaron a temperatura ambiente durante una a dos horas. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado de TPBS y se secaron con papel secante. Se añadieron 100 µl de la apolipoproteína A1 estándar de Abcam (Cambridge, MA, USA) y se añadieron las muestras de suero de estudio (diluidas 1: 3000 en Bloqueador A 1% (MSD Rockville, MD, USA)). Se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de lavado de TPBS y se secaron con papel secante. Se añadieron 100 µl de anticuerpo de detección a una concentración 0,5µl/ml, se añadieron anticuerpos policlonales de conejo de apolipoproteína A1 de Abcam (Cambridge, MA, USA) en leche seca al 2% y las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y tres veces con 200 µl de tampón de lavado de TPBS y se secaron con papel secante. Se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario (HRP de IgG H & L de cabra anti-conejo en leche seca al 2%) de Abcam (Cambridge, MA, EE.UU.) y las placas se incubaron en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres

MATERIALES Y MÉTODOS

veces con 200 µl de tampón de lavado TPBS y se secaron con papel secante. Se añadieron 50 µl de solución de sustrato (Turbo TMB-ELISA, ThermoFisher, Waltham, MA USA) y las placas se incubaron en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 µl de solución de parada (H₂SO₄ 2 M) y las placas se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de microplacas, SpectraMax M2 de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EE.UU.).

4.5 DEFINICIÓN DE EVENTO INFECCIOSO GRAVE

Se definieron los siguientes eventos infecciosos graves en nuestro estudio:

Toda infección grave definida como evento infeccioso ocurrida durante los tres primeros meses post-TC, que requiere la administración de tratamiento antimicrobiano específico por vía intravenosa.

Infección oportunista producida por citomegalovirus o fúngica invasiva, ocurrida durante los tres primeros meses post-TC, que requiere la administración de tratamiento antimicrobiano específico por vía intravenosa.

Cada paciente que haya tenido al menos un evento de este tipo se describirá como paciente que ha desarrollado una infección grave.

No se incluyeron infecciones asociadas a catéter intravenoso ni infecciones de herida quirúrgica superficial como evento infeccioso.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se efectuaron con el programa informático SPSS versión 22.0 para Windows (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, Illinois, USA)

Para comprobar la bondad de ajuste a la normalidad de cada una de las variables analizadas en este estudio se utilizó el test de *Kolmogorov-Smirnov*

El análisis descriptivo se desarrolló analizando todas las variables medidas en distintos puntos en el tiempo en la cohorte de estudio, previo al trasplante cardiaco, a los 7, 30, 90, 180 días y año post-TC. Los estadísticos utilizados fueron, la media, error estándar de la media, mediana, desviación típica y valores máximo y mínimo.

Se realizó un estudio cinético de todos los parámetros determinados en los distintos puntos de estudio para ver su distribución a lo largo de tiempo.

Se realizó un análisis de correlación entre los niveles de fármacos medidos y los distintos parámetros utilizados para evaluar la respuesta celular y humoral de la cohorte estudiada, mediante el coeficiente de correlación de Pearson (ccp) y el grado de significación bilateral, también analizamos la correlación entre los distintos parámetros entre sí (variables numéricas). Se consideró correlación significativa, aquella en la cual el ccp fue mayor o igual a 0,600 y una significación bilateral menor del 0,05

Para la comparación de medias entre dos grupos se utilizó la prueba *T de Student* para muestras independientes, considerando asociación significativa aquella que mostraba una $p < 0,05$. Se analizaron todos los parámetros medidos en un punto previo, pre-TC y en tres puntos de estudio consecutivos: 7,30 y 90 días post-TC, estudiando las diferencias entre grupos estratificados con una variable cualitativa: la aparición o no

MATERIALES Y MÉTODOS

de un proceso infeccioso grave durante los 90 días post-TC y de igual modo en función o no de la aparición de un fenómeno de rechazo agudo del injerto.

Para realizar la comparación de variables categóricas se utilizará el test de χ^2 . Las variables categóricas analizadas son: la aparición de procesos infecciosos graves antes de los tres meses y el desarrollo de fenómenos de rechazo agudo del injerto.

Para estratificar los valores de los biomarcadores de la cohorte estudiada en dos grupos, se establecieron como punto de corte el valor de las medianas de las variables de inmunidad humoral y celular analizadas, en las variables bioquímicas analizadas el valor de punto de corte utilizado es el valor asumido como patológico por el laboratorio del servicio de bioquímica y hematología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, o el resultado derivado de las curvas de operación característica del receptor (ROC).

Para la elaboración de una escala (*score*) con las variables bioquímicas e inmunológicas más relevantes, se identificaron las variables relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar un proceso infeccioso o un rechazo agudo del injerto y se realizó un análisis de regresión logística multivariante. Los criterios utilizados para la confección de estas escalas son:

El valor significativo de las variables en un análisis de regresión logística $p < 0,05$, el valor del *Odds Ratio* (OR) y la plausibilidad biológica, evitando variables de alta correlación entre sí.

Se elaboran distintas escalas (*Scores*) en función del tiempo de trasplante, desde el momento pre-TC, 7, 30 y 90 días post-TC y en función de la aparición durante los 90

días post-TC de procesos infecciosos o un evento de rechazo agudo del injerto determinando el valor de OR de la escala y el índice de confianza al 95%.

4.7 VALOR DE CORTE UTILIZADO PARA LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS

A continuación se muestra el valor límite de la normalidad de los parámetros bioquímicos y hematológicos establecidos por los laboratorios de hematología y bioquímica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón coincidente con el punto de inflexión utilizado en la asociación con los eventos clínicos estudiados.

Leucocitos >10.00 (x1000)/ μ L	GOT >40 U/L
Linfocitos porcentual < 16%	GPT > 41 U/L
Valor absoluto de Linfocitos < 1300/ μ L	GGT >60 U/L
Valor absoluto de Linfocitos > 3500/ μ L	PT < 6.40 gr/dL
Leucocitos <4.00 (x1000)/ μ L	ALB < 3.40 gr/dL
Neutrófilos porcentual < 42%	UREA > 45 mg/dL
Valor absoluto de neutrófilos < 1800/ μ L	CREA > 1.20 mg/dL
Valor absoluto de neutrófilos > 7500/ μ L	BT > 1.10 mg/dL
Rango terapéutico de los niveles de fármacos inmunosupresores	
CsA: 100-200 ng/mL	FK: 5-15 ng/mL
MMF: 2-5 μ g/mL	

V. RESULTADOS

5.1 VALORES DESCRIPTIVOS DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO

5.1.1 NORMALIDAD DE LAS VARIABLES

Existe muy poca información disponible sobre los valores de distintos parámetros bioquímicos, niveles de fármacos y variables de inmunidad innata y adquirida en el momento previo y en distintos tiempos posteriores al trasplante cardiaco. Esta información es necesaria para tratar de interpretar los distintos análisis que se plantean en esta tesis. La variabilidad de los biomarcadores orienta, por otro lado, el tipo de pruebas estadísticas que deben ser utilizadas. Un aspecto importante es la información acerca de la normalidad de las variables. Para comprobar la bondad de ajuste a la normalidad de cada una de las variables analizadas se utilizó el test de *Kolmogorov-Smirnov*. El análisis de la normalidad de las variables se presenta al final de la tesis en el **anexo 1** en distintas tablas que pueden servir de referencia para otros estudios en cohortes de pacientes trasplantados cardiacos que reciben terapia de inducción con anticuerpos anti-CD25 y que utilizan la terapia triple estándar de mantenimiento de la inmunosupresión.

Tal como puede apreciarse en las tablas del anexo 1, los parámetros bioquímicos que siguen una distribución normal son:

En el punto pre-TC la albúmina, a los 7 días las proteínas totales y la albúmina, a los 30 días, las proteínas totales, la albúmina y la urea, a los 90 días, proteínas totales, urea, creatinina y bilirrubina total, a los 180 días proteínas totales y la urea y al año post-TC, mantenían una distribución normal las proteínas totales, la albúmina y la urea.

La distribución de los fármacos inmunosupresores se mantuvo en una distribución normal en todos los puntos medidos a lo largo del estudio, para los niveles de CsA y FK,

RESULTADOS

pero los niveles de MMF sólo se ajustaban a la normalidad en el punto de medida correspondiente a los 90 y 180 días post-TC.

Los parámetros inmunológicos que seguían una distribución normal son:

En el punto pre-TC IgG, IgM, IgA, las subclases de IgG1, IgG2, IgG3, los factores de complemento C3, C4 y factor B properdina; a los 7 días IgG, IgM, IgA, las subclases de IgG1 e IgG3, C3, C4 y factor B properdina; a los 30 días la distribución es normal en los mismos parámetros que en día 7, a los 90 días se repite el mismo patrón que en el punto pre-TC; a los 180 días IgG, IgA, las subclases de IgG1, IgG2, IgG3, C3, C4 y al año post-TC IgG, IgM, IgA, las subclases de IgG1, IgG2, IgG3, C3 y C4.

Así pues se observa que tanto los niveles de PCR como los niveles de la subclase IgG4 no siguen una distribución normal en ningún punto de medida, perdiéndola puntualmente el factor B de properdina en el punto 180 días y al año, la IgG2 a los 7 días y la IgM a los 180 días.

Los parámetros de subpoblaciones de leucocitos y más específicamente linfocitarias que seguían una distribución normal son:

De los parámetros medidos, leucocitos totales, linfocitos totales y porcentajes así como neutrófilos totales y porcentuales en todos los puntos medidos salvo neutrófilos totales en el punto pre-TC, los linfocitos totales el día 7 y en el día 30 los leucocitos totales y los neutrófilos totales.

De las subpoblaciones linfocitarias, el recuento de células T CD3, CD4, CD8, NK, y linfocitos B, todos ellos en valor absoluto (totales) y porcentual (%), en el punto de

medida pre-TC, todos presentaban una distribución normal salvo las células NK totales y los linfocitos B porcentuales; el día 7 perdieron la distribución normal los recuentos de células T CD3, CD4, CD8, las células NK, los linfocitos B, totales y las células NK porcentuales. El día 30 todos los parámetros mostraban una distribución normal salvo las células NK totales y porcentuales. A los 90 días todos los parámetros se distribuían de forma normal salvo los linfocitos B totales. A los 180 días perdían la distribución normal las células T CD8, NK, los linfocitos B porcentuales y el recuento de linfocitos NK total. Al año post-TC todos los parámetros mostraban una distribución normal.

5.1.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL

La información cuantitativa de los parámetros analizados en los distintos tiempos es otra información relevante que aporta esta tesis. A continuación se presentan los datos cuantitativos de los distintos biomarcadores evaluados, globalmente. El análisis descriptivo se desarrolló analizando todas las variables medidas en distintos momentos en el tiempo en nuestra población de estudio, estos puntos fueron, el previo al trasplante cardiaco, 7, 30, 90, 180 días y año post-TC. Los estadísticos utilizados fueron, la media, error estándar de la media, mediana, desviación estándar y valores máximo y mínimo. Los resultados obtenidos se muestran en el **Anexo 2** de la tesis.

5.2 CINÉTICA DE LOS BIOMARCADORES

Uno de los aspectos más básicos del análisis estadístico realizado, es la evaluación prospectiva y longitudinal de todos los parámetros medidos en la cohorte estudiada, previo al trasplante cardiaco y en los 5 puntos consecutivos de estudio: 7, 30, 90, 180

RESULTADOS

días y un año post-TC. La información ha sido recogida prospectivamente a lo largo del desarrollo de la tesis.

En la figura 29 se muestra la cinética de la titulación de células sanguíneas, leucocitos, neutrófilos y linfocitos, en las figuras 30 y 31 mostramos la cinética de las subpoblaciones linfocitarias que monitorizan la respuesta inmune celular, de tal forma que tras el trasplante cardiaco puede observarse un aumento de los leucocitos totales durante la primera semana post-TC y una posterior disminución respecto a los valores determinados en el punto pre-TC que se estabiliza hasta el año.

Así mismo, los linfocitos experimentan una disminución durante la primera semana respecto a los valores de partida, observándose una recuperación progresiva en los distintos puntos extendiéndose hasta el año post-TC, tanto en valores absolutos como a nivel porcentual. Los neutrófilos siguen un patrón de comportamiento idéntico al que experimentan los leucocitos totales.

En los linfocitos T CD3, se observa una disminución discreta de la subpoblación celular porcentual durante la primera semana post-TC y una posterior recuperación y aumento de los mismos respecto a los valores determinados en el punto pre-TC que se estabiliza hasta el año, la tendencia en valores absolutos es similar pero mucho más marcada, salvo en el último punto, año post-TC en el que se manifiesta una disminución de los valores de linfocitos T CD3 respecto al punto de partida.

Los linfocitos T CD4 a nivel porcentual, muestran estabilidad desde el momento del trasplante hasta el punto 180 y año en los cuales se observa una ligera disminución progresiva, sin embargo en valores absolutos muestran una cinética similar a la que

presentan los linfocitos totales, disminución en la primera semana seguida de recuperación progresiva hasta el año. Este mismo patrón se observa en los linfocitos T CD8 porcentual pero aumentando respecto a los valores de inicio desde los 180 días y manteniéndose hasta el año, sin embargo en valores absolutos aun siguiendo un patrón similar se observa una disminución en su recuento entre los 180 días y el año.

Las células NK presentan la misma cinética que las células T CD8, tanto en valores absolutos como porcentuales, se observa un descenso a la semana y una recuperación de sus valores desde este momento hasta el año post-TC. Los linfocitos B siguen el mismo modelo cinético que los leucocitos totales con un aumento significativo durante la primera semana post-TC y una posterior disminución respecto a los valores determinados en el punto pre-TC que se estabiliza hasta el año, si bien es mucho más acusado en valores porcentuales que en valores absolutos.

En cuanto al comportamiento cinético de los parámetros inmunológicos de inmunidad humoral se observa un descenso brusco de los niveles séricos de IgG desde el momento previo al trasplante hasta la primera semana posterior a la intervención, seguido de un descenso progresivo hasta el mes para comenzar a recuperarse progresivamente hasta el año post-TC pero sin llegar a alcanzar los niveles basales. Este patrón de comportamiento se repite en las subclases IgG1, IgG3 e IgM pero de forma menos marcada. Los niveles de IgA y las subclases IgG2 e IgG4 disminuyen desde el momento previo al trasplante hasta el día 30, a partir de este momento se estabilizan los niveles hasta el año pero en concentraciones inferiores a los niveles mostrados en el punto inicial.

RESULTADOS

Los niveles séricos del factor del complemento C3, C4 y factor B de properdina siguen una pauta cinética similar, tras experimentar una bajada en sus niveles durante la primera semana respecto a los niveles basales, experimentan una leve recuperación al mes post-TC, sin llegar a los niveles de partida para experimentar un nuevo descenso a partir del día 30 que se estabiliza y mantiene hasta el año post-TC (Figuras 32 y 33).

En cuanto al comportamiento de los parámetros bioquímicos que ilustran las figuras 34 y 35, los niveles de PCR evidencian una elevación discreta respecto a los niveles basales hasta el día 30, para disminuir en el tercer mes manteniéndose constante hasta el año con niveles inferiores a los de partida.

Las proteínas totales y la albúmina, experimentan un descenso brusco durante la primera semana post-TC respecto a los niveles previos a la intervención, para recuperar progresivamente su concentración sérica a lo largo del año, alcanzando los niveles basales.

Los niveles de urea se ven aumentados a lo largo de la primera semana para bajar y estabilizarse hasta el año mostrando niveles similares a los basales, la creatinina muestra fluctuaciones a lo largo del periodo de tiempo estudiado.

La bilirrubina total experimenta una elevación discreta durante la primera semana, posteriormente disminuye hasta alcanzar niveles por inferiores a los basales, manteniéndose así hasta el año posterior al trasplante. Los niveles de GOT disminuyen a partir del mes de la intervención manteniéndose hasta el año niveles ligeramente inferiores a los mostrados en el momento previo al trasplante y en la primera semana.

Los niveles de GGT y GPT se ven elevados durante la primera semana para ir disminuyendo progresivamente hasta el día 90, manteniéndose de forma estable hasta el año post-TC recuperando titulaciones séricas similares a las que presentan en el punto pre-TC.

El comportamiento cinético de los fármacos inmunosupresores desde su primera medición el día 7 Post-TC hasta el año se muestra en la figura 35.

Así pues, los niveles de CsA desde la primera medición a la semana de la intervención se observa un aumento del nivel del fármaco en suero en el día 30 para posteriormente disminuir el día 90 y manteniéndose estable hasta el año en concentraciones ligeramente más elevadas que las que mostraba el día 7.

Cinética similar es observada para los niveles de FK, si bien, se observa una tendencia a la disminución progresiva del fármaco desde el día 30 hasta el año.

Los niveles de MMF se mantienen estables hasta el mes Post-TC, experimentando un ligero aumento posterior que se mantiene hasta el año.

RESULTADOS

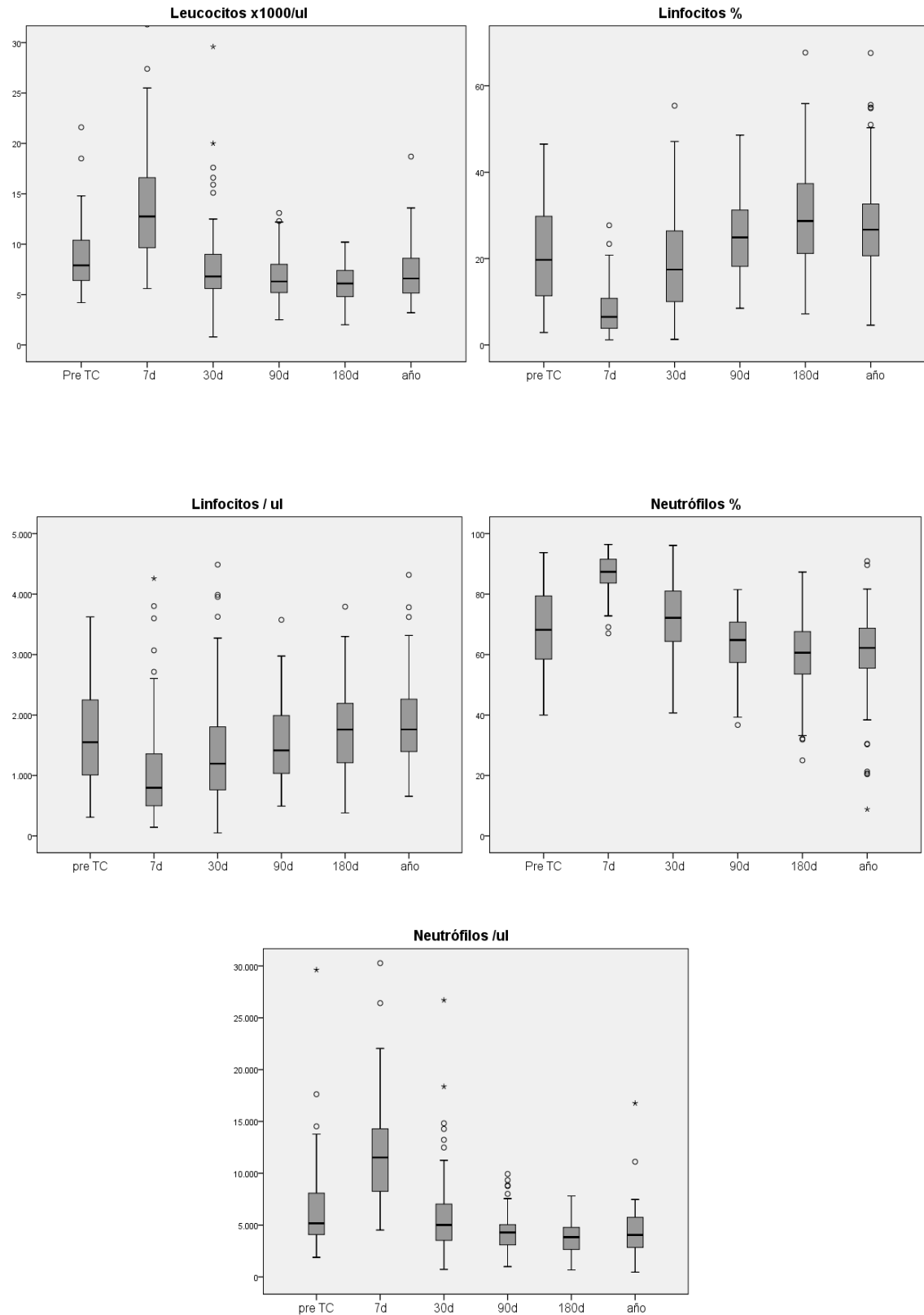


Figura 29: Cinética de las variables hematológicas, leucocitos y subpoblaciones leucocitarias. Análisis longitudinal con diagramas de cajas que representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

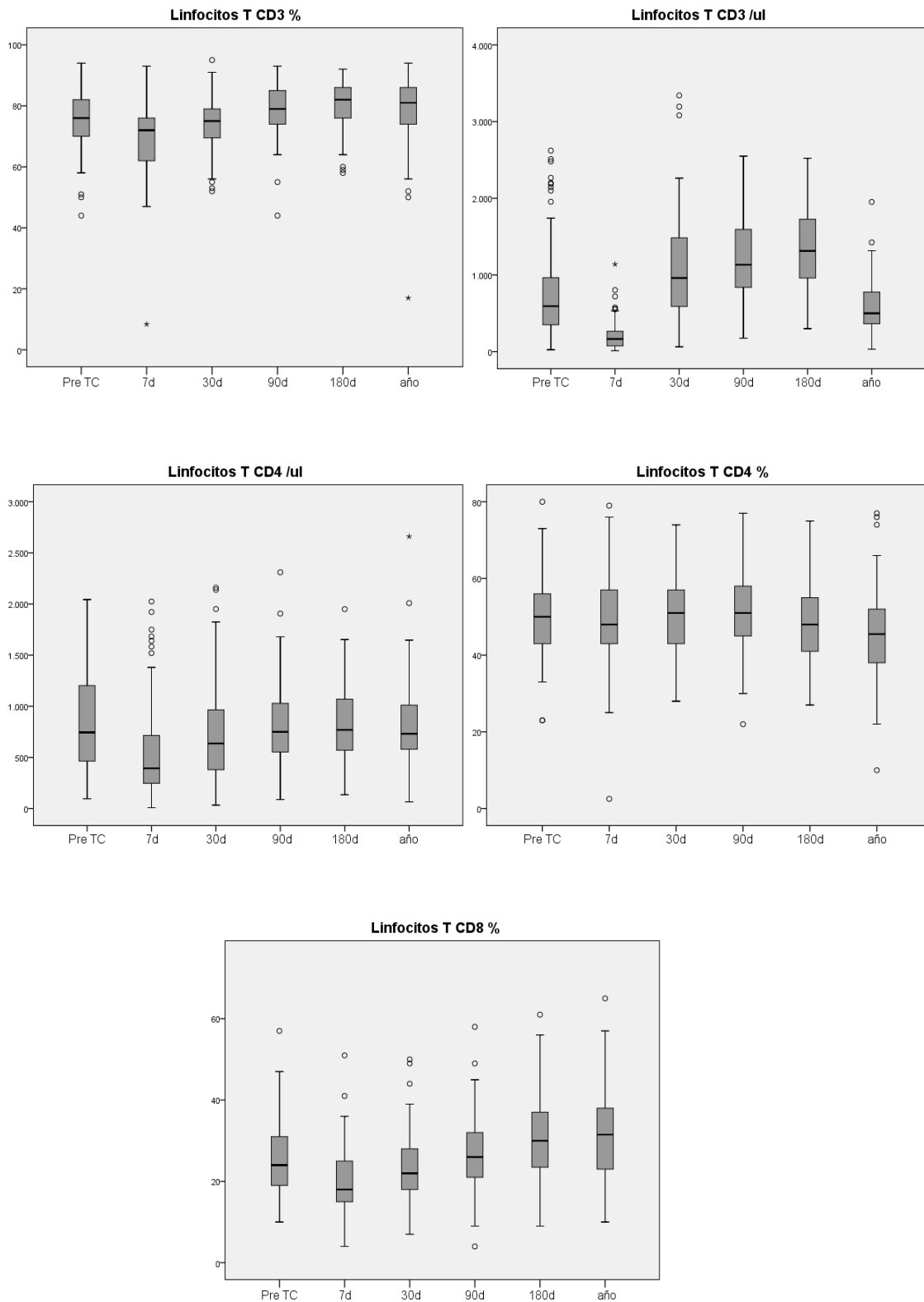


Figura 30: Cinética de las variables de inmunidad celular en TC. Análisis longitudinal con diagramas de cajas que representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

RESULTADOS

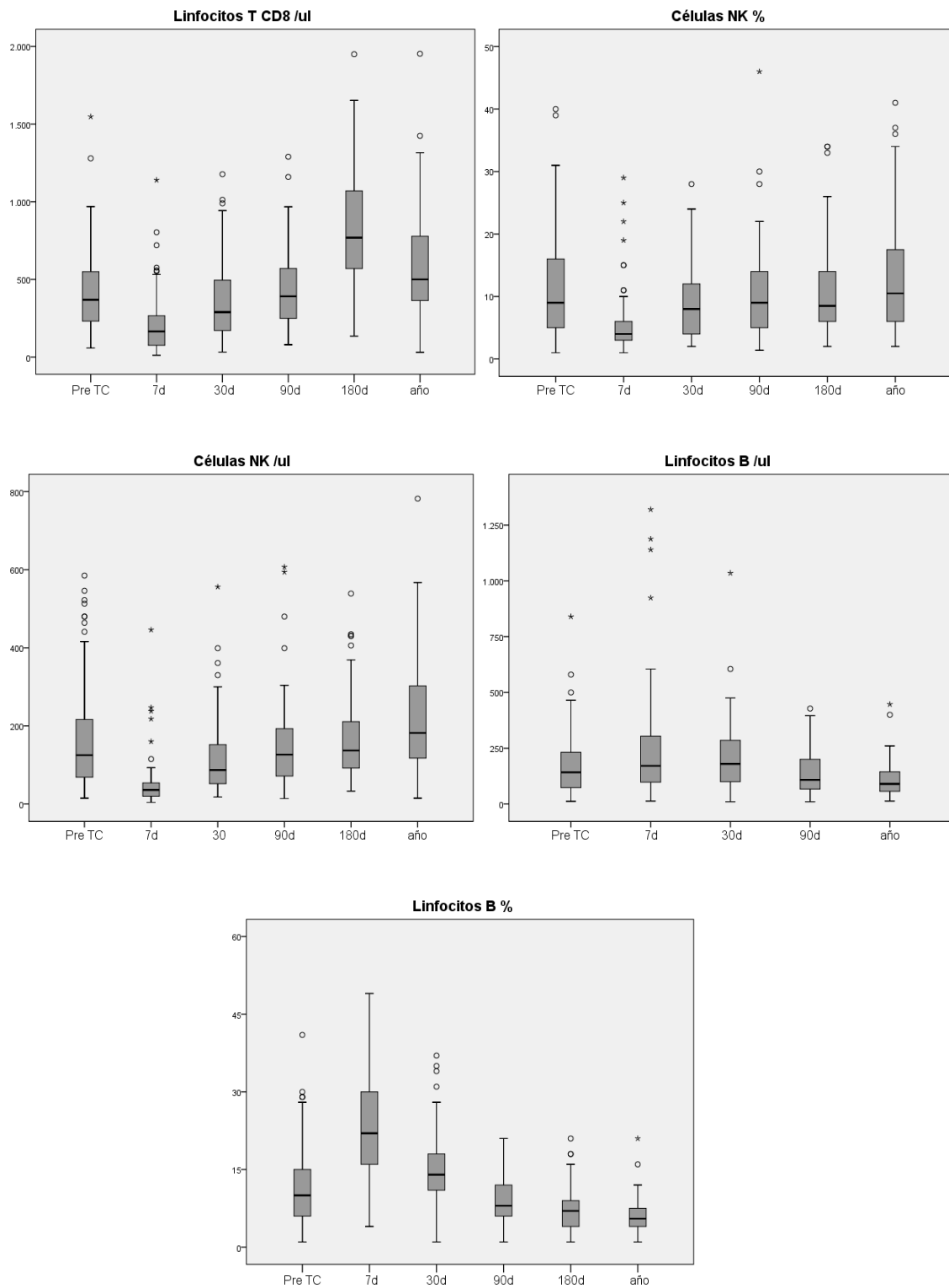


Figura 31: Cinética de las variables de inmunidad celular en TC. Análisis longitudinal con diagramas de cajas que representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

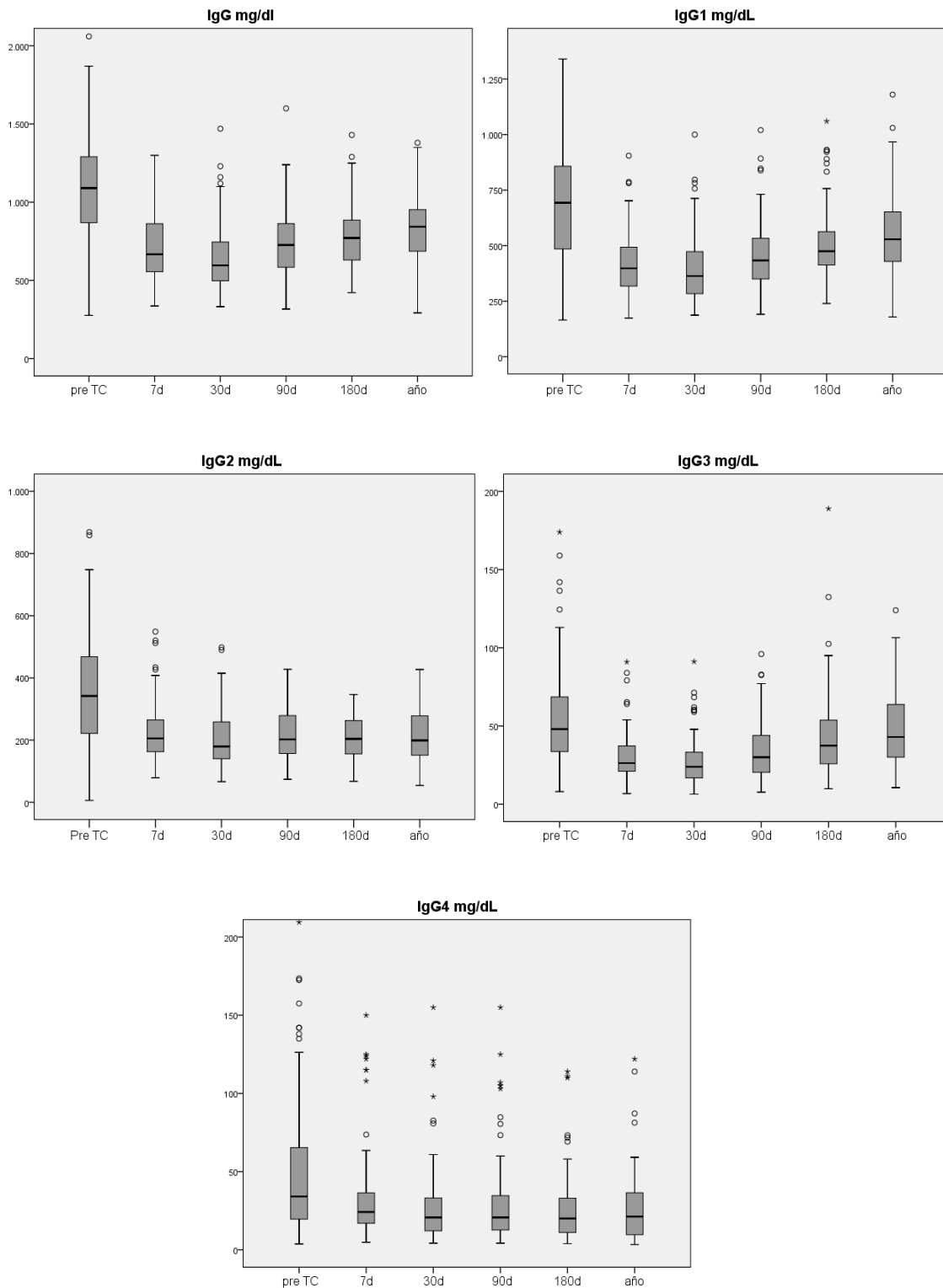


Figura 32: Cinética de las variables de inmunidad humoral en TC. Análisis longitudinal con diagramas de cajas que representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

RESULTADOS

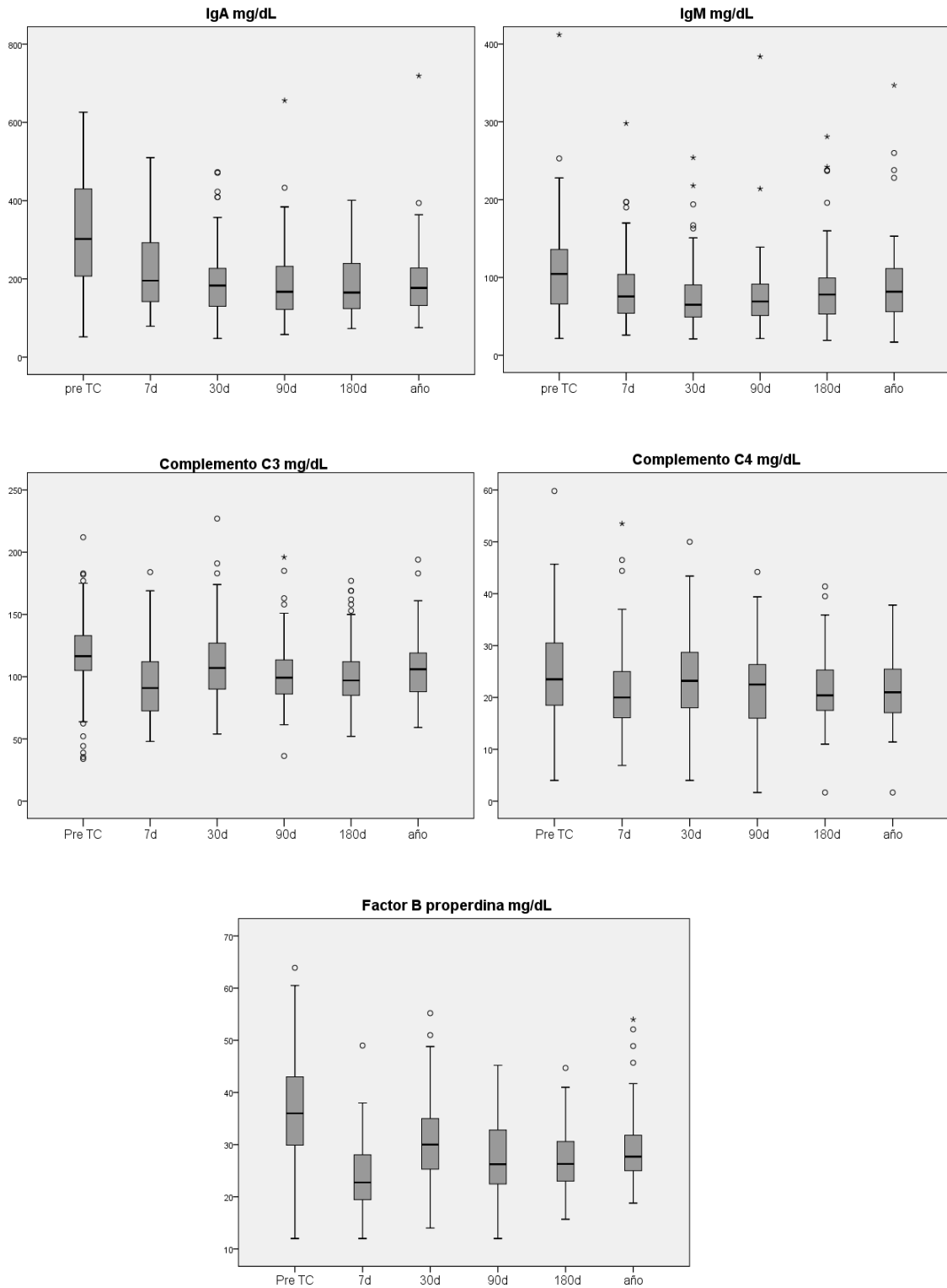


Figura 33: Cinética de las variables de inmunidad humoral en TC. Análisis longitudinal con diagramas de cajas que representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

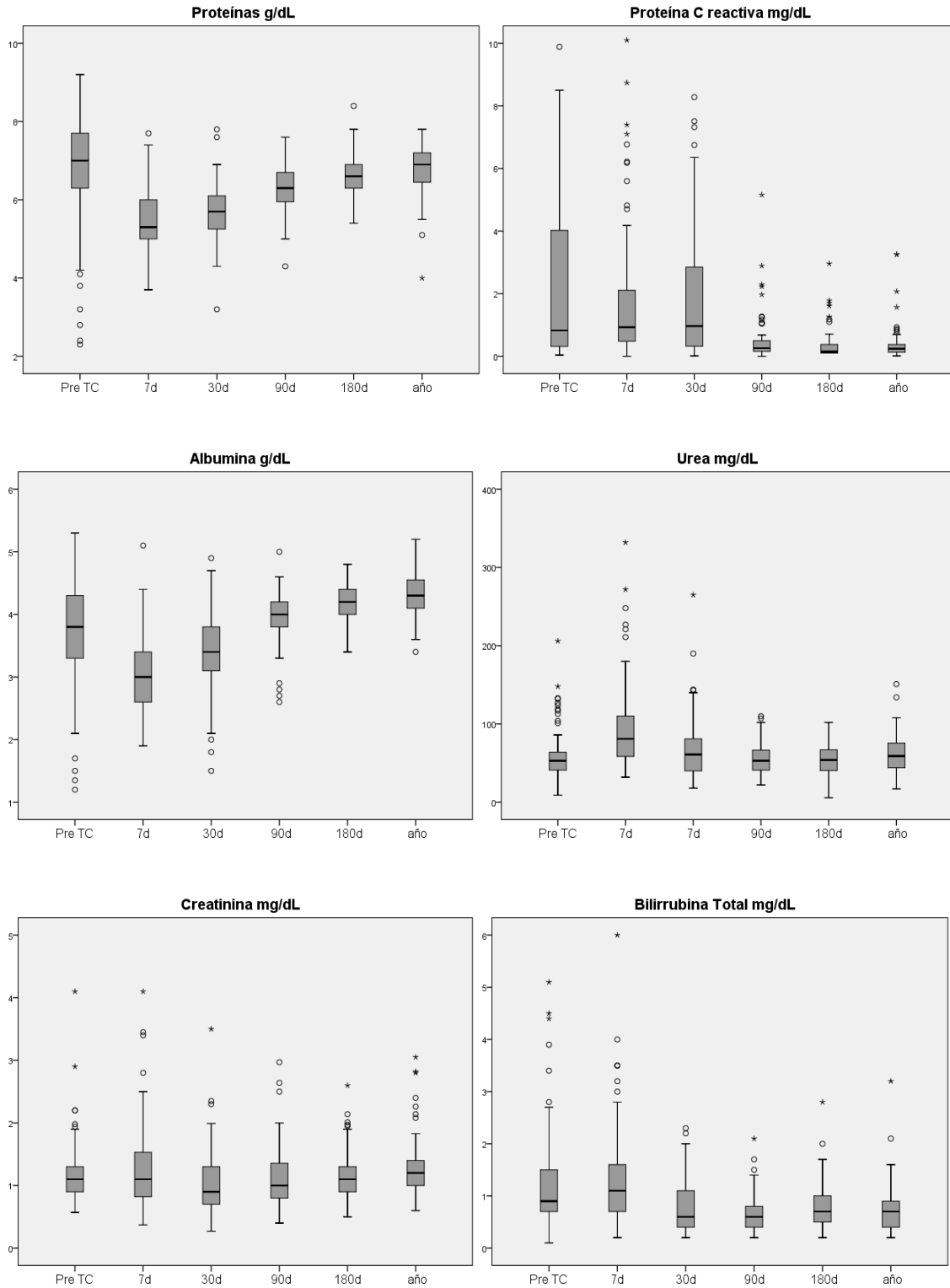


Figura 34: Cinética de las variables bioquímicas en TC. Análisis longitudinal con diagramas de cajas que representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

RESULTADOS

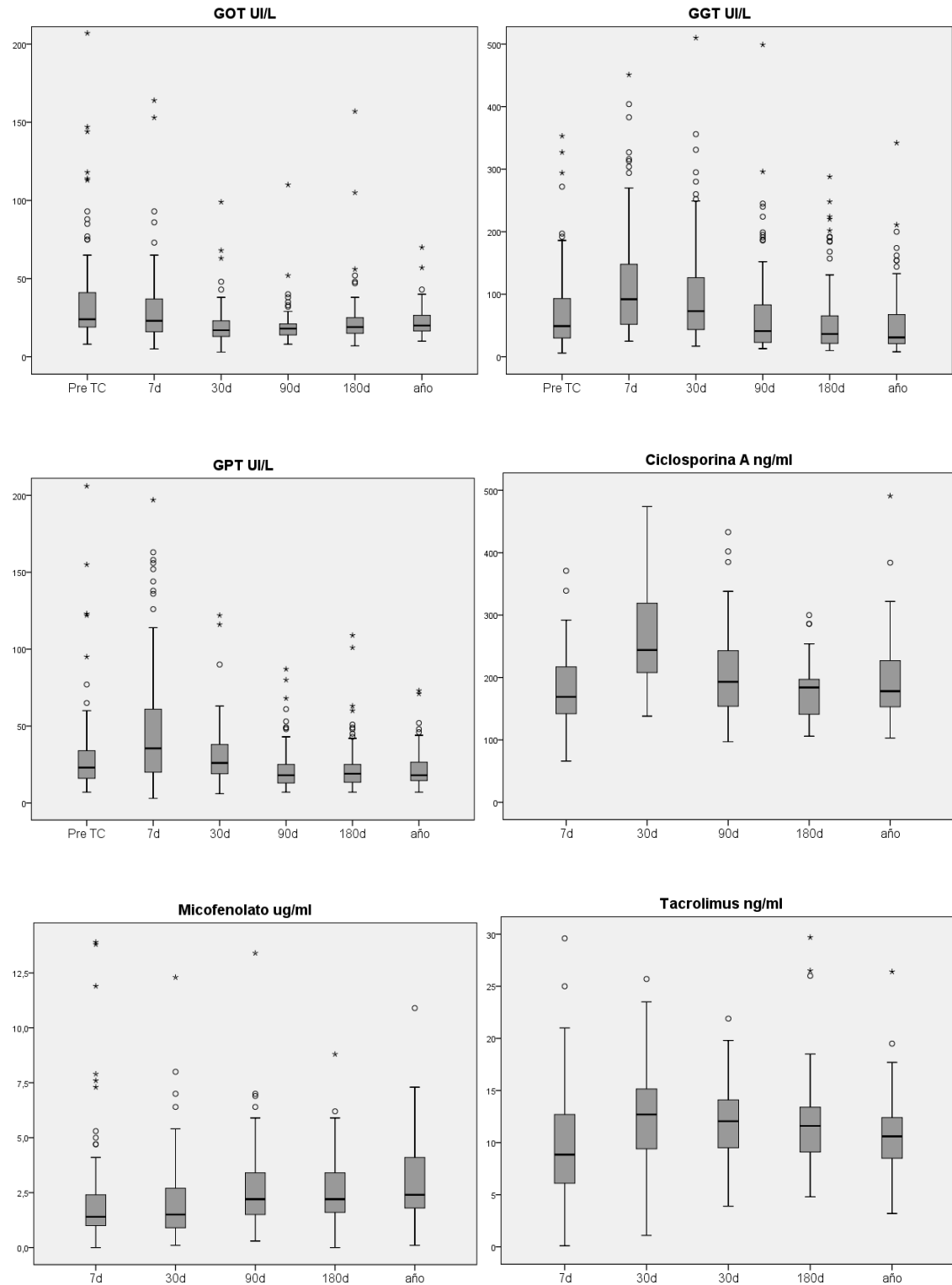


Figura 35: Cinética de las variables bioquímicas y niveles de fármacos inmunosupresores en TC. Análisis longitudinal con diagramas de cajas que representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

5.3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE NIVELES DE FÁRMACOS Y BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS

Ante la falta de estudios e información en el entorno del TC, en este apartado presentamos las correlaciones entre los posibles biomarcadores analizados. Es una de las aproximaciones realizadas a lo largo de este trabajo de tesis para establecer si hay relación entre los niveles de fármacos inmunosupresores y los distintos parámetros analizados, con especial interés, los de inmunocompetencia.

Esta información fue utilizada también para evitar incluir en los modelos de regresión logística multivariante predictivos, variables con alta correlación estadística. Estos modelos se exhibirán en secciones posteriores de la tesis.

Mediante el coeficiente de correlación (CC) de Pearson (CCP) y el grado de significación bilateral, analizamos la correlación entre los distintos parámetros (variables numéricas) medidos en distintos puntos consecutivos en el tiempo, 7 días, 30 días y 90 días post-TC.

Los niveles de fármacos inmunosupresores cuantificados fueron CsA, FK y MMF.

Los parámetros bioquímicos analizados fueron: niveles de proteínas totales, albumina, urea, creatinina, GOT, GPT, GGT y PCR.

Los parámetros de inmunidad humoral estudiados fueron: Inmunoglobulinas G, A y M, así como las subclases de inmunoglobulina G (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), también estudiaremos el comportamiento en nuestra población de los factores del complemento C3 y C4 y el FB. Para la evaluación de la inmunidad celular, estudiaremos el comportamiento en nuestro grupo de estudio de la distribución de las distintas poblaciones celulares, tanto de forma porcentual (%) como en valores absolutos

RESULTADOS

(células por μl), analizando la concentración de leucocitos, neutrófilos, linfocitos, y dentro de éstos la distribución de las distintas subpoblaciones de linfocitos T, CD3, CD4, CD8, los linfocitos B y las células NK.

Se Considera correlación significativa, cuando el coeficiente de correlación fue mayor o igual a 0.6 y una significación bilateral menor de valor de p de 0.05 ($p < 0.05$).

Como en el estudio pre-TC no hay medidas de niveles inmunosupresores no se hace el análisis en este punto.

En el **anexo 3** de la tesis se recogen las figuras que ilustra esta correlación.

En el punto de medida correspondiente a los 7 días post-TC no fueron observadas correlaciones significativas entre los niveles de fármacos inmunosupresores y los parámetros evaluados.

En el **anexo 3** de la tesis se recogen las figuras que ilustran la correlación entre los niveles de fármacos estudiados en el día 7 post-TC y las variables más representativas del estado de inmunocompetencia analizadas en este estudio.

En este mismo punto de estudio, los parámetros que presentaban una alta correlación de forma significativa fueron los que se indica a continuación.

Entre las parámetros bioquímicos: proteínas totales con albúmina (CC = 0.797) y urea con creatinina (CC = 0.727).

Entre las subpoblaciones celulares: leucocitos con neutrófilos/ μl (CC = 0.979); porcentaje (%) de linfocitos con % de neutrófilos (CC = 0.935), con células T CD3/ μl (CC = 0.845), con células T CD4/ μl (CC = 0.838), con células T CD8/ μl (CC = 0.681) y con el recuento de linfocitos B/ μl (CC = 0.616); recuento de linfocitos / μl con recuento de células T CD3/ μl (CC = 0.845), con células T CD4/ μl (CC = 0.838); con células T CD8/ μl (CC = 0.681) y con linfocitos B/ μl (CC = 0.616); porcentaje de neutrófilos con células T

CD3/ μ l (CC = -0.806), con linfocitos T CD4/ μ l (CC = -0.813) y con células T CD8/ μ l (CC = -0.631); porcentajes de células T CD3 con % de CD4 (CC = 0.745) y con % de linfocitos B (CC = -0.873); recuento de células T CD3/ μ l con el de células T CD4/ μ l (CC = 0.963), con células T CD8/ μ l (CC = 0.801) y con el de linfocitos B/ μ l (CC = 0.710); porcentaje de linfocitos T CD4 % con recuento de células T CD8/ μ l (CC = 0.707), con linfocitos B/ μ l (CC = 0.654); así como el recuento de células T CD8/ μ l con el de los linfocitos B/ μ l (CC = 0.683).

Entre las inmunoproteínas: Los niveles séricos de IgG correlacionaron altamente con los de las subclases IgG₁ (CC = 0.901) e IgG₂ (CC = 0.642).

En el punto de medida correspondiente a los 30 días post-TC no se detectaron correlaciones significativas entre los niveles de fármacos inmunosupresores y ninguno de los parámetros evaluados, como se ilustra mediante las figuras recogidas en el anexo 3.

Los parámetros que presentaban una correlación alta de forma significativa fueron los siguientes.

Entre los parámetros bioquímicos: El nivel de proteínas totales con los de albúmina (CC = 0.847) y entre las cifras de GOT y GPT (CC = 0.783).

De las subpoblaciones celulares evaluadas, las correlaciones altamente significativas han sido: El recuento de leucocitos con el de neutrófilos/ μ l (CC = 0.964); el % de neutrófilos con el recuento de linfocitos T CD3/ μ l (CC = - 0.730), T CD4/ μ l (CC = - 0.738); el % de linfocitos con el de neutrófilos (CC = - 0.950), con el de células T CD3/ μ l (CC = 0.741) y con el de T CD4/ μ l (CC = 0.743); recuento de linfocitos / μ l con el % de neutrófilos (CC = - 0.749); recuento de linfocitos T CD3/ μ l (CC = 0.903) con el nivel de T CD4/ μ l (CC = 0.869), T CD8/ μ l (CC = 0.774 y con linfocitos B / μ l (CC = 0.725); el % de

RESULTADOS

células T CD3 con el % de T CD4 (CC = 0.644), con el de linfocitos B (CC = -0.650); el recuento de linfocitos T CD3/ μl con el de T CD4/ μl (CC = 0.965), T CD8/ μl (CC = 0.873), linfocitos B/ μl (CC = 0.654); el % de T CD4 con el de T CD8 (CC = - 0.618); el recuento de T CD4/ μl con el de T CD8/ μl (CC = - 0.721 y con el de Linfocitos B/ μl (CC = 0.656).

Las IgG séricas totales tuvieron una correlación alta y significativa con la concentración de IgG₁ (CC = 0.913) e IgG₂ (CC = 0.732). El complemento C3 sérico mostró correlación significativa con el nivel de factor B circulante (CC = 0.688).

En el punto de medida correspondiente a los 90 días post-TC, se detectó una correlación altamente significativa entre los niveles de CsA y la concentración de bilirrubina total (CC = 0.620). No se detectaron correlaciones significativas entre otros niveles de fármaco y parámetros bioquímicos o inmunológicos.

Los parámetros que presentaban una correlación de forma significativa fueron como se exhibe a continuación. La cifra de proteínas totales con la de albúmina sérica (CC = 0.744); así como la GOT con la GPT (CC = 0.770). En lo que se refiere a recuentos y porcentajes de células: El recuento de leucocitos con el de neutrófilos/ μl (CC = 0.948), el % de linfocitos con el de neutrófilos (CC = - 0.938) y con su recuento/ μl (CC = - 0.623); el recuento linfocitario/ μl con el nivel de linfocitos T CD3/ μl (CC = 0.916), T CD4/ μl (CC = 0.836), T CD8/ μl (CC = 0.647) y con los de linfocitos B/ μl (CC = 0.654); el recuento de linfocitos T CD3/ μl con el de T CD4/ μl (CC = 0.915), con el de T CD8/ μl (CC = 0.699); el % de T CD4 con el de T CD8 (CC = - 0.675) y el % de células NK con el % de linfocitos T CD3 (CC = - 0.755). Finalmente la concentración de IgG total mostró correlación alta significativa con IgG₁ (CC = 0.871) e IgG₂ (CC = 0.662); el de C3 con el FB (CC = 0.699), y C4 (CC = 0.638); y el de C4 con el FB (CC = 0.658).

5.4 ASOCIACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CON EVENTOS CLINICOS: INFECCIÓN Y RECHAZO CELULAR AGUDO. ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS

La primera aproximación estadística para evaluar la posible asociación entre los biomarcadores y la presencia de infección o rechazo como variables clínicas, fue un análisis de comparación de medias entre pacientes que presentaban o no la complicación. Para la comparación de medias entre dos grupos utilizamos la prueba *T de student* para muestras independientes, consideramos asociación significativa aquella que mostraba un valor de $p < 0.05$. Analizamos todos los parámetros medidos en un punto previo pre-TC y en tres puntos de estudio consecutivos: 7, 30 y 90 días post-TC, estudiando las diferencias entre grupos estratificados con una variable cualitativa; la aparición o no de un proceso infeccioso grave a los 90 días post-TC y de igual modo en función o no de la aparición de un fenómeno de rechazo agudo del injerto en el mismo periodo.

El **anexo 4** de la tesis recoge las figuras que ilustran la asociación significativa entre los biomarcadores propuestos, la infección y el rechazo celular agudo

5.4.1 ASOCIACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CON EVENTOS DE INFECCIÓN.

ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS

5.4.1.1 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN GRAVE DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO

Se observa que los niveles sanguíneos de FK determinado el día 7 post-TC son significativamente mayores en individuos infectados en comparación con aquellos que no desarrollan infección (Tabla 5).

5.4.1.2 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN GRAVE DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO

Estudio pre-TC

El estudio realizado antes del trasplante, cuando el paciente es incluido en lista de espera, aquellos que desarrollaron infecciones durante los primeros 3 meses tras el trasplante (en adelante pacientes infectados), tuvieron porcentajes de linfocitos significativamente más bajos y porcentajes de neutrófilos más altos (Tabla 7).

Estudio día 7 post-TC

Siete días tras el trasplante cardiaco los pacientes infectados mostraron porcentajes y recuento absoluto de linfocitos más bajos, porcentaje de neutrófilos y de PCR más altos y niveles séricos de IgG, IgA, C3, C4 y FB más bajos como se muestra en las tablas 10 y 11.

Estudio día 30 post-TC

Al mes del trasplante, el grupo de pacientes infectados mostraban niveles de PT, ALB y valores porcentuales y absolutos de linfocitos más bajos que el resto. Al mismo tiempo este grupo mostró mayores cifras de urea, GOT, GGT, PCR, así como, valores porcentuales y absolutos de neutrófilos (tabla 13).

Estudio día 90 post-TC

En este punto de estudio los pacientes infectados mostraron concentraciones inferiores de PT, ALB, BT, IgA y del recuento absoluto de células T CD4. Los niveles de GGT, PCR y del porcentaje de linfocitos T CD8 fueron significativamente más alto en estos pacientes en comparación con aquellos que no desarrollaron infecciones (Tablas 16, 17 y 18).

5.4.1.3 TABLAS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN GRAVE DURANTE LOS PRIMEROS 90 DIAS POSTERIORES AL TRASPLANTE

Tabla 5: Asociación entre fármacos inmunosupresores e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	TIEMPO	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
CsA	7 DIAS	193.37 +/- 58.72	179.32 +/- 76.17	0.637
Fk		12.07 +/- 6.87	8.85 +/- 4.38	0.025
MMF		2.69 +/- 3.27	2.25 +/- 2.66	0.568
CsA	30 DIAS	216.87 +/- 41.63	283.92 +/- 89.30	0.050
Fk		11.36 +/- 3.14	13.23 +/- 4.09	0.111
MMF		1.69 +/- 1.45	2.29 +/- 2.01	0.173
CsA	90 DIAS	210.25 +/- 66.70	209.96 +/- 85.73	0.993
Fk		11.67 +/- 4.08	12.21 +/- 3.37	0.602
MMF		2.45 +/- 1.56	2.80 +/- 2.00	0.418

CsA = Ciclosporina ng/ml Fk = Tacrolimus ng/ml MMF = Micofenolato µg/ml
(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

RESULTADOS

Tabla 6: Asociación de la variabilidad a lo largo del tiempo del nivel de fármacos inmunosupresores e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE*	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
CV FK 90 DIAS	35.20+/-19.43	38.17+/-17.58	0.590
CV FK AÑO	40.25+/-13.57	33.26+/-13.46	0.088
CV CsA 90 DIAS	28.40+/-11.64	33.86+/-18.37	0.394
CV CsA AÑO	29.25+/-9.08	35.66+/-16.06	0.214
CV MMF 90 DIAS	61.50+/-40.10	58.27+/-30.03	0.757
CV MMF AÑO	57.58+/-19.93	53.00+/-23.68	0.540

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar.

(*) Mediana del valor de la variable. CV= Coeficiente de variación.

Tabla 7: Asociación entre las variables bioquímicas en el punto Pre-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
Proteínas g/dL	6.54 +/- 1.39	6.81 +/- 1.41	0.375
Urea mg/dL	62.87 +/- 40.31	56.64 +/- 24.32	0.329
Creatinina mg/dL	1.18 +/- 0.42	1.15 +/- 0.51	0.788
Albumina g/dL	3.61 +/- 0.72	3.76 +/- 0.88	0.462
Bilirrubina Total mg/dL	1.39 +/- 0.99	1.14 +/- 0.89	0.205
GOT U/L	52.73 +/- 87.74	133.68 +/- 750.06	0.558
GPT U/L	57.56 +/- 156.62	94.76 +/- 463.21	0.670
GGT U/L	66.36 +/- 74.15	73.31 +/- 61.94	0.626
Leucocitos x 1000 / μ l	9.42 +/- 2.80	8.62 +/- 4.31	0.342
Linfocitos %	17.02 +/- 9.63	22.03 +/- 10.76	0.026
Neutrófilos %	72.90 +/- 12.00	67.38 +/- 13.08	0.044
Linfocitos/ μ l	1474.90+/-780.67	1702.39+/-795.78	0.178
Neutrófilos/ μ l	7038.29+/-2852.31	6078.78+/-4107.78	0.233

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 8: Asociación entre las variables de inmunidad humoral en el punto pre-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
IgG mg/dL	990.93+/-410.54	1121.83+/-327.69	0.093
IgA mg/dL	282.10+/-115.30	339.45+/-148.13	0.057
IgM mg/dL	115.44+/-73.67	105.41+/-49.50	0.427
IgG ₁ mg/dL	645.93+/-292.45	711.59+/-255.04	0.291
IgG ₂ mg/dL	340.82+/-196.92	369.67+/-163.17	0.477
IgG ₃ mg/dL	52.12+/-35.39	57.91+/-33.40	0.463
IgG ₄ mg/dL	40.32+/-29.49	63.08+/-67.85	0.095
Complemento C ₃ mg/dL	109.20+/-40.02	121.45+/-29.16	0.128
Complemento C ₄ mg/dL	22.34+/-9.28	25.43+/-9.46	0.175
FB Properdina mg/dL	35.74+/-10.94	36.97+/-10.10	0.630
PCR mg/dL	4.74+/-7.44	3.10+/-6.53	0.310

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 9: Asociación entre las variables de inmunidad celular en el punto pre-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
Linfocitos T CD3 %	75.54+/-10.23	74.72+/-8.63	0.710
Linfocitos T CD3 / μ l	1169.37+/-695.75	1266.68+/-660.47	0.537
Linfocitos T CD4 %	50.75+/-9.70	49.19+/-10.61	0.515
Linfocitos T CD4 / μ l	753.67+/-415.27	840.60+/-473.98	0.417
Linfocitos T CD8 %	24.50+/-9.00	25.11+/-8.95	0.771
Linfocitos T CD8 / μ l	407.74+/-313.32	416.42+/-262.65	0.895
Natural killer %	11.00+/-7.41	11.23+/-8.06	0.900
Natural killer / μ l	157.15+/-132.86	179.09+/-146.774	0.512
Linfocitos B %	11.96+/-9.58	11.79+/-6.86	0.923
Linfocitos B / μ l	150.48+/-123.16	187.40+/-148.63	0.266

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 10: Asociación entre las variables bioquímicas a los 7 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
Proteínas g/dL	5.24 +/- 0.71	5.57 +/- 0.81	0.052
Urea mg/dL	106.06 +/- 49.76	91.00 +/- 54.21	0.195
Creatinina mg/dL	1.44 +/- 0.71	1.18 +/- 0.59	0.063
Albumina g/dL	2.86 +/- 0.62	3.09 +/- 0.61	0.163
Gamma %	13.22 +/- 2.81	14.21 +/- 3.85	0.317
Bilirrubina Total mg/dL	1.52 +/- 1.21	1.23 +/- 0.78	0.166
GOT U/L	39.86 +/- 49.80	29.58 +/- 23.62	0.164
GPT U/L	46.65 +/- 46.15	55.82 +/- 60.04	0.464
GGT U/L	124.24 +/- 91.04	119.27 +/- 93.30	0.810
Leucocitos x 1000 / μ l	14.19 +/- 5.21	13.42 +/- 4.82	0.479
Linfocitos %	6.24 +/- 4.51	8.54 +/- 5.56	0.048
Neutrófilos %	89.19 +/- 5.99	85.83 +/- 6.41	0.016
Linfocitos/ μ l	796.61+/-546.03	1148.52+/-869.42	0.043
Neutrófilos/ μ l	12766.16+/-5112.71	11542.38+/-4370.80	0.226

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 11: Asociación entre las variables de inmunidad humoral a los 7 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
IgG mg/dL	642.13+/-182.30	742.14+/-218.37	0.035
IgA mg/dL	186.07+/-83.37	232.54+/-98.19	0.030
IgM mg/dL	87.37+/-55.21	84.11+/-39.05	0.745
IgG ₁ mg/dL	400.67+/-123.91	433.48+/-147.59	0.313
IgG ₂ mg/dL	200.12+/-82.74	239.04+/-101.42	0.081
IgG ₃ mg/dL	31.09+/-16.38	30.62+/-15.90	0.900
IgG ₄ mg/dL	26.41+/-19.54	40.04+/-42.47	0.110
Complemento C ₃ mg/dL	78.04+/-19.18	103.91+/-29.84	0.001
Complemento C ₄ mg/dL	17.85+/-5.56	22.79+/-8.21	0.004
Fb Properdina mg/dL	21.98+/-6.74	25.00+/-6.32	0.044
PCR mg/dL	4.82+/-7.94	1.55+/-2.06	0.003

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

RESULTADOS

Tabla 12: Asociación entre las variables de inmunidad celular a los 7 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
Linfocitos T CD3 %	69.12+/-12.62	69.61+/-11.71	0.865
Linfocitos T CD3 / μ l	579.20+/-590.82	845.15+/-624.89	0.073
Linfocitos T CD4 %	48.48+/-11.46	49.15+/-12.42	0.818
Linfocitos T CD4 / μ l	415.08+/-464.11	597.18+/-441.57	0.092
Linfocitos T CD8 %	20.44+/-8.55	20.05+/-7.87	0.840
Linfocitos T CD8 / μ l	162.08+/-140.68	242.72+/-210.26	0.083
Natural killer %	5.32+/-4.02	5.39+/-5.47	0.953
Natural killer / μ l	30.04+/-21.11	58.65+/-72.04	0.055
Linfocitos B %	24.48+/-12.04	23.04+/-11.63	0.608
Linfocitos B / μ l	167.76+/-129.85	268.30+/-272.92	0.083

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 13: Asociación entre las variables bioquímicas a los 30 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
Proteínas g/dL	5.35 +/- 0.62	5.85 +/- 0.70	0.001
Urea mg/dL	79.48 +/- 52.30	62.20 +/- 26.57	0.033
Creatinina mg/dL	1.13 +/- 0.64	1.02 +/- 0.38	0.327
Albumina g/dL	3.02+/-0.58	3.50+/-0.55	0.001
Gamma %	11.75+/-2.39	12.19+/-3.22	0.555
Bilirrubina Total mg/dL	0.84+/-0.63	0.77+/-0.41	0.508
GOT U/L	26.13+/-19.73	18.31+/-8.40	0.007
GPT U/L	40.10+/-47.14	30.22+/-21.01	0.155
GGT U/L	137.44+/-130.51	94.43+/-78.03	0.048
Leucocitos x 1000 / μ l	8.93+/-5.72	7.42+/-2.76	0.084
Linfocitos %	14.23+/-9.37	20.81+/-10.95	0.006
Neutrófilos %	77.51+/-12.67	69.86+/-11.94	0.006
Linfocitos/ μ l	1104.97+/-743.58	1486.95+/-899.24	0.048
Neutrófilos/ μ l	7133.28+/-5405.61	5241.23+/-2345.25	0.018

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 14: Asociación entre las variables de inmunidad humoral a los 30 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
IgG mg/dL	597.06+/-204.89	663.57+/-205.45	0.145
IgA mg/dL	166.51+/-85.56	203.54+/-84.75	0.058
IgM mg/dL	75.05+/-49.34	77.47+/-37.86	0.799
IgG ₁ mg/dL	383.32+/-143.04	402.30+/-157.75	0.606
IgG ₂ mg/dL	195.61+/-109.02	207.71+/-86.19	0.589
IgG ₃ mg/dL	29.54+/-17.81	26.46+/-14.70	0.412
IgG ₄ mg/dL	18.91+/-8.94	35.52+/-43.06	0.060
Complemento C ₃ mg/dL	106.87+/-35.62	111.77+/-30.35	0.526
Complemento C ₄ mg/dL	23.41+/-8.89	24.11+/-7.20	0.707
Fb Properdina mg/dL	32.00+/-9.91	29.89+/-6.82	0.254
PCR mg/dL	6.38+/-8.76	2.22+/-6.16	0.015

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 15: Asociación entre las variables de inmunidad celular a los 30 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
Linfocitos T CD3 %	72.52+/-10.75	74.73+/-7.62	0.288
Linfocitos T CD3 / μ l	900.00+/-640.13	1195.00+/-712.07	0.079
Linfocitos T CD4 %	48.64+/-10.38	50.86+/-11.05	0.393
Linfocitos T CD4 / μ l	596.96+/-426.85	814.39+/-499.11	0.062
Linfocitos T CD8 %	23.64+/-7.01	23.31+/-8.68	0.865
Linfocitos T CD8 / μ l	296.80+/-234.67	371.32+/-259.41	0.222
Natural killer %	8.89+/-5.50	9.47+/-6.66	0.704
Natural killer / μ l	101.83+/-85.99	131.67+/-104.97	0.223
Linfocitos B %	16.92+/-9.79	14.05+/-5.57	0.096
Linfocitos B / μ l	185.17+/-118.27	225.67+/-172.13	0.296

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 16: Asociación entre las variables bioquímicas a los 90 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
Proteínas g/dL	6.06+/-0.67	6.42+/-0.48	0.004
Urea mg/dL	52.66+/-19.79	55.91+/-19.28	0.463
Creatinina mg/dL	1.13+/-0.53	1.12+/-0.43	0.943
Albumina g/dL	3.75+/-0.47	4.07+/-0.32	0.000
Bilirrubina Total mg/dL	0.56+/-0.23	0.72+/-0.36	0.038
GOT U/L	21.48+/-18.58	18.68+/-7.78	0.299
GPT U/L	21.85+/-17.42	21.13+/-13.83	0.832
GGT U/L	114.96+/-189.88	62.31+/-60.61	0.042
Leucocitos x 1000 / μ l	6.01+/-2.31	6.78+/-2.16	0.124
Linfocitos %	24.95+/-10.70	24.81+/-9.55	0.950
Neutrófilos %	64.72+/-11.46	63.62+/-10.03	0.646
Linfocitos/ μ l	1363.72+/-528.35	1621.77+/-670.79	0.077
Neutrófilos/ μ l	4030.39+/-1975.79	4410.52+/-1793.18	0.368

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 17: Asociación entre las variables de inmunidad humoral a los 90 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
IgG mg/dL	758.75+/-195.53	736.93+/-235.42	0.689
IgA mg/dL	138.68+/-53.43	203.85+/-102.76	0.004
IgM mg/dL	81.44+/-69.14	76.81+/-34.34	0.682
IgG ₁ mg/dL	496.57+/-157.56	441.85+/-160.12	0.183
IgG ₂ mg/dL	228.42+/-81.14	219.70+/-86.71	0.690
IgG ₃ mg/dL	40.91+/-23.15	33.05+/-17.64	0.114
IgG ₄ mg/dL	20.81+/-11.26	34.47+/-34.14	0.092
Complemento C ₃ mg/dL	104.35+/-30.24	101.20+/-25.59	0.634
Complemento C ₄ mg/dL	23.55+/-9.17	22.02+/-7.09	0.421
Fb Properdina mg/dL	29.43+/-8.52	27.15+/-6.67	0.200
PCR mg/dL	1.22+/-2.21	0.38+/-0.70	0.011

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

RESULTADOS

Tabla 18: Asociación entre las variables de inmunidad celular a los 90 días post-TC e infección. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	INFECCIÓN (X+/- DS)	NO INFECCIÓN (X+/- DS)	p
Linfocitos T CD3 %	81.04+/-6.39	77.86+/-8.62	0.096
Linfocitos T CD3 / μ l	1084.92+/-468.68	1310.60+/-544.00	0.071
Linfocitos T CD4 %	49.92+/-8.47	52.41+/-11.57	0.328
Linfocitos T CD4 / μ l	669.73+/-303.05	876.97+/-407.45	0.023
Linfocitos T CD8 %	30.65+/-10.20	24.97+/-8.79	0.011
Linfocitos T CD8 / μ l	409.00+/-217.34	424.07+/-244.36	0.788
Natural killer %	8.81+/-4.51	10.80+/-8.12	0.244
Natural killer / μ l	114.38+/-68.86	165.03+/-126.36	0.059
Linfocitos B %	8.69+/-5.11	9.10+/-4.55	0.714
Linfocitos B/ μ l	117.00+/-85.16	155.60+/-106.79	0.109

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

5.4.2 ASOCIACIÓN DE LOS BIOMARCADORES CON EVENTOS DE RECHAZO DEL INJERTO. ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS

5.4.2.1 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO

No se observa asociación significativa entre los niveles sanguíneos de los fármacos inmunosupresores determinados de forma sistemática en los distintos tiempos del estudio y el desarrollo de rechazo agudo del injerto (Tabla 19).

5.4.2.2 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO CELULAR AGUDO DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO

Estudio pre-TC

En el estudio realizado en el punto previo al trasplante, cuando el paciente es incluido en lista de espera, los pacientes que desarrollaron rechazo celular agudo durante los primeros 3 meses posteriores al trasplante (en adelante pacientes con rechazo), se

observan niveles significativamente más altos del factor C4 de complemento (tabla 22).

Estudio día 7 post-TC

Siete días tras el trasplante cardiaco como se detalla en la tabla 26, los pacientes con rechazo mostraron porcentajes más elevados de linfocitos B y simultáneamente más bajos de células T CD3 y CD8.

Estudio día 30 post-TC

Al mes del trasplante, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tablas 27, 28 y 29).

Estudio día 90 post-TC

En este punto de estudio los pacientes con rechazo tuvieron mayores niveles del recuento leucocitario y del valor porcentual y absoluto de neutrófilos (Tabla 30).

Recordamos que en el **anexo 4**, se recogen las figuras que ilustran la asociación significativa entre los biomarcadores propuestos y los distintos eventos clínicos estudiados, infección y el rechazo celular agudo.

5.4.2.3 TABLAS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS Y EL DESARROLLO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DURANTE LOS PRIMEROS 90 DIAS POSTERIORES AL TRASPLANTE

RESULTADOS

Tabla 19: Asociación entre niveles de fármacos inmunosupresores y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	TIEMPO	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
CsA	7 DIAS	195,37+/-61,13	178,68+/-75,48	0,575
Fk		9,21+/-5,89	10,07+/-5,37	0,595
MMF		3,28+/-3,54	2,15+/-2,58	0,172
CsA	30 DIAS	271,87+/-96,99	266,32+/-82,85	0,875
Fk		13,62+/-6,43	12,38+/-3,64	0,361
MMF		2,28+/-2,03	2,08+/-1,85	0,664
CsA	90 DIAS	194,50+/-72,29	215,00+/-83,77	0,539
Fk		12,82+/-5,51	11,84+/-2,82	0,386
MMF		2,70+/-1,54	2,70+/-1,99	0,986

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

CsA = Ciclosporina ng/ml Fk = Tacrolimus ng/ml MMF = Micofenolato µg/m

Tabla 20: Asociación entre la variabilidad a lo largo del tiempo del nivel de fármacos inmunosupresores y el rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE*	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
CV FK 3M	42.66+/-17.24	35.83+/-18.09	0.249
CV FK AÑO	36.72+/-11.05	34.63+/-15.01	0.604
CV CsA 3M	39.85+/-17.16	30.08+/-16.73	0.187
CV CsA AÑO	35.00+/-10.28	32.80+/-15.29	0.708
CV MMF 3M	53.81+/-27.24	60.06+/-33.04	0.562
CV MMF AÑO	50.22+/-18.78	55.39+/-24.77	0.433

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

(*) Mediana del valor de la variable. CV= Coeficiente de variación.

Tabla 21: Asociación entre las variables bioquímicas en el punto Pre-TC y el rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
Proteínas g/dL	7,26 +/- 0,75	6,71 +/-1,43	0,086
Urea mg/dL	50,34 +/-24,45	58,97+/-30,27	0,215
Creatinina mg/dL	1,03+/-0,29	1,14+/-0,38	0,235
Albumina g/dL	4,00+/-0,53	3,68+/-0,88	0,143
Bilirrubina Total mg/dL	0,88+/-0,60	1,30+/-0,98	0,054
GOT U/L	23,81+/-8,19	53,44+/-82,35	0,097
GPT U/L	25,00+/-10,35	50,61+/-118,79	0,328
GGT U/L	57,72+/-45,86	76,71+/-71,50	0,244
Leucocitos x 1000 /µl	8,09+/-1,94	8,89+/-4,26	0,384
Linfocitos %	23,41+/-9,17	20,10+/-10,85	0,188
Neutrófilos %	65,36+/-9,71	69,44+/-13,26	0,176
Linfocitos/µl	1861.45+/-834.33	1569.86+/-760.70	0.119
Neutrófilos/µl	5350.48+/-1814.72	6457.53+/-4103.04	0.213

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 22: Asociación entre las variables de inmunidad humoral en el punto pre-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
IgG mg/dL	1139,76+/-285,98	1067,88+/-380,49	0,426
IgA mg/dL	339,57+/-133,93	322,74+/-143,67	0,634
IgM mg/dL	117,95+/-63,00	107,75+/-58,34	0,491
IgG ₁ mg/dL	717,15+/-201,03	687,27+/-290,26	0,678
IgG ₂ mg/dL	405,73+/-178,51	351,41+/-174,38	0,244
IgG ₃ mg/dL	57,14+/-36,21	57,27+/-34,16	0,989
IgG ₄ mg/dL	48,00+/-44,08	58,88+/-64,57	0,497
Complemento C ₃ mg/dL	124,80+/-38,82	114,79+/-30,05	0,266
Complemento C ₄ mg/dL	29,28+/-12,58	22,92+/-6,92	0,009
Fb Properdina mg/dL	39,06+/-11,42	35,50+/-10,10	0,235
PCR mg/dL	2,40+/-4,62	3,44+/-6,35	0,492

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 23: Asociación entre las variables de inmunidad celular en el punto pre-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
Linfocitos T CD3 %	75,71+/-11,64	75,37+/-7,91	0,890
Linfocitos T CD3 / μ l	1317,38+/-778,93	1216,85+/-636,09	0,592
Linfocitos T CD4 %	50,71+/-13,19	49,77+/-9,73	0,748
Linfocitos T CD4 / μ l	877,25+/-544,81	798,92+/-434,51	0,544
Linfocitos T CD8 %	24,12+/-9,29	25,42+/-9,03	0,602
Linfocitos T CD8 / μ l	418,69+/-349,87	412,94+/-256,51	0,941
Natural killer %	11,41+/-10,75	11,29+/-7,19	0,956
Natural killer / μ l	167,50+/-149,88	175,19+/-141,00	0,848
Linfocitos B %	11,00+/-6,94	11,16+/-6,78	0,931
Linfocitos B / μ l	185,06+/-159,91	161,47+/-114,76	0,503

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 24: Asociación entre las variables bioquímicas a los 7 días Post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
Proteínas g/dL	5,57+/-0,93	5,44+/-0,75	0,517
Urea mg/dL	98,78+/-55,30	95,55+/-53,14	0,741
Creatinina mg/dL	1,44+/-0,85	1,21+/-0,55	0,137
Albumina g/dL	3,19+/-0,74	2,97+/-0,56	0,184
Bilirrubina Total mg/dL	1,31+/-1,26	1,28+/-0,76	0,887
GOT U/L	34,21+/-49,89	32,00+/-27,70	0,785
GPT U/L	51,60+/-36,38	54,06+/-61,48	0,856
GGT U/L	98,91+/-71,74	127,39+/-97,75	0,200
Leucocitos x 1000 / μ l	14,07+/-3,95	13,60+/-5,20	0,692
Linfocitos %	8,50+/-5,58	7,70+/-5,33	0,536
Neutrófilos %	86,68+/-6,59	86,78+/-6,42	0,948
Linfocitos/ μ l	1245.57+/-1029.21	990.67+/-716.24	0.183
Neutrófilos/ μ l	12167.82+/-3504.03	11889.81+/-4921.03	0.802

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

RESULTADOS

Tabla 25: Asociación entre las variables de la inmunidad humoral a los 7 días post-TC y el rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
IgG mg/dL	672,38+/-225,47	723,82+/-208,90	0,334
IgA mg/dL	206,66+/-86,22	218,79+/-97,35	0,609
IgM mg/dL	76,59+/-33,76	87,42+/-47,40	0,333
IgG ₁ mg/dL	393,26+/-98,11	431,63+/-150,95	0,300
IgG ₂ mg/dL	229,72+/-123,21	226,40+/-89,61	0,897
IgG ₃ mg/dL	25,62+/-11,76	31,73+/-16,37	0,134
IgG ₄ mg/dL	26,78+/-13,98	38,49+/-41,27	0,229
Complemento C ₃ mg/dL	93,40+/-23,14	96,20+/-31,40	0,707
Complemento C ₄ mg/dL	24,06+/-9,35	20,39+/-7,13	0,060
Fb Properdina mg/dL	25,61+/-8,30	23,38+/-5,82	0,174
PCR mg/dL	1,63+/-1,67	2,35+/-3,67	0,398

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 26: Asociación entre las variables de la inmunidad celular a los 7 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
Linfocitos T CD3 %	64,24+/-17,22	71,01+/-9,73	0,032
Linfocitos T CD3 / μ l	922,44+/-817,13	732,86+/-561,59	0,256
Linfocitos T CD4 %	47,20+/-16,17	49,49+/-10,91	0,481
Linfocitos T CD4 / μ l	684,22+/-612,58	511,09+/-398,21	0,153
Linfocitos T CD8 %	16,67+/-7,28	21,18+/-8,05	0,034
Linfocitos T CD8 / μ l	231,94+/-267,97	217,92+/-173,11	0,789
Natural killer %	5,21+/-5,60	5,39+/-4,99	0,894
Natural killer / μ l	60,61+/-99,41	47,79+/-49,67	0,448
Linfocitos B %	28,33+/-17,51	22,02+/-9,33	0,043
Linfocitos B / μ l	334,61+/-326,55	214,53+/-212,82	0,064

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 27: Asociación entre las variables bioquímicas a los 30 días post-TC y el rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
Proteínas g/dL	5,71+/-0,74	5,70+/-0,71	0,933
Urea mg/dL	71,04+/-40,76	66,23+/-35,67	0,591
Creatinina mg/dL	1,11+/-0,44	1,04+/-0,48	0,560
Albumina g/dL	3,33+/-0,58	3,38+/-0,60	0,781
Bilirrubina Total mg/dL	0,78+/-0,52	0,80+/-0,48	0,858
GOT U/L	17,91+/-9,06	21,40+/-14,15	0,287
GPT U/L	34,85+/-26,42	32,71+/-32,60	0,782
GGT U/L	78,52+/-66,64	115,52+/-104,30	0,128
Leucocitos x 1000 / μ l	8,14+/-2,92	7,80+/-4,17	0,723
Linfocitos %	17,17+/-11,84	19,31+/-10,62	0,421
Neutrófilos %	74,27+/-13,85	71,54+/-12,24	0,376
Linfocitos/ μ l	1303.95+/-842.03	1391.66+/-881.97	0.680
Neutrófilos/ μ l	6146.64+/-2785.37	5713.54+/-3859.77	0.626

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 28: Asociación entre las variables de la inmunidad humoral a los 30 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
IgG mg/dL	603,59+/-217,70	654,44+/-203,16	0,313
IgA mg/dL	189,46+/-74,48	192,81+/-89,37	0,884
IgM mg/dL	69,23+/-31,35	78,57+/-43,58	0,395
IgG ₁ mg/dL	373,22+/-131,01	403,04+/-158,66	0,467
IgG ₂ mg/dL	200,44+/-129,08	205,11+/-81,81	0,852
IgG ₃ mg/dL	22,96+/-9,99	28,58+/-16,72	0,179
IgG ₄ mg/dL	23,71+/-25,78	32,45+/-39,60	0,379
Complemento C ₃ mg/dL	102,02+/-21,07	112,63+/-33,87	0,211
Complemento C ₄ mg/dL	23,88+/-6,80	23,92+/-7,93	0,985
Fb Properdina mg/dL	28,45+/-5,38	30,98+/-8,30	0,224
PCR mg/dL	2,83+/-5,61	3,51+/-7,55	0,726

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 29: Asociación entre las variables de la inmunidad celular a los 30 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
Linfocitos T CD3 %	73,24+/-10,75	74,28+/-8,13	0,659
Linfocitos T CD3 / μ l	1114,65+/-649,49	1102,55+/-717,96	0,950
Linfocitos T CD4 %	49,82+/-13,53	50,30+/-10,17	0,873
Linfocitos T CD4 / μ l	788,06+/-512,94	737,65+/-482,52	0,706
Linfocitos T CD8 %	22,65+/-9,83	23,60+/-7,78	0,672
Linfocitos T CD8 / μ l	321,47+/-236,96	355,69+/-258,37	0,623
Natural killer %	8,94+/-6,39	9,40+/-6,35	0,792
Natural killer / μ l	116,88+/-126,17	124,41+/-93,15	0,785
Linfocitos B %	16,29+/-8,68	14,52+/-6,68	0,361
Linfocitos B / μ l	230,59+/-152,19	209,17+/-160,94	0,623

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 30: Asociación entre las variables bioquímicas a los 90 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
Proteínas g/dL	6,29+/-0,53	6,33+/-0,57	0,764
Urea mg/dL	54,68+/-16,90	55,09+/-20,16	0,931
Creatinina mg/dL	1,05+/-0,31	1,14+/-0,50	0,432
Albumina g/dL	3,85+/-0,40	4,02+/-0,39	0,087
Bilirrubina Total mg/dL	0,63+/-0,27	0,69+/-0,35	0,480
GOT U/L	19,13+/-6,50	19,56+/-13,01	0,881
GPT U/L	23,72+/-13,80	20,62+/-15,14	0,392
GGT U/L	88,68+/-106,74	73,68+/-116,93	0,592
Leucocitos x 1000 / μ l	7,45+/-2,51	6,30+/-2,07	0,033
Linfocitos %	21,95+/-10,00	25,73+/-9,68	0,115
Neutrófilos %	67,89+/-9,96	62,74+/-10,31	0,041
Linfocitos/ μ l	1587.77+/-761.47	1536.58+/-606.35	0.745
Neutrófilos/ μ l	5103.11+/-2052.80	4061.20+/-1719.47	0.019

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

RESULTADOS

Tabla 31: Asociación entre las variables de la inmunidad humoral a los 90 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	RECHAZO (X+/- DS)	p
IgG mg/dL	734,05+/-232,00	745,35+/-223,60	0,854
IgA mg/dL	183,62+/-82,06	185,91+/-99,59	0,931
IgM mg/dL	68,27+/-29,30	80,58+/-49,67	0,331
IgG ₁ mg/dL	435,76+/-133,98	460,75+/-165,64	0,611
IgG ₂ mg/dL	202,41+/-98,00	225,98+/-82,22	0,364
IgG ₃ mg/dL	27,01+/-14,57	36,80+/-19,97	0,098
IgG ₄ mg/dL	19,73+/-15,11	33,17+/-32,33	0,164
Complemento C ₃ mg/dL	107,65+/-28,00	100,65+/-26,50	0,339
Complemento C ₄ mg/dL	24,85+/-8,21	21,83+/-7,49	0,149
Fb Properdina mg/dL	28,77+/-7,71	27,52+/-7,16	0,532
PCR mg/dL	0,87+/-2,56	0,55+/-0,81	0,399

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

Tabla 32: Asociación entre las variables de la inmunidad celular a los 90 días post-TC y rechazo agudo del injerto. Comparación de medias mediante *T de Student* para muestras independientes

VARIABLE	RECHAZO (X+/- DS)	NO RECHAZO (X+/- DS)	p
Linfocitos T CD3 %	76,55+/-11,52	79,54+/-6,68	0,150
Linfocitos T CD3 / μ l	1202,60+/-640,00	1252,67+/-495,27	0,714
Linfocitos T CD4 %	49,50+/-13,31	52,31+/-9,83	0,309
Linfocitos T CD4 / μ l	799,60+/-507,15	816,95+/-348,20	0,863
Linfocitos T CD8 %	26,35+/-11,12	26,82+/-9,11	0,850
Linfocitos T CD8 / μ l	397,35+/-273,22	426,30+/-223,87	0,634
Natural killer %	9,75+/-9,51	10,33+/-6,48	0,757
Natural killer / μ l	145,65+/-135,64	150,52+/-107,25	0,869
Linfocitos B %	10,10+/-5,02	8,63+/-4,58	0,224
Linfocitos B/ μ l	166,00+/-111,16	136,37+/-98,24	0,258

(X+/- DS)= Media +/- Desviación Estandar

5.5 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES GRAVES O RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO

La segunda aproximación para la identificación de biomarcadores de riesgo de infección y rechazo, se desarrolla mediante el análisis de tablas cruzadas con el estadístico Chi-cuadrado, comparamos frecuencias de desarrollo del evento clínico estudiado en los pacientes estratificados en dos grupos según el nivel del biomarcador.

Hemos utilizado distintos puntos de corte para generar los dos grupos, tratando de establecer puntos de corte que se aproximen a una plausibilidad biológica. Valores por encima y por debajo del valor de corte establecido, se asociarían a mayor riesgo de desarrollo de alguno de los eventos estudiados.

Las variables categóricas relacionadas con evento clínico analizado son: la aparición de procesos infecciosos graves durante los tres meses tras el trasplante y el desarrollo de fenómenos de rechazo celular agudo del injerto durante el mismo periodo de observación.

Las variables categóricas del biomarcador se establecieron mediante distintas aproximaciones que dieron lugar a la formación de 2 grupos, por encima y por debajo de un valor concreto. Para estratificar los pacientes en dos grupos, se establecieron como punto de corte el valor de las medianas de las variables de inmunidad humoral y celular analizadas. En las variables bioquímicas y hematológicas, el valor de punto de corte utilizado es el valor, fuera de rango normal, asumido por el laboratorio del servicio de bioquímica y hematología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, o el resultado derivado de las curvas de operación característica del receptor (ROC).

Se consideran significativas aquellas asociaciones entre variables categóricas que muestran un valor de $p < 0.05$.

5.5.1 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES GRAVES

RESULTADOS

5.5.1.1 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES DE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES GRAVES EN PACIENTES TRASPLANTADOS CARDIACOS

No se observa asociación significativa entre las alteraciones cuantitativas de los niveles sanguíneos de los fármacos inmunosupresores determinados de forma sistemática en los distintos tiempos de estudio con el desarrollo de infección grave teniendo en cuenta los valores de efectividad establecidos por el Laboratorio de Bioquímica Hospital Gregorio Marañón (valores de FK comprendidos entre 5-15 ng/mL, CsA entre 100- 200 ng/mL y MMF entre 2-5 µg/mL).

Se observa una tendencia estadística hacia la presencia de niveles altos de alguno de los fármacos anticalcineurínicos determinados en el día 7 y el desarrollo de infecciones, asociación que se observa invertida en la determinación obtenida el día 30 post-TC, llegando a ser significativa cuando se determina el nivel de anticalcineurínico independientemente de su fórmula (tablas 33 y 34).

Teniendo en cuenta el rango de efectividad y seguridad en el entorno del TC del nivel de fármacos inmunosupresores (valores de FK comprendidos entre 10 y 15 ng/mL y de CsA entre 250 y 350 ng/mL), se observa una tendencia estadística hacia la presencia de niveles bajos de FK o de alguno de los fármacos anticalcineurínicos y la ausencia del desarrollo de infecciones en el tiempo de estudio correspondiente al día 7 post-TC (Tabla 35).

Tabla 33: Asociación entre los niveles elevados de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de infección grave a los 7 días posteriores al trasplante.

VARIABLE		INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
FK > 15 ng/ml	7 DIAS	23.8%	11%	0.268
CsA > 200 ng/ml		50%	28%	0.391
Anticalcineurínico alto *		31%	15.9%	0.105

(*) = FK >15 ng/ml o CsA >200 ng/ml

Tabla 34: Asociación entre los niveles elevados de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de infección grave a los 30 días posteriores al trasplante.

VARIABLE		INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
FK > 15	30 DIAS	15%	39.5%	0.080
CsA > 200		62.5%	88%	0.137
Anticalcineurínico alto *		28.6%	57.4%	0.014

(*) = FK >15 ng/ml o CsA >200 ng/ml

Tabla 35: Asociación entre niveles de fármacos inmunosupresores en función del rango de efectividad y seguridad en el entorno del trasplante y el desarrollo de infección grave.

VARIABLE		INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
FK <10	7 DIAS	38%	64%	0,063
AntiCalcineurínico bajo		48%	70%	0,066

Anticalcineurínico bajo= FK <10 y/o CsA <250

5.5.1.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD DE NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES CON DESARROLLO DE INFECCIONES

La variabilidad de los niveles de fármacos inmunosupresores tras el trasplante es un hecho frecuente. Por ello, intentamos evaluar el potencial impacto de esta variabilidad con la aparición de procesos infecciosos graves.

La variabilidad de la medición de los niveles séricos de fármacos realizada de forma sistemática a lo largo de los distintos puntos de estudio, día 7, día 30, día 90, día 180 y un año post-TC, se calculó mediante la obtención del coeficiente de variación de los niveles obtenidos en suero de los distintos fármacos inmunosupresores.

RESULTADOS

Como queda recogido en la tabla número 36, se observa asociación significativa entre el desarrollo de procesos de infección grave y el aumento de la variabilidad de la medición sérica de los niveles de FK a lo largo del año post-TC, aquellos que presentaban un coeficiente de variación superior al 34.50%, entre las medidas obtenidas del nivel del fármaco a lo largo de los distintos puntos de estudio, de tal forma que aquellos individuos en los cuales se superaba dicho nivel presentaban una mayor tendencia al desarrollo de infección respecto al resto de individuos. El valor de corte del coeficiente de variación coincide con el valor de la mediana de dicha variable.

Tabla 36: Asociación de la variabilidad a lo largo del tiempo del nivel de fármacos inmunosupresores y desarrollo de infección.

<i>VARIABLE*</i>	<i>INFECCIÓN</i>	<i>NO INFECCIÓN</i>	<i>p</i>
CV FK AÑO > 34.50%	75%	39%	0.035
CV CsA 3M >32.00%	52%	30%	0.283
CV CsA AÑO >29.00%	42%	52%	0.721
CV MMF 3M >56.00%	42%	52%	0.748
CV MMF AÑO >54.00%	58%	46%	0.527

(*) Mediana del valor de la variable. CV= Coeficiente de variación.

5.5.1.3 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

Estudio pre-TC

Durante el periodo pre-TC se observa que aquellos que mostraban leucocitosis y neutrofilia, tenían una mayor probabilidad de desarrollar un proceso infeccioso respecto al resto de individuos estudiados (Tabla 37).

Estudio día 7 post-TC

En los parámetros medidos a la semana de la intervención, no se observa asociación significativa con el desarrollo de infección activa (Tabla 40).

Estudio día 30 post-TC

En las determinaciones analíticas realizadas el día 30, se observa que aquellos que mostraban niveles séricos de proteínas totales inferiores a 5,25 gr/dL (hipoproteïnemia); de albúmina menores de 3,05 gr/dL (hipoalbuminemia: valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables con una especificidad del 80%); y de valores del recuento de linfocitos en sangre inferiores al 16,00% (linfopenia) presentaban mayor riesgo de desarrollar infección. Los pacientes con niveles de GOT superiores a 40,00 U/L (hipertransaminemia) desarrollaron infecciones con mayor frecuencia que aquellos que no presentan alteración en dichos parámetros (Tabla 43).

Estudio día 90 post-TC

Los pacientes en los cuales la determinación de parámetros se realizó a los tres meses post-TC, eran más propensos a padecer infección cuando presentaban niveles séricos de proteínas totales inferiores a 5,85 gr/dL y de albúmina inferior a 3,85 gr/dL (valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 90% y 80% respectivamente), como se muestra en la tabla 46.

5.5.1.4 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS DE INMUNIDAD HUMORAL Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

RESULTADOS

Estudio pre-TC

Durante el periodo previo al trasplante, ninguno de los parámetros determinados, presentaron una asociación significativa con una mayor o menor probabilidad de presentar un proceso infeccioso.

Estudio día 7 post-TC

Aquellos pacientes que en el día 7 presentaban valores de IgA inferiores a 195,50 mg/dL, hipocomplementemia C3 (con distintos puntos de corte), niveles de C4 por debajo de 20,00 mg/dL y de FB inferiores a 22,75 mg/dL, presentaban con más frecuencia un proceso infeccioso grave (Tabla 41).

Estudio día 30 post-TC

Al mes post-TC, los parámetros que indicaban una mayor probabilidad de infección en la cohorte estudiada, eran los niveles de IgG inferiores a 508,50 mg/dL (hipogammaglobulinemia IgG, valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables con una especificidad del 80%) y los de PCR superiores a 0,96 mg/dL como muestra la tabla 44.

Estudio día 90 post-TC.

La determinación paramétrica realizada a los tres meses del trasplante que recoge la tabla 47, mostró que los pacientes con mayor predisposición al desarrollo de una infección, eran aquellos que mostraban en su analítica unos valores de IgA inferiores a 167,00 mg/dL y un valor de PCR superior a 0,26 mg/dL.

5.5.1.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS CELULARES Y EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

Los parámetros utilizados para monitorizar la inmunidad celular en nuestro grupo de estudio, durante el periodo pre-TC, no han mostrado asociación significativa con el desarrollo de un proceso infeccioso activo (Tabla 39). Sin embargo en los resultados analíticos obtenidos el día 7, se observa asociación significativa entre infectados y niveles sanguíneos bajos de células T CD4 (varios puntos de corte) (Tabla 42).

Al mes post-TC no encontramos asociación entre los valores de estos parámetros y la propensión al desarrollo de infección (Tabla 45).

5.5.1.6 TABLAS ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE INFECCIONES GRAVES DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO

Tabla 37: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos en el punto pre-TC y desarrollo de infección grave

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
Proteínas g/dL >6.40	32.6%	23.6%	0.464
Urea mg/dL >45.00	62.5%	64.9%	0.829
Creatinina mg/dL >1.20	31.3%	27%	0.647
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	38.7%	31.5%	0.503
GPT U/L >41	13.3%	19.1%	0.574
GGT U/L >60	34.5%	43%	0.505
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	46.9%	23.3%	0.021
Linfocitos %<16.00	43.8%	37%	0.523
Linfocitos <1300 /μl	46.9%	35.6%	0.287
Neutrófilos>7500/ μl	46.9%	19.2%	0.005

RESULTADOS

Tabla 38: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral en el punto pre-TC e desarrollo de infección grave.

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
IgG mg/dL <1090.00	59.4%	44.6%	0.199
IgA mg/dL <302.00	59.4%	45.4%	0.281
IgM mg/dL <104.50	46.9%	50%	0.831
IgG ₁ mg/dL <693.00	55.2%	46.3%	0.495
IgG ₂ mg/dL <342.00	58.6%	44.4%	0.255
IgG ₃ mg/dL <48.00	55.2%	46.3%	0.495
IgG ₄ mg/dL <34.40	53.6%	48.1%	0.816
Complemento C ₄ mg/dL <23.50	57.7%	46.1%	0.472
Fb Properdina mg/dL <36.00	46.1%	51.1%	0.808
PCR mg/dL >0.82	66.7%	42.1%	0.061
PCR mg/dL >3.72**	40.7%	19.3%	0.061

(**) Valores según ROC 80% especificidad

Tabla 39: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular en el punto pre-TC y desarrollo de infección grave.

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
Linfocitos T CD3% <76.00	42.8%	50.9%	0.500
Linfocitos T CD3/μl <1137.00	59.2%	45.6%	0.350
Linfocitos T CD4./μl <744.50	55.5%	47.4%	0.641
Natural killer % <9.00	50%	40.3%	0.487
Natural killer /μl <125.00	51.8%	47.4%	0.816
Linfocitos B % <10.00	53.6%	42.1%	0.360
Linfocitos B /μl <142.00	59.2%	45.6%	0.350

Tabla 40: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 7 días post-TC y desarrollo de infección grave

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
Proteínas g/dL <6.40	93.3%	82.6%	0.217
Urea mg/dL >45.00	100%	91.4%	0.174
Creatinina mg/dL >1.20	53.3%	35.7%	0.123
Albumina g/dL <3.40	70%	64.8%	0.786
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	53.3%	37.7%	0.186
GOT U/L >40.00	23.3%	21.4%	0.799
GGT U/L >60.00	33.3%	43%	0.386
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	76.7%	68.6%	0.478
Linfocitos % <16.00	96.7%	88.6%	0.272
Linfocitos <1300 /μl	83.3%	68.6%	0.148
Linfocitos >3500/ μl	3%	4.3%	0.552
Neutrófilos >7500/ μl	86.7%	82.8%	0.771

Tabla 41: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 7 días post-TC y el desarrollo de infección grave.

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
IgG mg/dL <666.50	58.6%	46%	0.370
IgA mg/dL <195.50	69%	41.3%	0.024
IgM mg/dL <75.55	55.2%	47.6%	0.654
IgG ₁ mg/dL <398.00	53.6%	46.5%	0.647
IgG ₂ mg/dL <205.50	60.7%	44.8%	0.250
IgG ₃ mg/dL <26.30	53.6%	48.3%	0.818
IgG ₄ mg/dL <24.20	53.6%	45.8%	0.647
Complemento C ₃ mg/dL <90.90	69%	41%	0.023
Complemento C ₃ mg/dL <66.60*	31%	9.8%	0.017
Complemento C ₄ mg/dL <20.00	69%	39.3%	0.013
Fb Properdina mg/dL <22.75	67.8%	39.3%	0.038
Fb Properdina mg/dL <19.15*	53.6%	10%	0.000
PCR mg/dL > 0.93	57.1%	45.9%	0.367

(*) Valores según ROC 90% especificidad

Tabla 42: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 7 días post-TC y el desarrollo de infección grave.

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
Linfocitos T CD3% <72.00	52%	48.3%	0.815
Linfocitos T CD3/μl <593.00	60%	45%	0.240
Linfocitos T CD4% <48.00	52%	40%	0.344
Linfocitos T CD4/μl < 394.00	76%	38.3%	0.002
Linfocitos T CD4.Abs /μl <186.00*	28%	10%	0.049
Linfocitos T CD8% <18.00	48%	38.3%	0.472
Linfocitos T CD8/μl <165.00	56%	46.7%	0.482
Natural killer /μl 36.00	64%	41.7%	0.095
Linfocitos B /μl 166.00	60%	45%	0.240

(*) Valores según ROC 90% especificidad

RESULTADOS

Tabla 43: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 30 días post-TC y el desarrollo de infección grave

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
Proteínas g/dL <6.40	92.8%	79.4%	0.139
Proteínas g/dL <5.25**	46.4%	16.2%	0.004
Urea mg/dL >45.00	72.4%	63.8%	0.487
Creatinina mg/dL >1.20	34.5%	24.6%	0.332
Albumina g/dL <3.40	60%	37.9%	0.064
Albumina g/dL <3.05**	44%	16.7%	0.012
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	27.6%	17.9%	0.288
GOT U/L >40.00	13.8%	1.5%	0.027
GPT U/L >41.00	31%	16.2%	0.109
GGT U/L >60.00	72.4%	67.6%	0.811
Leucocitos x 1000 <4.00/μl	7%	2.9%	0.581
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	24.1%	13.2%	0.234
Linfocitos % <16.00	62.1%	35.8%	0.025
Linfocitos <1300 /μl	65.6%	55.2%	0.377
Neutrófilos <1800/ μl	3.4%	0%	0.302
Neutrófilos >7500/ μl	27.6%	14.9%	0.163

(**) Valores según ROC 80% especificidad

Tabla 44: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 30 días post-TC y el desarrollo de infección grave.

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
IgG mg/dL <596.50	63.3%	43.9%	0.123
IgG mg/dL <508.50**	50%	19.7%	0.004
IgA mg/dL <183.00	64.3%	42.8%	0.072
IgM mg/dL <65.00	57.1%	46%	0.370
IgG ₂ mg/dL <179.50	60%	45.8%	0.340
IgG ₄ mg/dL <20.70	52%	47.4%	0.812
Complemento C ₃ mg/dL <107.00	58.3%	45.9%	0.342
Fb Properdina mg/dL <30.00	41.7%	52.4%	0.471
PCR mg/dL >0.96	79.2%	38.7%	0.001

(**) Valores según ROC 80% especificidad

Tabla 45: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 30 días post-TC y el desarrollo de infección grave.

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
Linfocitos T CD3% <75.00	56%	44.1%	0.348
Linfocitos T CD3/μl <961.00	64%	43.8%	0.149
Linfocitos T CD4% <51.00	52%	47.4%	0.812
Linfocitos T CD4/μl <636.50	68%	42.1%	0.054
Linfocitos T CD8% <22.00	40%	45.8%	0.810
Linfocitos T CD8/μl <289.50	60%	45.6%	0.337
Natural killer % <8.00	41.7%	49.1%	0.630
Natural killer /μl <87.00	58.3%	45.6%	0.337
Linfocitos B % <14.00	33.3%	50.8%	0.224

Tabla 46: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 90 días post-TC y el desarrollo de infección grave

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
Proteínas g/dL <6.40	70.4%	44.9%	0.040
Proteínas g/dL <5.85*	37%	8.7%	0.002
Creatinina mg/dL >1.20	33.3%	30.4%	0.810
Albumina g/dL <3.40	14.8%	3%	0.055
Albumina g/dL <3.85**	55.6%	16.4%	0.000
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	3.7%	11.8%	0.438
GOT U/L >40.00	3.7%	1.4%	0.486
GPT U/L >41.00	14.8%	7.2%	0.263
GGT U/L >60.00	37%	31.9%	0.638
Leucocitos x 1000 <4.00/μl	18.6%	7.3%	0.141
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	3.7%	7.3%	0.671
Linfocitos % <16.00	29.6%	19.1%	0.283
Linfocitos <1300 /μl	48.1%	41.2%	0.647
Neutrófilos <1800/ μl	14.8%	4.4%	0.098

(*) Valores según ROC 90% especificidad. (**) Valores según ROC 80% especificidad.

Tabla 47: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 90 días post-TC y el desarrollo de infección grave.

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
IgG mg/dL <726.00	41.7%	52.4%	0.471
IgA mg/dL <167.00	75%	39.3%	0.004
IgM mg/dL <69.10	54.2%	47.5%	0.635
IgG ₁ mg/dL <433.50	42.8%	52.6%	0.610
IgG ₂ mg/dL <202.50	42.8%	52.6%	0.610
IgG ₃ mg/dL <30.05	38.1%	54.4%	0.307
IgG ₄ mg/dL <20.75	57.9%	47.4%	0.597
Complemento C ₄ mg/dL <22.50	34.8%	52.4%	0.220
Fb Properdina mg/dL <26.25	34.8%	55.7%	0.141
PCR mg/dL > 0.59*	47.8%	10.2%	0.000
PCR mg/dL >0.26	78.3%	37.3%	0.001

(*) Valores según ROC 90% especificidad

Tabla 48: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 90 días post-TC y el desarrollo de infección grave.

VARIABLE	INFECCIÓN	NO INFECCIÓN	p
Linfocitos T CD3% <79.00	35%	54.2%	0.106
Linfocitos T CD3/μl <1133.50	53.8%	48.3%	0.814
Linfocitos T CD4% 51.00	50%	42.4%	0.637
Linfocitos T CD4/μl <750.00	57.7%	46.6%	0.479
Linfocitos T CD8% <26.00	30.8%	56%	0.037
Natural killer % <9.00	42.3%	47.4%	0.814
Natural killer /μl <126.50	53.8%	48.3%	0.814
Linfocitos B% <8.00	46.1%	40.7%	0.643
Linfocitos B /μl <108.00	53.8%	47.4%	0.641

5.5.1.7 ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE RIESGO DE INFECCIÓN GRAVE

Las tablas cruzadas que se utilizaron para evaluar la asociación entre las variables cualitativas de la sección anterior, también nos dan información sobre la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de las mismas. Seleccionamos aquellas que poseían un valor de p significativo <0.05 con una especificidad mayor del 80% como posibles biomarcadores, por su capacidad para evidenciar una mayor probabilidad de desarrollar infección posterior al trasplante cardiaco. La alta especificidad se selecciona para minimizar la posibilidad de falsos positivos independientemente de la sensibilidad.

Estudio pre-TC

En la determinación analítica Pre-TC la neutrofilia junto con valores altos de PCR podrían ser variables de interés como biomarcador (Tabla 49).

Estudio día 7 post-TC

En el punto de toma de muestra correspondiente al día 7, los parámetros seleccionados fueron: hipocomplementemia C3, niveles de FB bajos y la linfopenia de células T CD4 < 200 células/ μ l (Tabla 50).

Estudio día 30 post-TC

En este punto de estudio, los parámetros seleccionados fueron: hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipogammaglobulinemia < 500 mg/dL, y presencia de hipertransaminemia (GOT >40 UI/L) (Tabla 51).

Estudio día 90 post-TC

Los parámetros seleccionados fueron: hipoproteinemia, hipoalbuminemia y los niveles séricos altos de PCR (tabla 52).

En las tablas se exhiben los valores que definen las variables y los niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

5.5.1.8 TABLAS DEL ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE RIESGO DE INFECCIÓN GRAVE

Tabla 49: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores de riesgo de infección grave en el punto pre-TC

VARIABLE	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
Leucocitos x 1000 > 10,00/μl	76,7	46,8	46,8	76,7
Neutrófilos > 7500/μl	80,8	46,8	51,7	77,6
PCR mg/dL > 0,82	57,8	66,6	42,8	78,5
PCR mg/dL > 3,72*	80,7	40,7	50,0	74,1

(*)Valores según ROC 90% especificidad

Tabla 50: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores de riesgo de infección grave a los 7 días post-TC

VARIABLE	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
IgA mg/dL < 195,50	58,7	68,9	43,4	80,4
Complemento C ₃ mg/dL < 90,90	59,0	69,0	44,4	80,0
Complemento C ₃ mg/dL < 66,60*	90,0	31,0	60,0	73,0
Complemento C ₄ mg/dL < 20,00	60,6	68,9	45,4	80,4
Fb Properdina mg/dL < 22,75	58,3	67,8	43,2	79,5
Fb Properdina mg/dL < 19,15*	90,0	53,5	71,4	80,5
Linfocitos T CD4/μl < 394,00	61,7	76,0	45,2	80,6
Linfocitos T CD4/μl < 186,00*	90,0	28,0	53,8	75,0

(*) Valores según ROC 90% especificidad

RESULTADOS

Tabla 51: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores de riesgo de infección grave a los 30 días post-TC

VARIABLE	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
Proteínas g/dL <5,25**	83,8	46,4	54,1	79,1
Albumina g/dl < 3,05**	83,8	44,0	50,0	79,7
GOT U/L>40,0	98,5	13,8	80,0	72,8
Linfocitos%<16,00	64,1	62,0	42,8	79,6
Anticalseurínico elevado	42,6	28,0	17,0	59,2
IgG mg/dL <508,50**	80,3	50,0	53,6	77,9
PCR mg/dL >0,96	61,3	79,2	44,2	88,4
Linfocitos T CD4.Abs/μl<636,50	57,9	68,0	41,5	80,5

(**) Valores según ROC 80% especificidad

Tabla 52: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores de riesgo de infección grave a los 90 días post-TC

VARIABLE	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
Proteínas g/dL <6,40	55,1	70,4	38,0	82,6
Proteínas g/dL <5,85*	91,3	37,0	62,5	78,8
Albumina g/dl < 3,85**	83,6	55,6	57,7	82,4
IgA mg/dL <167,00	60,7	75,0	42,8	86,0
PCR mg/dL >0,26	62,7	78,3	45,0	88,1
PCR mg/dL >0,59*	89,8	47,8	64,7	81,5
Linfocitos T CD8%<26,00	44,1	30,8	19,5	59,1

(*) Valores según ROC 90% especificidad. (**) Valores según ROC 80% especificidad.

5.5.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO AGUDO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

5.5.2.1 ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE UN EVENTO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

La tabla 53 muestra una asociación significativa entre los niveles séricos de fármacos inmunosupresores y la precipitación de un proceso de rechazo agudo del injerto en

aquellos en los cuales el nivel de FK determinado en el punto correspondiente al día 90 post-TC, superaba los valores máximos del rango considerado como terapéutico por nuestro laboratorio. Hay que tener en cuenta el tiempo que se produce esta asociación. Niveles bajos de fármaco no mostraban asociación significativa con dicho evento (Tabla 54).

De igual forma y utilizando, en este caso como valor de corte, los valores propuestos por el entorno científico y específico que trabajan con el tipo de pacientes dentro del cual se englobarían nuestro grupo de estudio (rango terapéutico y de seguridad de los fármacos inmunosupresores en trasplantados cardiacos), se observa asociación significativa entre los valores séricos de FK y los valores de anticalcineurínicos considerados de forma genérica y determinados a la semana del trasplante, lo cuales presentan niveles inferiores al valor terapéutico y el desarrollo de eventos de rechazo del injerto, respectivamente. Así mismo, también se observa que aquellos pacientes en los cuales el nivel de FK determinado en el punto correspondiente al tercer mes Post-TC, superaban los valores máximos del rango considerado como terapéutico, asociándose de forma significativa con el rechazo del injerto (Tabla 55).

5.5.2.2 ASOCIACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES Y EL DESARROLLO DE UN EVENTO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

No se observan diferencias significativas entre la variabilidad de la medición de los niveles séricos de los distintos fármacos inmunosupresores a lo largo del tiempo en los distintos puntos de estudio y la probabilidad de presentar un evento de rechazo agudo del injerto. No obstante cuando la variabilidad de los niveles de fármacos supera el

RESULTADOS

punto de corte estimado que coincide con el valor de la mediana, tanto en CsA como en FK, tanto a lo largo de los primeros tres meses como durante todo el año, se observa un mayor porcentaje de rechazo en aquellos pacientes en los cuales la variabilidad del nivel de fármaco es mayor respecto a aquellos en los cuales no varía tanto el valor de la determinación a lo largo del tiempo de estudio (Tabla 56).

5.5.2.3 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y EL DESARROLLO DE UN PROCESO DE RECHAZO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

Durante el periodo previo al trasplante, se observa que aquellos pacientes que presentan valores séricos de bilirrubina total superiores a 0,75 mg/dL (valores procedentes de la aplicación de curva ROC, con una especificidad del 80%), valores de GOT que superan las 40,00 U/L y un porcentaje de linfocitos inferior al 16,00%, eran menos propensos al desarrollo de un evento de rechazo agudo del órgano (Tabla 57).

En las analíticas realizadas a la semana y al mes, posteriores al proceso quirúrgico, no se observa una asociación de forma significativa entre las variables categóricas estudiadas (Tablas 60 y 63).

En la toma de muestra correspondiente al día 90 post-TC, el resultado que muestran el análisis de nuestros biomarcadores nos indica, que aquellos individuos en los cuales el valor de linfocitos en el recuento celular era inferior al 16,00% y el número absoluto de neutrófilos superaba los 7500/ μ L, sufrían un evento de rechazo del órgano trasplantado más frecuentemente que el resto de pacientes estudiados (Tabla 66).

5.5.2.4 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS QUE EVALUAN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y EL DESARROLLO DE UN PROCESO DE RECHAZO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

Las determinaciones de los biomarcadores sometidos a estudio y realizadas en el análisis correspondiente al periodo pre-TC (tabla 58), día 7 (tabla 61) y día 90 posterior a la operación (tabla 67) no mostraban asociación significativa entre las variables categóricas propuestas. Sin embargo, en el resultado de la determinación de los parámetros analizados en el punto correspondiente al mes post-TC, se observa que aquellos pacientes que muestran niveles séricos de IgG₂ inferiores a 138,00 mg/dL (valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%) presentaban más frecuentemente un evento de rechazo del injerto (Tabla 64).

5.5.2.5 ASOCIACIÓN ENTRE LA ALTERACION DE LOS PARÁMETROS QUE EVALUAN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y EL DESARROLLO DE UN PROCESO DE RECHAZO DEL INJERTO EN LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

Los valores obtenidos del análisis de los parámetros utilizados para valorar el estado celular de la inmunidad de nuestro grupo de estudio, en la toma de muestras correspondientes con el punto Pre-TC, día 30 y 90 Post-TC (Tablas 59, 65, 68), no mostraban una asociación significativa entre las variables categóricas comparadas. No obstante, aquellos individuos en los cuales su valor analítico correspondiente al día 7 posterior a la intervención (Tabla 62), mostraban un nivel porcentual de células T CD3 inferior al 72,00% y niveles de T CD8 inferiores al 16,5% (valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%), eran más propensos a desarrollar un evento de rechazo agudo del órgano trasplantado.

RESULTADOS

5.5.2.6 TABLAS ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE ALTERACIONES CUALITATIVAS DE LOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DURANTE LOS PRIMEROS TRES MESES POSTERIORES AL TRASPLANTE CARDIACO

Tabla 53: Asociación entre niveles elevados de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	TIEMPO	RECHAZO	NO RECHAZO	p
Fk	7 DIAS	6,7%	17,6%	0,433
MMF		13,3%	8,8%	0,630
Anticalcineurínico		4,34%	17,3%	0,177
CsA	30 DIAS	75%	84%	0,616
MMF		9,5%	5,5%	0,613
Anticalcineurínico		4,8%	1,3%	0,391
Fk	90 DIAS	46,1%	8,9%	0,005
Anticalcineurínico		9,5%	1,4%	0,132

CsA=Ciclosporina>200 ng/ml Fk=Tacrolimus>15 ng/ml MMF=Micofenolato>5 µg/m
Anticalcineurínico = CsA>200 ng/ml o Fk >15ng/ml

Tabla 54: Asociación entre niveles bajos de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	TIEMPO	RECHAZO	NO RECHAZO	p
CsA	7 DIAS	0,0%	1,2%	0,560
Fk		6,7%	21,6%	0,270
MMF		60%	68,4%	0,552
Anticalcineurínico	30DIAS	17,4%	21,3%	0,776
Fk		7,7%	2,0%	0,373
CsA		90 DIAS	12,5%	0,0%
Fk	7,7%		2,2%	0,401
MMF	40,9%		45,1%	0,809
Anticalcineurínico	42,8%		21,4%	0,087

CsA=Ciclosporina <100 ng/ml Fk=Tacrolimus <5 ng/ml MMF=Micofenolato <2 µg/ml
Anticalcineurínico = CsA<100 ng/ml o Fk <5ng/ml

Tabla 55: Asociación entre niveles de fármacos inmunosupresores en función del rango de efectividad y seguridad en el entorno del TC y el desarrollo de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	TIEMPO	RECHAZO	NO RECHAZO	p
FK <10 ng/ml	7 DIAS	87%	47%	0,008
Anticalcineurínico bajo		83%	57%	0,046
FK >15 ng/ml		7%	18%	0,433
Anticalcineurínico alto		4%	13%	0,450
CsA <250 ng/ml	30 DIAS	50%	60%	0,695
Anticalcineurínico alto		24%	28%	0,788
FK <10 ng/ml	90 DIAS	46%	20%	0,077
Anticalcineurínico bajo		62%	41%	0,135
CsA >350 ng/ml		0%	12%	0,560
FK >15 ng/ml		46%	9%	0,005
Anticalcineurínico alto		29%	10%	0,068

Anticalcineurínico alto= FK>15 y/o CsA>350 Anticalcineurínico bajo= FK<10 y/o CsA<250

Tabla 56: Asociación de la variabilidad a lo largo del tiempo de fármacos inmunosupresores y el desarrollo de un evento de rechazo agudo del injerto

VARIABLE*	RECHAZO	NO RECHAZO	p
CV FK 3M > 34.50%	67%	45%	0.327
CV FK AÑO > 34.50%	61%	44%	0.387
CV CsA 3M >32.00%	57%	42%	0.671
CV CsA AÑO >29.00%	63%	44%	0.438
CV MMF AÑO >54.00%	44%	49%	0.785

(*) Mediana del valor de la variable. CV= Coeficiente de variación.

RESULTADOS

Tabla 57: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos en el punto pre-TC y el desarrollo de rechazo del injerto

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
Proteínas g/dL >6.40	9,10%	28%	0,088
Urea mg/dL >45.00	52,1%	66,2%	0,230
Creatinina mg/dL >1.20	21,7%	28,6%	0,601
Albumina g/dL <3.40	15%	27,8%	0,364
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	17,4%	38,7%	0,078
Bilirrubina Total mg/dL >0.75**	43,5%	69,3%	0,029
GOT U/L >40	4,5%	29,3%	0,020
GOT U/L >21,50*	45,4%	66,7%	0,085
GPT U/L >41	4,8%	18,3%	0,177
GGT U/L >60	31,8%	44,6%	0,332
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	17,4%	31,6%	0,290
Linfocitos % <16.00	17,4%	42,1%	0,046
Linfocitos <1300 /μl	21,7%	43,4%	0,086
Linfocitos >3500/ μl	4,3%	1,3%	0,412
Neutrófilos >7500/ μl	13,4%	28,9%	0,173

(*) Valores según ROC 90% especificidad (**) Valores según ROC 80% especificidad

Tabla 58: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral en el punto pre-TC y el desarrollo de rechazo del injerto

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
IgG mg/dL <1090.00	48,8%	51,4%	0,620
IgA mg/dL <302.00	42,8%	50,7%	0,622
IgG ₁ mg/dL <693.00	38,6%	52,5%	0,295
IgG ₂ mg/dL <342.00	31,6%	54,2%	0,115
IgG ₄ mg/dL <34.40	68,4%	44,8%	0,112
Complemento C ₄ mg/dL <23.50	35,3%	53,6%	0,269
Fb properdina mg/dL <36.00	43,7%	52,8%	0,578
PCR mg/dL >0.82	38,1%	53,4%	0,310

Tabla 59: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular en el punto pre-TC y el desarrollo de rechazo del injerto

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	P
Linfocitos T CD3% <76.00	52,9%	45,2%	0,595
Linfocitos T CD3/μl <1137.00	43,7%	51,6%	0,780
Linfocitos T CD4 /μl <744.50	56,2%	48,4%	0,780
Linfocitos T CD8% <24.00	58,8%	43,5%	0,287
Natural killer % <9.00	52,9%	40,3%	0,413
Natural killer /μl <125.00	50%	45,2%	0,784
Linfocitos B% <10.00	41,2%	48,4%	0,785
Linfocitos B /μl <142.00	56,2%	51,6%	0,786

Tabla 60: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 7 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
Proteínas g/dL <6.40	82,6%	86,7%	0,734
Urea mg/dL >45.00	91,3%	94,7%	0,621
Creatinina mg/dL >1.20	47,8%	39,5%	0,481
Albúmina g/dL <3.40	47,4%	72,7%	0,054
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	26,1%	46,7%	0,095
GOT U/L >40.00	13%	23,7%	0,386
GPT U/L >41.00	56,5%	33,8%	0,085
GGT U/L >60.00	31,8%	44,6%	0,332
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	78,3%	69,7%	0,598
Linfocitos % <16.00	86,9%	92,1%	0,430
Linfocitos <1300 /μl	65,2%	75,0	0,425
Linfocitos >3500/ μl	8,7%	1,3%	0,134
Neutrófilos >7500/ μl	91,3%	82,9%	0,509

Tabla 61: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 7 días post-TC y el desarrollo de rechazo grave del injerto.

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
IgG mg/dL <666.50	57,1%	47,1%	0,464
IgA mg/dL <195.50	47,6%	51,4%	0,807
IgM mg/dL <75.55	47,6%	51,4%	0,807
IgG ₁ mg/dL <398.00	52,6%	48,5%	0,799
IgG ₂ mg/dL <205.50	57,9%	47%	0,444
IgG ₃ mg/dL <26.30	63,1%	47%	0,299
IgG ₄ mg/dL <24.20	52,6%	46,3%	0,795
Complemento C3 mg/dL <90.90	47,6%	51,5%	0,807
Complemento C ₄ mg/dL <20.00	38,1%	51,5%	0,326
Fb properdina mg/dL <22.75	57,1%	48,5%	0,618
PCR mg/dL > 0.93	55%	47%	0,615

Tabla 62: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 7 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
Linfocitos T CD3% <72.00	72,2%	42,4%	0,034
Linfocitos T CD3 /μl <593.00	44,4%	50%	0,792
Linfocitos T CD4 /μl < 394.00	33,3%	53%	0,186
Linfocitos T CD8% <18.00	61,1%	34,8%	0,059
Linfocitos T CD8% <16.50**	55,5%	25,7%	0,023
Linfocitos T CD8 /μl <165.00	61,1%	45,4%	0,293
Natural Killer% <4.00	50%	42,4%	0,601
Natural Killer/μl <36.00	44,4%	48,5%	0,796
Linfocitos B% <22.00	33%	43,9%	0,591
Linfocitos B/μl <166.00	27,8%	54,5%	0,062

(**) Valores según ROC 80% especificidad

RESULTADOS

Tabla 63: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 30 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
Proteínas g/dL <6.40	80,9%	84%	0,746
Urea mg/dL >45.00	63,3%	67,1%	0,801
Albumina g/dL <3.40	38,1%	45,7%	0,621
GOT U/L >40.00	0,0%	6,6%	0,582
GPT U/L >41.00	28,6%	18,4%	0,363
GGT U/L >60.00	60,9%	71,2%	0,440
Leucocitos x 1000 <4.00/μl	0,0%	5,3%	0,571
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	18,2%	16%	0,754
Linfocitos % <16.00	54,5%	40,5%	0,328
Linfocitos <1300 /μl	54,5%	59,4%	0,800
Linfocitos >3500/ μl	0,0%	5,4%	0,571

Tabla 64: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 30 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
IgG mg/dL <596.50	60%	47,3%	0,467
IgA mg/dL <183.00	55,5%	47,9%	0,607
IgM mg/dL <65.00	66,7%	45,2%	0,121
IgG ₁ mg/dL <363.50	55,5%	48,5%	0,791
IgG ₂ mg/dL <179.50	66,6%	45,4%	0,183
IgG ₂ mg/dL <138.00**	44,4%	18,2%	0,030
IgG ₃ mg/dL <23.90	55,5%	48,5%	0,791
IgG ₄ mg/dL <20.70	55,5%	47%	0,600
Complemento C ₃ mg/dL <107.00	55,5%	47,8%	0,604
Fb properdina mg/dL <30.00	55,5%	50,7%	0,792

(**) Valores según ROC 80% de especificidad

Tabla 65: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 30 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
Linfocitos T CD3% <75.00	58,8%	44,8%	0,416
Linfocitos T CD4% <51.00	52,9%	47,8%	0,789
Linfocitos T CD4 /μl <636.50	41,2%	52,3%	0,587
Linfocitos T CD8% <22.00	64,7%	38,8%	0,063
Linfocitos B% <14.00	53%	43,9%	0,590
Linfocitos B/μl <180.00	41,2%	51,6%	0,587

Tabla 66: Asociación entre las alteraciones de los parámetros bioquímicos a los 90 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
Proteínas g/dL <6.40	59,1%	50%	0,478
Urea mg/dL >45.00	68,2%	63,5%	0,802
Creatinina mg/dL >1.20	22,7%	33,8%	0,435
Albúmina g/dL <3.40	13,6%	4,2%	0,138
Albúmina g/dL <3.85**	45,4%	22,2%	0,054
GGT U/L >60.00	36,4%	32,4%	0,799
Leucocitos x 1000 <4.00/μl	4,5%	12,3%	0,444
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	13,6%	4,1%	0,135
Linfocitos % <16.00	40,9%	16,4%	0,021
Linfocitos <1300 /μl	36,4%	45,2%	0,624
Neutrófilos <1800/ μl	0,0%	9,6%	0,195
Neutrófilos >7500/ μl	18,2%	2,7%	0,024

(**) Valores según ROC 80% de especificidad

Tabla 67: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad humoral a los 90 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
IgA mg/dL <167.00	53%	48,5%	0,792
IgM mg/dL <69.10	64,7%	45,6%	0,184
IgG ₃ mg/dL <30.05	76,9%	44,6%	0,065
IgG ₄ mg/dL <20.75	66,6%	46,9%	0,346
Complemento C ₃ mg/dL <99.20	41,2%	50,7%	0,590
Complemento C ₄ mg/dL <22.50	41,2%	49,2%	0,597
PCR mg/dL >0.26	41,2%	50,8%	0,589

Tabla 68: Asociación entre las alteraciones de los parámetros de inmunidad celular a los 90 días post-TC y el desarrollo de rechazo del injerto.

VARIABLE	RECHAZO	NO RECHAZO	p
Linfocitos T CD3 /μl <1133.50	37,5%	51,6%	0,798
Linfocitos T CD4% 51.00	55,5%	41,5%	0,315
Linfocitos T CD4 /μl <750.00	40%	53,1%	0,443
Linfocitos T CD8% <26.00	55%	46,1%	0,610
Linfocitos T CD8 /μl <391.50	65%	45,3%	0,200
Natural Killer% <9.00	55,5%	43,1%	0,444
Natural Killer/μl <126.50	55%	48%	0,798
B Linfocitos % <8.00	35%	44,6%	0,606
Linfocitos B/μl <108	40%	52,4%	0,443

5.5.2.7 ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE RIESGO DE INFECCIÓN GRAVE

Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, de aquellas variables que poseían un valor de p significativo, mostrados en las tablas 69 a 72, y con

RESULTADOS

una especificidad superior al 80%, seleccionando las mismas como posibles biomarcadores por su capacidad para evidenciar una mayor probabilidad de sufrir un rechazo del injerto posterior al trasplante cardiaco con minimización de falsos positivos.

En la determinación analítica correspondiente al día 30, se seleccionaron los valores bajos en suero de IgG₂.

Los parámetros que mostraban significación en las determinaciones realizadas el día 90 post-TC fueron, la linfopenia y la neutrofilia. Llama la atención que los niveles séricos de FK superiores a 15 ng/mL se asociaban con riesgo de rechazo.

5.5.2.8 TABLAS DEL ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS BIOMARCADORES DE RIESGO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO

Tabla 69: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores de riesgo de rechazo agudo en el punto pre-TC

VARIABLE	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
Bilirrubina Total mg/dL >0,75**	30,7%	43,5%	16,1%	63,9%
GOT U/L >40,0	70,7%	4,5%	4,3%	71,6%
Linfocitos% <16,00	57,9%	17,4%	11,1%	69,8%

(**) Valores según ROC 80% especificidad

Tabla 70: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores de riesgo de rechazo agudo a los 7 días post-TC

VARIABLE	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
Albúmina g/dl < 3,40	27,3%	47,4%	18,4%	60%
Linfocitos T CD3/μl <72,00	57,6%	72,2%	31,7%	88,4%
Linfocitos B/μl 166,00	45,4%	54,5%	12,2%	69,8%

Tabla 71: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores de riesgo de rechazo agudo a los 30 días post-TC

VARIABLE	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	VPP	VPN
IgG ₂ mg/dL <138,00**	81,8%	44,4%	40%	84,4%

(**) Valores según ROC 80% especificidad

Tabla 72: Niveles de especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los biomarcadores de riesgo de rechazo agudo a los 90 días post-TC

<i>VARIABLE</i>	<i>ESPECIFICIDAD</i>	<i>SENSIBILIDAD</i>	<i>VPP</i>	<i>VPN</i>
Albúmina g/dl < 3,85**	77,8%	45,4%	38,5%	82,3%
Linfocitos%<16,00	83,6%	40,9%	42,8%	82,4%
Neutrófilos >7500/μl	97,3%	18,2%	66,6%	79,8%
IgG₃ mg/dL<30,05	55,4%	76,9%	25,6%	92,3%
Fk >15 ng/mL	91,1%	46,2%	60%	85,4%

(**) Valores según ROC 80% especificidad

5.6 ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

El siguiente paso para estudiar la asociación entre nuestros biomarcadores con un mayor riesgo de desarrollar un proceso infeccioso o un evento de rechazo agudo del injerto, es el análisis de regresión logística. Este análisis permite, ajustes multivariantes para seleccionar las variables que tenían un poder predictivo independiente en esta tesis.

Primero desarrollamos modelos de regresión logística univariante. El resultado se muestra en las tablas 73 a 87.

Mediante el análisis de regresión logística univariante, se identificaron los siguientes factores de riesgo relacionados con el desarrollo de las complicaciones clínicas tratadas en este estudio.

5.6.1 ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR DE LOS BIOMARCADORES ESTUDIADOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

5.6.1.1 ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR DE LOS NIVELES SERICOS DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

En el estudio analítico de los niveles de fármacos inmunosupresores durante el periodo de estudio comprendido entre: el día 7 y el día 90 posteriores a la cirugía, no encontramos en ninguno de los puntos de estudio niveles séricos de fármacos que pudieran ser identificados con como un factor de riesgo añadido al desarrollo de un proceso infeccioso grave (Tablas 73, 74 y 75).

Cuando se creó una variable combinada definida como niveles de FK altos o niveles de CsA altos y se analizó en el punto más temprano de observación (día 7 post-TC) esta variable mostraba tendencia como biomarcador de riesgo de infección grave (Tabla 73).

5.6.1.2 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

Estudio pre-TC

A través del estudio analítico realizado en el punto correspondiente al periodo previo al trasplante, se observa que los pacientes que muestran leucocitosis (nivel de leucocitos superior a 10.000 células/ μ L) y neutrofilia (neutrófilos por encima de 7.500 células/ μ L), mostraban un mayor riesgo de padecer un proceso infeccioso grave (Tabla 76).

Estudio día 7 post-TC

En el punto de recogida de muestra de sangre correspondiente al día 7 de la intervención, los resultados analíticos de los parámetros determinados no mostraron asociación significativa como posible factor de riesgo de infección (Tabla 79).

Estudio día 30 post-TC

Sin embargo, en el punto coincidente con el día 30 post-TC, aquellos pacientes con hipoproteinemia (nivel de proteínas totales inferior a 5,25 gr/dL [valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%]; la hipoalbuminemia (nivel de albúmina por debajo de 3,05 gr/dL [valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%]; hipertransaminemia de GOT (nivel en suero superior a 40,00 U/L, según valores normales del laboratorio); y la linfopenia (porcentaje de linfocitos en el recuento leucocitario en sangre periférica inferior al 16,00%, según valores normales del laboratorio), desarrollaban procesos infecciosos con una frecuencia mayor que el resto de pacientes pertenecientes al grupo de estudio, en los cuales no se diagnosticó infección grave (Tabla 82).

Estudio día 90 post-TC

Pasados tres meses del trasplante, aquellos individuos con hipoproteinemia (niveles de proteínas totales inferiores a 5,85 gr/dL [valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 90%]; o hipoalbuminemia (valores inferiores a 3,85 gr/dL [valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%], presentaban problemas de infección con una

RESULTADOS

frecuencia 6 veces mayor para ambos biomarcadores que el resto de los participantes del estudio (Tabla 85).

5.6.1.3 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS DE INMUNIDAD HUMORAL PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

Estudio pre-TC

El resultado de las pruebas analíticas realizadas en el punto pre-TC, muestran que el *Odds Ratio* (OR) para el valor de PCR mayor de 0,82 mg/dL, obtenido del análisis de regresión logística univariante, fue de 2.75 con una $p = 0.038$ (Tabla 77).

Estudio día 7 post-TC

A los 7 días del trasplante, los pacientes con hipogammaglobulinemia IgA (niveles de IgA inferiores a 195,50 mg/dL [valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%]; hipocomplementemia C3 (concentración inferior al punto de corte de 66,60 mg/dL [valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 90%]; hipocomplementemia C4 (niveles inferiores a 20,00 mg/dL, valor de laboratorio); y los niveles bajos de FB (niveles inferiores a 19,15 mg/dL [valores procedentes de la aplicación de curva ROC a la variable, con una especificidad del 90%], desarrollaron procesos infecciosos con una mayor frecuencia que el resto de los pacientes incluidos en el estudio (Tabla 80).

Estudio día 30 post-TC

Aquellos pacientes, los cuales, transcurrido un mes del trasplante presentaban hipogammaglobulinemia IgG (concentración sérica de IgG inferior a 508,50 mg/dL

[valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%], la posibilidad de aparición de un proceso infeccioso se daba con una frecuencia cuatro veces mayor, así como, en aquellos individuos que mostraban valores elevados del reactante de fase aguda PCR (superiores a 0,96 mg/dL) la frecuencia de aparición de infección se incrementaba 6 veces (Tabla 83).

Estudio día 90 post-TC

Los biomarcadores asociados con riesgo de infección en el tercer mes Post-TC, fueron la hipogammaglobulinemia IgA (niveles en sangre de IgA inferiores a 167,00 mg/dL) y un valor de PCR superior a 0,59 mg/dL (valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 90% en ambos casos) (Tabla 86).

5.6.1.4 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS DE INMUNIDAD CELULAR PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

Estudio pre-TC

En el estudio analítico realizado durante el periodo pre-TC no se identificaron subpoblaciones linfocitarias como biomarcadores de riesgo de infección entre las evaluadas y con los puntos de corte utilizados (Tabla 78).

Estudio día 7 post-TC

Los pacientes que a la semana del trasplante que mostraban linfopenia de células T CD4 (titulación de células T CD4 inferiores a 394,00/ μ L), presentaban infección con una frecuencia 5 veces mayor que el resto de los integrantes del estudio (Tabla 81).

RESULTADOS

Estudio día 30 post-TC

En el punto de monitorización correspondiente al día 30 post-TC, el OR correspondiente al número de células T CD4 inferiores a 636,50/ μ L, mostraba un valor de 2.92, asociado al desarrollo de eventos infecciosos (Tabla 84).

Estudio día 90 post-TC

En el tercer mes de seguimiento, ninguno de los parámetros determinados mostraba alteración en sus valores que pudieran ser identificados como un factor de riesgo para la predisposición a la infección (Tabla 89).

5.6.1.5 TABLAS DEL ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE INFECCIÓN EN TRASPLANTADOS CARDIACOS.

Tabla 73: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores elevados como factor de riesgo de desarrollo de infección grave.

VARIABLE	TIEMPO	OR	IC 95%	p
CsA	DIA 7	2,57	0,50-13,22	0,258
Fk		2,50	0,63-9,82	0,189
MMF		1,25	0,2-7,07	0,801
Anticalcineurínico		2,37	0,85-6,56	0,096
CsA	DIA 30	0,22	0,03-1,47	0,121
Fk		0,27	0,06-1,06	0,061
MMF		0,50	0,05-4,53	0,541
CsA	DIA 90	1,50	0,30-7,43	0,619
Fk		1,04	0,23-4,61	0,958
MMF		0,84	0,16-4,49	0,846

CsA=Ciclosporina>200 ng/ml Fk=Tacrolimus>15 ng/ml MMF=Micofenolato>5 μ g/m
Anticalcineurínico = CsA>200 ng/ml o Fk >15ng/ml OR = Odds Ratio.
IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 74: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores bajos como factor de riesgo de desarrollo de infección grave.

VARIABLE	TIEMPO	OR	IC 95%	p
CsA	7 DIAS	1,64	0,12-20,93	0,702
Fk		0,36	0,07-1,85	0,226
MMF		0,51	0,17-1,53	0,233
Anticalcineurínico		0,60	0,15-2,36	0,473
MMF	30 DIAS	1,32	0,51-3,38	0,561
Fk	90 DIAS	2,50	0,14-42,4	0,526
MMF		1,39	0,56-3,45	0,475
Anticalcineurínico		1,33	0,11-15,38	0,818

CsA=Ciclosporina <100 ng/ml Fk=Tacrolimus <5 ng/ml MMF=Micofenolato <2 µg/ml

Anticalcineurínico = CsA<100 ng/ml o Fk <5ng/ml

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 75: Análisis univariante de los niveles de fármacos anticalcineurínico elevados en al menos dos mediciones en los 90 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Anticalcineurínico	0,68	0,24-1,94	0,479

Anticalcineurínico = CsA>200 ng/ml o Fk >15ng/ml

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 76: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos en el punto pre-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Proteínas g/dL >6.40	1,54	0,60-3,90	0,362
Urea mg/dL >45.00	0,90	0,38-2,13	0,816
Creatinina mg/dL >1.20	1,22	0,49-3,03	0,658
Albumina g/dL <3.40	0,88	0,29-2,66	0,833
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	1,37	0,57-3,29	0,478
GOT U/L >40	1,03	0,39-2,70	0,947
GPT U/L >41	0,65	0,19-2,19	0,488
GGT U/L >60	0,69	0,28-1,70	0,428
Leucocitos x 1000>10.00/µl	2,90	1,20-7,01	0,018
Linfocitos %<16.00	1,32	0,56-3,08	0,514
Linfocitos <1300 /µl	1,59	0,68-3,70	0,278
Linfocitos >3500/ µl	0,00	0,00-0,00	0,999
Neutrófilos %<42.00	0,00	0,00-0,00	0,999
Neutrófilos >7500/ µl	3,71	1,50-9,20	0,005

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

RESULTADOS

Tabla 77: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral en el punto Pre-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
IgG mg/dL <1090.00	1,81	0,76-4,28	0,174
IgA mg/dL <302.00	1,75	0,74-4,12	0,198
IgM mg/dL <104.50	0,88	0,37-2,05	0,772
IgG ₁ mg/dL <693.00	1,42	0,57-3,53	0,441
IgG ₂ mg/dL <342.00	1,77	0,71-4,41	0,220
IgG ₃ mg/dL <48.00	1,42	0,57-3,53	0,441
IgG ₄ mg/dL <34.40	1,24	0,49-3,10	0,642
Complemento C ₄ mg/dL <23.50	1,59	0,61-4,11	0,338
Fb properdina mg/dL <36.00	0,82	0,31-2,14	0,688
PCR mg/dL >0.82	2,75	1,05-7,16	0,038
PCR mg/dL >3.72**	2,87	1,04-7,90	0,041

(**) Valores según ROC 80% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 78: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular en el punto pre-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Linfocitos T CD3% <76.00	0,72	0,29-1,80	0,487
Linfocitos T CD3/μl <1137.00	1,73	0,68-4,38	0,245
Linfocitos T CD4% <50.00	0,89	0,36-2,22	0,815
Linfocitos T CD4 /μl <744.50	1,38	0,55-3,48	0,484
Linfocitos T CD8% <24.00	0,89	0,36-2,22	0,815
Linfocitos T CD8 /μl <369.00	0,89	0,35-2,24	0,815
Natural Killer% <9.00	1,47	0,59-3,67	0,400
Natural Killer /μl <125.00	1,19	0,47-2,99	0,701
Linfocitos B% <10.00	1,58	0,63-3,94	0,320
Linfocitos B/μl <142.00	1,73	0,68-4,38	0,245

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 79: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 7 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Proteínas g/dL <6.40	2,94	0,61-14,07	0,175
Creatinina mg/dL >1.20	2,05	0,86-4,90	0,103
Albumina g/dL <3.40	1,26	0,41-3,83	0,676
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	1,89	0,79-4,49	0,150
GOT U/L >40.00	1,11	0,40-3,09	0,833
GPT U/L >41.00	0,95	0,38-2,32	0,911
GGT U/L >60.00	0,66	0,27-1,61	0,363
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	1,50	0,56-4,03	0,415
Linfocitos % <16.00	3,74	0,44-31,33	0,224
Linfocitos <1300 /μl	2,29	0,77-6,78	0,134
Neutrófilos >7500/ μl	1,34	0,39-4,56	0,635

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 80: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 7 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
IgG mg/dL <666.50	1,66	0,68-4,04	0,264
IgA mg/dL <195.50	3,16	1,24-8,03	0,016
IgM mg/dL <75.55	1,35	0,56-3,27	0,501
IgG ₁ mg/dL <398.00	1,32	0,53-3,27	0,542
IgG ₂ mg/dL <205.50	1,90	0,75-4,76	0,170
IgG ₃ mg/dL <26.30	1,23	0,50-3,05	0,646
IgG ₄ mg/dL <24.20	1,36	0,55-3,37	0,497
Complemento C ₃ mg/dL <90.90	3,20	1,25-8,17	0,015
Complemento C ₃ mg/dL <66.60*	4,12	1,30-13,06	0,016
Complemento C ₄ mg/dL <20.00	3,42	1,33-8,76	0,010
Fb properdina mg/dL <22.75	2,95	1,14-7,60	0,025
Fb properdina mg/dL <19.15*	10,38	3,37-31,94	0,000
PCR mg/dL > 0.93	1,57	0,63-3,87	0,326

(*) Valores según ROC 90% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 81: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 7 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Linfocitos T CD3% <72.00	1,15	0,45-2,94	0,758
Linfocitos T CD3/μl <593.00	1,83	0,71-4,73	0,210
Linfocitos T CD4% <48.00	1,62	0,63-4,15	0,311
Linfocitos T CD4/μl < 394.00	5,09	1,77-14,63	0,002
Linfocitos T CD4/μl <186.00*	3,50	1,04-11,78	0,043
Linfocitos T CD8% <18.00	1,48	0,57-3,80	0,410
Linfocitos T CD8 /μl <165.00	1,45	0,56-3,71	0,434
Natural Killer% <4.00	1,02	0,40-2,63	0,955
Natural Killer /μl <36.00	2,48	0,94-6,53	0,064
Linfocitos B% <22.00	0,93	0,36-2,41	0,887
Linfocitos B/μl <166.00	1,83	0,71-4,73	0,210

(*) Valores según ROC 90% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

RESULTADOS

Tabla 82: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 30 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Proteínas g/dL <6.40	3,37	0,71-15,93	0,125
Proteínas g/dL <5.25**	4,49	1,67-12,01	0,003
Urea mg/dL >45.00	1,49	0,57-3,86	0,410
Creatinina mg/dL >1.20	1,61	0,62-4,12	0,321
Albúmina g/dL <3.40	2,46	0,95-6,31	0,061
Albúmina g/dL <3.05**	3,92	1,41-10,90	0,009
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	1,74	0,62-4,87	0,287
GOT U/L >40.00	10,72	1,14-100,58	0,038
GPT U/L >41.00	2,32	0,84-6,45	0,103
GGT U/L >60.00	1,25	0,48-3,27	0,642
Leucocitos x 1000 <4.00/μl	2,44	0,32-18,25	0,384
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	2,08	0,69-6,28	0,191
Linfocitos % <16.00	2,93	1,19-7,21	0,019
Linfocitos <1300 /μl	1,54	0,62-3,80	0,349
Linfocitos >3500/ μl	0,76	0,07-7,64	0,817
Neutrófilos >7500/ μl	2,17	0,75-6,24	0,150

(**) Valores según ROC 80% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 83: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 30 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
IgG mg/dL <596.50	2,20	0,90-5,35	0,081
IgG mg/dL <508.50**	4,07	1,59-10,41	0,003
IgA mg/dL <183.00	2,40	0,95-6,02	0,062
IgM mg/dL <65.00	1,56	0,63-3,83	0,329
IgG ₁ mg/dL <363.50	0,89	0,35-2,27	0,811
IgG ₂ mg/dL <179.50	1,77	0,68-4,59	0,235
IgG ₃ mg/dL <23.90	1,12	0,44-2,85	0,811
IgG ₄ mg/dL <20.70	1,19	0,47-3,05	0,703
Complemento C ₃ mg/dL <107.00	1,65	0,63-4,28	0,304
Complemento C ₄ mg/dL <23.20	1,03	0,40-2,65	0,964
Fb properdina mg/dL <30.00	0,64	0,24-1,68	0,372
PCR mg/dL >0.96	6,01	1,98-18,25	0,002

(**) Valores según ROC 80% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 84: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 30 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Linfocitos T CD3% <75.00	1,61	0,63-4,14	0,318
Linfocitos T CD3/ μ l 961.00	2,27	0,86-6,00	0,097
Linfocitos T CD4% <51.00	1,19	0,47-3,05	0,703
Linfocitos T CD4/ μ l <636.50	2,92	1,08-7,87	0,034
Linfocitos T CD8% <22.00	0,79	0,30-2,04	0,627
Linfocitos T CD8/ μ l <289.50	1,78	0,68-4,64	0,233
Natural Killer% <8.00	0,73	0,28-1,92	0,536
Natural Killer/ μ l <87.00	1,66	0,63-4,37	0,298
Linfocitos B% <14.00	0,48	0,18-1,30	0,150
Linfocitos B/ μ l <180.00	1,03	0,39-2,68	0,943

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 85: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 90 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Proteínas g/dL <6.40	2,91	1,12-7,54	0,028
Proteínas g/dL <5.85*	6,17	1,96-19,41	0,002
Urea mg/dL >45.00	0,90	0,36-2,28	0,836
Creatinina mg/dL >1.20	1,14	0,44-2,95	0,783
Albúmina g/dL <3.40	5,65	0,97-32,94	0,054
Albúmina g/dL <3.85**	6,36	2,34-17,24	0,000
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	0,28	0,03-2,42	0,252
GOT U/L >40.00	2,61	0,15-43,37	0,502
GPT U/L >41.00	2,22	0,55-9,01	0,262
GGT U/L >60.00	1,25	0,49-3,18	0,630
Leucocitos x 1000 <4.00/ μ l	2,86	0,75-10,84	0,121
Leucocitos x 1000 >10.00/ μ l	0,48	0,05-4,35	0,518
Linfocitos % <16.00	1,78	0,64-4,95	0,269
Linfocitos <1300 / μ l	1,32	0,54-3,25	0,537
Neutrófilos % <42.00	0,83	0,08-8,38	0,877
Neutrófilos <1800/ μ l	3,76	0,78-18,12	0,098
Neutrófilos >7500/ μ l	1,28	0,22-7,43	0,783

(*) Valores según ROC 90% especificidad (**) Valores según ROC 80% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

RESULTADOS

Tabla 86: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 90 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave

VARIABLE	OR	IC 95%	P
IgG mg/dL <726.00	0,64	0,24-1,68	0,372
IgA mg/dL <167.00	4,62	1,60-13,31	0,005
IgM mg/dL <69.10	1,30	0,50-3,36	0,583
IgG ₁ mg/dL <433.50	0,67	0,24-1,85	0,445
IgG ₂ mg/dL <202.50	0,67	0,24-1,85	0,445
IgG ₃ mg/dL <30.05	0,51	0,48-1,43	0,205
IgG ₄ mg/dL <20.75	1,52	0,53-4,36	0,428
Complemento C ₃ mg/dL <99.20	0,94	0,36-2,47	0,912
Complemento C ₄ mg/dL <22.50	0,48	0,17-1,30	0,483
Fb properdina mg/dL <26.25	0,42	0,15-1,14	0,091
PCR mg/dL > 0.59*	8,09	2,49-26,23	0,000
PCR mg/dL >0.26	6,05	1,97-18,60	0,002

(*) Valores según ROC 90% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 87: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 90 días post-TC como factor de riesgo de desarrollo de infección grave en TC.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Linfocitos T CD3% <79.00	0,44	0,17-1,16	0,099
Linfocitos T CD3 / μ l <1133.50	1,25	0,49-3,15	0,637
Linfocitos T CD4% 51.00	1,36	0,53-3,43	0,515
Linfocitos T CD4/ μ l <750.00	1,56	0,61-3,98	0,347
Linfocitos T CD8% <26.00	0,35	0,13-0,93	0,036
Natural Killer% <9.00	0,81	0,32-2,05	0,661
Natural Killer/ μ l <126.50	1,25	0,49-3,15	0,637
Linfocitos B% <8.00	1,25	0,49-3,16	0,638
Linfocitos B/ μ l <108.00	1,29	0,51-3,28	0,584

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

5.6.2 ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR DE LOS BIOMARCADORES ESTUDIADOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE RECHAZO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

5.6.2.1 ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR DE LOS NIVELES SERICOS DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

En la monitorización de forma sistemática de los niveles de fármacos inmunosupresores a lo largo del tiempo y en la cohorte analizada, no se observa

alteración de sus niveles sanguíneos, asociado a un incremento del riesgo de sufrir un evento de rechazo, salvo en uno de los puntos de análisis, correspondiente a los 90 días post-TC y en concreto para los niveles de FK. Aquellos individuos que mostraban niveles de FK por encima del límite superior del rango terapéutico establecido por nuestro laboratorio, multiplicaban por ocho la posibilidad de enfrentarse a un rechazo agudo del injerto trasplantado. No se encontraron más posibilidades de asociación de los niveles farmacológicos como factor de riesgo asociado a la precipitación de rechazo del injerto, ni considerándoles de forma individual, cada fármaco por separado, ni de forma conjunta, agrupados como fármacos anticalcineurínicos, independientemente de su formulación química (Tablas 100 y 101).

Cuando estudiamos los niveles de fármacos, bajo el rango terapéutico y de seguridad establecido por la comunidad científica dedicada en concreto al tratamiento de pacientes sometidos a trasplante cardiaco, se observa que en aquellos pacientes en los cuales tanto el nivel de FK como los niveles en general de anticalcineurínico están por debajo del rango terapéutico, se asocian de forma significativa con un aumento de las posibilidades de desarrollar un evento de rechazo del injerto en siete veces y tres veces respectivamente, frente aquellos individuos que no cumplen esta condición. También se asocia de forma significativa la superación de los niveles de seguridad de FK a los tres meses con un aumento de la probabilidad de sufrir un rechazo agudo del injerto superior a ocho veces, respecto al resto de los individuos objeto de estudio (Tabla 103).

5.6.2.2 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA VARIACIÓN DEL VALOR DE LOS NIVELES SÉRICOS DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

En el estudio de la variabilidad de los niveles de fármacos inmunosupresores a lo largo del tiempo de estudio, se observa alteración de la variabilidad de los niveles de fármacos, asociado a un incremento del riesgo de sufrir rechazo, solamente en los niveles séricos de FK, correspondiente a la variabilidad anual, de tal forma que, en aquellos pacientes en los cuales la variabilidad de los niveles de FK medidos en los distintos puntos de estudio, desde la semana hasta el año post-TC, varían en más de un 34.50%, aumenta la posibilidad de sufrir un evento de rechazo del injerto en cuatro veces, respecto aquellos individuos en los cuales la variación de los niveles de fármaco es inferior al punto de corte establecido (Tabla 104).

5.6.2.3 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

Mediante el estudio realizado durante el periodo previo a someter a los pacientes al trasplante de corazón, el realizado a la semana y al mes de la cirugía cardiaca, como se muestra en las tablas 88, 91, y 94, no encontramos alteración en los valores de los parámetros determinados, que puedan ser identificados como un factor de riesgo asociado con el desarrollo de un evento de rechazo agudo del injerto. Sin embargo, transcurridos tres meses de la intervención, aquellos que mostraban valores de albúmina sérica inferiores a 3,85 gr/dL (valores procedentes de la aplicación de curva

ROC a las variables, con una especificidad del 80%), multiplicaban por tres la posibilidad de sufrir un rechazo agudo del órgano trasplantado, los niveles de linfocitos inferiores a 16,00 %, multiplicaban también por tres la posibilidad de rechazo, así mismo, superar en el recuento leucocitario el número de neutrófilos por encima de 7500/ μ L, predisponía a estos pacientes a sufrir rechazo del injerto con una probabilidad ocho veces mayor que aquellos que no presentaban alteración en los niveles de estos parámetros (Tabla 97).

5.6.2.4 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS DE INMUNIDAD HUMORAL PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

Solamente se relacionaron como factores de riesgo a padecer un evento de rechazo agudo del trasplante, la disminución al mes post-TC de los niveles de IgG2 por debajo de 138,00 mg/dL (valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%), asociándose con un aumento de la frecuencia de rechazo tres veces mayor que en aquellos que no cumplían dicha condición, aquellos individuos cuyos datos analíticos obtenidos el día 90 post-TC, presentaban el nivel de IgG3 inferior a 30,05 mg/dL, multiplicaban por 4 veces la posibilidad de enfrentarse a un rechazo del órgano injertado (Tablas 89, 92, 95 y 98).

5.6.2.5 ANÁLISIS UNIVARIANTE DE PARÁMETROS DE INMUNIDAD CELULAR PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EVENTOS DE RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

En el estudio de los parámetros que evalúan la inmunidad celular, los biomarcadores de riesgo asociados a una mayor posibilidad de un proceso agudo de rechazo del

RESULTADOS

injerto, fueron determinados solamente en el punto de estudio correspondiente con el día 7 post-TC, de tal modo que, aquellos individuos que presentaban un nivel de células T CD3 inferior al 72,00% y células T CD8 por debajo de 16,50% (valores procedentes de la aplicación de curva ROC a las variables, con una especificidad del 80%), incrementaba en 3 veces la posibilidad de rechazo del órgano trasplantado, respecto al resto de los integrantes del estudio. Datos presentados en las tablas 90, 93, 96 y 99.

5.6.2.6 TABLAS DEL ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO DE DESARROLLO DE UN EPISODIO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN TRASPLANTADOS CARDIACOS

Tabla 88: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos en el punto pre-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Proteínas g/dL >6.40	0,25	0,05-1,19	0,084
Urea mg/dL >45.00	0,55	0,21-1,43	0,223
Creatinina mg/dL >1.20	0,69	0,22-2,10	0,519
Albúmina g/dL <3.40	0,45	0,11-1,79	0,263
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	0,33	0,10-1,08	0,067
Bilirrubina Total mg/dL >0,75**	0,34	0,13-0,88	0,028
GOT U/L >40	0,11	0,01-0,90	0,040
GOT U/L >21,50*	0,41	0,15-1,09	0,076
GPT U/L >41	0,22	0,02-1,81	0,161
GGT U/L >60	0,58	0,21-1,58	0,289
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	0,45	0,14-1,48	0,193
Linfocitos % <16.00	0,28	0,09-0,93	0,038
Linfocitos <1300 /μl	0,36	0,12-1,07	0,068
Linfocitos >3500/ μl	3,40	0,20-56,75	0,393
Neutrófilos >7500/ μl	0,36	0,09-1,36	0,135

(*) Valores según ROC 90% especificidad (**) Valores según ROC 80% especificidad
OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 89: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral en el punto pre-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
IgG mg/dL <1090.00	0,70	0,26-1,89	0,492
IgA mg/dL <302.00	0,72	0,27-1,94	0,528
IgM mg/dL <104.50	0,98	0,37-2,62	0,983
IgG ₁ mg/dL <693.00	0,52	0,18-1,52	0,237
IgG ₂ mg/dL <342.00	0,38	0,13-1,16	0,091
IgG ₃ mg/dL <48.00	0,99	0,35-2,80	0,995
IgG ₄ mg/dL <34.40	2,66	0,89-7,98	0,080
Complemento C ₃ mg/dL <116.50	1,12	0,37-3,33	0,832
Complemento C ₄ mg/dL <23.50	0,47	0,15-1,45	0,192
Fb properdina mg/dL <36.00	0,69	0,22-2,14	0,525
PCR mg/dL >0.82	0,53	0,19-1,48	0,231

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 90: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular en el punto pre-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Linfocitos T CD3% <76.00	1,36	0,46-4,00	0,570
Linfocitos T CD3/ μ l <1137.00	0,72	0,24-2,20	0,576
Linfocitos T CD4% <50.00	1,01	0,34-2,96	0,983
Linfocitos T CD4 / μ l <744.50	1,37	0,45-4,14	0,576
Linfocitos T CD8% <24.00	1,85	0,62-5,50	0,267
Natural Killer% <9.00	1,66	0,56-4,89	0,354
Natural Killer/ μ l <125.00	1,21	0,40-3,64	0,729
Linfocitos B% <10.00	0,74	0,25-2,21	0,598
Linfocitos B / μ l <142.00	1,20	0,39-3,64	0,741

Tabla 91: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 7 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Proteínas g/dL <6.40	0,73	0,20-2,59	0,628
Urea mg/dL >45.00	0,58	0,10-3,41	0,550
Creatinina mg/dL >1.20	1,40	0,55-3,59	0,477
Albumina g/dL <3.40	0,33	0,11-0,99	0,048
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	0,40	0,14-1,16	0,086
GOT U/L >40.00	0,48	0,12-1,81	0,282
GPT U/L >41.00	2,54	0,98-6,62	0,055
GGT U/L >60.00	0,58	0,21-1,58	0,289
Leucocitos x 1000 >10.00/ μ l	1,56	0,51-4,71	0,429
Linfocitos % <16.00	0,57	0,13-2,49	0,456
Linfocitos <1300 / μ l	0,62	0,22-1,70	0,358
Linfocitos >3500 / μ l	7,14	0,61-82,6	0,116
Neutrófilos >7500 / μ l	2,16	0,45-10,39	0,334

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

RESULTADOS

Tabla 92: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 7 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
IgG mg/dL <666.50	1,49	0,55-3,99	0,423
IgA mg/dL <195.50	0,85	0,32-2,27	0,760
IgM mg/dL <75.55	0,85	0,32-2,27	0,760
IgG ₁ mg/dL <398.00	1,18	0,42-3,28	0,750
IgG ₂ mg/dL <205.50	1,55	0,55-4,35	0,403
IgG ₃ mg/dL <26.30	1,93	0,67-5,53	0,218
IgG ₄ mg/dL <24.20	1,29	0,46-3,58	0,624
Complemento C ₃ mg/dL <90.90	0,85	0,32-2,28	0,758
Complemento C ₄ mg/dL <20.00	0,58	0,21-1,57	0,286
Fb properdina mg/dL <22.75	1,41	0,52-3,81	0,490
PCR mg/dL > 0.93	1,37	0,50-3,74	0,533

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 93: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 7 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo del injerto

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Linfocitos T CD3% <72.00	3,52	1,12-11,04	0,030
Linfocitos T CD3 / μ l <593.00	0,80	0,28-2,28	0,676
Linfocitos T CD4% <48.00	1,08	0,38-3,10	0,878
Linfocitos T CD4/ μ l < 394.00	0,44	0,14-1,32	0,144
Linfocitos T CD8% <18.00	2,93	1,00-8,60	0,049
Linfocitos T CD8% <16.50**	3,60	1,22-10,62	0,020
Linfocitos T CD8 / μ l <165.00	1,88	0,65-5,46	0,243
Natural Killer% <4.00	1,35	0,47-3,85	0,567
Natural Killer / μ l <36.00	0,85	0,29-2,42	0,761
Linfocitos B% <22.00	0,63	0,21-1,90	0,421
Linfocitos B/ μ l <166.00	0,32	0,10-1,00	0,050

(**) Valores según ROC 80% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 94: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 30 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Proteínas g/dL <6.40	0,81	0,23-2,83	0,741
Urea mg/dL >45.00	0,85	0,31-2,31	0,762
Creatinina mg/dL >1.20	0,98	0,33-2,84	0,974
Albúmina g/dL <3.40	0,73	0,26-1,98	0,538
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	0,86	0,25-2,94	0,820
GPT U/L >41.00	1,77	0,58-5,37	0,313
GGT U/L >60.00	0,62	0,23-1,67	0,352
Leucocitos x 1000 >10.00/ μ l	1,16	0,33-4,06	0,809
Linfocitos % <16.00	1,76	0,67-4,59	0,248
Linfocitos <1300 / μ l	0,81	0,31-2,13	0,682
Neutrófilos >7500/ μ l	0,95	0,27-3,25	0,938

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 95: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 30 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
IgG mg/dL <596.50	1,61	0,61-4,22	0,334
IgA mg/dL <183.00	1,35	0,48-3,82	0,564
IgM mg/dL <65.00	2,42	0,82-7,16	0,109
IgG ₁ mg/dL <363.50	1,32	0,46-3,78	0,595
IgG ₂ mg/dL <179.50	2,40	0,80-7,16	0,117
IgG ₂ mg/dL <138.00**	3,60	1,17-11,03	0,025
IgG ₃ mg/dL <23.90	1,32	0,46-3,78	0,595
IgG ₄ mg/dL <20.70	1,41	0,49-4,02	0,519
Complemento C ₃ mg/dL <107.00	1,36	0,48-3,89	0,558
Complemento C ₄ mg/dL <23.20	1,03	0,36-2,91	0,955
Fb properdina mg/dL <30.00	0,77	0,27-2,21	0,635
PCR mg/dL >0.96	0,86	0,29-2,50	0,787

(**) Valores según ROC 80% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 96: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 30 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Linfocitos T CD3% <75.00	1,76	0,59-5,18	0,304
Linfocitos T CD3/μl 961.00	0,80	0,29-2,51	0,785
Linfocitos T CD4% <51.00	1,23	0,42-3,57	0,703
Linfocitos T CD4/μl <636.50	0,63	0,21-1,88	0,416
Linfocitos T CD8% <22.00	2,89	0,95-8,76	0,061
Linfocitos T CD8/μl <289.50	1,16	0,39-3,38	0,785
Natural Killer% <8.00	1,00	0,34-2,92	0,995
Natural Killer/μl <87.00	0,88	0,30-2,59	0,829
Linfocitos B% <14.00	1,43	0,49-4,18	0,508
Linfocitos B/μl <180.00	0,65	0,22-1,94	0,448

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 97: Análisis univariante del valor de los parámetros bioquímicos a los 90 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Proteínas g/dL <6.40	1,44	0,55-3,78	0,455
Urea mg/dL >45.00	1,23	0,44-3,39	0,688
Creatinina mg/dL >1.20	0,57	0,19-0,74	0,330
Albumina g/dL <3.40	3,63	0,67-19-46	0,132
Albumina g/dL <3.85**	2,91	1,06-7,98	0,037
Bilirrubina Total mg/dL >1.10	0,94	1,18-4,90	0,944
GPT U/L >41.00	0,95	0,18-4,97	0,958
GGT U/L >60.00	1,19	0,44-3,22	0,731
Leucocitos x 1000 <4.00/μl	0,33	0,04-2,83	0,318
Leucocitos x 1000 >10.00/μl	3,68	0,68-19,74	0,128
Linfocitos % <16.00	3,51	1,23-10,07	0,019
Linfocitos <1300 /μl	0,69	0,25-1,85	0,464
Neutrófilos % <42.00	1,11	0,11-11,25	0,929
Neutrófilos >7500/ μl	7,88	1,33-46,52	0,023

(**) Valores según ROC 80% especificidad OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

RESULTADOS

Tabla 98: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad humoral a los 90 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	P
IgG mg/dL <726.00	0,88	0,30-2,57	0,828
IgA mg/dL <167.00	1,19	0,41-3,46	0,745
IgM mg/dL <69.10	2,18	0,72-6,59	0,164
IgG ₁ mg/dL <433.50	1,20	0,36-3,97	0,761
IgG ₂ mg/dL <202.50	0,83	0,25-2,74	0,761
IgG ₃ mg/dL <30.05	4,13	1,04-16,44	0,044
IgG ₄ mg/dL <20.75	2,26	0,62-8,29	0,216
Complemento C ₃ mg/dL <99.20	0,67	0,23-1,99	0,482
Complemento C ₄ mg/dL <22.50	0,72	0,24-2,12	0,552
Fb properdina mg/dL <26.25	1,15	0,39-3,36	0,786
PCR mg/dL >0.26	0,67	0,23-2,00	0,483

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 99: Análisis univariante del valor de los parámetros de inmunidad celular a los 90 días post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Linfocitos T CD3% <79.00	1,09	0,40-2,98	0,857
Linfocitos T CD3/ μ l <1133.50	0,76	0,28-2,10	0,609
Linfocitos T CD4% 51.00	1,72	0,62-4,72	0,292
Linfocitos T CD4/ μ l <750.00	0,58	0,21-1,63	0,308
Linfocitos T CD8% <26.00	1,42	0,52-3,90	0,490
Linfocitos T CD8/ μ l <391.50	2,24	0,79-6,35	0,129
Linfocitos T CD8/ μ l <271.50**	2,45	0,86-6,99	0,093
Natural Killer% <9.00	1,61	0,58-4,42	0,352
Natural Killer/ μ l <126.50	1,30	0,47-3,56	0,609
Linfocitos B% <8.00	0,66	0,23-1,89	0,448
Linfocitos B / μ l <108	0,60	0,21-1,68	0,337

(**) Valores según ROC 80% especificidad

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 100: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores elevados como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	TIEMPO	OR	IC 95%	p
CsA	7 DIAS	1,27	0,24-6,70	0,774
Fk		0,33	0,03-2,86	0,317
MMF		1,60	0,27-9,19	0,598
Anticalcineurínico	30 DIAS	0,77	0,23-2,60	0,682
CsA		0,57	0,08-3,91	0,569
Fk		0,94	0,25-3,53	0,932
MMF	90 DIAS	1,81	0,30-10,67	0,509
Anticalcineurínico		0,93	0,35-2,46	0,890
CsA		0,76	0,14-3,91	0,746
Fk	90 DIAS	8,78	1,96-39,28	0,004
MMF		1,08	0,20-5,79	0,925
Anticalcineurínico		2,75	0,97-7,74	0,056

CsA=Ciclosporina>200 ng/ml Fk=Tacrolimus>15 ng/ml MMF=Micofenolato>5 μ g/ml

Anticalcineurínico = CsA>200 ng/ml o Fk >15ng/ml OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo confianza 95%

Tabla 101: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores bajos como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	TIEMPO	OR	IC 95%	p
Fk	7 DIAS	0,26	0,03-2,19	0,216
MMF		0,69	0,24-2,24	0,539
Anticalcineurínico		0,21	0,02-1,75	0,152
Fk	30 DIAS	4,08	0,23-70,08	0,332
MMF		1,07	0,39-2,90	0,893
Anticalcineurínico		3,70	0,22-61,79	0,362
Fk	90 DIAS	3,66	0,21-63,03	0,371
MMF		0,84	0,32-2,22	0,731
Anticalcineurínico		7,26	0,62-84,47	0,113

CsA=Ciclosporina <100 ng/ml Fk=Tacrolimus <5 ng/ml MMF=Micofenolato <2 µg/ml

Anticalcineurínico = CsA<100 ng/ml o Fk <5ng/ml. OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo confianza 95%

Tabla 102: Análisis univariante de los niveles de fármacos anticalcineurínico elevados en al menos dos mediciones en los 90 días Post-TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	OR	IC 95%	p
Anticalcineurínico	0,76	0,25-2,33	0,636

Anticalcineurínico = CsA>200 ng/ml o Fk >15ng/ml

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 103: Análisis univariante de los niveles de fármacos inmunosupresores en función del rango de efectividad y seguridad en el entorno del TC como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE	TIEMPO	OR	IC 95%	p
Fk <10 ng/ml	7 DIAS	7.32	1.49-35.75	0.014
Anticalcineurínico bajo		3.50	1.09-11.40	0.035
FK 3Mes >15 ng/ml	90 DIAS	8.78	1.96-39.28	0.004

Anticalcineurínico bajo = FK<10ng/ml y/o CsA<250ng/ml

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 104: Análisis univariante de la variabilidad a lo largo del tiempo del nivel de fármacos inmunosupresores como factor predictor de riesgo de desarrollo de eventos de rechazo agudo del injerto.

VARIABLE*	OR	IC 95%	p
CV FK AÑO> 34.50%	4.60	1.24-16.96	0.022

(*) Mediana del valor de la variable. CV= Coeficiente de variación.

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

RESULTADOS

Tabla 105: Factores clínicos de riesgo de desarrollo de infecciones tras el trasplante. Regresión Logística

Parámetros clínicos	OR	IC 95%	p
Edad (años)*	1.02	0.98-1.07	0.17
Sexo (mujer)	1.58	0.66-3.77	0.30
Rechazo celular agudo	1.08	0.41-2.84	0.87
Insuficiencia renal pre trasplante (ausencia)	0.46	0.15-1.40	0.17
Infección pre trasplante (ausencia)	0.54	0.14-2.17	0.39
Diabetes (ausencia)	0.74	0.17-3.28	0.69
Hipercolesterolemia (ausencia)	0.44	0.19-1.01	0.05
Peso (kg)*	0.99	0.97-1.03	0.79
Seronegativo para IgG CMV	2.48	0.74-8.38	0.14
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo	0.98	0.95-1.02	0.30
Tiempo de circulación extracorpórea (minutos)*	0.99	0.99-1.0059	0.59
Retrasplante (ausencia)	0.32	0.06-1.52	0.15
Inducción de inmunosupresión	1.47	0.23-9.28	0.68
Trasplante urgente	4.13	1.72-9.94	0.001
Fallo primario de injerto (ausencia)	0.96	0.40-2.27	0.92

(*) Por cada aumento de unidad de medida. OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

5.7 ESTUDIO PARA IDENTIFICAR BIOMARCADORES ASOCIADOS A RIESGO DE INFECCIÓN Y DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DE FORMA INDEPENDIENTE. REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE

Para la identificación de biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de un proceso infeccioso y al desarrollo de eventos de rechazo celular agudo del injerto, se realizó un análisis de regresión logística multivariante, incluyendo solamente aquellas variables que en la prueba χ^2 para la comparación de variables categóricas mostraban un nivel de significativo con nivel de $p < 0.05$.

5.7.1 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE E INFECCIÓN GRAVE EN EL DIA 7 POST-TRASPLANTE

A los 7 días Post-TC, se observa que la única variable que sigue siendo significativa en el modelo estadístico, es la linfopenia T CD4, tras ajuste por las variables

hipogammaglobulinemia IgA, hipocomplementemia C3, hipocomplementemia C4 y los niveles séricos de FB bajos (Tabla 106).

Tabla 106: Regresión logística multivariante para identificar biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de infección grave a los 7 días post-TC.

BIOMARCADOR	OR	IC 95%	p
T CD4 <394,00 / μ l	3,89	1,27-11,86	0,012
Fb properdina <22,75 mg/dL	2,83	0,93-8,88	0,057
IgA <195,50 mg/dL	2,38	0,80-7,05	0,109
Complemento C4 <20,00/ μ L	2,12	0,67-6,72	0,195
Complemento C3 <90,90 mg/dL	0,75	1,16-3,41	0,718

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

5.7.2 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE E INFECCIÓN GRAVE EN EL DÍA 30 POST-TRASPLANTE

Al mes post-TC, se observa que las variables que permanecían de forma significativa en el modelo estadístico multivariante, fueron valor alto de GOT y la presencia de PCR elevada, tras ajuste por la presencia de hipogammaglobulinemia IgG, hipoproteinemia, hipoalbuminemia y linfopenia relativa en el recuento celular (Tabla 107).

Tabla 107: Regresión logística multivariante para identificar biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de infección grave a los 30 días post-TC

BIOMARCADOR	OR	IC 95%	p
GOT > 40,00 U/L	25,96	1,85-363,42	0,009
PCR > 0,96 mg/dL	5,02	1,23-20,46	0,012
Albúmina < 3,05 g/dL	3,68	0,95-14,32	0,058
IgG < 508,50 mg/dL	2,21	0,57-8,45	0,250
Linfocitos < 16,00%	1,43	0,38-5,37	0,597
Proteínas < 5,25 g/dL	1,27	0,25-6,45	0,771

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

RESULTADOS

5.7.3 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE E INFECCIÓN EN EL DIA 90 POST-TRASPLANTE

Al tercer mes Post-TC, se observa que las variables que permanecían de forma significativa en el modelo estadístico, eran niveles altos de PCR, hipoalbuminemia e hipogammaglobulinemia IgA, tras ajuste por los niveles séricos de proteínas totales.

Datos recogidos en la tabla 108.

Tabla 108: Regresión logística multivariante para identificar biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de infección grave a los 90 días post-TC

BIOMARCADOR	OR	IC 95%	p
IgA < 167,00 mg/dL	7,35	1,94-27,86	0,001
PCR >0,26 mg/dL	6,19	1,68-22,79	0,003
Albúmina < 3,85 g/dL	5,24	1,38-19,84	0,011
Proteínas < 6,40 g/dL	0,71	0,15-3,28	0,662

OR = Odds Ratio. IC 95% = intervalo de confianza del 95%

Tabla 109: Factores clínicos de riesgo de desarrollo de infecciones post-TC. Regresión Logística

Parámetros clínicos	OR	IC 95%	p
Score del mes > 10.5	5.98	2.06-17.36	0.001
Trasplante urgente	1.54	1.54-14.64	0.006
Hipercolesterolemia (ausencia)	0.31	0.11-0.87	0.027

5.7.4 REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIANTE Y RECHAZO DEL INJERTO EN EL DIA 7 POST-TRASPLANTE

A la semana Post-TC, se observa que tras el ajuste por los niveles de células T CD3 la única variable que permanecía significativa en el modelo estadístico, es el valor de células T CD8, (Tabla 110).

Tabla 110: Regresión logística multivariante para identificar biomarcadores independientemente asociados a riesgo de desarrollo de rechazo del injerto a los 7 días post-TC

BIOMARCADOR	OR	IC 95%	p
T CD8 < 72,00%	3,60	1,22-10,62	0,018
T CD3 < 16,50%	2,59	0,77-8,69	0,111

5.8 ELABORACIÓN DE ESCALAS DE RIESGO EN EL DESARROLLO DE INFECCIÓN GRAVE Y DE RECHAZO DEL INJERTO

Para la elaboración de una escala (*score*) con las variables bioquímicas e inmunológicas, se utilizaron las variables asociadas con un mayor riesgo de desarrollar un proceso infeccioso o un evento de rechazo agudo del injerto, utilizando los resultados de análisis univariante y multivariante de regresión logística ya mencionados. Los criterios utilizados para la confección de estas escalas fueron:

RESULTADOS

A. El valor significativo de las variables en un análisis de regresión logística con un nivel de significación estadística ($p < 0.05$).

B. A la variable se le asigna un número de puntos según el OR.

C. Plausibilidad biológica de la asociación.

Se elaboraron distintas escalas, en función del tiempo de trasplante, desde el momento pre-TC, 7, 30 y 90 días post-TC y en función de la aparición de procesos infecciosos o un evento de rechazo agudo del injerto a los tres meses post-TC.

5.8.1 ESCALA DE RIESGO DE INFECCIÓN EN EL ESTUDIO PRE -TC

Los parámetros utilizados para la elaboración de esta escala fueron:

- a. Leucocitos x 1000 > 10.00/ μ l = 3 puntos
- b. Neutrófilos > 7500/ μ l = 3 puntos
- c. Nivel de PCR > 3,72 mg/dL = 3 puntos

Se asignó tres puntos a cada uno de los hallazgos, correspondientes con el valor del OR obtenido en la regresión logística univariante y la suma de valores fue la escala en cada paciente. Mediante curva ROC de todos los valores en asociación con la variable infección, se estableció un punto de corte de 4,5 para el *Score* con una especificidad de 81,3%, sensibilidad de 47%, un VPP de 53%, VPN de 77,2%. El riesgo relativo de los pacientes con una *Score* > 4.5 fue de 3.87, intervalo de confianza al 95% (I.C. 95%) 1,59-9,42, p= 0,003.

RESULTADOS

5.8.2 ESCALA DE RIESGO DE INFECCIÓN EN EL DÍA 7 POST-TC.

Los parámetros utilizados para la elaboración de esta escala fueron:

a. IgA <195,50 mg/dL = 3 puntos

b. C3* <66,60 mg/dL = 4 puntos

c. FB* <19,15 mg/dL = 10 puntos

d. T CD4* <186,00/ μ l = 3 puntos

(*) Valores obtenidos de curva ROC con un 90% de especificidad.

Como se indicó en la anterior sección los puntos son los correspondientes con el valor del OR obtenido en la regresión logística univariante. La suma de valores da la escala. Mediante curva ROC del sumatorio de todos los parámetros, se estableció un punto de corte de 3,50 para la escala en este punto de estudio con una especificidad de 82%, sensibilidad de 62%, un VPP de 62%, VPN de 82%. De esta manera en el modelo de regresión un paciente con una escala de 3.5 o más tuvo un riesgo de 7 veces mayor de tener infecciones (OR=7.43, I.C. 95% 2,75-20,10, $p < 0.001$).

5.8.3 ESCALA DE RIESGO DE INFECCIÓN EN EL DÍA 30 POST-TC.

Los parámetros utilizados para la elaboración de esta escala fueron:

- a. Hipoproteinemia (proteínas** <5,25 g/dL) = 4 puntos
- b. Hipoalbuminemia (albúmina**<3,05 g/dL) = 4 puntos
- c. Hipertransaminemia (GOT > 40,00 U/L) = 10 puntos
- d. Linfopenia (linfocitos <16,00%) = 3 puntos
- e. Hipogammaglobulinemia IgG (IgG**<508,50 mg/dL)= 4 puntos
- f. Reactante de fase aguda elevado (PCR >0,96 mg/dL) = 6 puntos
- g. Recuento de T CD4 < 636,50/ μ l = 3 puntos

(**) Valores obtenidos de curva ROC con un 80% de especificidad.

Los puntos son los correspondientes con el valor del OR obtenido en la regresión logística univariante. La suma fue el valor de la escala. Mediante curva *ROC* del sumatorio de todos los valores, se estableció un punto de corte de 10.50 para el *Score* de riesgo de infección grave con una especificidad de 81%, sensibilidad de 57%, un VPP de 57% y VPN de 81%. De esta manera un paciente con más de 10.5 puntos tenía 6 veces más posibilidades de tener infecciones graves (OR 5.73, I.C. 95% 2.23-14.68, $p<0.001$).

5.8.4 ESCALA DE RIESGO DE INFECCIÓN GRAVE EN EL DÍA 90 POST-TC.

Los parámetros utilizados para la elaboración de este *Score* fueron:

- a. Hipoproteinemia (Proteínas* < 5,85 g/dL) = 6 puntos
- b. Hipoalbuminemia (Albúmina** < 3,85 g/dL) = 6 puntos
- c. Hipogammaglobulinemia IgA (IgA < 167,00 mg/dL) = 4 puntos
- d. Reactante de fase aguda elevado (PCR* > 0,59 mg/dL) = 8 puntos

(*) Valores obtenidos de curva ROC con un 90% de especificidad.

(**) Valores obtenidos de curva ROC con un 80% de especificidad

Los puntos son asignados correspondientemente con el valor de OR obtenido en la regresión logística univariante. Mediante curva *ROC* del sumatorio de todos los parámetros, se estableció un punto de corte de 7.00 para la escala, con una especificidad de 84%, sensibilidad de 71%, un VPP de 64.5% y VPN de 87.8%. Los pacientes que a los 3 meses del trasplante mostraron 7 o más puntos en su escala individual tuvieron 13 veces más posibilidades de haber tenido o tener una infección grave (OR 13.18, I.C. 95% 4.64-37.40, $p < 0.001$). La limitación de esta escala es el tiempo en la que se ha cuantificado (a los 3 meses) ya que muchos eventos pueden haber ocurrido antes de su cálculo.

5.8.5 ESCALA DE RIESGO DE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO EN EL DÍA 90 POST-TC.

Los parámetros utilizados para la elaboración de este *Score* fueron:

- a. Hipoproteinemia (Proteínas** <3.85 g/dL) = 3 puntos
- b. Linfopenia relativa (linfocitos < 16.00 %) = 3 puntos
- c. Neutrofilia (neutrófilos > 7500/ μ l) = 8 puntos

(**) Valores obtenidos de curva ROC con un 80% de especificidad.

Los puntos se asignaron usando el correspondiente valor del OR obtenido en la regresión logística univariante. Mediante un análisis de curva *ROC* del sumatorio de todos los parámetros (escala), se estableció un punto de corte de 4.00 para la misma como biomarcador de riesgo de rechazo celular agudo con una especificidad de 93.3%, sensibilidad de 36.4%, un VPP de 61.5% y VPN de 83.3%. Los pacientes que a los tres meses tras el trasplante tuvieron una escala mayor a 4 tuvieron una posibilidad 8 veces mayor de haber tenido o tener un episodio de rechazo celular agudo en los tres meses de seguimiento post-TC (OR 8.00, I.C. 95% 2.27-28.09, $p = 0.001$).

En los puntos de estudio previos no se obtuvo suficiente información para la confección de escalas. La limitación de esta escala es el tiempo en la que se ha cuantificado (a los 3 meses) ya que muchos eventos pueden haber ocurrido antes de su cálculo.

5.8.6 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE OTRAS PROTEÍNAS COMO NUEVOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO CELULAR AGUDO

Para analizar el posible rol de otros biomarcadores en la patogenia de rechazo celular agudo se diseñó un sub estudio de casos y controles con seguimiento clínico completo y biopsias endomiocárdicas de protocolo. Con la colaboración del laboratorio de la Dra. Sarwal en California se seleccionaron una serie de proteínas potencialmente implicadas en procesos inflamatorios en el área cardiovascular. Se incluyeron proteínas que se expresan en gran cantidad en pacientes con IAM (fetuína B, NAP2), fallo cardiaco (CD14, CD31), hipertrofia y fibrosis cardiaca (galectina 3), quimiocinas implicadas en inhibición de la angiogénesis (CXCL4, CXCL9), pero también proteínas ateroprotectoras (Apo-1).

Se observa que los pacientes con rechazo (n=32) tuvieron niveles significativamente más altos de galectina 3 que los pacientes sin rechazo (n=31) (13 ± 4.7 vs 9.9 ± 3.8 ng/ μ L, $p=0.016$). Cuando estratificamos a los pacientes en 2 grupos según el nivel de esta proteína (punto de corte de 10 ng/ μ L, correspondiente al valor de la mediana), demostramos que los pacientes con niveles superiores a 10 ng/ μ L de la proteína, desarrollaron con más frecuencia rechazo celular agudo (OR, 3.07; 95% CI, 1.09-8.61; $p=0.033$).

No se asociaron de forma significativa variables clínicas con el rechazo celular agudo (Tabla 111). Tras ajuste con las variables que mostraron tendencia de asociación ($p < 0.2$), los niveles de galectina permanecieron en el modelo con valor significativo tras ajuste por el tiempo de seguimiento tras el trasplante en meses (OR, 3.07; 95% IC, 1.09-8.61; $p=0.033$) y por el tiempo de circulación extracorpórea (OR, 3.41; 95% IC,

1.19-9.77, $p=0.02$). No se observan diferencias significativas en las otras proteínas evaluadas.

Tabla 111: Asociación entre variables demográficas y clínicas con el desarrollo de rechazo agudo del injerto en pacientes sometidos a trasplante cardiaco.

Parámetros	RECHAZO (n=32)	No RECHAZO (n=31)	p
Edad	53±11	54±12	0.77
Sexo, hombres (%)	77	87	0.34
Tiempo de isquemia (media ± DT)	201±62	215±60	0.38
Tiempo de CEC (media ± DT)	137±46	124±28	0.18
Trasplante urgente (%)	9.4	12.9	0.73
Tiempo de seguimiento, meses (media ± DT)	101±67	72±55	0.06

DT: Desviación típica

CEE: Circulación extracorpórea

RESULTADOS

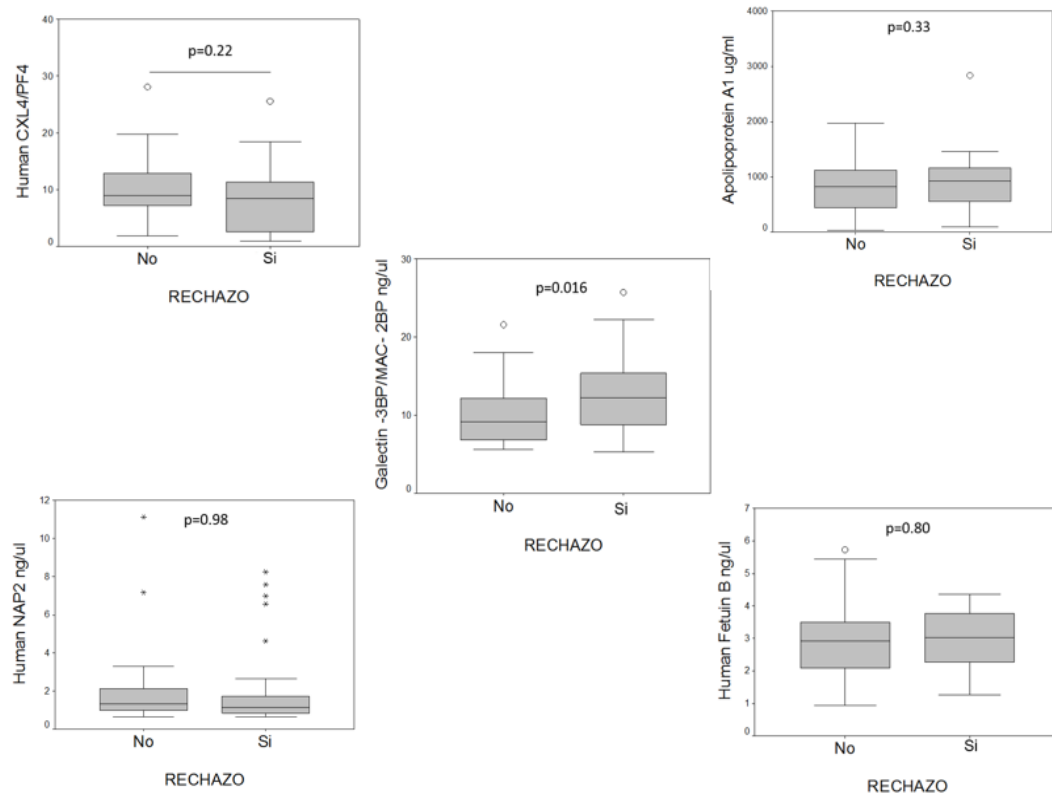


Figura 36: Asociación entre nuevos biomarcadores y rechazo agudo del injerto. Análisis transversal mediante comparación de medias con T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (0)

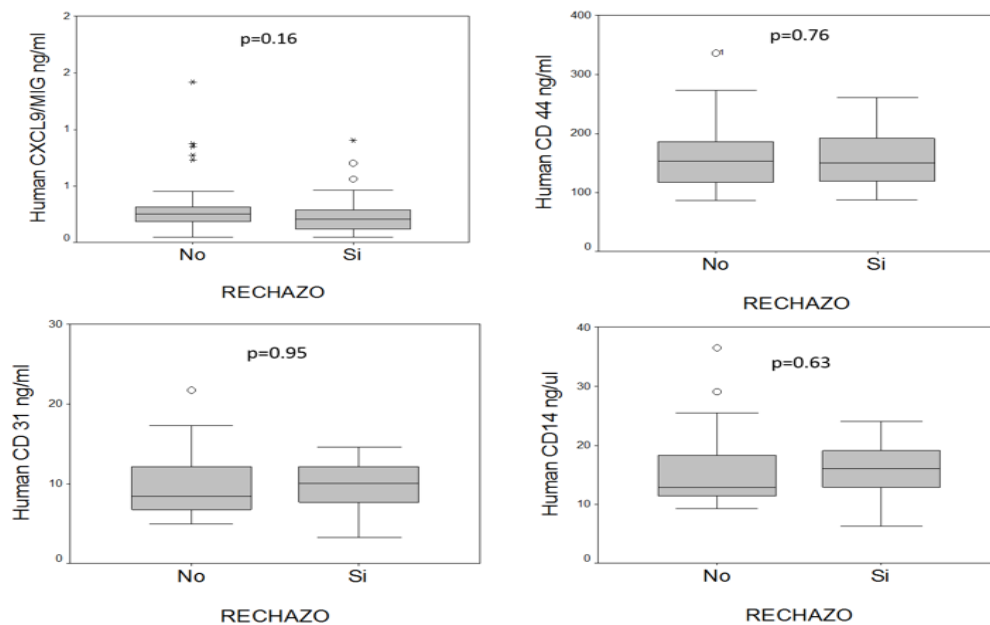


Figura 37: Asociación entre nuevos biomarcadores y rechazo agudo del injerto. Análisis transversal mediante comparación de medias con T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (0)

VI. DISCUSIÓN

Las infecciones y el rechazo del injerto siguen siendo las complicaciones más frecuentemente descritas en individuos sometidos a trasplante de corazón debido a la pérdida de la función cardiaca de forma irreversible. En el periodo post-TC es necesario el mantenimiento de un elevado nivel de inmunosupresión que evite el desarrollo de eventos de rechazo del injerto sin que aumente la aparición de procesos infecciosos, es decir, poder mantener un equilibrio adecuado entre inmunosupresión e infección, propósito difícil de conseguir pero única posibilidad para garantizar una elevada supervivencia de aquellos pacientes sometidos a esta terapia de reemplazo del órgano dañado como estrategia de supervivencia en estos pacientes. Aun así, hay muy pocos trabajos publicados que estudien el impacto de la inmunosupresión sobre los biomarcadores de inmunocompetencia. Por otro lado también son pocos los estudios que evalúan el estado de inmunocompetencia de los pacientes trasplantados cardiacos y sus consecuencias en la evolución clínica de los mismos. Ante la escasez de conocimiento de biomarcadores útiles para detectar pacientes en riesgo de sufrir estas complicaciones, es importante conocer los distintos componentes de la respuesta inmune, de las alteraciones que sufren las variables analizadas y de los principales factores que impactan negativamente en los mismos, como potencialmente son los niveles en sangre de los distintos inmunosupresores que se utilizan en la etapa de mantenimiento de la inmunosupresión farmacológica.

En este trabajo se pretenden identificar y describir las alteraciones que se observan antes y después del trasplante cardiaco en el entorno de la respuesta inmune celular, estudiando el comportamiento de distintas poblaciones y subpoblaciones celulares, a nivel bioquímico estudiando las variaciones de los niveles séricos de los parámetros bioquímicos más utilizados en la monitorización de la evolución clínica del trasplante,

DISCUSIÓN

así como, la variabilidad de los niveles séricos de los fármacos inmunosupresores utilizados en la terapia que implica el trasplante de órgano sólido y la alteración de los parámetros séricos inmunológicos utilizados en la evaluación de la respuesta inmune. La tesis desarrolla también un estudio piloto retrospectivo de distintos biomarcadores experimentales que podrían estar implicados en la patogenia del rechazo allogénico.

Entre los factores bioquímicos está la cuantificación sérica de la concentración de fármacos inmunosupresores que en nuestro caso concreto han sido: FK, CsA y MMF, cuyos niveles han sido medidos en distintos puntos propuestos en nuestro estudio.

Muy pocos estudios han correlacionado los niveles de inmunocompetencia con el nivel en sangre de estos agentes terapéuticos.

La primera hipótesis de esta tesis, propone que los niveles de fármacos inmunosupresores se correlacionan con los valores en sangre periférica de parámetros inmunológicos y bioquímicos determinados en los pacientes de trasplante cardiaco.

Para evaluar esta hipótesis se realizó un estudio prospectivo cuyos resultados han sido expuestos previamente en el capítulo de resultados.

6.1 CINÉTICA Y VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES, DESDE EL MOMENTO DEL TRASPLANTE HASTA EL AÑO DESPUÉS DEL TRASPLANTE CARDIACO

Se ha descrito en la cohorte de estudio, la cinética y la variabilidad de los niveles de fármacos inmunosupresores, desde el momento del trasplante hasta el año posterior del mismo, cuyos resultados se muestran en profundidad en el capítulo de resultados.

Del análisis cinético descrito por los fármacos inmunosupresores, comparando cada punto de estudio y el punto basal determinado en el día 7 post-TC, se observa que los resultados de la determinación de los niveles medidos en los puntos de estudio propuestos, se ajusta de forma adecuada a las recomendaciones actuales en el manejo de este tipo de pacientes, siendo este un método adecuado para establecer si nuestros pacientes están fuera o dentro de los rangos terapéuticos que se manejan actualmente en el entorno del trasplante cardiaco.

- a) Las recomendaciones actuales proponen la determinación en C_2 (concentración a las dos horas de administrar el fármaco) de los niveles de CsA en sangre, pues debido a la naturaleza del fármaco, una exposición inadecuada ante él, por exceso o por defecto, tendría consecuencias, propiciando efectos tóxicos o de rechazo respectivamente. Se ha confirmado que C_2 es la concentración que mejor predice la exposición al fármaco, permitiendo a su vez identificar pacientes con distinto grado de absorción del fármaco prediciendo mejor sus efectos tóxicos o de desarrollo de eventos de rechazo del injerto que la determinación del nivel valle (C_0) de CsA (22,256). En la mayoría de consensos, se determina el nivel de fármacos C_0 , aun así, hay distintas referencias en las cuales se observan algunas diferencias

DISCUSIÓN

entre los niveles de fármacos propuestos, algunos investigadores cifran los niveles de CsA entre 250-350 ng/mL durante los primeros seis meses, entre 200-250 ng/mL entre los seis meses y el año y entre 100-200 ng/mL a partir del año post-TC **(257)**, el informe de cuidados post-TC de la ISHLT cifra los niveles de CsA más adecuados entre 275 y 375 ng/mL durante las primeras 6 semanas, entre 200 y 350 ng/mL de la semana 6 a la 12 y entre 150 y 250 ng/mL a partir del 6 mes **(3)**, no obstante deberían de ser individualizados en función del riesgo de rechazo, infección o toxicidad por el fármaco **(257)**. En nuestro caso concreto, a lo largo de todo el periodo de estudio, desde el día 7 hasta el año Post-TC, la media de concentración de fármaco es de 208 ng/mL, determinando un pico de concentración superior a 250 ng/mL en el día 30, ajustándose así a las recomendaciones actuales, pretendiendo minimizar los efectos secundarios del fármaco.

- b) Una cinética similar se observa en los niveles de FK en el suero de los integrantes de la cohorte estudiada sin llegar a sobrepasar los niveles de toxicidad propuestos actualmente (15ng/mL) **(258)**. Como en el caso de la CsA, se recomienda mantener los niveles de FK sanguíneos en rango terapéutico, considerándose niveles adecuados determinados en C_0 de 10-20 ng/mL en el inicio y 5-15 en la terapia de mantenimiento **(258,259)**. Incluso hay pautas más generales que recomiendan niveles de FK entre 10-15 ng/mL durante los seis primeros meses y entre 5-10 ng/mL a partir de esta fecha **(257)**. El informe de cuidados post-TC de la ISHLT recomienda niveles de Fk de 10-15 ng/mL durante los primeros 60 días post-TC, de 8-12 ng/mL entre los 3 y 6 meses y de 5-10 ng/mL a partir de sexto mes del TC **(3)**. En nuestro caso la media en la concentración del fármaco está dentro del rango de actividad terapéutica durante todo el periodo de estudio, si bien, se encuentran el

nivel ligeramente elevado sin superar los 15 mg/dL en el día 30 post-TC ajustándose a las recomendaciones fijadas en el entorno del TC.

- c) Los niveles de MMF fluctúan ligeramente durante el periodo de tiempo estudiado, siempre manteniéndose los niveles dentro del rango terapéutico recomendado (2-3.5µg/mL) **(260)**, aunque en algunos estudios se cifran entre 2-5 ng/mL **(257)**.

6.2 CINÉTICA Y VARIABILIDAD DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DETERMINADOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD INMUNOLÓGICA, DESDE EL MOMENTO DEL TRASPLANTE HASTA UN AÑO DESPUÉS DEL INJERTO

Se ha descrito la cinética y la variabilidad de los parámetros inmunológicos y bioquímicos utilizados habitualmente para evaluar el estado de inmunocompetencia en la cohorte estudiada, desde el momento previo al trasplante cardiaco hasta el año después del mismo.

En el contexto referente a los parámetros séricos inmunológicos se observan distintas alteraciones en su comportamiento cinético tales como:

Los niveles séricos de IgG muestran un descenso brusco desde el momento previo al trasplante hasta la primera semana posterior a la intervención, seguidamente se observa un descenso progresivo hasta el mes para comenzar a recuperarse progresivamente hasta el año post-TC pero sin llegar a alcanzar los niveles basales, evidenciándose importantes diferencias con el punto de medición de niveles previo al trasplante. Este patrón de comportamiento se repite en las subclases de IgG, IgG1 e IgG3 así como el isotipo IgM pero de forma menos marcada. Aun así, en el caso de

DISCUSIÓN

IgG3 e IgM la capacidad de recuperación de los valores de normalidad con respecto a los otros parámetros se hace más patente ya que llegado el año no llegan a restablecerse del todo los niveles de partida pero tampoco se observan grandes diferencias entre la medición realizada en el punto pre-TC y el año, indicando una clara tendencia a la recuperación. Está descrito que la disminución de los niveles de inmunoglobulinas se pueden deber a varios factores tales como, la pérdida de proteínas totales tras el trasplante, la hemodilución, el daño tisular producido durante la intervención, la activación del sistema del complemento, el daño producido por las bombas de oxígeno y los aspiradores, la circulación extracorpórea necesaria para la cirugía a corazón abierto y el uso de metilprednisolona y MMF por vía intravenosa en los protocolos de inducción inmunosupresora **(60,261)**. La misma cinética se observa en los niveles de IgA, IgG2 e IgG4, mostrando un descenso brusco a la semana seguido de una disminución progresiva hasta el mes, mostrando posteriormente una estabilización en ese rango de valores, se observan grandes diferencias entre la medida realizada previa al trasplante y el resto de mediciones. El comportamiento cinético de los parámetros estudiados coincide con el observado en otros estudios donde la hipogammaglobulinemia IgA e IgG presenta una asociación directa con la probabilidad de aparición de eventos infecciosos, las subclases de IgG muestran patrones similares en otros estudios pero no se pudo asociar de forma significativa cinética mostrada con una mayor propensión a desarrollar infección **(261)**.

Los niveles séricos del factor del complemento C3, C4 y factor B de properdina siguen una pauta cinética similar entre ellos, pero con ciertas diferencias, de tal forma que, en todos los casos se experimenta una caída brusca de los niveles desde la medición en el

punto previo al trasplante y la primera semana, para experimentar al mes, una leve recuperación seguidos de un nuevo descenso que se mantiene hasta el año, en el cual el nivel de C3 se recupera respecto al valor basal sin llegar a ese nivel pero sin mostrar grandes diferencias con el valor pre-TC, en el caso de C4 la tendencia se repite de forma tan suave que no se observan diferencias evidentes entre ninguna de las mediciones realizadas a lo largo del estudio. Esta cinética ya está descrita, pues los niveles del complemento se ven afectados por la circulación extracorpórea, la activación del complemento durante la cirugía y la activación post-quirúrgica de la PCR **(262)**. Sin embargo, en el caso del factor B de properdina, que mantiene la cinética del resto, una vez que caen sus niveles en el punto de medida correspondiente al día 30, nunca llegan a recuperarse, manteniéndose bajos hasta el año de la intervención, lo que podría proponerlo como un biomarcador de gran potencia como predictor de la aparición de procesos infecciosos. Así pues, la reducción simultánea y coincidente en el tiempo de todos estos parámetros que hemos mencionado, podría explicar el aumento de la probabilidad de desarrollar un proceso infeccioso en pacientes sometidos a trasplante cardiaco, ya que existen estudios realizados en el entorno del TC en los cuales queda demostrada la importancia de la hipogammaglobulinemia IgG como marcador precoz de riesgo de procesos infecciosos graves que junto con la alteración de otros componentes inmunológicos como la hipocomplementemia C3 y C4, podrían identificar a aquellos pacientes que tras someterse a un trasplante cardiaco, estuviesen en riesgo de sufrir el desarrollo de un evento infeccioso grave **(58, 60, 263-267)**.

En el contexto referente a los parámetros séricos bioquímicos, se observan alteraciones en el comportamiento cinético tales como:

DISCUSIÓN

Partimos de valores de PCR discretamente elevados según el rango de normalidad del laboratorio de bioquímica Gregorio Marañón (L.B.G.M) cuyos valores oscilan entre 0.0-0.5 mg/dL, para alcanzar valores normales a partir de la medición realizada el día 90 post-TC. La PCR es una de las denominadas proteínas de fase aguda, la cual se altera ante gran cantidad de eventos de distinta etiología, desde enfermedad cardiovascular, infección, procesos inflamatorios o traumatismos, cargando a este parámetro de mucha inespecificidad **(268)**. No obstante, se ha demostrado en numerosos estudios la relación entre la infección y los procesos inflamatorios de distinta índole con el aumento de los niveles séricos de este marcador **(269,270)**. La elevación discreta de este parámetro desde el momento previo al trasplante, posiblemente debido a los problemas generados por la patología cardíaca subyacente de nuestros pacientes, hasta el mes post-TC en el que vemos la disminución del mismo para alcanzar valores normales, puede deberse a la respuesta del organismo ante el proceso traumático e inflamatorio y la mayor concentración del número de eventos infecciosos que tienen lugar en los primeros tres meses posteriores a la intervención quirúrgica.

Se observa un descenso brusco de los niveles de proteínas totales y albumina sérica (valores normales según L.B.G.M para las proteínas totales 6.4-8.5 g/dL y de albúmina 3.4-4.8 g/dL) durante la primera semana post-TC para recuperarse posteriormente de forma progresiva llegando a alcanzar niveles séricos normales en la medición realizada al año. Se debe tener en cuenta la posibilidad de existencia de patologías nefropáticas, enteropáticas por alteración de la permeabilidad intestinal y procesos de malabsorción, hepáticas crónicas o por desnutrición **(271,272)** como posibles factores en casos aislados. Posiblemente esta disminución brusca de los niveles pueda ser

inherentes al procedimiento quirúrgico del trasplante al que sometemos a nuestros pacientes, generando daño tisular, hipovolemia por pérdida de sangre, la cual a medida se va recuperando el volumen sanguíneo normal promueve la recuperación de los niveles basales normales de ambos parámetros. No obstante, es relevante destacar, debido a su naturaleza proteica, la falta de correlación entre la recuperación en el tiempo de estudio de los niveles basales de proteínas totales y albúmina y la lenta y ausente recuperación total de los niveles de IgG al año del TC, indicando así, la falta de asociación entre la depleción de IgG y la pérdida proteica generalizada que pudiese darse en cualquier punto de medida del estudio, no pudiendo atribuir la hipogamaglobulinemia a la pérdida proteica que subyace en cualquier proceso quirúrgico como se trata en nuestro caso y ya mencionado justificando la cinética de las inmunoglobulinas.

Se observa un aumento de los niveles de urea durante la primera semana posterior al TC (valores normales según L.B.G.M 15-45 mg/dL), junto con unos valores fluctuantes de creatinina a lo largo de todo el periodo de estudio siempre dentro del rango de niveles séricos normales (valores normales según L.B.G.M 0.7-1.2 mg/dL) para disminuir progresivamente hasta el mes alcanzando valores normales estabilizándose hasta el año post-TC. En ausencia de situaciones patológicas de etiología ligada a enfermedad renal, sangrado gastrointestinal o deshidratación provocando hemoconcentración, en cuyos casos aumenta el nivel sérico de urea, esta elevación es atribuible a la pérdida de sangre e hipovolemia transitoria generada en la intervención quirúrgica provocando hemoconcentración, normalizándose sus valores a medida que evoluciona el paciente hacia la estabilidad clínica **(271)**. Así pues, más concentración

DISCUSIÓN

de urea puede considerarse como biomarcador subrogado de un estado clínico de inestabilidad, propia del periodo post-TC y ésta asociarse con morbilidad.

Los niveles de GOT, GPT y bilirrubina total muestran una cinética paralela entre ellos, disminuyendo desde el momento pre-TC con niveles serológicos elevados por encima del rango de normalidad hasta alcanzar unos valores de normalidad a partir de la semana y el mes post-TC manteniéndose estables hasta el año. El nivel elevado pre-TC no parece relacionado con patología hepática (valores normales según L.B.G.M para GOT 10-40 U/L, GPT 5-41 U/L y bilirrubina total 01-1.1 mg/dL). Debido al origen principalmente hepático de los tres marcadores, cuya determinación es útil en el diagnóstico y seguimiento preferentemente de la patología hepática, podemos considerar el posible efecto de factores como la elevación iatrogénica producida por el uso de gran cantidad de fármacos por la patología de origen cardíaco subyacente de forma inherente al estado clínico de nuestros pacientes antes de ser intervenidos quirúrgicamente, la congestión hepática por el estadio de insuficiencia cardíaca terminal, como ejemplos que podrían explicar la elevación inicial de estos parámetros que radica en la posible afectación hepática a nivel isquémico por reducción del flujo sanguíneo de forma crónica y continuada, concomitante al desarrollo de procesos congestivos en nuestros pacientes y descartando el proceso isquémico agudo que cursa con elevaciones mayores de este enzima, ya que restablecida la función del órgano trasplantado los niveles evolucionan hacia la normalidad **(268,273)**. Otros posibles factores de la elevación pre-TC de los niveles de estos parámetros incluyen otra serie de circunstancias en las cuales también se observan alterados, como la insuficiencia renal, procesos inflamatorios e infecciosos previos al trasplante.

Igualmente como ocurre con el aumento de urea, el de las transaminasas podrían suponer un marcador que refleje una situación más inestable y ésta predisponer al paciente a complicaciones.

Referente a los parámetros inmunológicos celulares, se observan alteraciones en su comportamiento cinético, importantes para entender su posible asociación con el desarrollo de complicaciones.

Se observa un aumento de la población de leucocitos totales durante la primera semana alcanzando niveles patológicos para descender progresivamente hasta alcanzar valores normales manteniéndoles hasta el año.

Las subpoblaciones de neutrófilos y linfocitos totales muestran una cinética inversa, de tal forma que la evolución descrita es similar al leucocito total por parte de los neutrófilos que contrasta con la disminución en el mismo punto de medida que es a la semana con los linfocitos los cuales a partir de este momento llevan una cinética opuesta al neutrófilo aumentando y alcanzando niveles normales. Este comportamiento de las células sanguíneas es habitual ante un evento de la magnitud de un trasplante, la liberación de adrenalina, como suscita esta situación, genera estrés provocando una desmarginación de los neutrófilos en el bazo y los pulmones determinando el aumento de los neutrófilos en cuestión de minutos. La leucocitosis es provocada ante procesos traumáticos que conllevan lesión hística como es en nuestro caso y otros como la infección o reacción inflamatoria aguda **(274)**. La linfopenia, en este caso es relativa y desarrollada como un fenómeno de depleción de esta subpoblación leucocitaria relativa y dependiente del aumento de la subpoblación de neutrófilos **(275)**.

DISCUSIÓN

En relación al estudio de las subpoblaciones linfocitarias la bibliografía documentada es más extensa, permitiéndonos comparar nuestros resultados con los de otros investigadores. Así pues, el comportamiento de los linfocitos T CD3 tanto a nivel porcentual como absoluto disminuyen desde el momento del TC para comenzar a aumentar a partir de la semana alcanzando niveles normales en posteriores puntos de estudio. El comportamiento de las distintas subpoblaciones linfocitarias es peculiar, se observa en el porcentaje de las células T CD4 un mantenimiento de los niveles con pequeñas fluctuaciones que no representan diferencias entre el momento pre-TC y el resto de mediciones, sin embargo, en valores absolutos se observa una disminución muy patente de sus niveles durante la primera semana para comenzar a recuperarse de forma progresiva a partir de ese momento, manteniéndose estable hasta el año recuperando entonces los valores basales. Hay estudios en los cuales se describe un descenso significativo de las células T CD4 en el punto de medida a los 7 días. En este estudio **(276)** se monitorizó por separado a aquellos pacientes los cuales recibieron como terapia de inducción globulinas anti-timocito (ATG) o anticuerpos monoclonales como daclizumab o basiliximab coincidente con nuestros pacientes. En aquellos que recibieron ATG se observa una cinética de disminución, pero en el resto de integrantes del estudio tratados con daclizumab, presentan una cinética coincidente con nuestro estudio al comparar valores porcentuales, observándose fluctuaciones poco significativas. En nuestro caso también hemos encontrado significación cuando se comparaban valores absolutos.

Las células T CD8 tienen un comportamiento similar, tanto a nivel porcentual como en valores absolutos, se observa una disminución inicial en la primera semana que se va

recuperando desde entonces hasta el año, alcanzando valores superiores que los basales, observando diferencias evidentes en comparación con el nivel basal a partir del día 180 hasta el año. El aumento de las células T CD8 a partir de los 6 meses del trasplante parece indicar que se ha estimulado la proliferación y diferenciación de células aloespecíficas debido a un reconocimiento antigénico del injerto, justificando el aumento y el mantenimiento en periodos avanzados del trasplante de células T CD8 citotóxicas, fenómeno que ya ha sido descrito, pues la proliferación de células citotóxicas donante-específicas ricas en perforina queda explicada por la exposición al injerto **(277)**. Este patrón de comportamiento coincide con el observado en otros estudios **(278)** pudiendo sugerir la idoneidad de la monitorización de estos parámetros en el entorno de nuestro estudio ya que se muestran diferencias evidentes entre los valores celulares previos al TC y los valores medidos a lo largo de la evolución del mismo. Los linfocitos B aumentan durante la primera semana posiblemente por la reducción correspondiente a los niveles de células T. Posteriormente, las células B comienzan a disminuir presentando diferencias muy evidentes con el estado basal a partir de los 180 días, manteniéndose hasta el año en niveles inferiores respecto al punto basal. Como se ha indicado, estas variaciones del recuento de células B en los primeros días del trasplante podrían asociarse a la depleción sufrida por la población de células T en ese momento. Este mismo patrón cinético se observa en otros estudios pero sin alcanzar diferencias tan marcadas con los niveles basales a partir de los 180 días **(278,279)**. Hay estudios en los cuales niveles altos de linfocitos B en el periodo previo al trasplante y la primera semana post-TC está asociada a un menor riesgo de desarrollo de procesos infecciosos **(279)**, en nuestro caso los niveles de linfocitos B permanecían dentro del rango de normalidad (100-500 células/ μ L) **(263)**.

DISCUSIÓN

Las células NK (CD3-CD16/CD56+) tienen un comportamiento similar a los linfocitos T CD8. A la semana muestran un descenso. Se ha descrito que niveles bajos de éstas células en este momento se correlacionan con desarrollo de infecciones **(262)**. Posteriormente los niveles aumentan, superando ampliamente el nivel basal en la determinación realizada al año post-TC en números absolutos pero no en porcentaje, pudiéndose comportar así como protectores ante un evento infeccioso, ya que en estudios recientes se ha demostrado que son capaces de reconocer y responder ante la infección bacteriana, jugando un papel importante en la prevención de la infección post-TC **(280, 281)**.

6.3 CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS ANTICALCINEURÍNICOS Y MICOFENOLATO CON LOS DISTINTOS PARÁMETROS QUE EVALÚAN LA RESPUESTA CELULAR Y HUMORAL DEL PACIENTE TRASPLANTADO

En relación con el objetivo en el que proponemos la evaluación de la correlación existente entre los niveles de fármacos anticalcineurínicos y MMF con los niveles de los distintos parámetros que evalúan la respuesta celular y humoral del paciente trasplantado, sólo se ha encontrado una correlación significativa en el punto de medida correspondiente a los 90 días post-TC, entre los niveles séricos de CsA y bilirrubina total. Este análisis se realizó previamente, evaluando las correlaciones puntuales de cada momento de estudio de la tesis. Esta falta de correlación temporal es muy interesante ya que *a priori* se pensaba detectar correlaciones significativas. La tesis no ha desarrollado evaluaciones funcionales de la inmunidad humoral y celular. Posiblemente a ese nivel se detecten correlaciones significativas. Una posible

interpretación a esta falta de correlación entre niveles de fármaco y niveles de mediadores inmunológicos podría explicarse por la variabilidad de la respuesta individual de los pacientes.

La segunda hipótesis de la tesis pretende identificar la existencia de alteraciones bioquímicas e inmunológicas en nuestro grupo de estudio que puedan estar asociadas con el aumento del riesgo de desarrollo de infecciones y rechazo del injerto, adelantándonos así a los acontecimientos modificando el tratamiento de mantenimiento del mismo, actuando en prevención de un deterioro del órgano trasplantado, evitando así la disfunción orgánica que supondría un desenlace fatal en la evolución clínica de nuestros pacientes.

6.4 ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES DE FÁRMACOS ANTICALCINEURÍNICOS Y MICOFENOLATO, OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS CON DISTINTAS COMPLICACIONES CLÍNICAS DEL TRASPLANTE

En relación con el segundo objetivo propuesto en esta tesis, pretendemos la evaluación de la asociación existente entre los niveles de fármacos anticalcineurínicos y MMF junto con otros parámetros bioquímicos e inmunológicos con las distintas complicaciones clínicas del trasplante, como pueden ser el desarrollo de infecciones y el rechazo del órgano trasplantado durante los tres meses siguientes al trasplante, periodo en el cual se concentran la mayoría de los eventos referidos previamente.

Los principales hallazgos encontrados en este estudio, los hemos estratificado por periodos de tiempo, pre-TC, semana, mes y tercer mes post-TC coincidentes con el

DISCUSIÓN

momento de extracción de la muestra y su análisis y el tipo de parámetro analítico utilizado; bioquímico, inmunología humoral o celular.

6.4.1 EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS ANTICALCINEURÍNICOS Y MICOFENOLATO Y OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS CON EL DESARROLLO DE PROCESOS INFECCIOSOS

Analizados los valores del recuento celular en sangre periférica hemos detectado durante el periodo pre-TC, que niveles elevados de leucocitos totales y de neutrófilos se asocian a un mayor riesgo de padecer infección durante los primeros tres meses post-TC. Dicho de otra forma, la leucocitosis y la neutrofilia pre-TC podrían predisponer a los pacientes a tener infecciones. Hay muy pocos trabajos referenciados bibliográficamente de características similares en diseño a nuestro estudio, no se han encontrado similitud con nuestros resultados, pues en los trabajos documentados no se encontraba una asociación significativa del valor de estas variables en el estado basal de los pacientes con el desarrollo de infección post-TC **(276)** no pudiendo así valorar de forma adecuada nuestros hallazgos. No obstante ante la baja representación de este tipo de estudios, sería interesante la introducción de estos parámetros en siguientes trabajos para valorar si la alteración que se observa es relevante en el entorno del TC. Una posible explicación de esta diferencia radica en el régimen de inmunosupresión utilizado en otros trabajos.

Hemos encontrado significación estadística en la evaluación de la asociación entre el número de células T CD4 con la aparición de eventos infecciosos. No obstante estos valores significativamente más bajos de células T CD4 determinados a los 7 días del

trasplante y al mes post-TC, estaban próximos a los límites de normalidad teóricos (300-1400 células/ μ) **(263)**. Esto es muy interesante ya que podría ser una evidencia de que no hacen falta valores “anormales” de células T CD4 para entrar en fase de riesgo de infección. Así mismo, la única variable que permanecía significativa en un modelo estadístico de regresión logística multivariante tras ajuste por el resto de variables que resultaron significativas en el modelo de regresión univariante en el mismo punto del tiempo de medición coincidente con los 7 días, fueron los niveles de células T CD4, pudiéndole considerar un factor de riesgo importante, predictor de la aparición de eventos infecciosos. Hemos encontrado similitud en los resultados con otros estudios tanto en trasplante cardiaco como en otros trasplantes de órgano sólido, en los cuales descensos de T CD4 durante el primer mes se asociaba a un aumento de aparición de infecciones oportunistas cifrando el título de células T CD4 en valores inferiores a 200 células/ μ L **(282, 283)**. Hay otros modelos de inmunodeficiencia secundaria en los cuales la linfopenia T CD4 se asocia también al riesgo de infección bacteriana **(284)**. También hemos encontrado riesgo elevado de desarrollo de infección grave en aquellos pacientes en los cuales los niveles porcentuales de linfocitos totales en sangre medidos al mes post-TC, eran inferiores a un 16% (linfopenia). Este hallazgo coincide con la cinética descrita anteriormente en las distintas subpoblaciones linfocitarias donde se observaba esa disminución en el periodo correspondiente al primer mes post-TC. Esta es una aportación original de esta tesis en pacientes sometidos a trasplante cardiaco. Resultados similares se han descrito en el trasplante hepático.

La potencia de la linfopenia total como predictor de infección debe tomarse en conjunto junto con la asociación en la disminución de células T CD4 previamente mencionado, y hallazgos encontrados en otros estudios como la asociación de la

DISCUSIÓN

disminución del porcentaje de células T CD3 en el día 7 del TC **(278)** con la infección oportunista. El hecho de que los recuentos celulares de las distintas subpoblaciones T CD3, TCD4, TCD8 y linfocitos totales, sean bajos en el punto de medida correspondiente al día 30 post-TC en aquellos individuos que desarrollaron infección respecto a los que no la desarrollaron **(276)** podría hacer interesante incluir en los estudios la valoración de los niveles totales de las poblaciones celulares medidas mediante hematimetría general en un análisis de rutina como posibles factores de riesgo predisponentes a la infección en el entorno del trasplante cardiaco, complementando así los estudios subpoblacionales mediante citometría de flujo.

En cuanto a la asociación de los parámetros inmunológicos medidos en suero y el desarrollo de infección grave en nuestros pacientes, se observa un descenso en los niveles de IgA y un descenso del sistema del complemento, representado por C3 y C4, así como hipocomplementemia del factor B de properdina durante la medición realizada a los 7 días del trasplante. Se trata de un perfil que combina deficiencia secundaria de inmunidad innata (complemento) con adquirida (IgA).

Al mes del trasplante la hipogammaglobulinemia IgG (definida como niveles inferiores a 508 mg/dL de IgG), y a los 90 días del trasplante la hipogammaglobulinemia IgA (por debajo de 167 mg/dL) fueron factores de riesgo de infección.

La hipogammaglobulinemia IgG (valores inferiores a 600 o 700 mg/dL) y severa (cuando la IgG es inferior a 400 mg/dL) **(285)** están claramente representadas en la bibliografía, como factores asociados al riesgo de desarrollo de infección vírica, fúngica y bacteriana siendo considerados como un marcador precoz de riesgo de las mismas **(58, 60, 263-267, 285)**, confirmando así los resultados obtenidos en nuestro estudio al día 30 pos-TC.

Sin embargo, hay muy pocos estudios en los cuales se considere la hipogammaglobulinemia IgA como un factor de riesgo de aparición de eventos infecciosos. Ha sido asociada la disminución de sus niveles con una mayor probabilidad de aparición de eventos infecciosos en trasplante de pulmón **(286)** y cardiaco **(261)**. Los hallazgos encontrados en nuestro estudio a la semana y al tercer mes post-TC de los niveles bajos de IgA, hacen interesante seguir monitorizando y valorar la incorporación de la titulación de sus niveles como factor predictivo de riesgo de infección. Esto es interesante dado que el biomarcador IgG puede influirse por la administración de preparados de inmunoglobulinas intravenosas, utilizadas tanto en protocolos de desensibilización como en protocolos de terapia de reemplazo. Estos preparados están compuestos básicamente de IgG con tan solo trazas de otros isotipos como IgM e IgA. Por ello es importante considerar que el biomarcador IgA no sufriría alteración debido a la administración de estos preparados.

La hipocomplementemia C3 ya es considerada como factor de riesgo de aparición de procesos infecciosos, tanto bacterianos como víricos **(261,60)**. En este estudio los resultados obtenidos en la monitorización de C4 y FB proporcionan información adicional respecto a otros estudios de características similares, pudiéndose considerar sus deficiencias séricas durante los primeros días posteriores al TC como un potencial factor de riesgo en el desarrollo de infección. Además el FB es una variable que permanecía muy próxima a la significación en el modelo estadístico de regresión logística multivariante tras ajuste por el resto de variables que resultaron significativas, en el modelo de regresión univariante a los 7 días post-TC, aumentando así su potencial predictivo de eventos infecciosos.

DISCUSIÓN

La monitorización de distintos parámetros bioquímicos en suero durante los periodos de estudio prefijados, ha dejado patente la asociación entre la alteración de los valores considerados normales de algunos de éstos y el aumento del riesgo a desarrollar eventos infecciosos. Entre ellos se encuentran, la ALB, las PT, PCR y los valores de GOT. En la cohorte estudiada, se observa asociación entre el descenso de PT y ALB al mes y a los tres meses post-TC y el desarrollo de infecciones con una especificidad de entre un 80-90% y un valor predictivo negativo superior al 80%. Ante la ausencia de datos similares en el entorno del TC hemos recabado información de estudios relacionados con otros tipos trasplantes de órgano sólido como el hepático, el renal o intervenciones quirúrgicas complejas como la resección hepática. En estos trabajos se han encontrado similitudes con nuestros resultados, asociando la disminución de los niveles de PT y ALB con un incremento del riesgo de desarrollar infección **(287-289)**. Además en el entorno del trasplante renal se han encontrado hallazgos que asocian la inflamación crónica y la hipoalbuminemia con la infección y otras complicaciones como el desarrollo de anemia e insuficiencia cardiaca congestiva posiblemente debido al denominado síndrome de malnutrición-inflamación por hipoalbuminemia **(290)**. Estos hallazgos son de interés siempre que documentemos un riesgo bioquímico de infección no evaluado anteriormente en TC, el cual parece ser vigente al menos durante 3 meses, uno de los periodos más críticos tras el trasplante.

En cuanto a la variación de los niveles de PCR se observa un aumento discreto de los mismos asociados al desarrollo de procesos infecciosos, mostrando aun así un valor predictivo negativo superior al 80%. Si bien, se observa una disminución desde los valores medidos previos al TC hasta los niveles medidos a los tres meses, que están ligeramente por encima de los valores normales, estos valores bajos pero patológicos

claramente asociados a infección, podrían ser atribuidos al déficit proteico de nuestros pacientes trasplantados y bajo un régimen de inmunosupresión inducido por el tratamiento **(290)**. No obstante, está ampliamente reconocida bibliográficamente la asociación entre la elevación de los valores de PCR y el aumento de riesgo a sufrir un evento infeccioso **(258, 261, 269)**.

En cuanto a la asociación entre el ligero aumento de los niveles séricos de GOT al mes post-TC y el desarrollo de procesos infecciosos, existe muy poca bibliografía que confirme este hallazgo, pero los resultados emitidos en este estudio asocian esta ligera elevación de los niveles séricos de este parámetro con el desarrollo de infección con una especificidad del 98,5%. Se observa que la GOT es una de las variables que permanece de forma significativa en el modelo estadístico de regresión logística multivariante, fenómeno que asocia fuertemente este parámetro y la infección. Niveles más altos de GOT se han asociado a riesgo de infección en estudios realizados en pacientes con otras inmunodeficiencias secundarias como factor de riesgo de mala evolución **(291-294)**. Quizás sería interesante tener en cuenta la medición de este parámetro en futuros estudios para poder confirmar este hallazgo y valorar la introducción de la medición de GOT como parámetro de predicción de riesgo de infección. La reducción de la perfusión arterial en la patología cardíaca provoca enfermedad hepática por isquemia lo que puede provocar un aumento discreto de GOT en suero. Típicamente el incremento de transaminasas se reduce tras corregir la causa del evento es típico de la hipoxia hepática, patología que afecta al pronóstico de pacientes sometidos a cirugía **(273)** como es nuestro caso, por lo cual podría valorarse la posibilidad de la monitorización de los niveles de GOT valorando así la evolución del estado del injerto trasplantado.

DISCUSIÓN

En el estudio analítico de los niveles de fármacos inmunosupresores durante el periodo de estudio comprendido entre el periodo previo al trasplante y los tres meses posteriores a la cirugía, en el análisis de comparación de medias, los niveles de FK elevados según el rango terapéutico propuesto por nuestro laboratorio, en el punto correspondiente a los 7 días, se asocian significativamente con el desarrollo de infecciones graves como cabe esperar teniendo en cuenta el mecanismo de acción del fármaco. En el análisis de variables categóricas, aunque los resultados obtenidos a la semana post-TC no son significativos, se muestra la misma tendencia anteriormente descrita, tanto en FK como en CsA determinada en el punto correspondiente al día 7. En la determinación realizada al mes post-TC, la variación de los niveles de fármacos anticalcineurínicos de forma global (CsA o FK sin tener en cuenta la naturaleza química del fármaco) se asoció de forma paradójica con el desarrollo de infección, niveles más altos de fármacos anticalcineurínicos se observan en los pacientes que no tuvieron infecciones. Análisis previos del grupo investigador detectaron en estos pacientes un aparente rol protector de ciclosporina, frente a FK, que tiende a ser un factor de riesgo a la semana. Hay gran cantidad de estudios realizados durante los últimos años que demuestran lo contrario, ya que disminuye el recuento de leucocitos totales, el número de las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 e incluso se ha demostrado la reducción de su actividad observándose descenso de producción de citocinas proinflamatorias como interferón γ o interleucina-2 asociando niveles elevados de anticalcineurínicos con un nivel de inmunosupresión menor y una mayor susceptibilidad en el desarrollo de infecciones **(295, 296, 297)**. La explicación que se encuentra para asociar el nivel de fármacos de forma contraria a lo esperado y tal como ocurre también en otros trabajos, se fundamenta en la idiosincrasia que

caracteriza a la terapia inmunosupresora y la clínica observada en este tipo de pacientes. De tal forma que, ante la aparición de eventos infecciosos y según el criterio del clínico responsable del tratamiento del paciente, se procede disminuyendo la dosificación de inmunosupresor para restituir la función del sistema inmune del individuo y combatir así el proceso infeccioso, este hallazgo coincide en el tiempo durante el cual se concentran un mayor número de infecciones en el entorno de nuestro estudio en concreto **(261)**, en nuestra cohorte de estudio el 87% (n= 40) sobre el total de infectados al año (n=46), se desarrollan durante los primeros 3 meses, por esta razón la determinación de los niveles del fármaco coinciden con una disminución de dosis ante la aparición de eventos infecciosos, asociándose de forma significativa pero contraria a lo que cabría esperar. Por otro lado, los eventos infecciosos son *per se*, un factor de riesgo de rechazo. Así pues, la determinación de los niveles de fármacos de forma concertada en una serie de puntos en el tiempo posteriores al trasplante, para intentar identificar predisposición al desarrollo de un evento infeccioso, no se ajusta a la evolución del paciente ni al estado de inmunocompetencia de los mismos, no pudiendo asociar de forma correcta los niveles medidos en sangre periférica y el estado inmunológico real de nuestros pacientes pudiendo predecir y evitar la infección.

6.4.2 ASOCIACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS NIVELES DE FÁRMACOS ANTICALCINEURÍNICOS Y MICOFENOLATO Y OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS E INMUNOLÓGICOS CON EL RECHAZO DEL ÓRGANO TRASPLANTADO

Debido a la elevada frecuencia con la que se observa variabilidad en la determinación de los niveles de fármacos inmunosupresores durante todo el periodo de estudio, se generó una nueva variable de estudio que se correspondía con el cálculo del coeficiente de variación del valor de los niveles de fármaco medidos en los distintos puntos de estudio. Este cociente de variación se ha propuesto como una posible herramienta de monitorización en clínica. El análisis de estos datos mostró una asociación de forma significativa entre el aumento de la variabilidad de la medida de los niveles de FK a lo largo del año de monitorización de los integrantes del estudio y un aumento en la posibilidad de desarrollar procesos infecciosos. De igual forma se observa una tendencia, aunque no significativa, a la asociación entre el aumento de la variabilidad de la medida del nivel de fármaco y el desarrollo de un evento de rechazo agudo del injerto, tanto en la utilización de CsA como de FK en la terapia inmunosupresora de mantenimiento del injerto.

Hay estudios publicados recientemente en el entorno del trasplante renal que apoyan los resultados obtenidos en la cohorte de estudio, asociando el aumento de la variabilidad de la medición de los niveles de FK superando el 30% con un aumento de la precipitación de la aparición de un episodio de rechazo agudo del injerto **(298)**.

En cuanto a la monitorización en momentos puntuales, la plausibilidad biológica no es la misma. Cuando analizamos los niveles de fármacos inmunosupresores y su

asociación con la presencia de eventos de rechazo, hemos encontrado de forma significativa mayores valores de los niveles de FK a los 90 días del trasplante en aquellos individuos que sufrieron un evento de rechazo. Posiblemente se deba a un aumento de la dosis del fármaco ante la aparición de un episodio previo de rechazo, los cuales se concentran mayoritariamente durante los tres primeros meses. En el estudio realizado analizando los niveles de fármacos inmunosupresores, y la posible relación con el desarrollo de rechazo, utilizando en este caso los valores de fármacos, propuestos como rango terapéutico y de seguridad por el entorno científico específico que trabajan con el tipo de pacientes dentro del cual se englobaría nuestro grupo de estudio, se observa que niveles por debajo del rango de efectividad de FK y de anticalcineurínico en general, sin hacer distinción entre CsA y FK en la primera semana post-TC, se asocian de forma significativa con la probabilidad de sufrir un episodio de rechazo agudo del injerto. En este caso la interpretación es más plausible. El tiempo es muy temprano, quizás se ha retrasado el inicio de la terapia de mantenimiento en algunos casos, por lo que menores niveles conducen a un mayor riesgo de rechazo. Del mismo modo se observa una asociación significativa entre los niveles de FK por encima de rango terapéutico medidos a los tres meses post-TC y el aumento de rechazo, confirmando los resultados obtenidos en el análisis en el cual se tomaban los valores de eficacia propuestos por nuestro laboratorio.

Durante los últimos 15 años distintos estudios asocian niveles altos de anticalcineurínicos con un nivel de inmunosupresión mayor, pues a mayor dosificación de inmunosupresor más disminuye el recuento de leucocitos totales, el número de las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 e incluso se ha demostrado la reducción de su actividad observándose descenso de producción de citocinas

DISCUSIÓN

proinflamatorias como interferón γ o interleucina-2 **(297)** disminuyendo así la probabilidad de desarrollo de rechazo del injerto promovido por la actividad citotóxica llevada a cabo por el propio sistema inmune. Cuando encontramos lo contrario, es decir, que la elevación de los niveles de los inmunosupresores se asocia a mayor tasa de rechazo, se fundamenta posiblemente en la idiosincrasia del tratamiento de nuestros pacientes que hemos relatado anteriormente en el punto de discusión que relacionaba la disminución de los niveles farmacológicos y la asociación con el desarrollo de infección. En este caso ante la precipitación de rechazo del injerto se procede con un aumento de la dosis de fármaco, asociando así el evento de rechazo con una determinación de niveles aumentada. En nuestra cohorte de estudio, el 70% (n= 14) sobre el total de rechazos al año (n=20) los eventos de rechazo se desarrollaron durante los primeros 90 días posteriores al trasplante con una media de 44,5 días y en consecuencia se les aumento la dosis de inmunosupresor y en estos casos, la medición de los niveles de fármaco en dicho punto en el tiempo (90 días) se corresponde con el estado previo de rechazo, asociándose de forma significativa niveles elevados de fármaco con desarrollo de evento de rechazo explicando así la discordancia observada en nuestros resultados.

Así pues, la determinación de los niveles de fármacos de forma concertada en una serie de puntos en el tiempo posterior al trasplante, para intentar identificar predisposición al desarrollo de un evento de rechazo del injerto, no se ajusta a la evolución del paciente ni al estado de inmunocompetencia de los mismos, no pudiendo asociar de forma correcta los niveles medidos en sangre periférica y el estado inmunológico real de nuestros pacientes pudiendo predecir y evitar el rechazo

del órgano trasplantado. Esto destaca la mayor validez que tienen los coeficientes de variación de niveles de fármaco que utilizan 3 o más puntos de estudio y si reflejarían un estado de predisposición biológicamente plausible.

En cuanto a la distribución de las distintas poblaciones celulares, se observa que en el punto de medida correspondiente a los 90 días, se asocia un aumento del número de neutrófilos con un mayor riesgo de padecer un evento de rechazo. Hay estudios en los cuales se relaciona el aumento de neutrófilos con la aparición de eventos fibróticos en distintos órganos **(299)**, entre ellos el corazón pudiendo relacionar este evento con una mayor probabilidad de pérdida de función de nuestro injerto justificando el rechazo. Así mismo, se observa una disminución porcentual de la subpoblación linfocitaria total, lo cual puede estar explicado por ser relativa y desarrollada como un fenómeno de depleción de esta subpoblación leucocitaria dependiente del aumento de la subpoblación de neutrófilos (es decir, por redistribución celular) **(275)** pero no asociada directamente al proceso de rechazo en sí mismo.

Se observa una disminución significativa el día 7 post-TC del porcentaje de células T CD3 y CD8 asociado con un aumento de rechazo del injerto. La merma observada en sus porcentajes coincide con la cinética descrita previamente en este trabajo. Podría parecer difícil justificar su asociación con el desarrollo de rechazo debido al papel que juega esta subpoblación celular en la respuesta citotóxica relacionada con el evento en cuestión **(300)**. Sin embargo, este descenso predispone a los pacientes a infección y ésta a su vez a rechazo. Se trataría de una predisposición indirecta, de un biomarcador a través de un evento clínico que coincide a su vez con otro. No obstante como se comentó anteriormente, sería importante tener también en cuenta que los distintos

DISCUSIÓN

subtipos celulares tienen distinta actividad en función del estado en el que se encuentran (inmunofenotipo) y que nosotros no hemos valorado en este estudio (estado nativo, memoria, activado o efector en función de la expresión de determinadas marcadores de membrana) **(301)**. Sin conocer el inmunofenotipo funcional de nuestras células no podemos interpretar su variación de forma correcta asociándoles a la aparición de un determinado tipo de evento como es el rechazo del injerto.

Relativo a la variación de los parámetros bioquímicos determinados a lo largo de nuestro estudio, solamente hemos encontrado asociación según un modelo de regresión logística univariante, entre los niveles bajos de ALB determinados a los tres meses del TC y el desarrollo de eventos de rechazo del injerto. Hay pocos estudios donde se valoren los niveles de albumina como factor de riesgo de rechazo del injerto, aun así hay registros bibliográficos recientes en los cuales consideran la hipoalbuminemia como un factor de riesgo independiente en el fallo primario del injerto **(302)**. Esto es muy interesante. La presencia de hipoalbuminemia hablaría de un peor estado generalizado del paciente y éste ser el que predispone al paciente al rechazo. Es interesante descubrir la múltiple causalidad que participa en el rechazo, esto va más allá de la simple interpretación de la alorespuesta, otros factores también contribuyen a esta barrera a largo plazo para la supervivencia del injerto.

De los parámetros que evalúan la inmunidad humoral, se observa asociación positiva con el rechazo solamente en la variación de dos de las subclases de IgG, observándose nivel bajos de IgG2 al mes y de IgG3 a los tres meses del TC asociados a rechazo. Hay varios trabajos en los que se vincula la hipogamaglobulinemia IgG con el aumento de

episodios de rechazo del órgano trasplantado, apoyando la terapia de reemplazo de inmunoglobulinas intravenosas en estos casos mejorando la supervivencia del injerto **(303,304)**. Aun así no hemos encontrado publicaciones en las cuales se detalle las subclases de IgG que se vean alteradas en estos procesos. Así pues descensos en los niveles de las subclases de IgG2 e IgG3, podrían revelar un estado de hipogammaglobulinemia en potencia enmascarado por una compensación por el resto de subclases, provocando los efectos típicos desencadenados ante niveles disminuidos de IgG. Por otro lado en el modelo de inmunodeficiencia primaria, es conocido en el entorno del trasplante, que el descenso de subclases de IgG puede predisponer a los pacientes a estados inflamatorios y autoinmunes. No está determinado con claridad que mecanismos de tolerancia inmunológica dependen de las subclases de IgG. Esta falta de información nos permite especular sobre si el déficit de subclase puede acompañar a un déficit de tolerancia que presuntamente predisponga al rechazo, de una manera similar a la que se observa en el modelo de déficit primario no pudiéndose controlar la aparición de procesos de autoinmunidad.

Hemos detectado mediante el análisis comparativo de medias, una asociación significativa entre niveles elevados de complemento C4 en el periodo pre-TC y el desarrollo de rechazo del injerto. Hay estudios que vinculan el rechazo humoral en trasplante renal, cardíaco y pulmonar con un aumento de la actividad del complemento y depósito de fragmentos estables del mismo en estos órganos (C3d, C4d y otros) **(305,306)**, pudiendo relacionar elevaciones del complemento con aumento de actividad humoral y rechazo del injerto. Esta información es otra de las aportaciones originales de esta tesis.

6.5 IDENTIFICACIÓN DE UNA ESCALA, MEDIANTE EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE VARIABLES BIOQUÍMICAS E INMUNOLÓGICAS MÁS RELEVANTES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON UN MAYOR RIESGO DE SUFRIR UN EVENTO DE INFECCIÓN GRAVE O RECHAZO DEL INJERTO

Según el informe de la ISHLT **(1)** la infección y el rechazo continúan siendo de los problemas más importantes asociados al trasplante cardiaco aumentando la morbimortalidad de este tipo de pacientes provocando un aumento en el tiempo de cuidados y en el consumo de recursos, traduciéndose en un aumento del gasto sanitario.

Teniendo en cuenta la complejidad de la respuesta inmune y su alteración tras el trasplante cardiaco, es poco probable que con la monitorización de un solo biomarcador podamos hacer una buena predicción del riesgo de infección o rechazo con una sensibilidad y especificidad adecuada en nuestros pacientes **(262)**. Así pues, una vez evaluados por separado, la asociación de la variación de una serie de parámetros presentes en la cartera de servicio de un laboratorio de rutina clínica, con el riesgo de desarrollo de infección o de rechazo, sería interesante elaborar escalas conformadas por estos parámetros, los cuales evalúan la respuesta inmune innata, adaptativa y la situación bioquímica, en una misma escala y en distintos puntos de estudio en el periodo pre y post-TC. Mediante estas escalas (*scores*) podríamos identificar pacientes en riesgo de padecer episodios de infección o rechazo, con una mayor precisión que monitorizando los parámetros asociados a estos mismos eventos de forma individual, pudiendo a su vez, actuar profilácticamente en prevención del

Página | 242

desarrollo de este tipo de procesos, disminuyendo así, la morbimortalidad entre nuestro colectivo de estudio y la elevación del gasto sanitario.

En estudios actuales se han propuesto escalas que mediante la combinación de parámetros coincidentes con los evaluados en nuestro estudio como, nivel de hipocomplementemia C3 o células T CD4, que evalúan la respuesta inmune innata y adaptativa en el día 7 post-TC analizando la variación de sus valores en torno a un rango determinado por los investigadores mediante herramientas estadísticas similares a las utilizadas en este estudio, obtuvieron como resultado la elaboración de una escala que predecía con más potencia que los parámetros que la componían de forma individual, el riesgo a desarrollar un proceso infeccioso grave **(262)** con una sensibilidad y especificidad muy similar a la obtenida en nuestro estudio, coincidente en la medición realizada en el día 7 post-TC, aunque en esta tesis se complementa esta evaluación con nuevos biomarcadores accesibles.

A parte de la escala desarrollada para el punto de evaluación al día 7 del trasplante, hemos elaborado escalas coincidentes en el momento previo al trasplante, del día 30 post-TC, día 90 post-TC y el riesgo de desarrollo de infección grave, mediante la combinación de distintos parámetros que asociamos con riesgo de infección a lo largo del estudio, obteniendo resultados satisfactorios, datos que están reflejados previamente en el capítulo de resultados.

Una escala pre-TC que combina el recuento de leucocitos, neutrófilos y la PCR, pone el riesgo de infección en cuatro veces más para aquellos pacientes por encima del valor propuesto.

DISCUSIÓN

En la escala correspondiente al día 7 se combinando la alteración de IgA, complemento C3, FB y el recuento de células T CD4, se multiplica la posibilidad de tener infecciones por 7. Esta escala se destaca por las siguientes razones: A diferencia de la escala publicada por Sarmiento et al (**262**), se utiliza el nivel de IgA y no el de IgG. Ambos factores se asocian a riesgo de infección. Sin embargo, la IgG tiene una limitación, al poder influirse por el uso de gammaglobulinas intravenosas pre-TC o muy tempranas tras el trasplante. La IgA no se afecta por la infusión de gammaglobulinas intravenosas. Otro elemento original es el uso del factor B properdina como representante de inmunidad innata. El interés de la escala radica en su cuantificación temprana tras el trasplante, cuando aún no se han producido la mayoría de infecciones.

En la escala coincidente con el día 30 intervienen la hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipertransaminemia GOT, linfopenia, la hipogammaglobulinemia IgG, reactantes de fase aguda elevados (PCR) y un recuento bajo de T CD4. En este caso el riesgo se eleva en 5 veces. El interés de esta escala radica en la coincidencia en el tiempo con un momento muy cercano al inicio del trasplante y la incorporación de datos bioquímicos en un momento en que se debe haber alcanzado una homeostasis tras el acto quirúrgico. Otro aspecto interesante es la inclusión del nivel de GOT en su cálculo. Niveles altos de la misma se han descrito en otras inmunodeficiencias secundarias como factor de riesgo de mala evolución (**291-294**). En la escala correspondiente al día 90 el riesgo se multiplica por 13 para desarrollar un proceso infeccioso, en función de superar o no el punto de corte de nuestras escalas propuestas. No obstante esta escala no la proponemos como escala preventiva ya que se cuantifica cuando muchos eventos infecciosos ya se han producido. Podría tener

valor de asociación y para la toma eventual de decisiones, vigilando de forma más cercana a los pacientes con un valor de riesgo alto.

Además hemos definido una escala en relación al riesgo de rechazo en el día 90 post-TC evaluando parámetros bioquímicos (PT) y hematimétricos (linfocitos y neutrófilos) exclusivamente, con un alto grado de especificidad muy interesante para estudios futuros evaluando estos parámetros en un mayor número de pacientes, ya que la alteración individual de los parámetros que constituyen la escala están asociados a eventos de rechazo **(299,302)**. Una vez más, al tratarse de una escala tardía no tiene finalidad pronóstica, sino de clasificación y selección de trasplantados para dedicarles una mayor vigilancia.

Así pues, la validación mediante estudios multicéntricos de estas escalas permitiría en un futuro su incorporación en la práctica clínica.

6.6 ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE OTRAS PROTEÍNAS COMO NUEVOS BIOMARCADORES Y EL DESARROLLO DE RECHAZO CELULAR AGUDO

Para analizar el posible rol de otros biomarcadores en la patogenia del rechazo celular agudo, se diseñó un sub estudio retrospectivo de casos y controles con seguimiento clínico completo y biopsias endomiocárdicas de protocolo. Se evaluaron una serie de proteínas potencialmente implicadas en procesos inflamatorios en el área cardiovascular incluyendo proteínas que se expresan en niveles aumentados en pacientes con IAM (fetuína B, NAP2), fallo cardiaco (CD14, CD31), hipertrofia y fibrosis

DISCUSIÓN

cardiaca (galectina 3), quimiocinas implicadas en inhibición de la angiogénesis (CXCL4, CXCL9), pero también se incluyeron proteínas ateroprotectoras (Apo-1).

En este estudio se observa que los pacientes con rechazo tenían niveles significativamente más altos de galectina 3 que los pacientes sin rechazo. Cuando estratificamos a los pacientes en 2 grupos según el nivel de esta proteína, se demostró que los pacientes con niveles más altos de la proteína desarrollaron más frecuentemente rechazo celular agudo. No se observan diferencias significativas en el resto de proteínas evaluadas.

Esta parte del estudio podría sugerir la implicación de la galectina 3 en el rechazo celular agudo. Como se mencionaba en la introducción, en condiciones normales en las células cardiacas la expresión de esta proteína es muy baja **(138, 151)**. Se han descrito elevaciones de galectina 3 en macrófagos antes del fallo cardiaco **(156)**. Interaccionando con el receptor de membrana CD32, tiene la capacidad de inhibir la transcripción de ciertas interleucinas en las células T, promoviendo una desviación hacia una respuesta citotóxica Th1 **(157)**, además de tener propiedades mitógenas y antiapoptóticas **(158, 159)**. Se han descrito niveles elevados de galectina 3 como un potencial biomarcador asociado a la inflamación y a la fibrosis que predice una evolución adversa relacionada con la renovación de matriz extracelular en los procesos de insuficiencia cardiaca **(162)**.

Limitaciones de este sub estudio incluyen el diseño retrospectivo, presentando riesgo de sesgo de selección. El tamaño muestral permite el análisis pero es bajo y precisa confirmación con estudios realizados en más pacientes. Finalmente se reconoce la limitación de la temporalidad de las muestras de suero. En la mayoría de los casos eran

sueros obtenidos antes del episodio de rechazo, pero había casos en que éste ya había ocurrido. Por esta razón existe la posibilidad de que la diferencia encontrada sea en parte consecuencia y no causa de rechazo. También existe la posibilidad de que otros factores puedan haber estado implicados en la variabilidad del nivel de galectina 3. Para minimizar estos posibles sesgos hicimos el análisis de regresión lineal múltiple que demostró que la galectina 3 > 10 ng/μl persistió como biomarcador de rechazo tras ajuste por variables clínicas.

VII. CONCLUSIONES

- 1.- El análisis cinético descrito por los fármacos inmunosupresores; micofenolato, ciclosporina A y tacrolimus a lo largo del tiempo de estudio, es un método adecuado para establecer si nuestros pacientes están en rango terapéutico que actualmente se utiliza en el entorno del trasplante cardiaco.
- 2.- La cinética mostrada por las proteínas totales y la albúmina no correlaciona en los distintos tiempos de estudio con la cinética descrita por la IgG, no pudiendo atribuir de manera exclusiva la hipogammaglobulinemia IgG a la pérdida de proteínas que acontece en el proceso quirúrgico del trasplante.
- 3.- La cinética que siguen los linfocitos totales correlaciona de forma directa con las subpoblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) y células NK a lo largo de todo el estudio, obteniendo así de la determinación rápida, habitual y que se realiza de forma rutinaria en el estudio hematimétrico de las poblaciones celulares, indicios para realizar estudios más específicos mediante otras técnicas más especializadas no implementadas en los laboratorios de rutina o urgencia.
- 4.- No se observa correlación entre los niveles de fármacos inmunosupresores inhibidores de calcineurina y micofenolato con los parámetros inmunológicos estudiados, no pudiendo evaluar el estado de inmunocompetencia de nuestra cohorte en función de los niveles farmacológicos determinados en sangre.
- 5.- La leucocitosis y la neutrofilia pre trasplante se asocian con un mayor riesgo de infección grave durante los primeros tres meses del trasplante cardiaco.
- 6.- Valores de linfocitos T CD4 bajos y próximos al límite de normalidad en el primer mes posterior al TC, se asocian con el riesgo de infección, no es necesario presentar valores anormales de los mismos para identificar este riesgo.

CONCLUSIONES

7.- La presencia de linfopenia en porcentaje durante el primer mes post-trasplante se asocia a un aumento del riesgo de infección.

8.- La hipogammaglobulinemia IgA durante los tres primeros meses posteriores al trasplante, se asocia con el desarrollo de infecciones.

9.- La deficiencia sérica de complemento C4 y factor B de properdina durante los primeros días posteriores al trasplante se asocian con el riesgo de infección.

10.- La hipoproteinemia y la hipoalbuminemia durante los 3 primeros meses posteriores al trasplante aumentan el riesgo de desarrollo de una infección grave.

11.- Niveles de PCR elevados se asocian con el desarrollo de infección grave.

12.- La determinación de los niveles de fármacos de forma sistemática posterior al trasplante, no se ajusta a la evolución del paciente ni a su estado de inmunocompetencia, no pudiendo predecir en función de sus niveles un evento de infección.

13.- El aumento de la variabilidad de los niveles de tacrolimus a lo largo del año posterior al trasplante está asociado con un aumento del número de episodios de infección desarrollados en el trasplante cardiaco.

14.- La determinación de niveles bajos de fármacos anticalcineurínicos durante la primera semana post-trasplante se asocian a un aumento de probabilidad de rechazo durante los primeros 3 meses del trasplante cardiaco.

15.- La neutrofilia al tercer mes del trasplante se asocia con un aumento del riesgo de rechazo.

16.- Niveles elevados de complemento C4 en el periodo previo al trasplante se asocian con eventos de rechazo.

17.- Los niveles de galectina 3 elevados en suero se asocian con un aumento del riesgo de rechazo del injerto, podría considerarse como un biomarcador de rechazo agudo del injerto, datos no publicados con anterioridad.

18.- La evaluación de las alteraciones de distintos parámetros inmunológicos y bioquímicos en distintos tiempos y de forma sistemática nos ha permitido elaborar escalas que podrían ser más útiles para identificar pacientes con un mayor riesgo a presentar un evento infeccioso o de rechazo que con la evaluación de esos parámetros de forma individualizada.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb SB *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report--2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34(10):1264-77
2. González-Vílchez F, Segovia Cubero J, Almenar L, Crespo-Leiro MG, Arizón JM, Villa A, Delgado J *et.* Registro Español de Trasplante Cardíaco. XXVI Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2014). *Rev Esp Cardiol.* 2015;68(11):1008-1021
3. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S, *et al.* The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2010 Aug;29(8):914-56.
4. Liberman AC, Druker J, Refojo D, Arzt E. Molecular mechanisms of action of some immunosuppressive drugs. *Medicina (B Aires).* 2008;68(6):455-64.
5. Stepkowski SM. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med.* 2000;2(4):1-23.
6. Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology*, 2000; 47(2-3):63-83.
7. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F *et al.* The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2014 Oct;33(10):1009-24.
8. Martín-Dávila P, Blanes M, Fortún J. Immunosuppression and infection in transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007 Feb;25(2):143-54.
9. Alberú J, Mancilla Urrea E. Inmunosupresión para receptores de trasplante renal: estrategias actuales. *Rev Invest Clin.* 2005; 57 (2): 213-224.
10. Wang D *et al.* CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(1):164-71.
11. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005. 56(1):23-46.
12. Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation.* 2005;80(2 Suppl):S181-90.
13. Shaw LM, Nicholls A, Hale M, Armstrong VW, Oellerich M, Yatscoff R *et al.* Therapeutic monitoring of mycophenolic acid. A consensus panel report. *Clin Biochem.* 1998 Jul;31(5):317-22.
14. Bulligaham RES, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolic mofetil. *Clin pharmacokinet.* 1998; 34(6):429-455.
15. Ortega-Pérez I, Redondo JM. The NFAT transcription factor family as immunosuppression target. *Nefrologia.* 2000;20 Suppl 2:25-30.
16. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Bioche.*, 2002; 131(1):1-15.
17. Dumont FJ. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem.* 2000; 7(7):731-48.

BIBLIOGRAFÍA

18. Kim TJ et al. FK506 causes cellular and functional defects in human natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 2010; 88(6):1089-97.
19. Danovitch GM. Immunosuppressant-induced metabolic toxicities. *Transplant Rev.* 2000; 14(2): 65-81.
20. Choc MG. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine formulations: Neoral vs Sandimmune. *International Journal of Dermatology.* 1997; 36 (suppl 1):1-6
21. Ferguson RM, Sutherland.DER, Simmons RL et al. Ketoconazole, cyclosporin metabolism and renal transplantation. *Lancet.* 1982; 2:882-883.
22. Ortega Suárez F, en nombre del Grupo Español de Consenso Ciclosporina C2. Análisis de la ciclosporina en sangre mediante la concentración a las 2 h de administrar la dosis. *Med Clin (Barc).* 2007;128(7):268-74.
23. Warty VS, Zuckerman S, Venkataramanan R et al. FK506 measurement: comparison of different analytical methods. *Ther Drug Monit.* 1993; 15:204-208.
24. Prograf. Physicians desk reference, 50th ed. Montvale.NJ: Medical economics company. 1996:1042-1045.
25. Clemente Bautista S, Mendarte Barrenechea L. Daclizumab en la prevención del rechazo agudo en el trasplante de riñón y en otros órganos sólidos. *Farmacia Hospitalaria.* 2001; 25 (3):129-134.
26. Tkaczuk J et al. Effect of anti-IL-2R alpha antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling. *Am J Transplant.* 2002; 2(1):31-40.
27. Baan CC et al. Anti-CD25 monoclonal antibody therapy affects the death signals of graft-infiltrating cells after clinical heart transplantation. *Transplantation.* 2003; 75(10):1704-10.
28. McDyer JF et al. IL-2 receptor blockade inhibits late, but not early, IFN-gamma and CD40 ligand expression in human T cells: disruption of both IL-12-dependent and -independent pathways of IFN-gamma production. *J Immunol.* 2002; 169(5):2736-46.
29. Hirose R, Roberts JP, Quan D, et al. Experience with daclizumab in liver transplantation: renal transplant dosing without calcineurin inhibitors is insufficient to prevent acute rejection in liver transplantation. *Transplantation* 2000; 69(2): 307-11.
30. Hershberger RE et al. Daclizumab to prevent rejection after cardiac transplantation. *N Engl J Med.* 2005; 352(26):2705-13.
31. Serra HA, Roganovich JM, Rizzo LF. Glucocorticoids: examples of translational medicine; from molecular aspects to bedside. *Medicina (B Aires).* 2012;72(2):158-70.
32. Bartholome B et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 2004. 18(1): p. 70-80.
33. Lowenberg M et al. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med.* 2007. 13(4): p. 158-63.

34. Liberman AC, Druker J, Perone MJ, Arzt E. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 45-56.
35. Barnes PJ. Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2005; 25(3):451-68.
36. Gross KL, Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab*. 2008; 19(9): 331-9.
37. Davies L, Karthikeyan N, Lynch JT. Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol*. 2008; 22(6): 1331-44.
38. Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010; 75(1): 1-12.
39. Webster JI. The Glucocorticoid Receptor: A Revisited Target for Toxins. *Toxins*. 2010; 2: 1357-80.
40. Wikstrom AC. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. *J Endocrinol*. 2003; 178(3):331-7.
41. De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: Latest Perspectives on Antiinflammatory Actions of Glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 2009; 23(3): 281-91.
42. Newton R, Holden NS. Separating Transrepression and Transactivation: A Distressing Divorce for the Glucocorticoid Receptor? *Mol Pharmacol*. 2007; 72: 799-809.
43. Novac N, Baus D, Dostert A, Heinzl T. Competition between glucocorticoid receptor and NFkappaB for control of the human FasL promoter. *Faseb J*. 2006; 20:1074-81.
44. Dostert A, Heinzl T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des*. 2004; 10(23):2807-16.
45. Kelly A, Bowen H, Jee YK, Mahfiche N, Soh C, Lee T et al. The glucocorticoid receptor beta isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121(1): 203-208.
46. Stahn C, Buttgerit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008; 4(10):525-33.
47. Rojas AM, Rada Escobar R, Martínez Caballero A, Montaña López J, Rincón Sierra O. The human glucocorticoid receptor and its genetic mechanisms. *Rev Colomb Neumol*. 2011; 23(1): 9-15.
48. Ganschow R, Pollok JM, Jankofsky M, Junge G. The role of everolimus in liver transplantation. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014 Sep 2;7:329-43.
49. Shihab F, Christians U, Smith L, Wellen JR, Kaplan B. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes. *Transpl Immunol*. 2014 Jun; 31(1):22-32.
50. Kovarik JM, Snell GI, Valentine V, Aris R, Chan CK, Schmidli H, Pirron U. Everolimus in pulmonary transplantation: pharmacokinetics and exposure-response relationships. *J Heart Lung Transplant*. 2006; 25(4):440-6.

BIBLIOGRAFÍA

51. Everson GT. Everolimus and mTOR inhibitors in liver transplantation: opening the "box". *Liver Transpl.* 2006;12:1571-3
52. Lopez MM *et al.* Long-term problems related to immunosuppression. *Transpl Immunol.*2006; 17(1):31-5.
53. Gurgui M, Munoz P. Infection in heart transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007. 25(9):587-97
54. Bouza E, Munoz P. Infectious complications in patients undergoing a heart transplant. *Rev Esp Cardiol.* 1995; 48 (Suppl) 7:96-107.
55. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med.* 2007; 357(25):2601-14.
56. Zeevi A *et al.* Monitoring immune function during tacrolimus tapering in small bowel transplant recipients. *Transpl Immunol.*2005; 15(1):17-24.
57. Mawhorter S, Yamani MH. Hypogammaglobulinemia and infection risk in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant.*2008; 13(6):581-5.
58. Sarmiento E *et al.* Decreased levels of serum immunoglobulins as a risk factor for infection after heart transplantation. *Transplant Proc.* 2005. 37(9):4046-9.
59. Thomas B *et al.* Chronic respiratory complications in pediatric heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2007; 26(3):236-40.
60. Sarmiento E *et al.* IgG monitoring to identify the risk for development of infection in heart transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2006; 8(1):49-53.
61. Saas P *et al.* Immune monitoring of kidney transplant recipients: can markers predictive of over-immunosuppression be identified?.*Ann Pharm Fr.* 2008; 66(2):115-21.
62. Wahidi MM *et al.* Diagnosis and outcome of early pleural space infection following lung transplantation. *Chest.*2009; 135(2):484-91.
63. Alvarez CM *et al.* Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. *Am J Transplant.* 2005; 5(4 Pt 1):746-56.
64. Cortesini R, Suciú-Foca N. The concept of "partial" clinical tolerance. *Transpl Immunol.* 2004; 13(2):101-4.
65. Bettens F *et al.* Microchimerism after liver transplantation: absence of rejection without abrogation of anti-donor cytotoxic T-lymphocyte-mediated alloreactivity. *Liver Transpl.* 2005; 11(3):290-7.
66. Gras J *et al.* Early immunological monitoring after pediatric liver transplantation: cytokine immune deviation and graft acceptance in 40 recipients. *Liver Transpl.*2007; 13(3):426-33.
67. Sommerer C *et al.* Ciclosporin A tapering monitored by NFAT-regulated gene expression: a new concept of individual immunosuppression. *Transplantation.* 2008; 85(1):15-21.
68. Nozaki T *et al.* CD4 T cell-mediated rejection of cardiac allografts in B cell-deficient mice. *J Immunol.* 2008; 181(8):5257-63.
69. Kreijveld E *et al.* Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS One.*2008; 3(7): e2711.

70. Castroagudin JF, Molina Pérez E, Varo Pérez E. Mecanismo nefrotóxico de los inhibidores de la calcineurina. Prevención de... Insuficiencia renal después del trasplante hepático. Alternativas a los anticalcineurínicos. *GH Continuada*. 2008;7(3):136-140.
71. Cromin RE, Henrich WL. Toxic Nephropathies. "The Kidney" Brenner BM ed. WB Sanders Company. ed 16. 2000; Capitulo 34: 1563-96.
72. Williams D, Haragsim L. Calcineurin nephrotoxicity. *Adv Chronic kidney Dis* 2006; 13(1):47-55.
73. Pascual J, Alonso A, Burgos D, Cruzado JM, Serón D. Grupo Español de Consenso sobre disfunción renal crónica en pacientes trasplantados renales. Disfunción renal crónica en pacientes trasplantados renales Documento de Consenso. *Nefrología*. 2012; 32(Suppl.2):1-28.
74. Monsour HP, Wood RP, Cyer CH, Galati JS, Ozaki CF, Clark JH. Renal insufficiency and hypertension as long-term complications in liver transplantation. *Semin Liv Dis*. 1995; 15(2):123-32.
75. Ponticelli C, Banfi G. Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2006; 19:789-94.
76. Kim BS, Lee SG, Hwang S, Park KM, Kim KH, Ahn CS et al. Neurologic complications in adult living donor liver transplant recipients. *Clin Transplant*. 2007;21(4):544-7.
77. Mellado P, Peredo P, Valenzuela R, Arrese M, Pérez RM, Domínguez P, Guerra JF, Jarufe N, Martínez J. Neurological complications following a liver transplantation. Experience from a Chilean center. *Rev Méd Chile* 2008; 136: 1255-1263.
78. Sandoval P, Rematal E. Encefalopatías por hiperperfusión encefálica. *Cuadernos de Neurología*. 2006; 5-26.
79. Sato T, Inagaki A, Uchida K, Ueki T, Goto N, Matsuoka S. Diabetes mellitus after transplant: Relationship to pretransplant glucose metabolism and tacrolimus or cyclosporine A-based therapy. *Transplantation*. 2003;76:1320-6.
80. Goicoechea M, García de Vinuesa S, Arroyo D, Luño J. Hiperuricemia, gota y enfermedad renal crónica. *Nefrología Sup Ext*. 2012;3:8-15.
81. Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, Griffith JL, Salem DN, Levey A et al. Uric acid and incident kidney disease in the community. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:1204-11.
82. Chonchol M, Shlipak MG, Katz R, Sarnak MJ, Newman AB, Siscovick DS et al. Relationship of uric acid with progression of kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2007; 50:239-47.
83. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(5):836-47.
84. Jacobson PA, Oetting WS, Brearley AM, Leduc R, Guan W, Schladt D et al. Novel polymorphisms associated with tacrolimus trough concentrations: results from a multicenter kidney transplant consortium. *Transplantation*. 2011; 91(3):300-8.
85. Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p450 3 A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation*. 2002;74(1 1):1486-9.

86. Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003;76:1233-5.
87. Haufroid V, Wallemacq P, VanKerckhove V, Elens L, De Meyer M, Eddoure DC *et al*. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant*. 2006;6(11):2706-13.
88. Tavira B, Coto E, Diaz-Corte C, Ortega F, Arias M, Torres A *et al*. Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49(5):825-33.
89. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K *et al*. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2004;78(8):1182-7.
90. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Durrbach A, Letierce A, Ferlicot S *et al*. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; 103(6):546-52.
91. Satoh S, Saito M, Inoue T, Kagaya H, Miura M, Inoue K *et al*. CYP3A5 *1 allele associated with tacrolimus trough concentrations but not subclinical acute rejection or chronic allograft nephropathy in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65(5):473-81.
92. MacPhee IA, Holt DW. A pharmacogenetic strategy for immunosuppression based on the CYP3A5 genotype. *Transplantation*. 2008; 85(2):163-5.
93. Dirks NL, Huth B, Yates CR, Meibohm B. Pharmacokinetics of immunosuppressants: a perspective on ethnic differences. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2004;42(12):701-18.
94. Tavira B, Díaz-Corte C, Coronel D, Ortega F, Eliecer Coto. Farmacogenética del tacrolimus: ¿del laboratorio al paciente?. *Nefrología*. 2014;34(1):11-7.
95. Tavira B, Coto E, Diaz-Corte C, Alvarez V, López-Larrea C, Ortega F. A search for new CYP3A4 variants as determinants of tacrolimus dose requirements in renal transplanted patients. *Pharmacogenet Genomic*. 2013;23(8):445-8.
96. Santoro AB, Struchiner CJ, Felipe CR, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO, Suarez-Kurtz G. CYP3A5 genotype, but not CYP3A4*1b, CYP3A4*22, or hematocrit, predicts tacrolimus dose requirements in Brazilian renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2013; 94(2):201-2.
97. Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, Zimprich A, Plumer S, Baumgartner C, Mannhalter C. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2004; 63(6):1087-9.
98. Orozco R, Benavente D. Drug interactions in trasplant. *Rev. Med. Clin. Condes*. 2010; 21(2):248-53.
99. Chen R, Sigdel TK, Li L, Kambham N, Dudley JT *et al*. Differentially Expressed RNA from Public Microarray Data Identifies Serum Protein Biomarkers for Cross-Organ Transplant Rejection and Other Conditions. *PLoS Comput Biol*. 2010; 6(9): e1000940.

100. Lee C, Bongcam-Rudloff E, Sollner C, Jahnen-Dechent W, Claesson-Welsh L. Type 3 cystatins: fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Front. Biosci.* 2009;14: 2911–2922.
101. Denecke B *et al.* Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J.* 2003; **376**: 135–145.
102. Altschul SF *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 2005; **272**: 5101–5109.
103. Altschul SF *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25**: 3389–3402.
104. Schafer C, Heiss A, Schwarz A *et al.* The serum protein α -2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest.* 2003; 112: 357-66.
105. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzinger J, Yamamoto K, Renné T, Jahnen-Dechent W. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem.* 2003;278(15):13333-41.
106. Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem.* 2002;277(6):3926-34.
107. El-Shehaby AM, Zakaria A, El-Khatib M, Mostafa N. Association of fetuin-A and cardiac calcification and inflammation levels in hemodialysis patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010;70:575–582.
108. Cozzolino M, Galassi A, Biondi ML, Turri O, Papagni S, Mongelli N, Civita L, Gallieni M, Brancaccio D. Serum fetuin-A levels link inflammation and cardiovascular calcification in hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2006;26:423–429.
109. Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Chan IH, Gao P, Lui SF, Li PK, Sanderson JE. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:1676–1685.
110. Hermans MM, Brandenburg V, Ketteler M, Kooman JP, van der Sande FM, Boeschoten EW, Leunissen KM, Krediet RT, Dekker FW. Association of serum fetuin-A levels with mortality in dialysis patients. *Kidney Int.* 2007;72:202–207.
111. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnen-Dechent W, Floege J. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet.* 2003;361:827–833.
112. Roos M, Oikonomou D, von Eynatten M, Luppia PB, Heemann U, Lutz J, Baumann M, Nawroth PP, Bierhaus A, Humpert PM. Associations of fetuin-A levels with vascular disease in type 2 diabetes patients with early diabetic nephropathy. *Cardiovasc Diabetol.* 2010;9:48.
113. Chen HY, Chiu YL, Hsu SP, Pai MF, Yang JY, Peng YS. Low serum fetuin A levels and incident stroke in patients with maintenance haemodialysis. *Eur J Clin Invest.* 2013;43:387–396.

114. Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, Barany P, Lindholm B, Jogestrand T, Heimbürger O, Holmes C, Schalling M, Nordfors L. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int.* 2005; 67:2383–2392.
115. Keçebaş M, Güllülü S, Sağ S, Beşli F, Açıkgöz E, Sarandöl E, Aydınlar A. Serum fetuin-A levels in patients with systolic heart failure. *Acta Cardiol.* 2014;69(4):399-405.
116. Uz Ö *et al.* The relationship between coronary calcification and the metabolic markers of osteopontin, fetuin-A and visfatin. *Türk Cardiyol Derm Ars.* 2009; 37: 397-402
117. Jara A, Mezzano S. Vascular damage in chronic kidney disease. *Rev Med Chil.* 2008;136(11):1476-84
118. Choi J-W, Liu H, Mukherjee R, Yun JW. Downregulation of fetuin-B and zinc-alpha-2-glycoprotein is linked to impaired fatty acid metabolism in liver cells. *Cell Physiol Biochem.* 2012; 30: 295–306.
119. Choi J-W *et al.* Plasma proteome analysis in diet-induced obesity-prone and obesity-resistant rats. *Proteomics.* 2010; 10: 4386–4400.
120. Jung SH, Won KJ, Lee KP, Kim HJ, Seo EH, Lee HM *et al.* The serum protein fetuin-B is involved in the development of acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond).* 2015;129(1):27-38.
121. Bosch JA, Berntson GG, Cacioppo JT, Dhabhar FS, Marucha PT. Acute stress evokes selective mobilization of T cells that differ in chemokine receptor expression: a potential pathway linking immunologic reactivity to cardiovascular disease. *Brain Behav Immun.* 2003; 17, 251–259
122. Chi Z, Melendez AJ. Role of cell adhesion molecules and immune-cell migration in the initiation, onset and development of atherosclerosis. *Cell Adh. Migr.* 2007; 1, 171–175
123. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24, 1161–1170
124. Huang H, Virmani R, Younis, H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2001; 103, 1051–1056
125. Beckman JA, Ganz J, Creager MA, Ganz P, Kinlay S. Relationship of clinical presentation and calcification of culprit coronary artery stenoses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21, 1618–1622
126. Toutouzas K, Synetos A, Nikolaou C, Tsiamis E, Tousoulis D, Stefanadis C. Matrix metalloproteinases and vulnerable atheromatous plaque. *Curr Top Med Chem.* 2012; 12, 1166–1180
127. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 2005; 85, 1–31
128. Newby AC. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques?. *Curr Opin Lipidol.* 2006; 17, 556–561
129. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation.* 1995; 91, 2125–2131

130. Pöllänen PJ, Lehtimäki T, Mikkelsson J, Ilveskoski E, Kunnas T, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Nikkari ST, Syrjäkoski Ket *al.* Relationship of clinical presentation and calcification of culprit coronary artery stenoses. *Atherosclerosis*. 2005;180, 73–78
131. Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT *et al.* Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1996;148(1):121-8.
132. Volcik KA, Campbell S, Chambless LE, Coresh J, Folsom AR, Mosley TH, Ni H, Wagenknecht LE, Wasserman BA, Boerwinkle E. MMP2 genetic variation is associated with measures of fibrous cap thickness: The atherosclerosis risk in communities carotid MRI study. *Atherosclerosis*. 1990; 210,188–193
133. Derosa G, D'Angelo A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Pricolo F, Salvadeo S, Montagna L, Gravina A, Ferrari I, Galli Set *al.* Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. *Endothelium*. 2006; 13, 227–231
134. 134. Thrailkill KM, Bunn RC, Moreau CS, Cockrell GE, Simpson PM, Coleman HN, Frindik JP, Kemp SF, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinase-2 dysregulation in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2007; 30, 2321–2326
135. Jung SH, Won KJ, Lee KP, Lee DH, Yu S, Lee DY, Seo EH, Kang H, Park ES, Kim HJ *et al.* DJ-1 protein regulates CD3+ T cell migration via overexpression of CXCR4 receptor. *Atherosclerosis*. 2014; 235, 503–509
136. Zhang K, Huang XZ, Li XN, Feng M, Li L, Cai XJ, Zhang C, Liu XL, Zhang MX, Zhang Y *et al.* Interleukin 6 destabilizes atherosclerotic plaques by downregulating prolyl-4-hydroxylase alpha1 via a mitogen-activated protein kinase and c-Jun pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2012; 528, 127–133
137. Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760:616–635.
138. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, Andre´ S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*. 2004;110:3121–3128
139. Van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, Martinez A, Crijns HJ, MacRae CA, Menheere PP, Pinto YM. Utility of aminoterminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1217–1224.
140. Lok D, van der Meer P, de La Porte PB, Lipsic E, van Wijngaarden J, van Veldhuisen DJ, Pinto YM. Galectin-3, a novel marker of macrophage activity, predicts outcome in patients with stable chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(Suppl. A): 98A.
141. Milting H, Ellinghaus P, Seewald M, Cakar H, Bohms B, Kassner A, Ko` rfer R, Klein M, Krahn T, Kruska L, El Banayosy A, Kramer F. Plasma biomarkers of myocardial fibrosis and remodeling in terminal heart failure patients supported by mechanical circulatory support devices. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27:589–596.

142. Thandavarayan RA, Watanabe K, Ma M, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Palaniyandi SS, Zhang S, Muslin AJ, Kodama M, Aizawa Y. 14-3-3 Protein regulates Ask1 signaling and protects against diabetic cardiomyopathy. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:1797–1806.
143. Sharma U, Rhaleb NE, Pokharel S, Harding P, Rasoul S, Peng H, Carretero OA. Novel anti-inflammatory mechanisms of N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in hypertension-induced target organ damage. *Am J Physiol.* 2008;294:1226–1232.
144. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:5060–5065.
145. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol.* 2008;172:288–298
146. Rabinovich GA. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 711-22.
147. Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J Biochem.* 1996; 119: 1-8.
148. Rabinovich GA, Riera CM, Landa CA, Sotomayor CE. Galectins; a key intersection between glycobiology and immunology. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32: 383-93.
149. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj.* 2004;19:527–535.
150. Barboni EA, Bawumia S, Henrick K, Hughes RC. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology.* 2000;10:1201–1208.
151. Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, Shirolkar SC, Donahue M, Kitzman DW, Zannad F, Piña IL, O'Connor CM. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. *Circ Heart Fail.* 2012;5(1):72-8.
152. Reifenberg K, Lehr HA, Torzewski M, Steige G, Wiese E, Küpper I, Becker C, Ott S, Nusser P, Yamamura K, Rechtsteiner G, Warger T, Pautz A, Kleinert H, Schmidt A, Pieske B, Wenzel P, Münzel T, Löhler J. Interferon-g induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2007;171:463–472.
153. Elliott MJ, Strasser A, Metcalf D. Selective up-regulation of macrophage function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice. *J Immunol.* 1991;147:2957–2963.
154. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest.* 2003;112:389–397.
155. Rabinovich GA, Rubinstein N. Galectins: a novel family of proteins involved in the regulation of the immune response. Implications in immunopathological processes. *Medicina (B Aires).* 2001;61(1):85-92.

156. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. *Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. Eur J Heart Fail.* 2009 Sep;11(9):811-7.
157. Cortegano I, Pozo V, Cardaba B, Arrieta I, Gallardo S, Rojo M, Takai T, Verbeek S, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Interaction between galectin-3 and FcγRII induces down-regulation of IL-5 gene: implication of the promoter sequence 5REIII. *Glycobiology.* 2000; 10: 237-42.
158. Iglesias MM, Rabinovich GA, Ivanovic V, Sotomayor CE and Wolfenstein-Todel C. Galectin-1 from ovine placenta: aminoacid sequence, physicochemical properties and implications in T-cell death. *Eur J Biochem.* 1998; 252: 400-7.
159. Iglesias MM, Rabinovich GA, Ambrosio AL, Castagna LF, Sotomayor CE and Wolfenstein-Todel CW. Purification of galectin-3 from ovine placenta: developmentally regulated expression and immunological relevance. *Glycobiology.* 1998; 8: 59-65.
160. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:827–840.
161. Liu YH, D’Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, Andre´ S, Gabius HJ, Carretero OA. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:404–412.
162. Chachques JC. Galectin-3 Associated With Post-Ischemic Ventricular Remodeling: Biomarker Role and Potential Therapeutic Applications. *Rev Argent Cardiol.* 2015;83:282-284.
163. Lund-Katz S, Phillips MC. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell Biochem.* 2010;51:183–227.
164. Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med.* 2012;4:251–268.
165. Phillips MC. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism. *J Lipid Res.* 2013;54:2034–2048.
166. Segrest JP, Jones MK, De Loof H et al. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res.* 1992;33:141–166.
167. Wang S, Smith JD. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *Biofactors.* 2014; 40:547–554.
168. Allahverdian S, Pannu PS, Francis GA. Contribution of monocyte derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovasc Res.* 2012;95:165–172.
169. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med. (Berl)* 2006;84:276–294.
170. Hewing B, Parathath S, Barrett T et al. Effects of native and myeloperoxidase-modified apolipoprotein A1 on reverse cholesterol transport and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34:779–789.

171. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV2. ApoA1 and ApoA1-specific self-antibodies in cardiovascular disease. *Lab Invest.* 2016;96(7):708-18.
172. Pagano S, Satta N, Werling D *et al.* Anti-apolipoprotein A-1 IgG in patients with myocardial infarction promotes inflammation through TLR2/CD14 complex. *J Intern Med.* 2012;272:344–357.
173. Vuilleumier N, Charbonney E, Fontao L *et al.* Anti-(apolipoprotein A-1) IgGs are associated with high levels of oxidized low-density lipoprotein in acute coronary syndrome. *Clin Sci (Lond)* 2008;115:25–33.
174. Montecucco F, Vuilleumier N, Pagano S *et al.* Anti-Apolipoprotein A-1 auto-antibodies are active mediators of atherosclerotic plaque vulnerability. *Eur Heart J.* 2011; 32:412–421.
175. Vuilleumier N, Rossier MF, Pagano S *et al.* Anti-apolipoprotein A-1 IgG as an independent cardiovascular prognostic marker affecting basal heart rate in myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010; 31:815–823
176. Keller PF, Pagano S, Roux-Lombard P *et al.* Autoantibodies against apolipoprotein A-1 and phosphorylcholine for diagnosis of non-STsegment elevation myocardial infarction. *J Intern Med.* 2012;271: 451–462
177. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med.* 2010;16:133–44.
178. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:540–50.
179. Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, Yang BG, Hayasaka H, Miyasaka M. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci.* 2005;96:317–22.
180. Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol.* 2008;9:953–9.
181. Romagnani P, Maggi L, Mazzinghi B, Cosmi L, Lasagni L, Liotta F, *et al.* CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:1372-9.
182. Aidoudi S, Bujakowska K, Kieffer N, Bikfalvi A. The CXC-Chemokine CXCL4 Interacts with Integrins Implicated in Angiogenesis. *PLoS ONE.* 2008; 3(7): e2657
183. Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1920–7.
184. Preston RJS, Tran S, Johnson JA, Ainle FN, Harmon S, White B, Smith OP, Jenkins PV, Dahlback B, O_Donnell JS. Platelet factor 4 impairs the anticoagulant activity of activated protein C. *J Biol Chem.* 2009;284: 5869–75.
185. Smith C, Damas JK, Otterdal K, Oie E, Sandberg WJ, Yndestad A, *et al.* Increased levels of neutrophil-activating peptide-2 in acute coronary syndromes: possible role of platelet-mediated vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1591–9.
186. Hyseni A, Roest M, Braun SL, Barendrecht AD, de Groot PG, Ndrepepa G, Kastrati A. Chronic dysfunction of the endothelium is associated with mortality in acute coronary syndrome patients. *Thrombosis Research.* 2013; 131: 198–203
187. Snoep JD, Roest M, Barendrecht AD, de Groot PG, Rosendaal FR, van der Bom JG. High platelet reactivity is associated with myocardial infarction in premenopausal women: a population-based case–control study. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 906–13.

188. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 2002;168(7):3195-204.
189. Whiting D, Hsieh G, Yun JJ, Banerji A, Yao W, Fishbein MC, Belperio J, Strieter RM, Bonavida B, Ardehali A. Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7417-24.
190. Kondo T, Ito F, Nakazawa H, Horita S, Osaka Y, Toma H. High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2004; 171: 2171–2175.
191. Dengel LT, Norrod AG, Gregory BL, Clancy-Thompson E, Burdick MD, Strieter RM, Slingluff CL Jr, Mullins DW. Interferons induce CXCR3-cognate chemokine production by human metastatic melanoma. *J Immunother.* 2010;33(9):965-74.
192. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, McKee M, Gajewski TF. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* 2009; 69: 3077– 3085.
193. Mantovani A. Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol.* 1999; 72:1–6.
194. Lukacs N W, Hogaboam C, Campbell E, Kunkel SL. Chemokines: function, regulation and alteration of inflammatory responses. *Chem Immunol.* 1999; 72: 102–120.
195. Petro M, Kish D, Guryanova OA, Ilyinskaya G, Kondratova A, Fairchild RL, Gorbachev AV. Cutaneous tumors cease CXCL9/Mig production as a result of IFN- γ -mediated immunoediting. *J Immunol.* 2013 Jan 15;190(2):832-41.
196. Eggermann J, Kliche S, Jarmy G *et al.* Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res.* 2003;58: 478–86.
197. Wang C, Jiao C, Hanlon HD, Zheng W, Tomanek RJ, Schatteman GC. Mechanical, cellular, and molecular factors interact to modulate circulating endothelial cell progenitors. *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 286:1985–93.
198. Jersman HP. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunology and Cell Biology.* 2005; 83, 462–467
199. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology,* 2006. 211(6-8):609-18.
200. Varol C, Yona S, Jung S. *Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes.* *Immunol Cell Biol.* 2009. 87(1):30-8.
201. McLean K, Buckanovich RJ. Myeloid cells functioning in tumor vascularization as a novel therapeutic target. *Transl Res,* 2008. 151(2):59-67.
202. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immuno.* 2009; 27:669-92.
203. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007. 81(3):584-92.
204. Urra X *et al.* Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009. 29(5):994-1002.

205. Mizuno K *et al.* Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol.* 2005. 142(3):461-70.
206. Seki E *et al.* CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119(7):1858-70.
207. Mitchell C *et al.* Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1766-75.
208. Karlmark KR *et al.* Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2009. 50(1):261-74.
209. Imamura M *et al.* Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology.* 2005. 128(1): 138-46.
210. Heymann F, Trautwein C, Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009. 8(4):307-18.
211. Duffield JS *et al.* Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* 2005. 115(1):56-65.
212. Klein I *et al.* Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood.* 2007. 110(12):4077-85.
213. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7: 77–86.
214. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011; 17: 1410–1422.
215. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, *et al.* CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1512–1520.
216. Ozaki Y, Imanishi T, Taruya A, *et al.* Circulating CD14⁺ CD16⁺ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Circ J* 2012; 76: 2412–2418.
217. Shimoni S, Meledin V, Bar I, Fabricant J, Gandelman G, George J. Circulating CD14⁺ monocytes in patients with aortic stenosis. *Journal of Geriatric Cardiology.* 2016; 13: 81-87
218. Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L *et al.* Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2012; 5(1): 122–131.
219. Newman PJ. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest.* 1999;103:5–9.
220. Liu L, Shi GP. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovascular Research.* 2012; 94(1): 3–5.
221. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci.* 2013; 126: 2343–2352.
222. Clement M, Fornasa G, Guedj K *et al.* CD31 is a key coinhibitory receptor in the development of immunogenic dendritic cells. *PNAS.* 2014; 111(12): 1101–1110.

223. Caligiuri G, Groyer E, Khallou-Laschet J, Al Haj Zen A, Sainz J, Urbain D et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in the blood of atherosclerotic mice with plaque thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1659–1664.
224. Flego D, Severino A, Trotta F, Copponi G, Manchi M, Pedicino D, Giglio AF, Crea F, Liuzzo G. Reduced CD31 expression on CD14+CD16+ monocyte subset in acute coronary syndromes. *International Journal of Cardiology.* 2015; 197: 101–104
225. Gomez I, Hainz U, Jenewein B, Schwaiger S, Wolf AM, Grubeck-Loebenstien B. Changes in the expression of CD31 and CXCR3 in CD4+ naïve T cells in elderly persons. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124 (4):395–402.
226. Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:618–623.
227. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol.* 1998 Aug;51(4):191-200.
228. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 260-267.
229. Ceyran AB, Şenol S, Güzelmeriç F, Tunçer E, Tongut A, Özbek B, Şavluk Ö, Aydın A, Ceyran H. Effects of hypoxia and its relationship with apoptosis, stem cells, and angiogenesis on the thymus of children with congenital heart defects: a morphological and immunohistochemical study. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8038-47.
230. Xu H, Shi BM, Lu XF, Liang F, Jin X, Wu TH, et al. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(15):2349-57.
231. Garcia LF, Mataveli FD, Mader AM, Theodoro TR, Justo GZ, Pinhal MA. Cells involved in extracellular matrix remodeling after acute myocardial infarction. *Einstein.* 2015 Jan-Mar;13(1):89-95.
232. Simons D, Grieb G, Hristov M, Pallua N, Weber C, Bernhagen J, et al. Hypoxia-induced endothelial secretion of macrophage migration inhibitory factor and role in endothelial progenitor cell recruitment. *J Cell Mol Med.* 2011;15(3):668–78.
233. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(10):791–800.
234. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, et al. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity.* 2006;25(4):595–606.
235. Lue H, Kapurniotu A, Fingerle-Rowson G, Roger T, Leng L, Thiele M, et al. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/ CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal.* 2006;18(5):688–703

236. Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeiffer U, Knarren S, Roller M, *et al.* Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(3):380–5.
237. Chen Z, Sakuma M, Zago AC, Zhang X, Shi C, Leng L *et al.* Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(4):709–14.
238. Van der Vorst EP, Döring Y, Weber C. MIF and CXCL12 in Cardiovascular Diseases: Functional Differences and Similarities. *Front Immunol*. 2015 Jul 21;6:373.
239. Wild D. The Immunoassay handbook. 4 ed. Elsevier, Amsterdam, 2013.
240. González de Buitrago, J.M. “Técnicas y métodos de laboratorio clínico”. 2 ed. Masson, Barcelona, 2005.
241. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005;51:12, 2415–2418
242. Parviainen MT. A modification of the acid diazo coupling method (Malloy-Evelyn) for the determination of serum total bilirubin. *Scand J Clin Lab Invest*. 1997;57(3):275-9.
243. Bergmeyer HU, Hørder M, Rej R. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1986;24:481-495.
244. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F *et al.* IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C – Part 4. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Activity Concentration of Alanine Aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):718-724.
245. Bergmeyer HU, Hørder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC Method for aspartate aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1986;24:497-510.
246. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, *et al.* IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C – Part 5. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Aspartate Aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(7):725-733.
247. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F *et al.* IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C Part 6. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of γ -Glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):734-738.
248. Abicht K, Samalouti V, Kroll W. Multicenter evaluation of new GGT and ALP reagents with new reference standardization and determination of 37 °C reference intervals. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(Suppl):S346
249. Weichselbaum TE. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am J Clin Pa thol*. 1946;10:40-49.
250. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1971;31:87-96.

251. Jaffé M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z Physiol Chem.* 1886;10:391-400.
252. Fabiny DL, Ertinghausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the Centrifichem. *Clin Chem.* 1971;17:696-700.
253. Bartels H, Böhmer M. Micro-determination of creatinine. *Clin Chim Acta.* 1971;32:81-85.
254. Sampson EJ, Baird MA, Burtis CA et al. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: Optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem.* 1980;26:816-826.
255. Eda S, Kaufmann J, Roos W, et al. Development of a New Microparticle-Enhanced Turbidimetric Assay for C-reactive Protein with Superior Features in Analytical Sensitivity and Dynamic Range. *J Clin Lab Anal.* 1998;12:137-144.
256. Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007 Mar;2(2):374-84.
257. Pham MX, Chen JM, Berry GJ, Rose EA, Schroeder JS. Surgical Treatment of Heart Failure, Cardiac Transplantation, and Mechanical Ventricular Support. In: Hurst's The Heart. 12 ed. McGraw-Hill, New York, 2007.
258. Cross SA, Perry CM. Tacrolimus once-daily formulation in the prophylaxis of transplant rejection in renal or liver allograft recipients. *Drugs.* 2007; 67 (13): 1931-43.
259. Servicio de Farmacia. hospital universitario virgen de la arrixaca. Comisión de farmacia y terapeutica. Informe técnico de evaluación tacrolimus. Liberación retardada. 2009.
260. Guillén D, Brunet M. Monitorización farmacológica de la inmunosupresión. *Ed Cont Lab Clin.* 2009; 13: 22-32.
261. Sarmiento E, del Pozo N, Gallego A et al. Decreased levels of serum complement C3 and natural killer cells add to the predictive value of total immunoglobulin G for severe infection in heart transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; 14 (5):526-539.
262. Sarmiento E, Navarro J, Fernandez-Yañez J, Palomo J, Muñoz P, Carbone J. Evaluation of an immunological score to assess the risk of severe infection in heart recipients. *Transpl Infect Dis.* 2014;16(5):802-12.
263. Sarmiento E, Fernández-Yañez J, Muñoz P, Palomo J, Rodríguez-Molina JJ, Bermejo J et al. Hypogammaglobulinemia after heart transplantation: use of intravenous immunoglobulin replacement therapy in relapsing CMV disease. *Int Immunopharmacol.* 2005 ;5(1):97-101.
264. Sarmiento E, Rodríguez-Hernández C, Rodríguez-Molina J, Fernández-Yáñez J, Palomo J, Anguita J, Pérez JL, Lanio N, Fernández-Cruz E, Carbone J. Impaired anti-pneumococcal polysaccharide antibody production and invasive pneumococcal infection following heart transplantation. *Int Immunopharmacol.* 2006; 6(13-14):2027-30.

265. Sarmiento E, Lanio N, Gallego A, Rodríguez-Molina J, Navarro J, Fernandez-Yañez J, Palomo J, Rodríguez-Hernández C, Ruiz M, Alonso R, Fernandez-Cruz E, Carbone J. Immune monitoring of anti cytomegalovirus antibodies and risk of cytomegalovirus disease in heart transplantation. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(6):649-52.
266. Carbone J, Sarmiento E, Palomo J, Fernandez-Yañez J, Muñoz P, Bouza E, Rodríguez-Molina J, Lanio N, Fernandez-Cruz E. The potential impact of substitutive therapy with intravenous immunoglobulin on the outcome of heart transplant recipients with infections. *Transplant Proc*. 2007;39(7):2385-8.
267. Carbone J et al. Immune monitoring to predict the development of infections after immunosuppression for solid organ transplantation and autoimmune diseases. *Curr Drug Saf*, 2008 3(2): 91-99.
268. Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra M.J, Ferré Masferrer M. Codex del laboratorio clínico. Elsevier, Madrid, 2003.
269. Orriss DE. Serial serum C-reactive protein levels as an indicator of infection in cardiac transplant patients. *Med lab sci*. 1988; 45: 116-120.
270. Schindler R. Causes of therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial transplant*. 2004; 19 (5): 34-40.
271. Manary MJ, Trehan I, Goldman L, Schafer AI. Goldman-Cecil Medicine. 25 ed. Philadelphia, 2016.
272. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22 ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2011.
273. Møller S, Bernardi M. Interactions of the heart and the liver. *Eur Heart J*. 2013;34(36):2804-11.
274. Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jamenson, Loscalzo. Harrison. Principios de Medicina Interna. 17 Ed. D.F. McGraw-Hill, Mexico, 2009.
275. Prieto Valtueña J.M, Yuste Ara J.R. Balcells. La clínica y el laboratorio. 21 Ed. Elsevier Masson. Barcelona 2010.
276. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, Andrés A, García-Reyne A, Lumbreras C et al. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014 Jul;27(7):674-85.
277. Schenk AD, Gorbacheva V, Rabant M, Fairchild RL, Valujskikh A. Effector functions of donor-reactive CD8 memory T cells are dependent on ICOS induced during division in cardiac grafts. *Am J Transplant*. 2009;9(1):64-73.
278. Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, Navarro J, Palomo J, Fernandez-Yañez J, Ruiz M, Fernandez-Cruz E, Carbone J. Kinetics of functionally distinct T-lymphocyte subsets in heart transplant recipients after induction therapy with anti-CD25 monoclonal antibodies. *Transpl Immunol*. 2013;28(4):176-82.
279. Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, Calahorra L, Jaramillo M, Navarro J, Palomo J, Fernandez-Yañez J, Ruiz M, Fernandez-Cruz E, Carbone J. Alterations of naïve and memory B-cell subsets are associated with risk of rejection and infection in heart recipients. *Transpl Int*. 2013;26(8):800-12.

280. Jiao L, Gao X, Joyee AG, et al. NK cells promote type 1 T cell immunity through modulating the function of dendritic cells during intracellular bacterial infection. *J Immunol.* 2011; 187 (1):401–411.
281. Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S. Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer.* 2013; 4 (1): 25–35.
282. Calarota SA, Chiesa A, De Silvestri A, Morosini M, Oggionni T, Marone P, Meloni F, Baldanti F. T-lymphocyte subsets in lung transplant recipients: association between nadir CD4 T-cell count and viral infections after transplantation. *J Clin Virol.* 2015 Aug;69:110-6.
283. Calarota SA, Zelini P, De Silvestri A, Chiesa A, Comolli G, Sarchi E, Migotto C, Pellegrini C, Esposito P, Minoli L, Tinelli C, Marone P, Baldanti F. Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2012;93(1):112-9.
284. Mussini C, Galli L, Lepri AC *et al.* Incidence, timing, and determinants of bacterial pneumonia among HIV-infected patients: data from the ICONA Foundation Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 63 (3): 339–345.
285. Florescu DF, Kalil AC, Qiu F, Schmidt CM, Sandkovsky U. What is the impact of hypogammaglobulinemia on the rate of infections and survival in solid organ transplantation? A meta-analysis. *Am J Transplant.* 2013 Oct;13(10):2601-10.
286. Chambers DC, Davies B, Mathews A, Yerkovich ST, Hopkins PM. Bronchiolitis obliterans syndrome, hypogammaglobulinemia, and infectious complications of lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32(1):36-43.
287. Moreno Elola-Olaso A, Davenport DL, Hundley JC, Daily MF, Gedaly R. Predictors of surgical site infection after liver resection: a multicentre analysis using National Surgical Quality Improvement Program data. *HPB (Oxford).* 2012;14(2):136-41.
288. Wan Q, Ye Q, Su T, Zhou J. The epidemiology and distribution of pathogens and risk factors for mortality in liver transplant recipients with Gram negative bacteremia. *Hepatology.* 2014;61(134):1730-3.
289. Hu R, Jiang XY, Wu Y. Risk factors for invasive pulmonary fungal infection in patients with hematological malignancies not receiving hematopoietic stem cell transplant. *Neoplasma.* 2012;59(6):669-75.
290. Borrows R, Loucaidou M, Chusney G, Borrows S, Tromp JV, Cairns T *et al.* Anaemia and congestive heart failure early post-renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(5):1728-34.
291. Scherzer R, Heymsfield SB, Rimland D, Powderly WG, Tien PC, Bacchetti P, Shlipak MG, Grunfeld C. Association of serum albumin and aspartate transaminase with 5-year all-cause mortality in HIV/hepatitis C virus coinfection and HIV mono-infection. *AIDS.* 2017;31(1):71-79.
292. Sherrod BA, Johnston JM, Rocque BG. Risk factors for unplanned readmission within 30 days after pediatric neurosurgery: a nationwide analysis of 9799 procedures from the American College of Surgeons National Surgical Quality Improvement Program. *J Neurosurg Pediatr.* 2016;18(3):350-62.

293. Jayaratne SD, Atukorale V, Gomes L, Chang T, Wijesinghe T, Fernando S, Ogg GS, Malavige GN. Evaluation of the WHO revised criteria for classification of clinical disease severity in acute adult dengue infection. *BMC Res Notes*. 2012;5:645.
294. Brenner T, Rosenhagen C, Brandt H, Schmitt FC, Jung GE, Schemmer P *et al*. Cell death biomarkers as early predictors for hepatic dysfunction in patients after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 2012;94(2):185-91.
295. Shah A, Kannambath S, Herbst S, Rogers A, Soresi S, Carby M, Reed A, Mostowy S, Fisher MC5, Shaunak S, Armstrong-James DP. Calcineurin Orchestrates Lateral Transfer of *Aspergillus fumigatus* during Macrophage Cell Death. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(9):1127-1139.
296. Millán O, Brunet M, Campistol JM, Faura A, Rojo I, Vidal E, Jiménez O, Vives J, Oppenheimer F, Martorell J. Pharmacodynamic approach to immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil. *Clin Chem*. 2003;49(11):1891-9.
297. Leyking S, Budich K, van Bentum K, *et al*. Calcineurin inhibitors differentially alter the circadian rhythm of T-cell functionality in transplant recipients. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:51.
298. Rodrigo E, Segundo DS, Fernández-Fresnedo G, López-Hoyos M, Benito A, Ruiz JC, de Cos MA, Arias M. Within-Patient Variability in Tacrolimus Blood Levels Predicts Kidney Graft Loss and Donor-Specific Antibody Development. *Transplantation*. 2016;100(11):2479-2485.
299. Jiang HM, Wang HX, Yang H, Zeng XJ, Tang CS, Du J, Li HH. Role for granulocyte colony stimulating factor in angiotensin II-induced neutrophil recruitment and cardiac fibrosis in mice. *Am J Hypertens*. 2013;26(10):1224-33
300. Hall BM. CD4+CD25+ T Regulatory Cells in Transplantation Tolerance: 25 Years On. *Transplantation*. 2016;100(12):2533-2547.
301. Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, Fernández-Yáñez J, Palomo J, Pérez-Rojas J, Carbone J. The potential role of T-cell memory distribution as predisposing factor for rejection in heart transplant recipients. *Transplant Proc*. 2009;41(6):2480-4.
302. Chen JW, Chen YS, Chi NH, Huang SC, Yu HY, Chou NK, Wang CH, Wang SS. Risk factors and prognosis of patients with primary graft failure after heart transplantation: an Asian center experience. *Transplant Proc*. 2014; 46(3):914-9.
303. Yamani MH, Avery R, Mawhorter S, Young JB, McNeill A, Cook DJ, Ratiff NB, McCarthy P, Starling RC. Hypogammaglobulinemia after heart transplantation: impact of pre-emptive use of immunoglobulin replacement (CytoGam) on infection and rejection outcomes. *Transpl Infect Dis*. 2001;3 Suppl 2:40-3.
304. Yamani MH, Avery RK, Mawhorter SD, Young JB, Ratliff NB, Hobbs RE, McCarthy PM, Smedira NG, Goormastic M, Pelegrin D, Starling RC. Hypogammaglobulinemia following cardiac transplantation: a link between rejection and infection. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(4):425-30-
305. Zeglen S, Zakliczynski M, Wozniak-Grygiel E, Nozynski J, Laszewska A, Wojarski J, Wojnicz R, Przybylski R, Kucewicz-Czech E, Zembala M. Mixed cellular and humoral acute rejection in elective biopsies from heart transplant recipients. *Transplant Proc*. 2009;41(8):3202-5.

306. Magro CM, Pope Harman A, Klinger D, Orosz C, Adams P, Waldman J, Knight D, Kelsey M, Ross P Jr. Use of C4d as a diagnostic adjunct in lung allograft biopsies. *Am J Transplant*. 2003;3(9):1143-54.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

VALORES DE NORMALIDAD DE LAS VARIABLES ANALIZADAS.

TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV

ANEXO 1

Tabla 1: Análisis de Normalidad de las Variables bioquímicas y Hematimétricas.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Proteínas g/dl	PRE TC	1,754	,004
Urea mg/dl		1,877	,002
Creatinina mg/dl		1,989	,001
Albumina g/dl		1,141	,148
Bilirrubina mg/dl		2,189	,000
GOT UI/L		4,424	,000
GPT UI/L		4,224	,000
GGT UI/L		1,684	,007
Leucocitos x1000/ μ L		1,251	,088
Linfocitos %		,685	,737
Linfocitos/ μ L		,775	,585
Neutrófilos/ μ L		1,536	,018
Neutrófilos %		,780	,577

Tabla 2: Análisis de Normalidad de las Variables bioquímicas y Hematimétricas.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Proteínas g/dl	7 DIAS	,929	,354
Urea mg/dl		1,688	,007
Creatinina mg/dl		1,458	,028
Albumina g/dl		,656	,783
Bilirrubina mg/dl		1,868	,002
GOT UI/L		2,123	,000
GPT UI/L		2,340	,000
GGT UI/L		1,688	,007
Leucocitos x1000/ μ L		,910	,379
Linfocitos %		1,338	,056
Linfocitos/ μ L		1,484	,025
Neutrófilos/ μ L		,983	,289
Neutrófilos %		1,065	,207
CsA ng/ml		,821	,510
FK ng/ml		,776	,583
MMF μ g/ml		2,250	,000

Tabla 3: Análisis de Normalidad de las Variables bioquímicas y Hematimétricas.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Proteínas g/dl	30 DIAS	0,644	0,801
Urea mg/dl		1,141	0,148
Creatinina mg/dl		1,612	0,011
Albumina g/dl		0,866	0,441
Bilirrubina mg/dl		1,751	0,004
GOT UI/L		1,912	0,001
GPT UI/L		2,062	0,000
GGT UI/L		1,859	0,002
Leucocitos x1000/ μ L		1,581	0,013
Linfocitos %		0,639	0,809
Linfocitos/ μ L		1,302	0,067
Neutrófilos/ μ L		1,609	0,011
Neutrófilos %		0,571	0,900
CsA ng/ml		0,990	0,281
FK ng/ml		0,557	0,915
MMF μ g/ml		1,697	0,006

Tabla 4: Análisis de Normalidad de las Variables bioquímicas y Hematimétricas.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Proteínas g/dl	90 DIAS	0,720	0,678
Urea mg/dl		0,720	0,678
Creatinina mg/dl		1,319	0,062
Albumina g/dl		1,375	0,046
Bilirrubina mg/dl		1,337	0,056
GOT UI/L		2,333	0,000
GPT UI/L		1,925	0,001
GGT UI/L		2,816	0,000
Leucocitos x1000/ μ L		1,052	0,218
Linfocitos %		0,867	0,440
Linfocitos/ μ L		0,956	0,321
Neutrófilos/ μ L		1,053	0,217
Neutrófilos %		0,830	0,496
CsA ng/ml		0,901	0,391
FK ng/ml		0,490	0,970
MMF μ g/ml		1,206	0,109

Tabla 5: Análisis de Normalidad de las Variables bioquímicas y Hematimétricas.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Proteínas g/dl	180 DIAS	1,076	0,198
Urea mg/dl		0,676	0,751
Creatinina mg/dl		1,489	0,024
Albumina g/dl		1,054	0,216
Bilirrubina mg/dl		2,36	0,000
GOT UI/L		2,328	0,000
GPT UI/L		2,608	0,000
GGT UI/L		2,967	0,000
Leucocitos x1000/ μ L		0,549	0,924
Linfocitos %		0,669	0,762
Linfocitos/ μ L		0,772	0,590
Neutrófilos/ μ L		0,560	0,912
Neutrófilos %		0,867	0,440
CsA ng/ml		0,921	0,364
FK ng/ml		1,317	0,062
MMF μ g/ml		1,330	0,058

ANEXO 1

Tabla 6: Análisis de Normalidad de las Variables bioquímicas y Hematimétricas.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Proteínas g/dl	AÑO	1,013	0,257
Urea mg/dl		0,686	0,735
Creatinina mg/dl		1,522	0,019
Albumina g/dl		0,686	0,735
Bilirrubina mg/dl		2,930	0,000
GOT UI/L		1,687	0,007
GPT UI/L		1,781	0,004
GGT UI/L		2,572	0,000
Leucocitos x1000/ μ L		0,834	0,491
Linfocitos %		1,029	0,241
Linfocitos/ μ L		0,971	0,303
Neutrófilos/ μ L		0,865	0,443
Neutrófilos %		1,438	0,032
CsA ng/ml		1,102	0,177
FK ng/ml		1,009	0,260
MMF μ g/ml		1,543	0,017

Tabla 7: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Celular.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Linfocitos T CD3%	PRE TC	0,710	0,695
Linfocitos T CD3/ μ L		0,783	0,573
Linfocitos T CD4%		0,635	0,814
Linfocitos T CD4/ μ L		0,740	0,645
Linfocitos T CD8%		1,100	0,178
Linfocitos T CD8/ μ L		1,064	0,208
Natural Killer %		1,355	0,051
Natural Killer/ μ L		1,728	0,005
Linfocitos B%		1,609	0,011
Linfocitos B/ μ L		1,190	0,118

Tabla 8: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Celular.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Linfocitos T CD3%	7 DIAS	1,060	0,211
Linfocitos T CD3/ μ L		1,905	0,001
Linfocitos T CD4%		0,808	0,531
Linfocitos T CD4/ μ L		1,656	0,008
Linfocitos T CD8%		1,034	0,236
Linfocitos T CD8/ μ L		1,601	0,012
Natural Killer %		2,231	0,000
Natural Killer/ μ L		2,212	0,000
Linfocitos B%		0,766	0,600
Linfocitos B/ μ L		1,783	0,003

Tabla 9: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Celular.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Linfocitos T CD3%	30 DIAS	0,880	0,421
Linfocitos T CD3/ μ L		1,141	0,148
Linfocitos T CD4%		0,681	0,742
Linfocitos T CD4/ μ L		0,999	0,271
Linfocitos T CD8%		1,170	0,129
Linfocitos T CD8/ μ L		1,335	0,057
Natural Killer %		1,458	0,028
Natural Killer/ μ L		1,451	0,030
Linfocitos B%		1,145	0,145
Linfocitos B/ μ L		0,946	0,333

Tabla 10: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Celular.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Linfocitos T CD3%	90 DIAS	0,670	0,760
Linfocitos T CD3/ μ L		0,796	0,551
Linfocitos T CD4%		0,584	0,885
Linfocitos T CD4/ μ L		0,982	0,290
Linfocitos T CD8%		0,917	0,369
Linfocitos T CD8/ μ L		1,026	0,243
Natural Killer %		1,345	0,054
Natural Killer/ μ L		1,166	0,132
Linfocitos B%		1,029	0,240
Linfocitos B/ μ L		1,376	0,045

Tabla 11: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Celular.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Linfocitos T CD3%	180 DIAS	1,260	0,084
Linfocitos T CD3/ μ L		0,974	0,299
Linfocitos T CD4%		0,573	0,898
Linfocitos T CD4/ μ L		1,168	0,131
Linfocitos T CD8%		2,643	0,000
Linfocitos T CD8/ μ L		0,989	0,282
Natural Killer %		1,519	0,020
Natural Killer/ μ L		1,546	0,017
Linfocitos B%		1,405	0,039

Tabla 12: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Celular.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
Linfocitos T CD3%	AÑO	1,183	0,122
Linfocitos T CD3/ μ L		0,977	0,295
Linfocitos T CD4%		0,932	0,350
Linfocitos T CD4/ μ L		0,961	0,314
Linfocitos T CD8%		0,571	0,900
Linfocitos T CD8/ μ L		1,236	0,094
Natural Killer %		1,267	0,081
Natural Killer/ μ L		1,052	0,218
Linfocitos B%		1,175	0,126
Linfocitos B/ μ L		1,013	0,256

ANEXO 1

Tabla 13: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Humoral.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
IgG mg/dL	PRE TC	0,449	0,988
IgA mg/dL		0,804	0,537
IgM mg/dL		0,920	0,365
IgG1 mg/dL		0,447	0,988
IgG2 mg/dL		0,722	0,675
IgG3 mg/dL		1,298	0,069
IgG4 mg/dL		1,713	0,006
Complemento C3 mg/dL		1,172	0,128
Complemento C4 mg/dL		0,605	0,857
Fb Properdina mg/dL		0,626	0,828
PCR mg/dL		2,747	0,000

Tabla 14: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Humoral.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
IgG mg/dL	7 DIAS	0,888	0,410
IgA mg/dL		1,027	0,242
IgM mg/dL		0,984	0,288
IgG1 mg/dL		1,059	0,212
IgG2 mg/dL		1,372	0,046
IgG3 mg/dL		1,202	0,111
IgG4 mg/dL		2,407	0,000
Complemento C3 mg/dL		0,790	0,560
Complemento C4 mg/dL		1,113	0,168
Fb Properdina mg/dL		0,998	0,272
PCR mg/dL		2,843	0,000

Tabla 15: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Humoral.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
IgG mg/dL	30 DIAS	1,209	0,107
IgA mg/dL		1,031	0,238
IgM mg/dL		1,342	0,054
IgG1 mg/dL		1,059	0,212
IgG2 mg/dL		1,372	0,046
IgG3 mg/dL		1,202	0,111
IgG4 mg/dL		2,385	0,000
Complemento C3 mg/dL		0,633	0,818
Complemento C4 mg/dL		0,497	0,966
Fb Properdina mg/dL		0,848	0,468
PCR mg/dL		2,962	0,000

Tabla 16: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Humoral.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
IgG mg/dL	90 DIAS	0,728	0,664
IgA mg/dL		1,227	0,099
IgM mg/dL		1,287	0,073
IgG1 mg/dL		0,968	0,306
IgG2 mg/dL		0,938	0,342
IgG3 mg/dL		1,069	0,204
IgG4 mg/dL		1,954	0,001
Complemento C3 mg/dL		0,934	0,348
Complemento C4 mg/dL		0,636	0,814
Fb Properdina mg/dL		1,048	0,222
PCR mg/dL		3,056	0,000

Tabla 17: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Humoral.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
IgG mg/dL	180 DIAS	0,703	0,707
IgA mg/dL		1,166	0,132
IgM mg/dL		1,411	0,037
IgG1 mg/dL		1,292	0,071
IgG2 mg/dL		0,830	0,496
IgG3 mg/dL		1,306	0,066
IgG4 mg/dL		1,525	0,019
Complemento C3 mg/dL		1,139	0,149
Complemento C4 mg/dL		1,075	0,198
Fb Properdina mg/dL		1,379	0,045
PCR mg/dL		2,663	0,000

Tabla 18: Análisis de Normalidad de las Variables de Inmunidad Humoral.

VARIABLE	TIEMPO	Z DE KOLMOGOROV	
		SMIRNOV	SIGNIFICACION BILATERAL
IgG mg/dL	AÑO	0,574	0,896
IgA mg/dL		1,041	0,229
IgM mg/dL		1,119	0,163
IgG1 mg/dL		1,136	0,151
IgG2 mg/dL		0,829	0,498
IgG3 mg/dL		1,027	0,242
IgG4 mg/dL		1,360	0,049
Complemento C3 mg/dL		0,701	0,709
Complemento C4 mg/dL		0,910	0,379
Fb Properdina mg/dL		1,392	0,042
PCR mg/dL		2,407	0,000

ANEXO 2

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES ANALIZADAS.

Tabla 1. Análisis descriptivo variables bioquímicas y hematimétricas Pre-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Proteínas g/dl	6,73	0,13	7,00	1,405	2,30	9,20
Urea mg/dl	58,52	2,91	53,00	29,99	9,00	206,00
Creatinina mg/dl	1,16	0,04	1,10	0,49	0,57	4,10
Albumina g/dl	3,71	0,09	3,80	0,83	1,20	5,30
Bilirrubina mg/dl	1,21	0,09	0,90	0,92	0,10	5,10
GOT UI/L	110,10	62,36	24,00	632,97	8,00	6430,00
GPT UI/L	83,37	39,87	23,00	394,76	7,00	3820,00
GGT UI/L	71,27	6,45	49,00	65,17	6,00	353,00
Leucocitos x1000/ μ L	8,87	0,38	7,90	3,91	4,20	33,10
Linfocitos %	20,51	1,03	19,70	10,63	2,90	46,50
Linfocitos / μ L	1633,06	77,53	1551,00	794,45	308,70	3622,60
Neutrófilos %	69,06	1,26	68,20	12,95	40,00	93,70
Neutrófilos / μ L	6371,25	369,0	5165,20	3782,0	1880,00	29624,50

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 2. Análisis descriptivo variables bioquímicas y hematimétricas 7 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Proteínas g/dl	5,47	0,08	5,30	0,79	3,70	7,70
Urea mg/dl	95,52	5,31	81,00	53,12	32,00	332,00
Creatinina mg/dl	1,26	0,06	1,10	0,64	0,37	4,10
Albumina g/dl	3,03	0,07	3,00	0,62	1,90	5,10
Bilirrubina mg/dl	1,32	0,09	1,10	0,93	0,20	6,00
GOT UI/L	32,67	3,37	23,00	33,73	5,00	258,00
GPT UI/L	53,11	5,67	35,50	56,21	3,00	384,00
GGT UI/L	120,76	9,36	92,00	92,18	25,00	451,00
Leucocitos x1000/ μ L	13,65	0,49	12,75	4,93	5,60	31,80
Linfocitos %	7,85	0,53	6,50	5,35	1,20	27,70
Linfocitos / μ L	1042,94	80,02	797,90	800,28	144,00	4258,80
Neutrófilos %	86,84	0,64	87,35	6,44	67,00	96,40
Neutrófilos / μ L	11909,51	461,4	11523,65	4614,0	4519,20	30273,60
CyAng/ml	182,72	12,48	169,00	71,71	66,00	371,00
FK ng/ml	9,87	0,67	8,85	5,45	0,10	29,60
MMF μ g/ml	2,36	0,32	1,40	2,81	0,00	13,90

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 3. Análisis descriptivo variables bioquímicas y hematimétricas 30 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Proteínas g/dl	5,70	0,07	5,70	0,71	3,20	7,80
Urea mg/dl	67,31	3,70	61,00	36,71	18,00	265,00
Creatinina mg/dl	1,05	0,04	0,90	0,47	0,27	3,50
Albumina g/dl	3,37	0,06	3,40	0,60	1,50	4,90
Bilirrubina mg/dl	0,79	0,04	0,60	0,48	0,20	2,30
GOT UI/L	20,65	1,34	17,00	13,26	3,00	99,00
GPT UI/L	33,17	3,17	26,00	31,25	6,00	271,00
GGT UI/L	107,42	10,02	73,00	98,21	17,00	559,00
Leucocitos x1000/ μ L	7,87	0,39	6,80	3,91	0,80	29,60
Linfocitos %	18,82	1,11	17,45	10,88	1,30	55,40
Linfocitos / μ L	1371,56	88,73	1196,15	869,39	49,60	4487,40
Neutrófilos %	72,17	1,28	72,15	12,60	40,70	96,10
Neutrófilos / μ L	5812,79	370,7	5017,60	3632,67	723,20	26699,20
CyAng/ml	267,66	14,78	244,00	84,92	138,00	474,00
FK ng/ml	12,63	0,54	12,70	4,33	1,10	25,70
MMF μ g/ml	2,12	0,19	1,50	1,88	0,10	12,30

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

ANEXO 2

Tabla 4. Análisis descriptivo variables bioquímicas y hematimétricas 90 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Proteínas g/dl	6,32	0,05	6,30	0,56	4,30	7,60
Urea mg/dl	55,00	1,97	53,00	19,38	22,00	110,00
Creatinina mg/dl	1,12	0,04	1,00	0,46	0,40	2,97
Albumina g/dl	3,98	0,04	4,00	0,40	2,60	5,00
Bilirrubina mg/dl	0,67	0,03	0,60	0,33	0,20	2,10
GOT UI/L	19,46	1,20	18,00	11,81	8,00	110,00
GPT UI/L	21,33	1,51	18,00	14,83	7,00	87,00
GGT UI/L	77,12	11,66	41,00	114,30	13,00	912,00
Leucocitos x1000/ μ L	6,56	0,22	6,30	2,22	2,50	13,10
Linfocitos %	24,85	1,00	24,90	9,83	8,50	48,60
Linfocitos/ μ L	1548,43	65,82	1415,00	641,57	492,80	3573,90
Neutrófilos %	63,93	1,06	64,80	10,41	36,70	81,50
Neutrófilos / μ L	4302,49	189,2	4284,20	1844,25	990,90	9929,80
CyAng/ml	210,03	14,01	193,00	80,53	97,00	433,00
FK ng/ml	12,06	0,46	12,05	3,56	3,90	21,90
MMF μ g/ml	2,70	0,19	2,20	1,89	0,30	13,40

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 5. Análisis descriptivo variables bioquímicas y hematimétricas 180 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Proteínas g/dl	6,62	0,05	6,60	0,48	5,40	8,40
Urea mg/dl	55,84	2,01	54,00	19,75	5,70	102,00
Creatinina mg/dl	1,15	0,03	1,10	0,36	0,50	2,60
Albumina g/dl	4,15	0,02	4,20	0,28	3,40	4,80
Bilirrubina mg/dl	0,86	0,07	0,70	0,75	0,20	7,00
GOT UI/L	23,47	1,89	19,00	18,54	7,00	157,00
GPT UI/L	25,37	2,67	19,00	26,17	7,00	222,00
GGT UI/L	70,12	11,88	36,50	116,44	10,00	1039,00
Leucocitos x1000/ μ L	6,25	0,19	6,10	1,91	2,00	10,20
Linfocitos %	29,78	1,21	28,70	11,85	7,20	67,70
Linfocitos/ μ L	1772,03	70,82	1760,80	690,31	381,60	3791,20
Neutrófilos %	59,32	1,21	60,60	11,80	25,00	87,30
Neutrófilos / μ L	3825,43	164,1	3834,00	1599,82	669,90	7812,00
CyAng/ml	183,78	9,34	184,00	53,69	106,00	300,00
FK ng/ml	12,12	0,59	11,60	4,49	4,80	29,70
MMF μ g/ml	2,61	0,15	2,20	1,45	0,00	8,80

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 6. Análisis descriptivo variables bioquímicas y hematimétricas Año Post-Trasplante Cardíaco.

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Proteínas g/dl	6,81	0,06	6,90	0,60	4,00	7,80
Urea mg/dl	61,08	2,28	59,00	22,34	17,00	151,00
Creatinina mg/dl	1,28	0,04	1,20	0,44	0,60	3,05
Albumina g/dl	4,31	0,03	4,30	0,34	3,40	5,20
Bilirrubina mg/dl	0,84	0,12	0,70	1,16	0,20	11,10
GOT UI/L	22,56	0,93	20,00	9,20	10,00	70,00
GPT UI/L	21,89	1,18	18,00	11,61	7,00	73,00
GGT UI/L	61,31	8,98	31,00	86,21	8,00	696,00
Leucocitos x1000/ μ L	7,01	0,25	6,60	2,49	3,20	18,70
Linfocitos %	28,15	1,13	26,70	11,10	4,60	67,60
Linfocitos/ μ L	1866,60	75,27	1762,20	733,64	656,00	4317,30
Neutrófilos %	59,99	1,41	62,20	13,76	8,80	90,90
Neutrófilos / μ L	4345,00	229,5	4045,60	2237,33	457,60	16755,20
CyAng/ml	202,15	14,25	178,00	81,87	103,00	491,00
FK ng/ml	10,85	0,51	10,60	3,89	3,20	26,40
MMF μ g/ml	2,98	0,18	2,40	1,76	0,10	10,90

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 7. Análisis descriptivo variables de inmunidad celular Pre-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Linfocitos T CD3%	74,99	0,99	76,00	9,13	44,00	94,00
Linfocitos T CD3/ μ L	1235,40	73,03	1137,00	669,36	189,00	2988,00
Linfocitos T CD4%	49,71	1,11	50,00	10,29	23,00	80,00
Linfocitos T CD4/ μ L	812,65	49,67	744,50	455,26	95,00	2044,00
Linfocitos T CD8%	24,91	0,96	24,00	8,92	10,00	57,00
Linfocitos T CD8/ μ L	413,63	30,33	369,00	278,05	58,00	1548,00
Natural Killer %	11,15	0,84	9,00	7,80	1,00	40,00
Natural Killer/ μ L	172,04	15,49	125,00	142,02	15,00	585,00
Linfocitos B%	11,85	0,84	10,00	7,80	1,00	41,00
Linfocitos B/ μ L	175,54	15,41	142,00	141,27	12,00	840,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 8. Análisis descriptivo variables de inmunidad celular 7 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Linfocitos T CD3%	69,46	1,29	72,00	11,91	8,00	93,00
Linfocitos T CD3/ μ L	766,93	67,64	593,00	623,61	25,00	2622,00
Linfocitos T CD4%	48,95	1,31	48,00	12,08	3,00	79,00
Linfocitos T CD4/ μ L	543,62	49,16	394,00	453,28	8,00	2025,00
Linfocitos T CD8%	20,16	0,87	18,00	8,03	4,00	51,00
Linfocitos T CD8/ μ L	219,00	21,16	165,00	195,12	12,00	1140,00
Natural Killer %	5,37	0,55	4,00	5,06	1,00	29,00
Natural Killer/ μ L	50,24	6,81	36,00	62,81	4,00	446,00
Linfocitos B%	23,46	1,26	22,00	11,70	4,00	82,00
Linfocitos B/ μ L	235,75	26,54	166,00	243,32	13,00	1320,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

ANEXO 2

Tabla 9. Análisis descriptivo variables de inmunidad celular 30 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Linfocitos T CD3%	74,07	0,94	75,00	8,66	52,00	95,00
Linfocitos T CD3/ μ L	1105,06	77,35	961,00	700,45	64,00	3341,00
Linfocitos T CD4%	50,20	1,18	51,00	10,84	28,00	74,00
Linfocitos T CD4/ μ L	748,10	53,68	636,50	486,17	33,00	2160,00
Linfocitos T CD8%	23,40	0,89	22,00	8,18	7,00	50,00
Linfocitos T CD8/ μ L	348,60	27,94	289,50	253,05	32,00	1178,00
Natural Killer %	9,30	0,69	8,00	6,32	2,00	28,00
Natural Killer/ μ L	122,83	11,12	87,00	100,13	18,00	556,00
Linfocitos B%	14,88	0,78	14,00	7,11	1,00	37,00
Linfocitos B/ μ L	213,67	17,60	180,00	158,45	10,00	1035,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 10. Análisis descriptivo variables de inmunidad celular 90 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Linfocitos T CD3%	78,84	0,87	79,00	8,10	44,00	93,00
Linfocitos T CD3/ μ L	1240,75	57,77	1133,50	529,54	176,00	2550,00
Linfocitos T CD4%	51,65	1,16	51,00	10,73	22,00	77,00
Linfocitos T CD4/ μ L	812,82	42,39	750,00	388,54	88,00	2310,00
Linfocitos T CD8%	26,71	1,03	26,00	9,55	4,00	58,00
Linfocitos T CD8/ μ L	419,40	25,65	391,50	235,12	80,00	1290,00
Natural Killer %	10,19	0,78	9,00	7,24	1,00	46,00
Natural Killer/ μ L	149,36	12,41	126,50	113,79	14,00	607,00
Linfocitos B%	8,98	0,51	8,00	4,70	1,00	21,00
Linfocitos B/ μ L	143,51	11,15	108,00	101,60	10,00	428,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 11. Análisis descriptivo variables de inmunidad celular 180 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Linfocitos T CD3%	79,94	0,81	82,00	7,62	58,00	92,00
Linfocitos T CD3/ μ L	1363,17	55,02	1313,50	510,24	300,00	2523,00
Linfocitos T CD4%	48,71	1,15	48,00	10,72	27,00	75,00
Linfocitos T CD4/ μ L	833,01	38,92	769,00	361,00	135,00	1950,00
Linfocitos T CD8%	34,11	3,64	30,00	33,99	9,00	333,00
Linfocitos T CD8/ μ L	523,74	28,30	461,50	262,49	113,00	1400,00
Natural Killer %	11,06	0,78	8,50	7,23	2,00	34,00
Natural Killer/ μ L	175,61	14,97	137,00	138,07	33,00	986,00
Linfocitos B%	7,36	0,44	7,00	4,08	1,00	21,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 12. Análisis descriptivo variables de inmunidad celular Año Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
Linfocitos T CD3%	77,92	1,37	81,00	11,80	17,00	94,00
Linfocitos T CD3/ μ L	1442,30	76,04	1352,00	649,75	253,00	3526,00
Linfocitos T CD4%	45,99	1,41	45,50	12,20	10,00	77,00
Linfocitos T CD4/ μ L	829,18	48,94	731,00	418,19	66,00	2660,00
Linfocitos T CD8%	31,93	1,28	31,50	11,05	10,00	65,00
Linfocitos T CD8/ μ L	591,60	41,08	500,00	350,98	31,00	1953,00
Natural Killer %	13,17	1,07	10,50	9,13	2,00	41,00
Natural Killer/ μ L	232,41	19,94	182,00	168,09	15,00	891,00
Linfocitos B%	5,91	0,38	5,50	3,30	1,00	21,00
Linfocitos B/ μ L	110,58	9,72	90,00	81,93	13,00	447,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 13. Análisis descriptivo variables de inmunidad humoral Pre-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
IgG mg/dL	1078,64	36,58	1090,00	360,33	276,00	2060,00
IgA mg/dL	320,72	14,17	302,00	140,30	51,6,00	626,00
IgM mg/dL	108,68	5,88	104,50	58,30	21,6,00	412,00
IgG1 mg/dL	688,65	29,50	693,00	268,77	165,00	1340,00
IgG2 mg/dL	359,59	19,21	342,00	175,05	6,30	869,00
IgG3 mg/dL	55,89	3,73	48,00	34,01	8,02	174,00
IgG4 mg/dL	55,31	6,45	34,10	58,48	3,80	383,00
ComplementoC3 mg/dL	117,36	3,78	116,50	33,42	33,90	212,00
Complemento C4 mg/dL	24,40	1,07	23,50	9,45	4,00	59,80
FbProperdina mg/dL	36,53	1,21	36,00	10,35	12,00	63,90
PCR mg/dL	3,63	0,74	0,82	6,84	0,04	35,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 14. Análisis descriptivo variables de inmunidad humoral 7 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
IgG mg/dL	710,61	22,09	666,50	211,89	336,00	1300,00
IgA mg/dL	217,89	9,98	195,50	95,81	79,00	510,00
IgM mg/dL	85,14	4,63	75,55	44,49	26,00	298,00
IgG1 mg/dL	422,80	15,14	398,00	140,44	174,00	905,00
IgG2 mg/dL	226,37	10,45	205,50	97,00	78,80	549,00
IgG3 mg/dL	30,77	1,72	26,30	15,96	6,79	91,00
IgG4 mg/dL	35,66	3,97	24,20	37,11	4,80	237,00
ComplementoC3 mg/dL	95,58	3,09	90,90	29,39	48,00	184,00
Complemento C4 mg/dL	21,20	0,82	20,00	7,79	6,90	53,50
FbProperdina mg/dL	24,04	0,70	22,75	6,57	12,00	49,00
PCR mg/dL	2,58	0,52	0,93	4,95	0,00	37,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 15. Análisis descriptivo variables de inmunidad humoral 30 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
IgG mg/dL	642,79	21,07	596,50	206,53	332,00	1470,00
IgA mg/dL	192,14	9,04	183,00	86,25	47,90	473,00
IgM mg/dL	76,72	4,34	65,00	41,46	21,00	254,00
IgG1 mg/dL	396,65	16,68	363,50	152,91	187,00	1000,00
IgG2 mg/dL	204,11	10,15	179,50	93,05	66,40	498,00
IgG3 mg/dL	27,38	1,70	23,90	15,65	6,40	91,20
IgG4 mg/dL	30,58	4,04	20,70	37,11	4,30	264,00
ComplementoC3 mg/dL	110,39	3,44	107,00	31,78	53,90	227,00
Complemento C4 mg/dL	23,91	0,83	23,20	7,67	4,00	50,00
FbProperdina mg/dL	30,44	0,84	30,00	7,81	14,00	55,20
PCR mg/dL	3,38	0,77	0,96	7,18	0,01	46,00

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

ANEXO 2

Tabla 16. Análisis descriptivo variables de inmunidad humoral 90 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
IgG mg/dL	743,09	24,29	726,00	223,95	317,00	1600,00
IgA mg/dL	185,45	10,40	167,00	95,89	57,80	656,00
IgM mg/dL	78,12	5,03	69,10	46,43	21,50	384,00
IgG1 mg/dL	456,58	18,14	433,50	160,28	191,00	1020,00
IgG2 mg/dL	222,05	9,60	202,50	84,82	74,20	428,00
IgG3 mg/dL	35,17	2,20	30,05	19,44	7,74	96,00
IgG4 mg/dL	31,05	3,50	20,75	30,59	4,30	155,00
Complemento C3 mg/dL	102,06	2,92	99,20	26,79	36,30	196,00
Complemento C4 mg/dL	22,44	0,83	22,50	7,68	1,67	44,2,00
FbProperdina mg/dL	27,78	0,79	26,25	7,24	12,00	45,20
PCR mg/dL	0,62	0,14	0,26	1,35	0,00	10,80

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 17. Análisis descriptivo variables de inmunidad humoral 180 Días Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
IgG mg/dL	775,01	23,14	771,00	210,82	422,00	1430,00
IgA mg/dL	182,58	8,35	165,00	76,14	73,00	401,00
IgM mg/dL	85,64	5,48	78,00	49,99	19,20	281,00
IgG1 mg/dL	515,97	19,03	475,00	168,11	240,00	1060,00
IgG2 mg/dL	211,45	8,30	204,00	73,35	67,50	347,00
IgG3 mg/dL	44,22	3,25	37,45	28,73	9,94	189,00
IgG4 mg/dL	27,10	2,69	20,05	23,75	4,00	114,00
Complemento C3 mg/dL	102,10	2,77	97,00	24,99	52,10	177,00
Complemento C4 mg/dL	21,02	0,72	20,40	6,56	1,67	41,40
FbProperdina mg/dL	27,17	0,67	26,30	6,03	15,70	44,70
PCR mg/dL	0,35	0,05	0,15	0,47	0,10	2,96

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

Tabla 18. Análisis descriptivo variables de inmunidad humoral Año Post-Trasplante Cardíaco

VARIABLE	MEDIA	ESM	MEDIANA	DS	MINIMO	MAXIMO
IgG mg/dL	832,70	24,16	843,00	214,77	292,00	1380,00
IgA mg/dL	193,89	10,82	177,00	96,22	75,30	719,00
IgM mg/dL	91,62	6,11	81,70	54,31	16,90	347,00
IgG1 mg/dL	559,02	23,64	529,00	193,56	179,00	1180,00
IgG2 mg/dL	217,72	11,49	199,00	94,08	54,00	427,00
IgG3 mg/dL	48,95	3,00	43,00	24,55	10,60	124,00
IgG4 mg/dL	27,25	3,00	21,30	24,56	3,44	122,00
Complemento C3 mg/dL	106,22	2,94	106,00	25,46	59,20	194,00
Complemento C4 mg/dL	22,02	0,75	21,00	6,55	1,67	37,80
FbProperdina mg/dL	29,54	0,90	27,70	7,38	18,80	54,00
PCR mg/dL	0,42	0,07	0,24	0,59	0,01	3,26

ESM= Error Estandar de la Media DS= Desviación Estandar

ANEXO 3

**FIGURAS QUE ILUSTRAN LA CORRELACIÓN SIGNIFICATIVA
ENTRE LOS DISTINTOS PARÁMETROS MONITORIZADOS A LO
LARGO DEL TIEMPO DE ESTUDIO.**

Correlación entre los niveles de fármacos inmunosupresores y los parámetros más representativos de los evaluados en este estudio en el día 7 post-TC

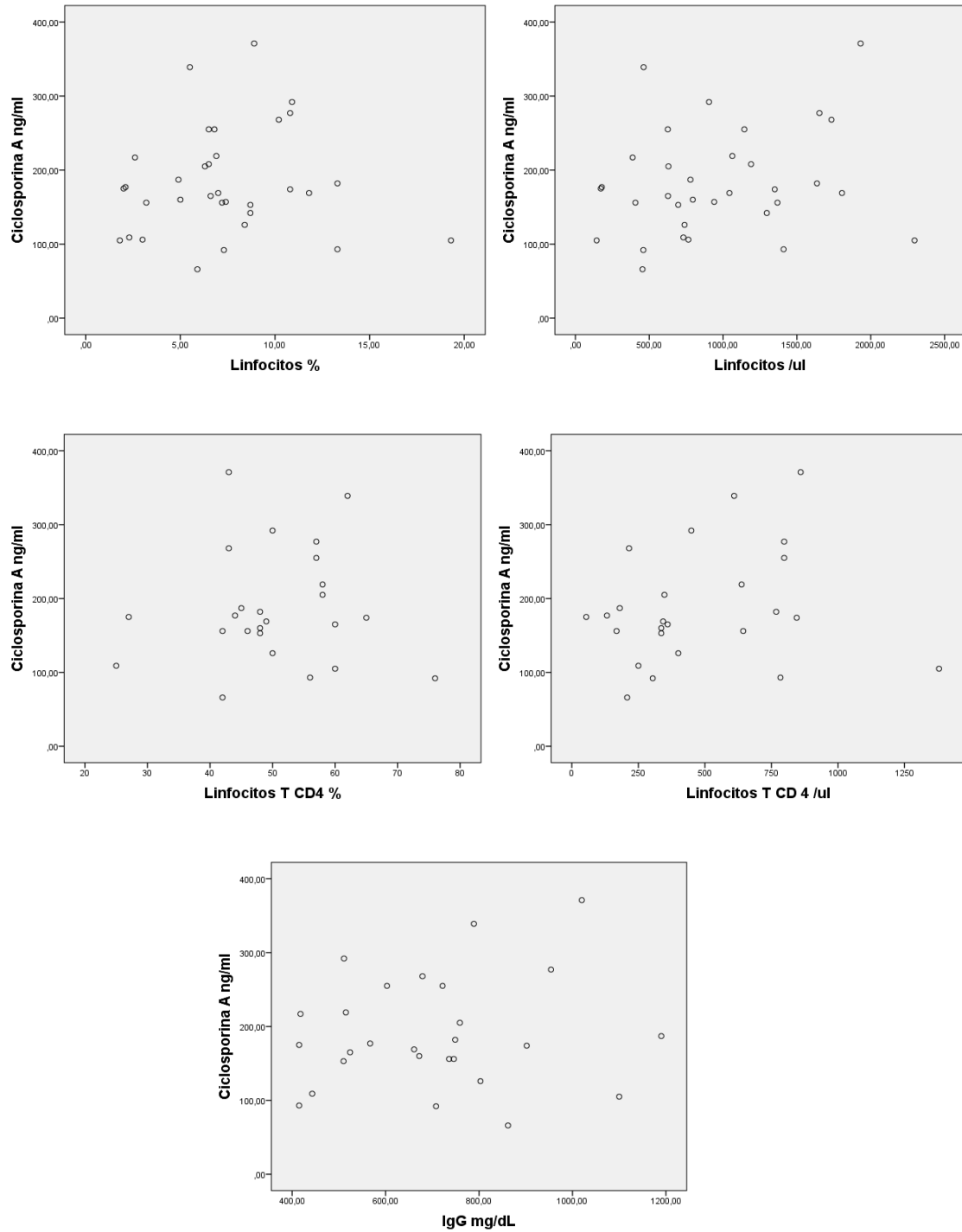


Figura 1: Correlación entre los niveles de CyA y biomarcadores bioquímicos e inmunológicos a los 7 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson.

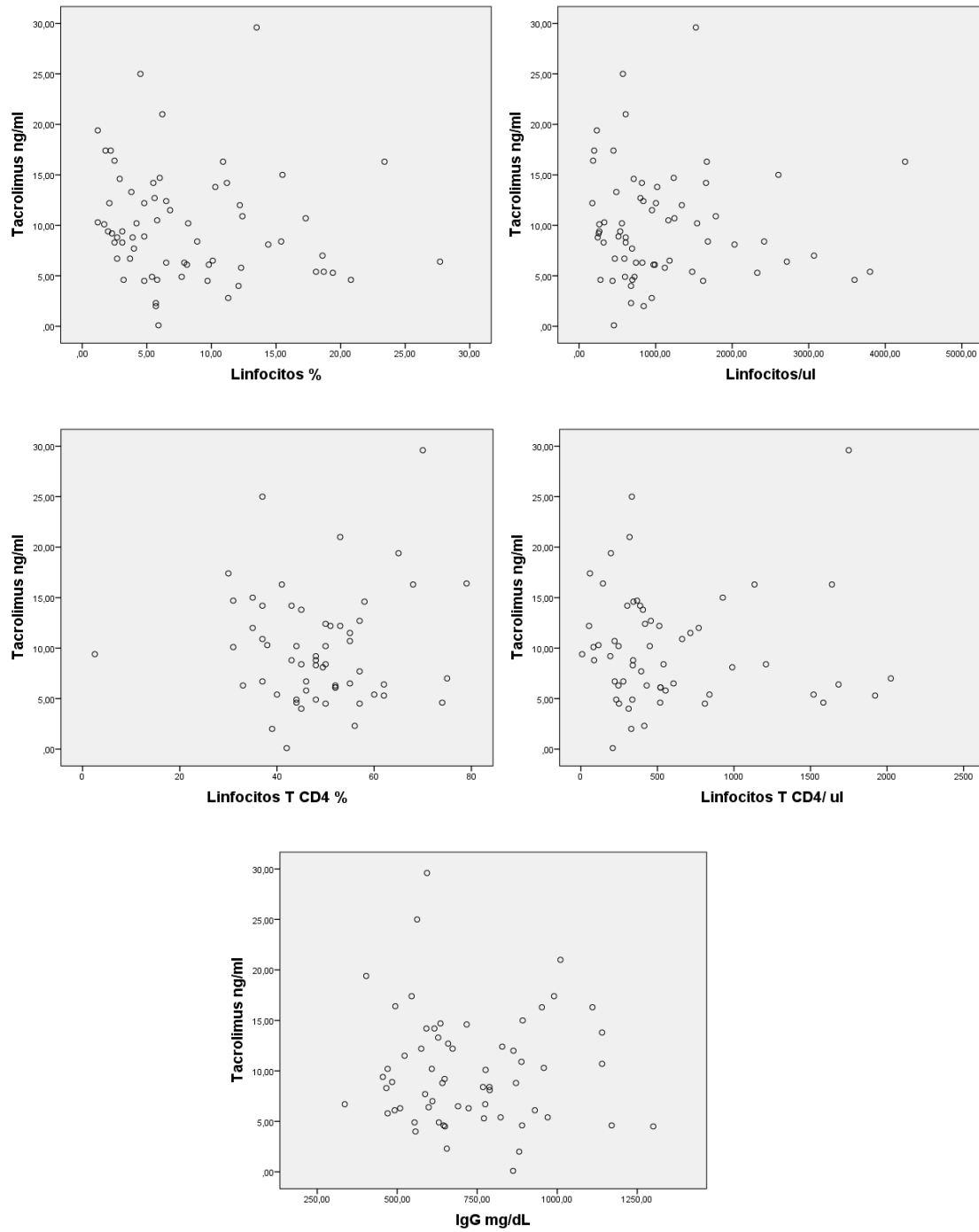


Figura 2: Correlación entre los niveles de FK y biomarcadores bioquímicos e inmunológicos a los 7 días Post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

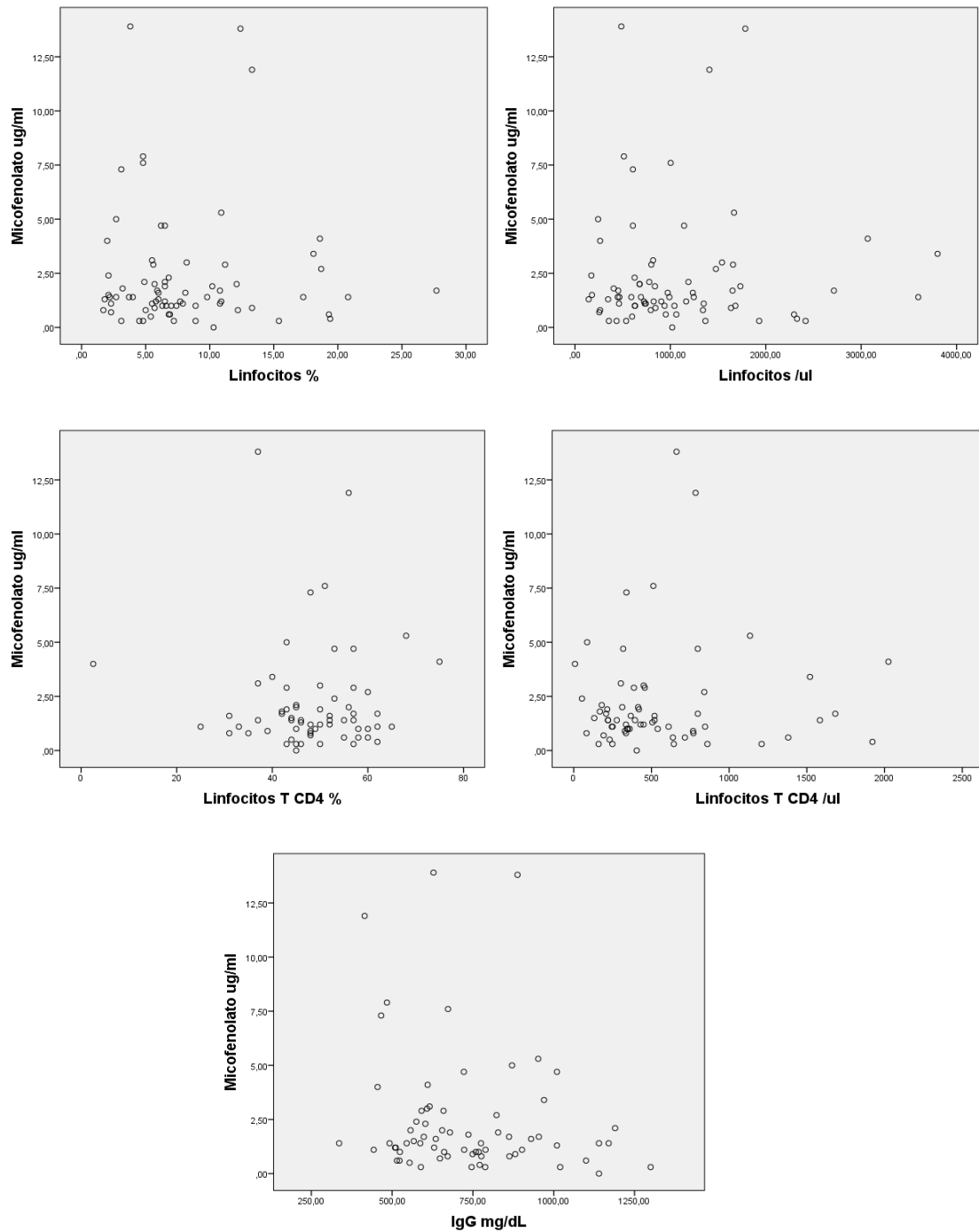


Figura 3: Correlación entre los niveles de MMF y biomarcadores bioquímicos e inmunológicos a los 7 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

Correlación entre los distintos biomarcadores a los 7 días post-trasplante.

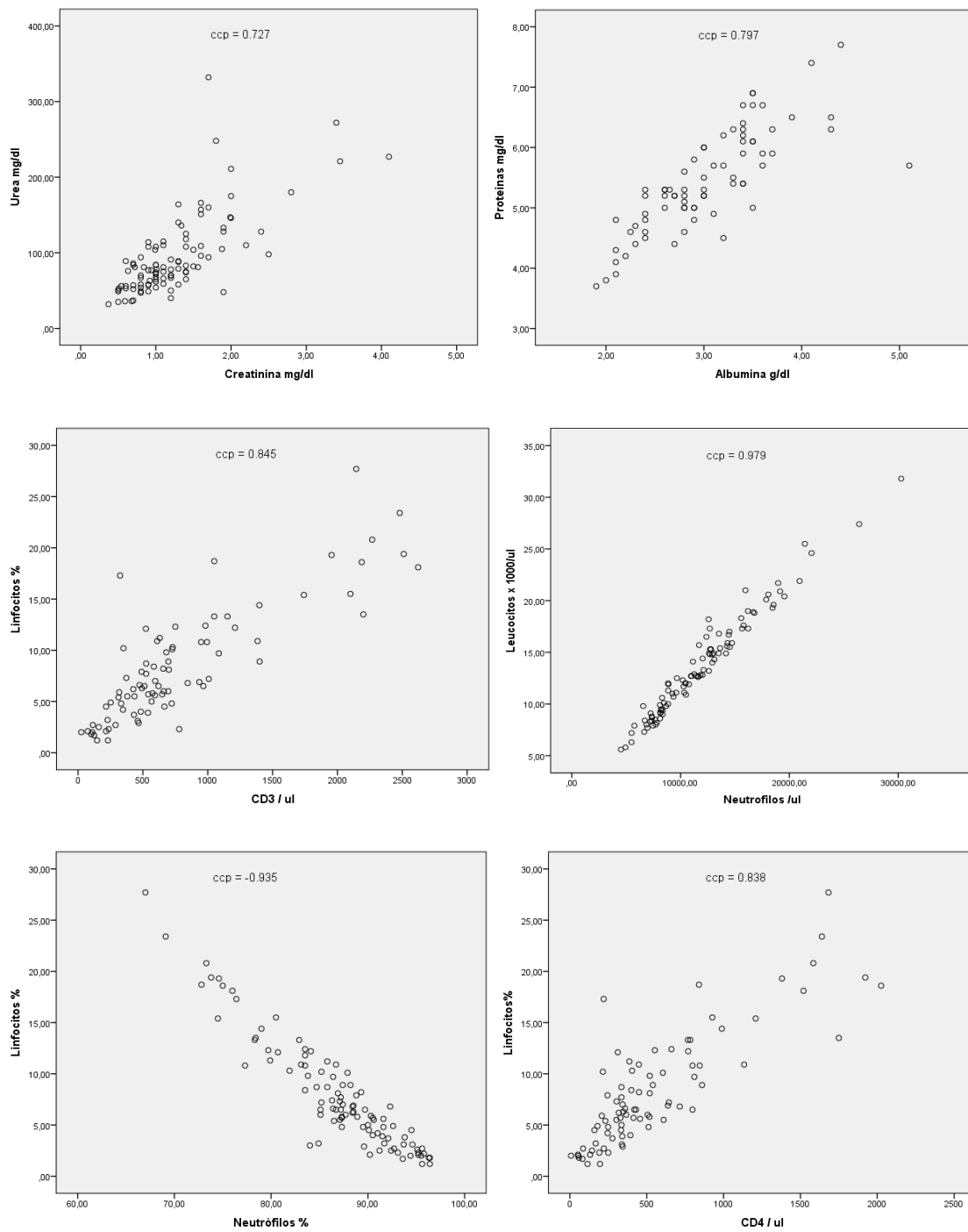


Figura 4: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 7 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

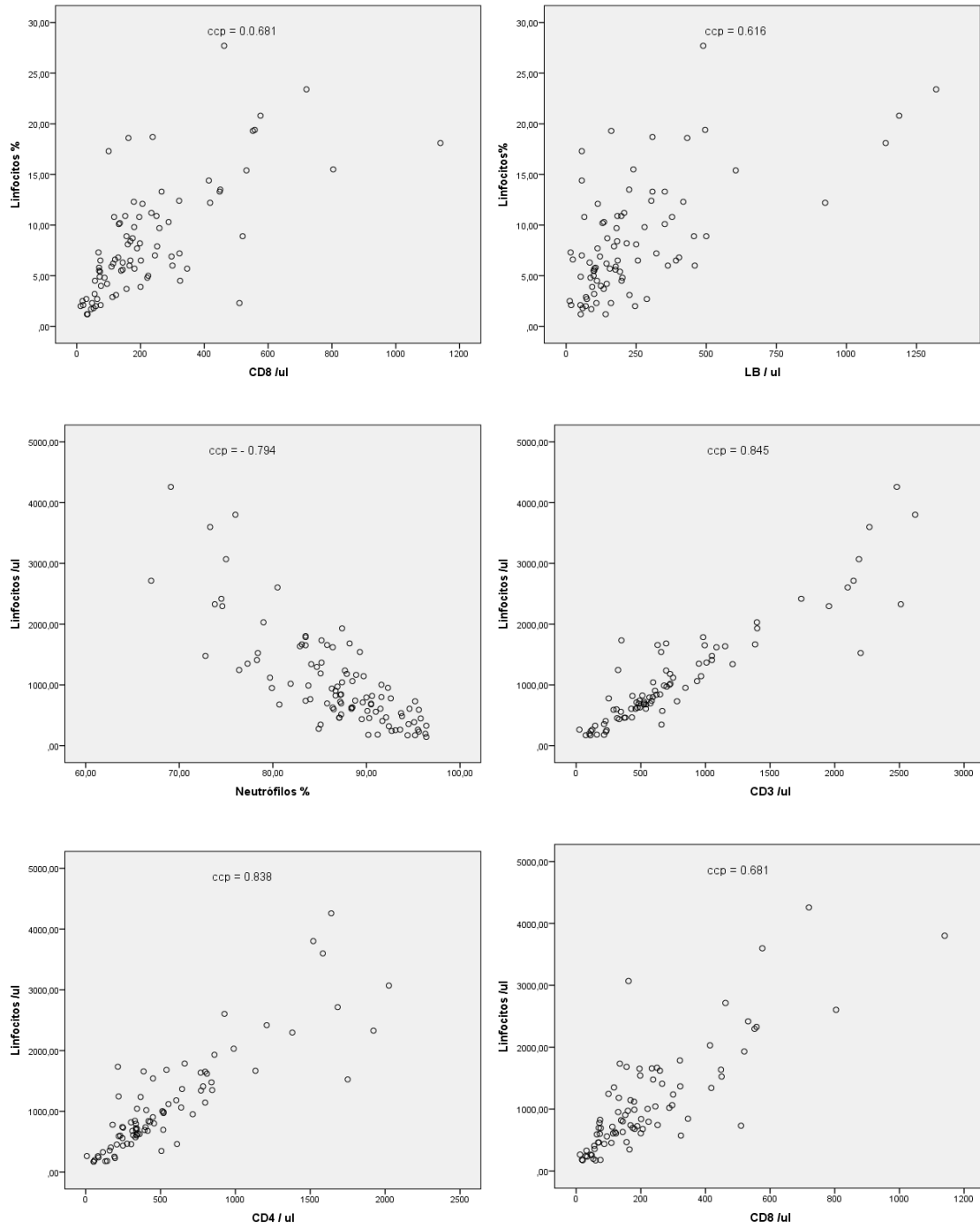


Figura 5: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 7 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

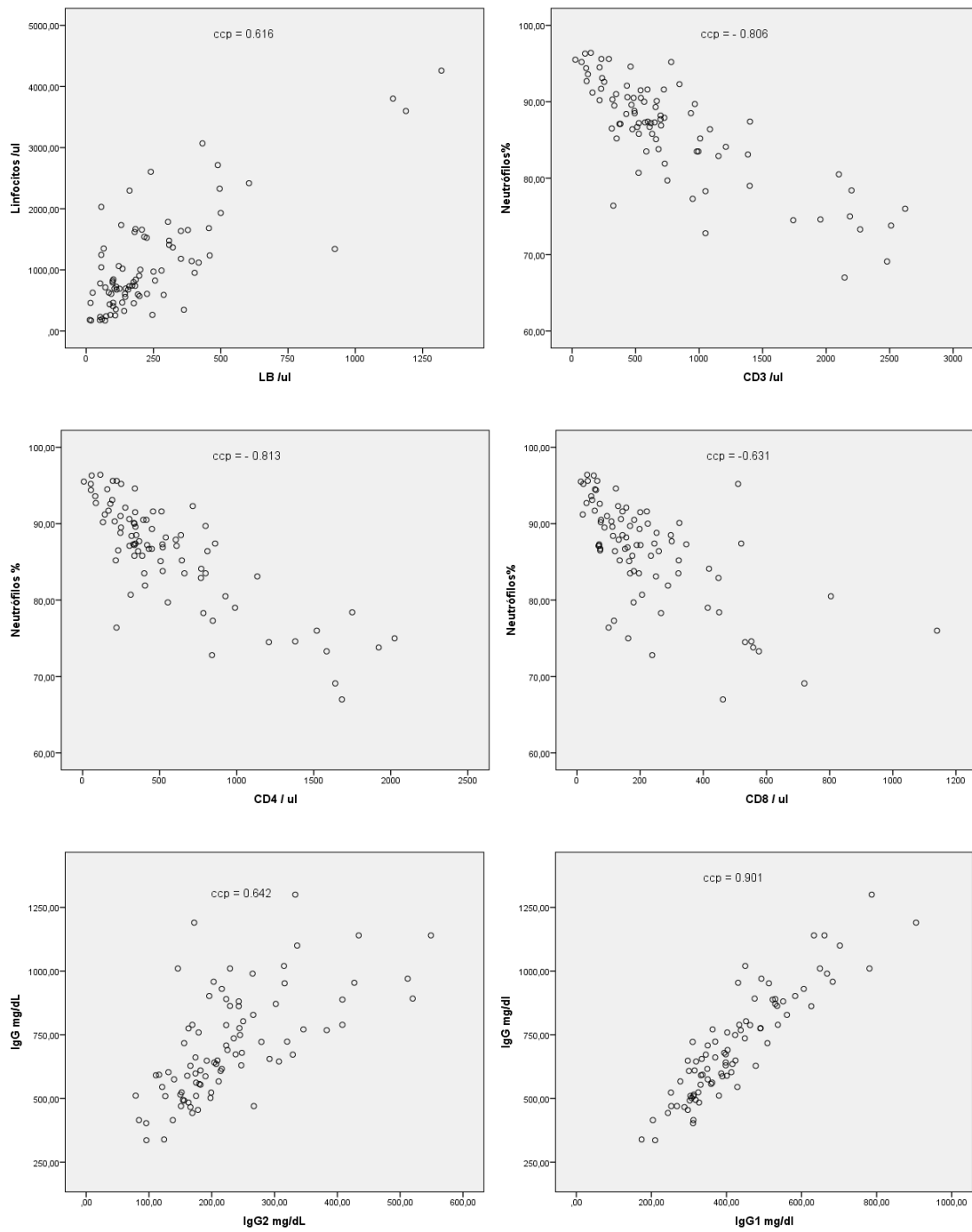


Figura 6: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 7 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

ANEXO3

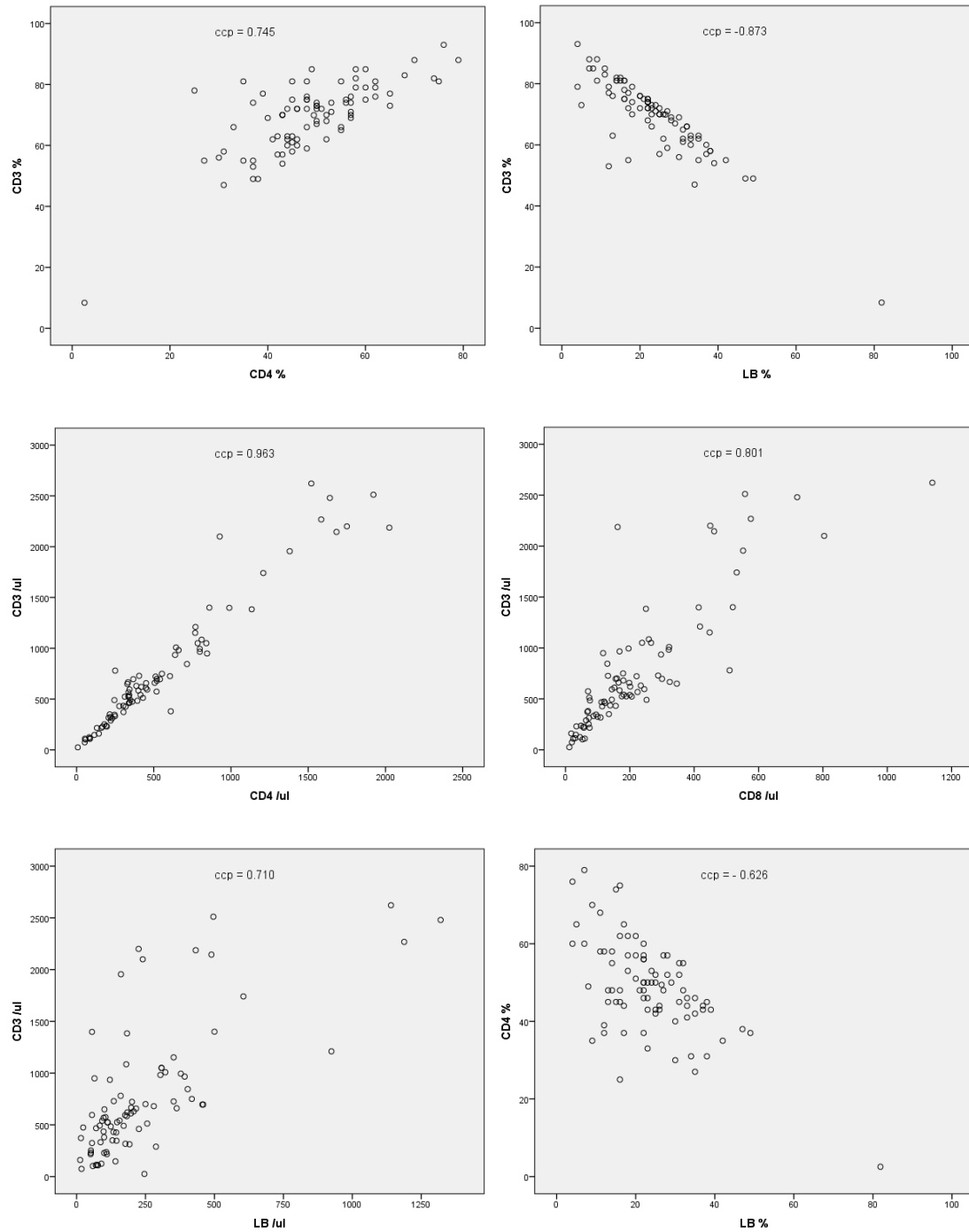


Figura 7: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 7 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

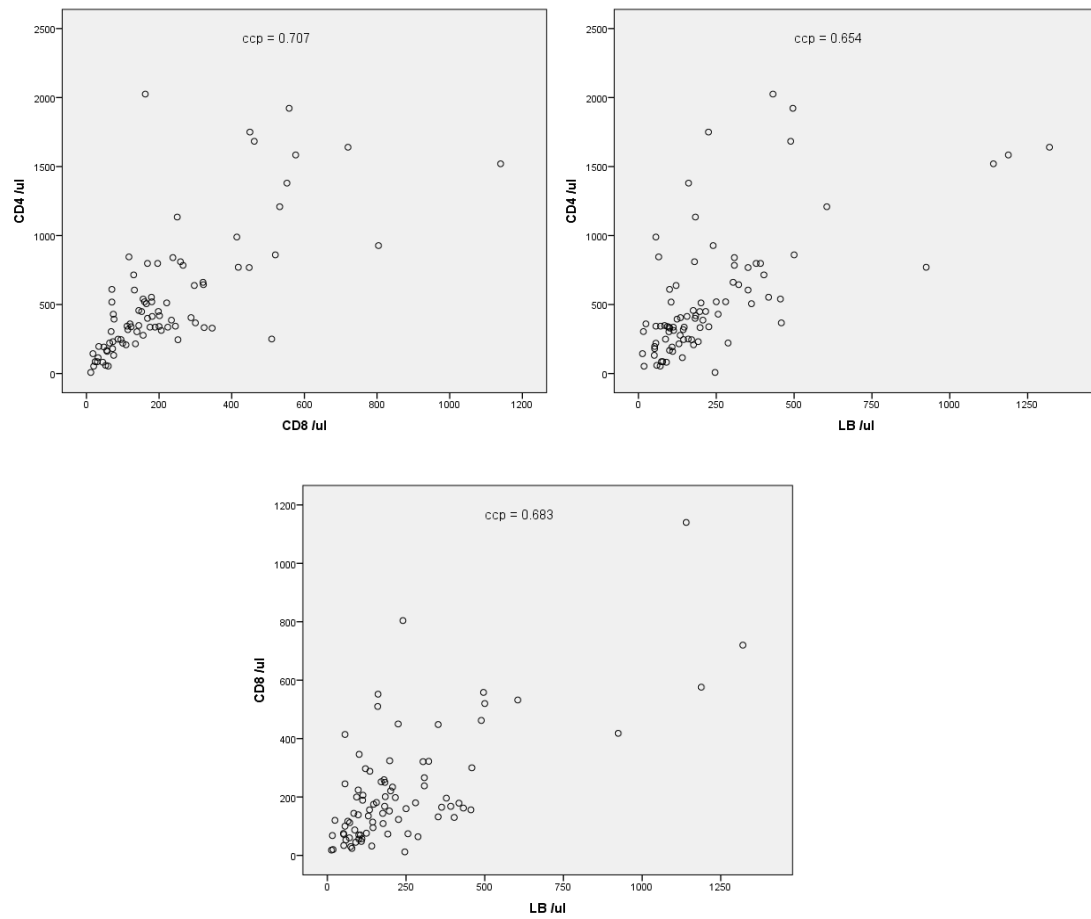


Figura 8: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 7 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson.

Correlación entre los distintos biomarcadores a los 30 días post-traspla

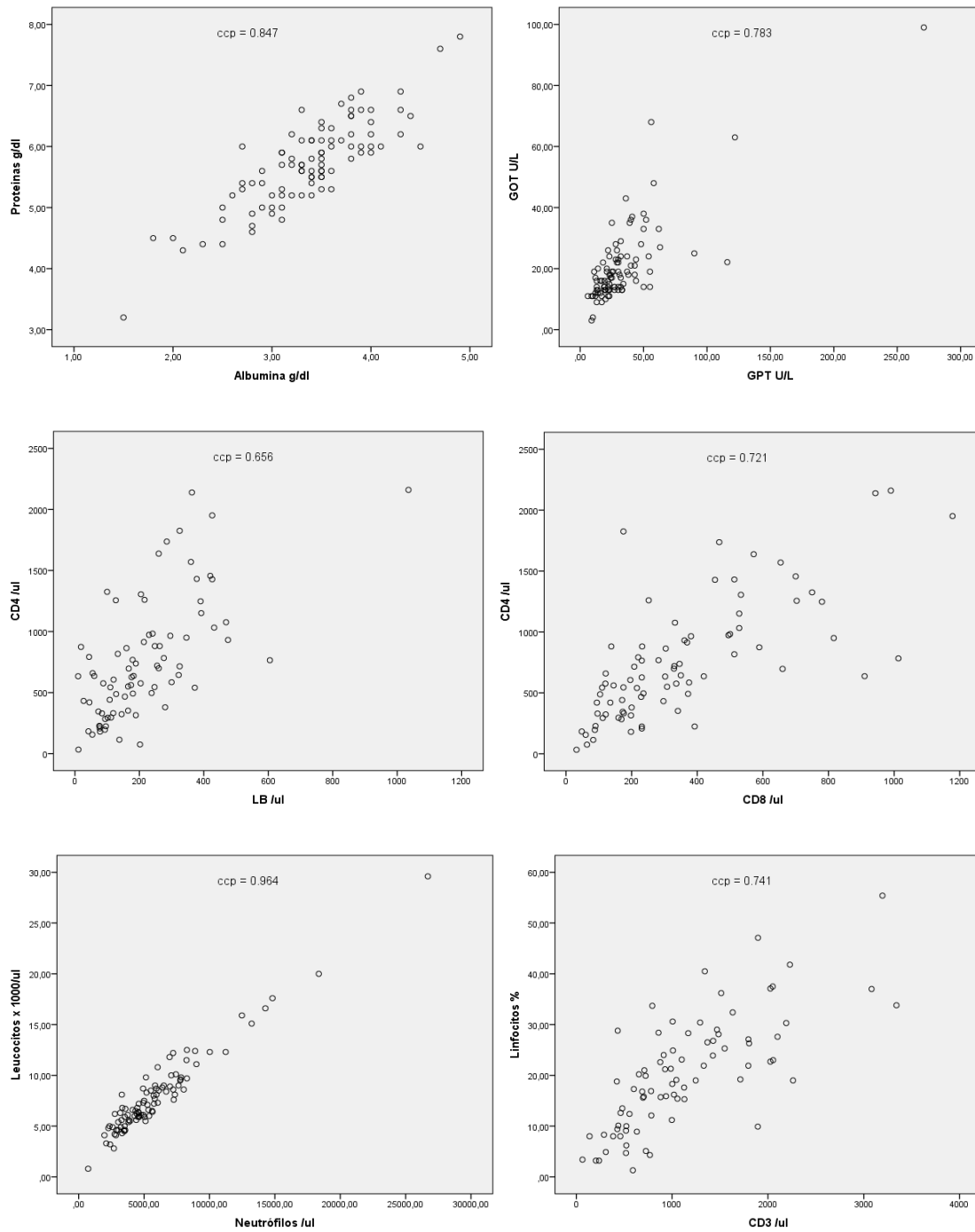


Figura 9: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 30 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson.

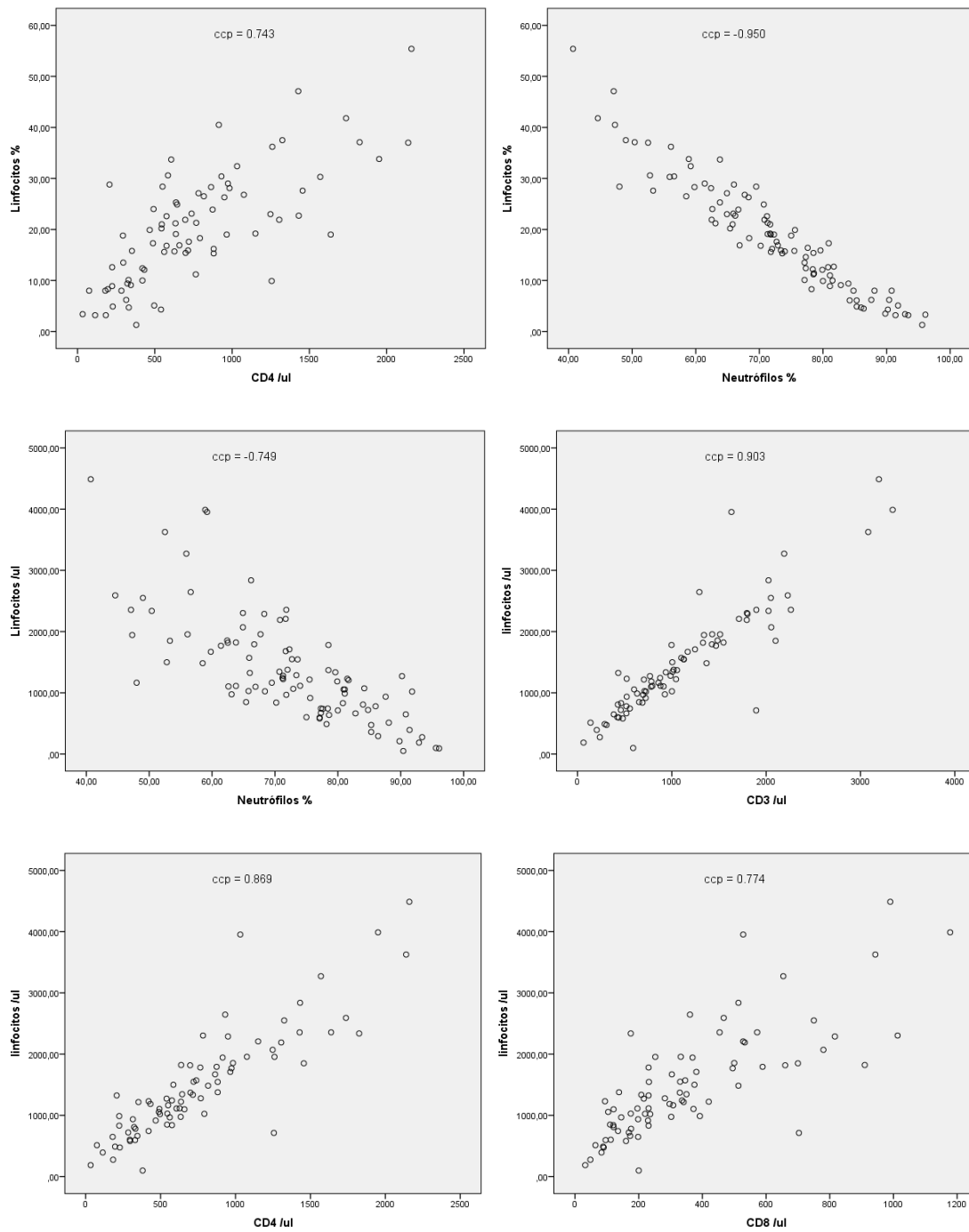


Figura 10: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 30 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson.

ANEXO3

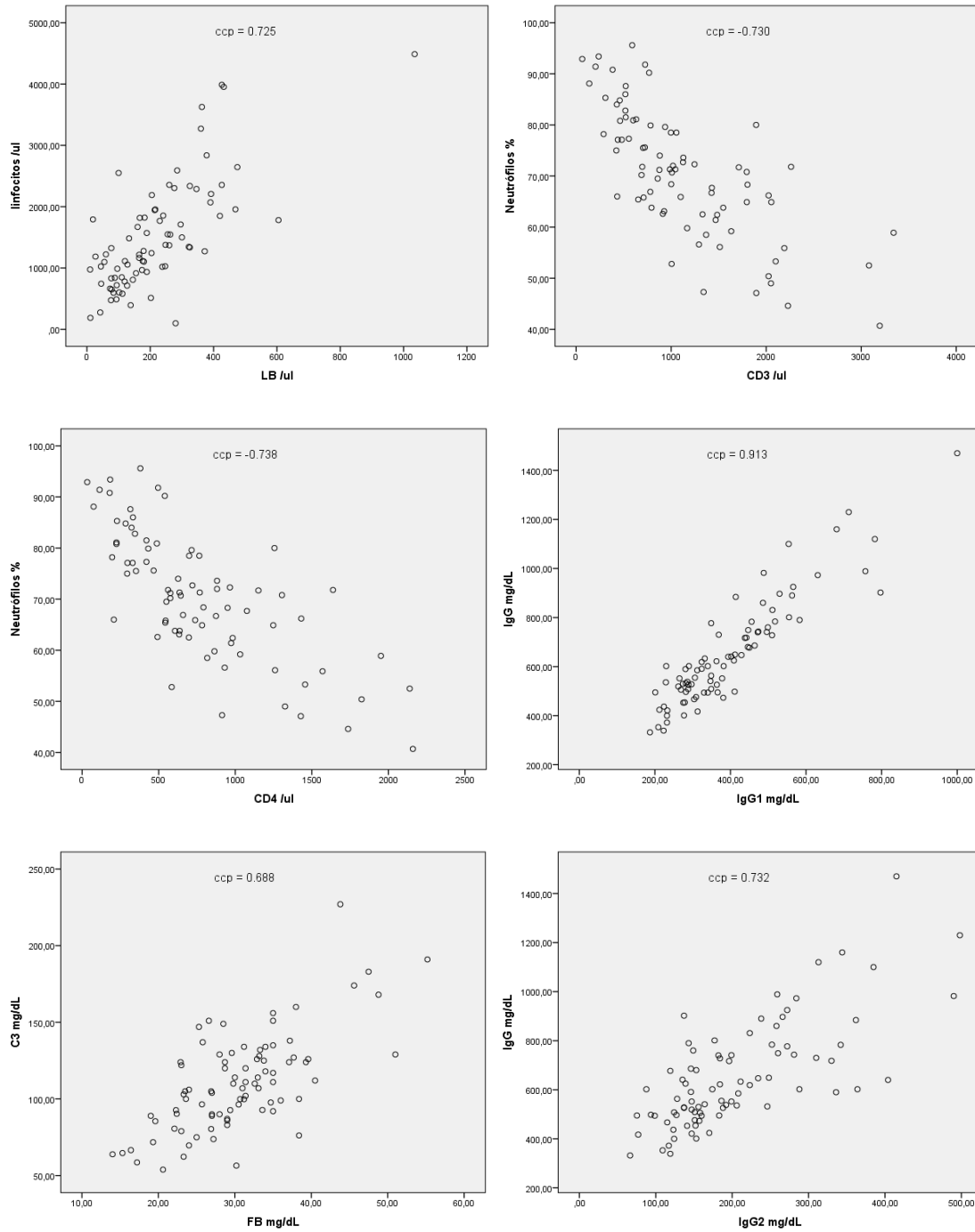


Figura 11: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 30 días post-trasplant. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

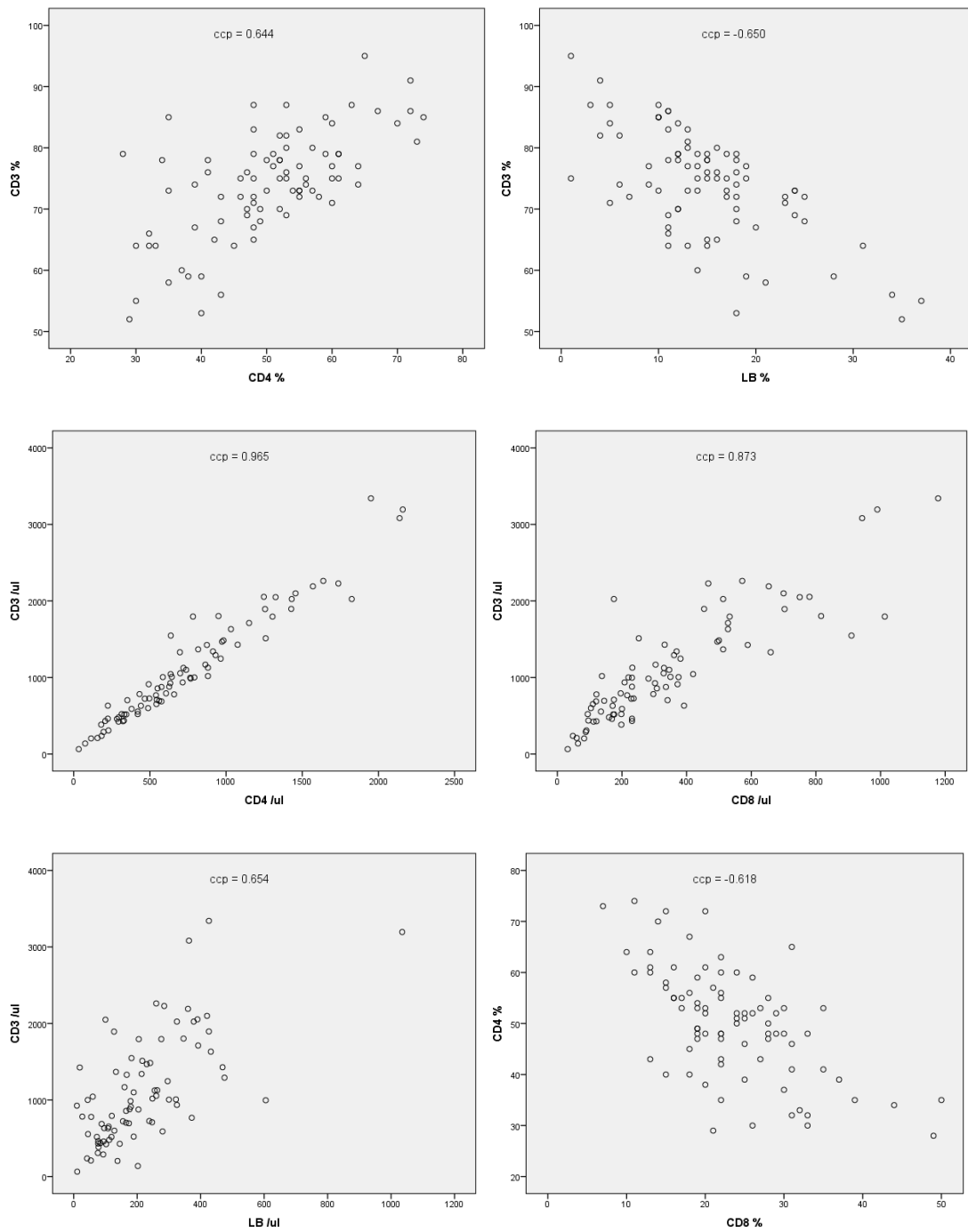


Figura 12: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 30 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson.

Correlación entre los distintos biomarcadores a los 90 días post-trasplante.

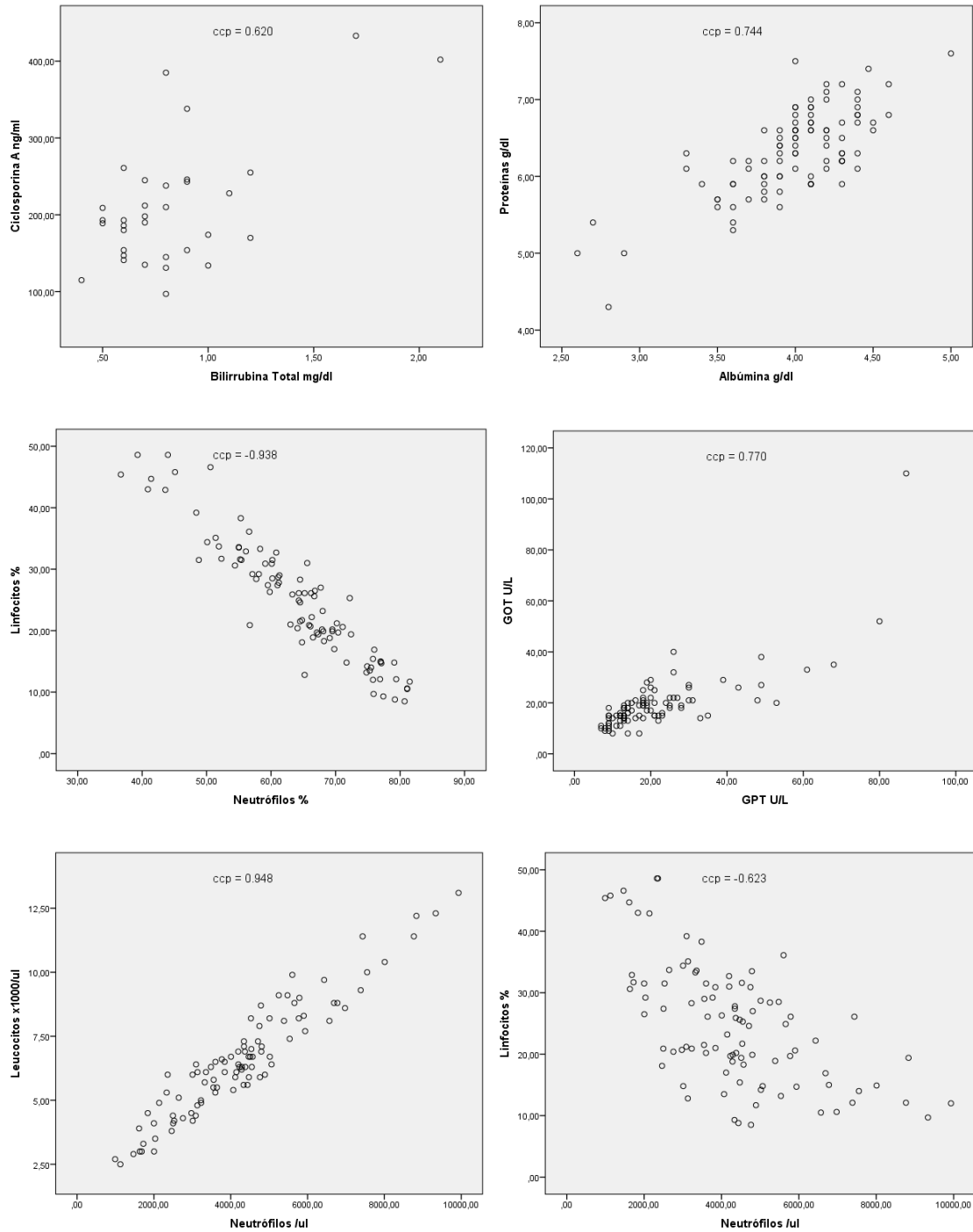


Figura 13: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 90 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson.

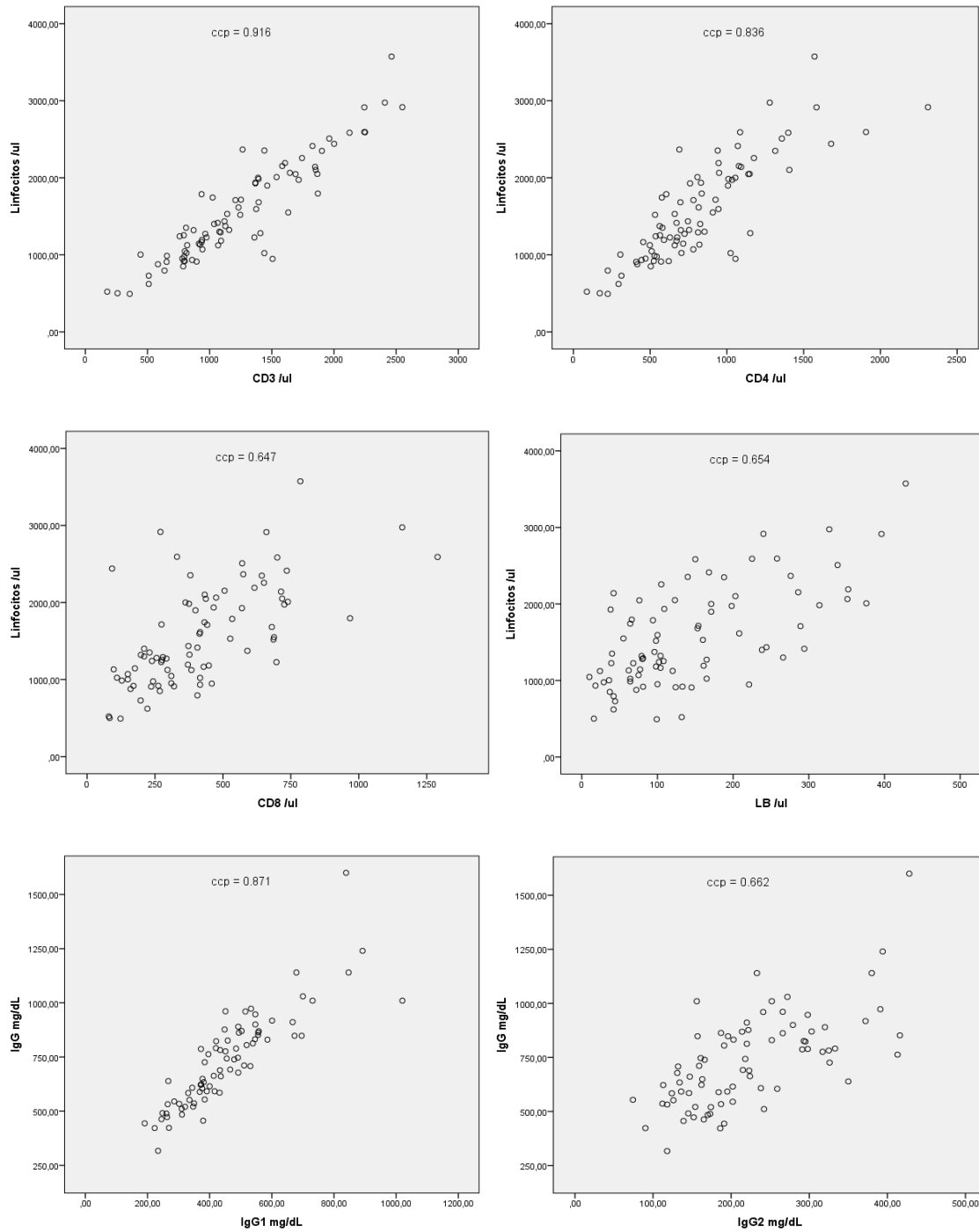


Figura 14: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 90 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson.

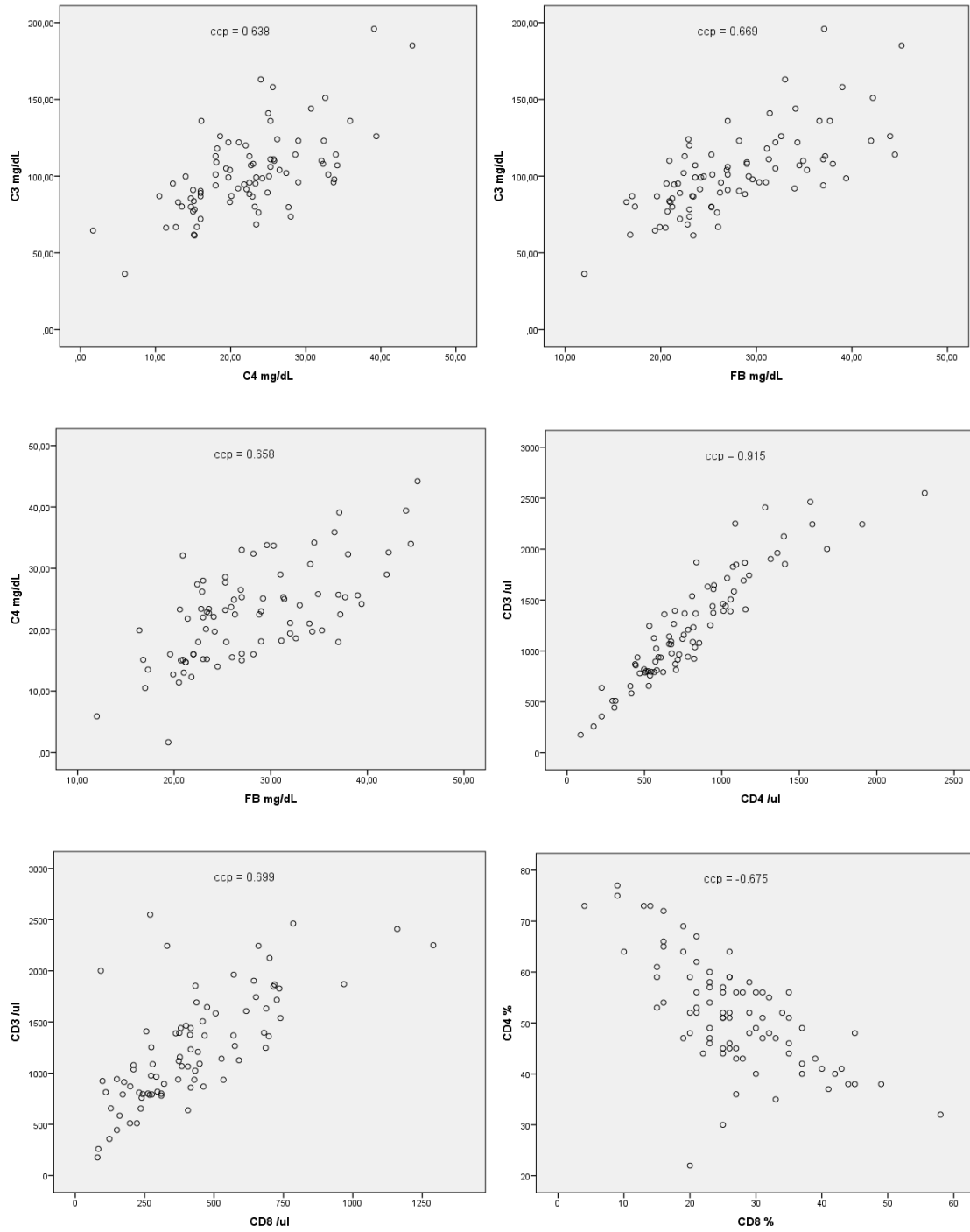


Figura 15: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 90 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

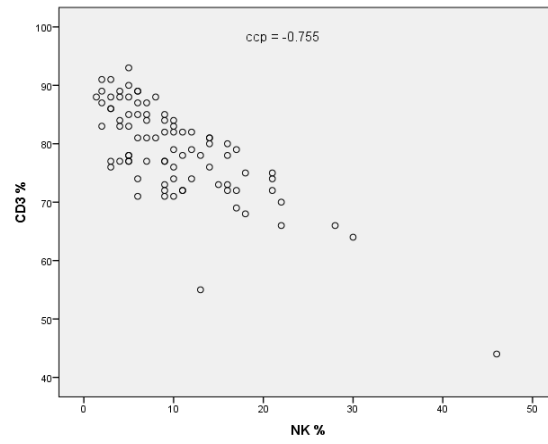


Figura 16: Correlación entre los distintos biomarcadores a los 90 días post-trasplante. Análisis de correlación mediante test bilateral de Pearson

ANEXO 4

**FIGURAS QUE ILUSTRAN LA ASOCIACIÓN DE LOS
BIOMARCADORES CON EVENTOS DE INFECCIÓN Y RECHAZO
AGUDO DEL INJERTO. ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS.**

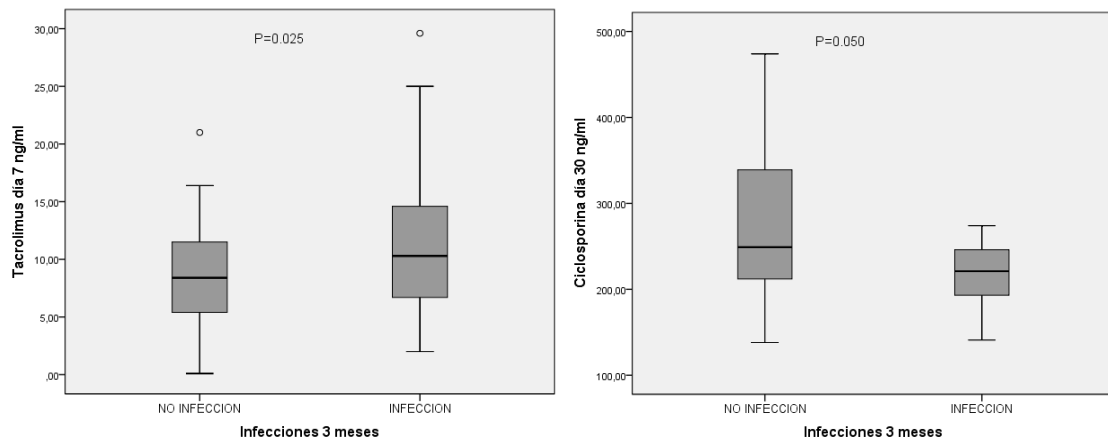


Figura 1: Asociación significativa entre niveles de fármacos inmunosupresores e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

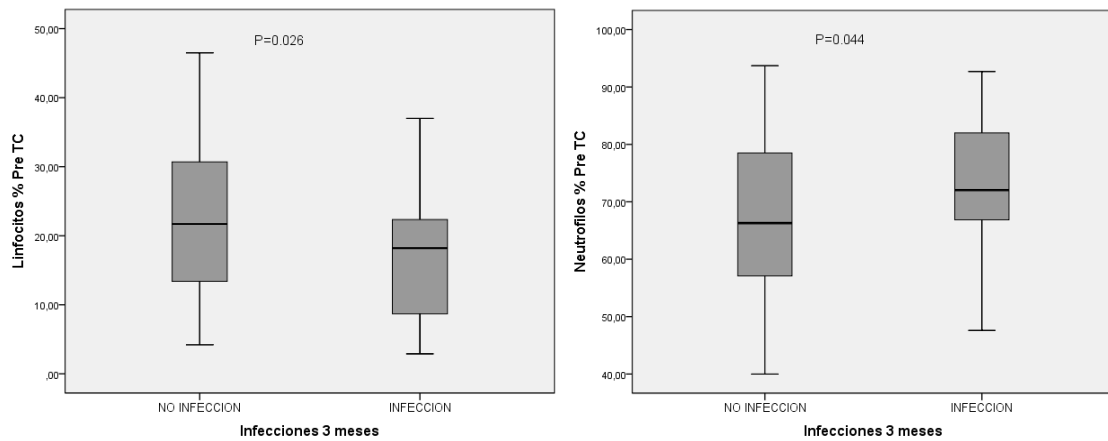


Figura 2: Asociación significativa entre variables en el punto pre-trasplante e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°). TC: Trasplante cardiaco

ANEXO 4

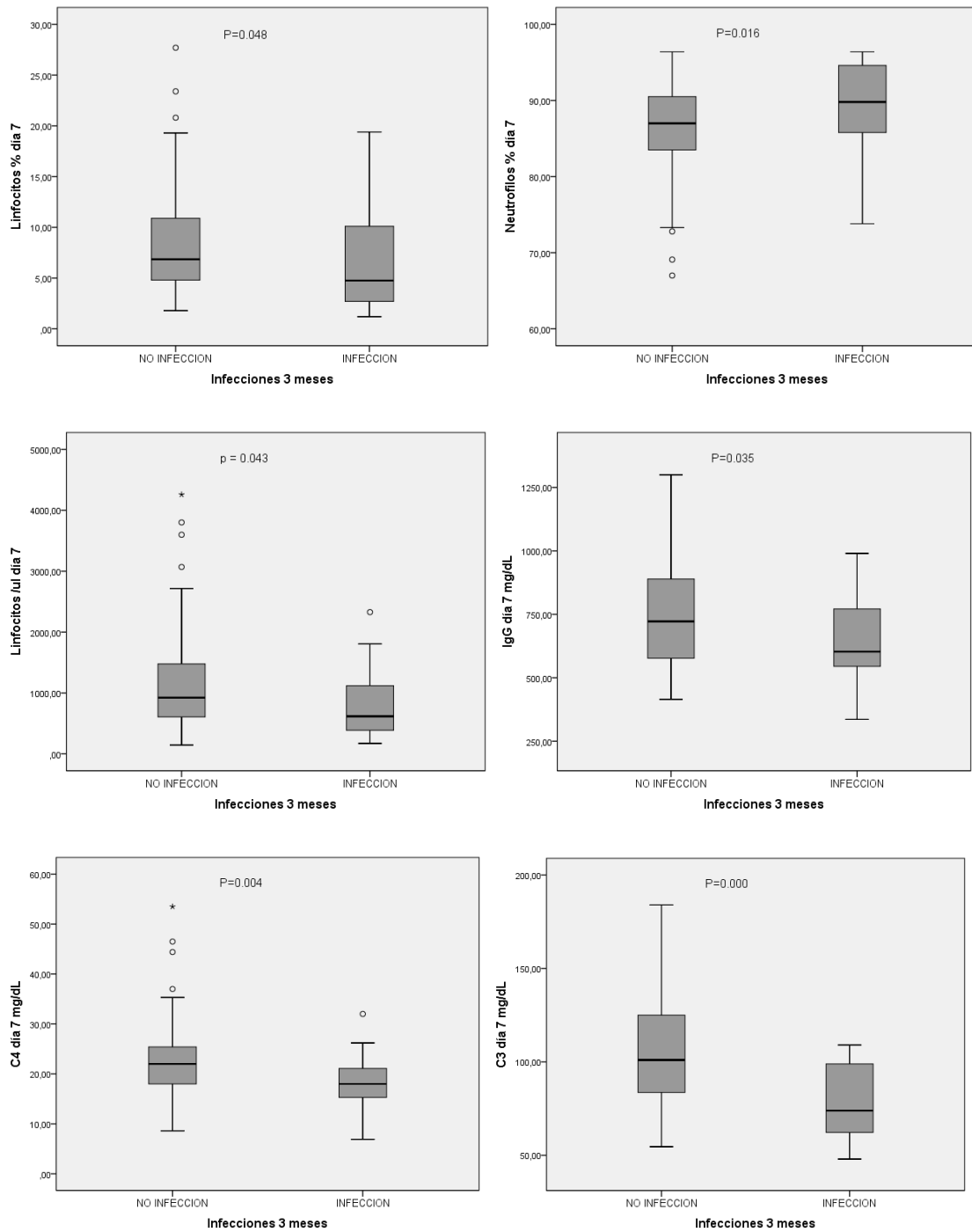


Figura 3: Asociación significativa entre variables a los 7 días post-trasplante e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

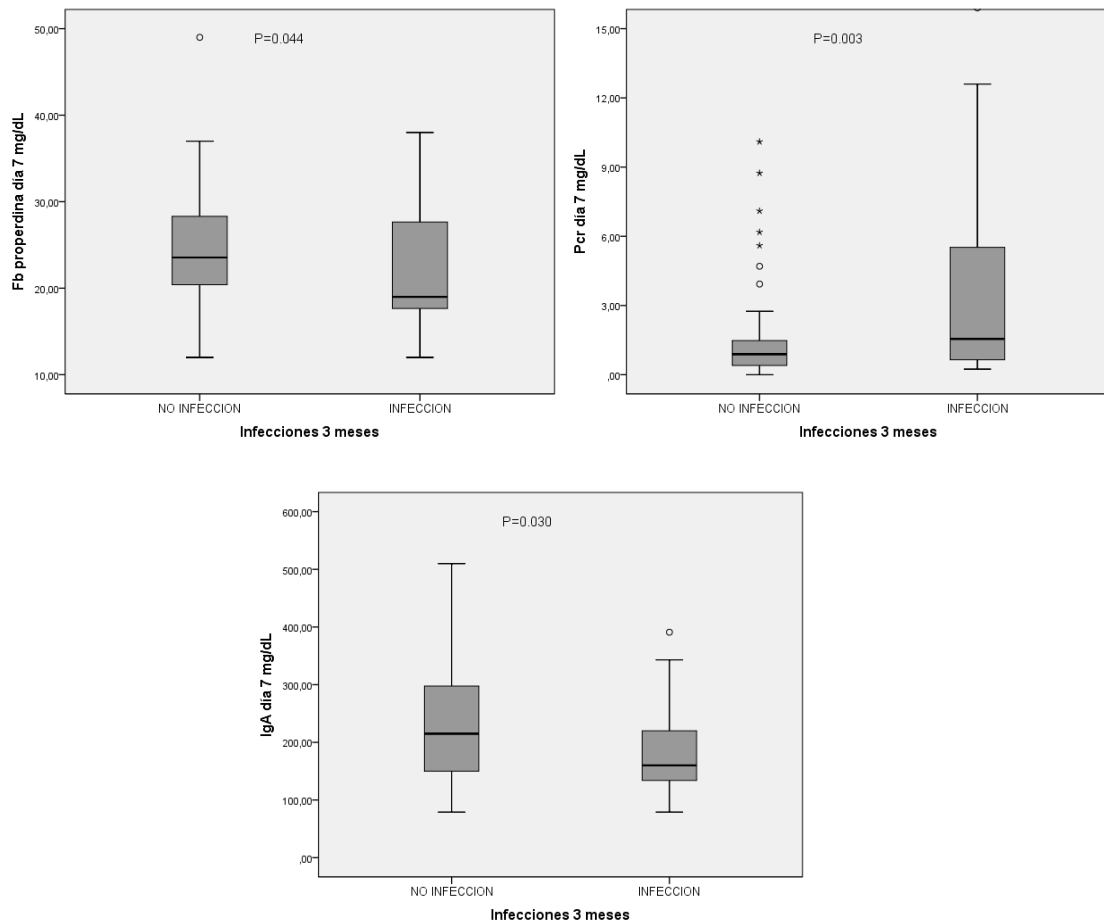


Figura 4: Asociación significativa entre variables a los 7 días post-trasplante e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (o)

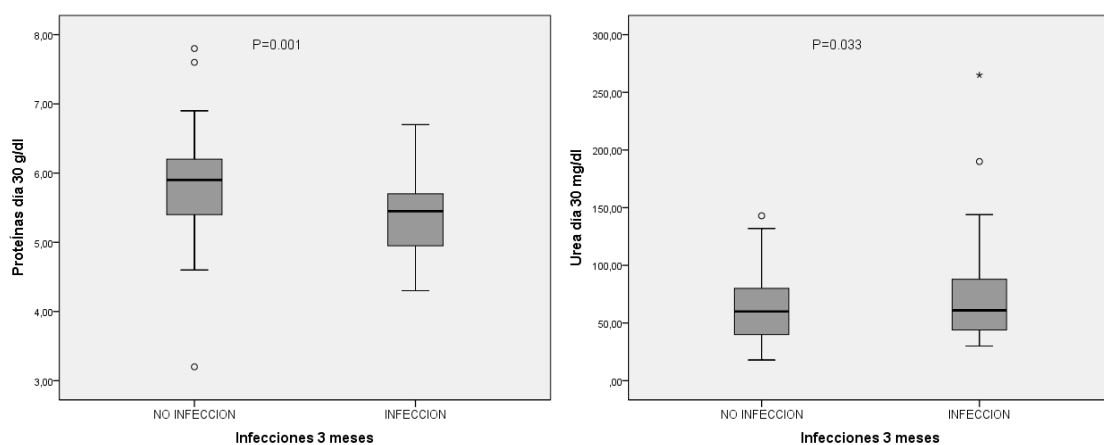


Figura 5: Asociación significativa entre variables a los 30 días post-trasplante e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (o)

ANEXO 4

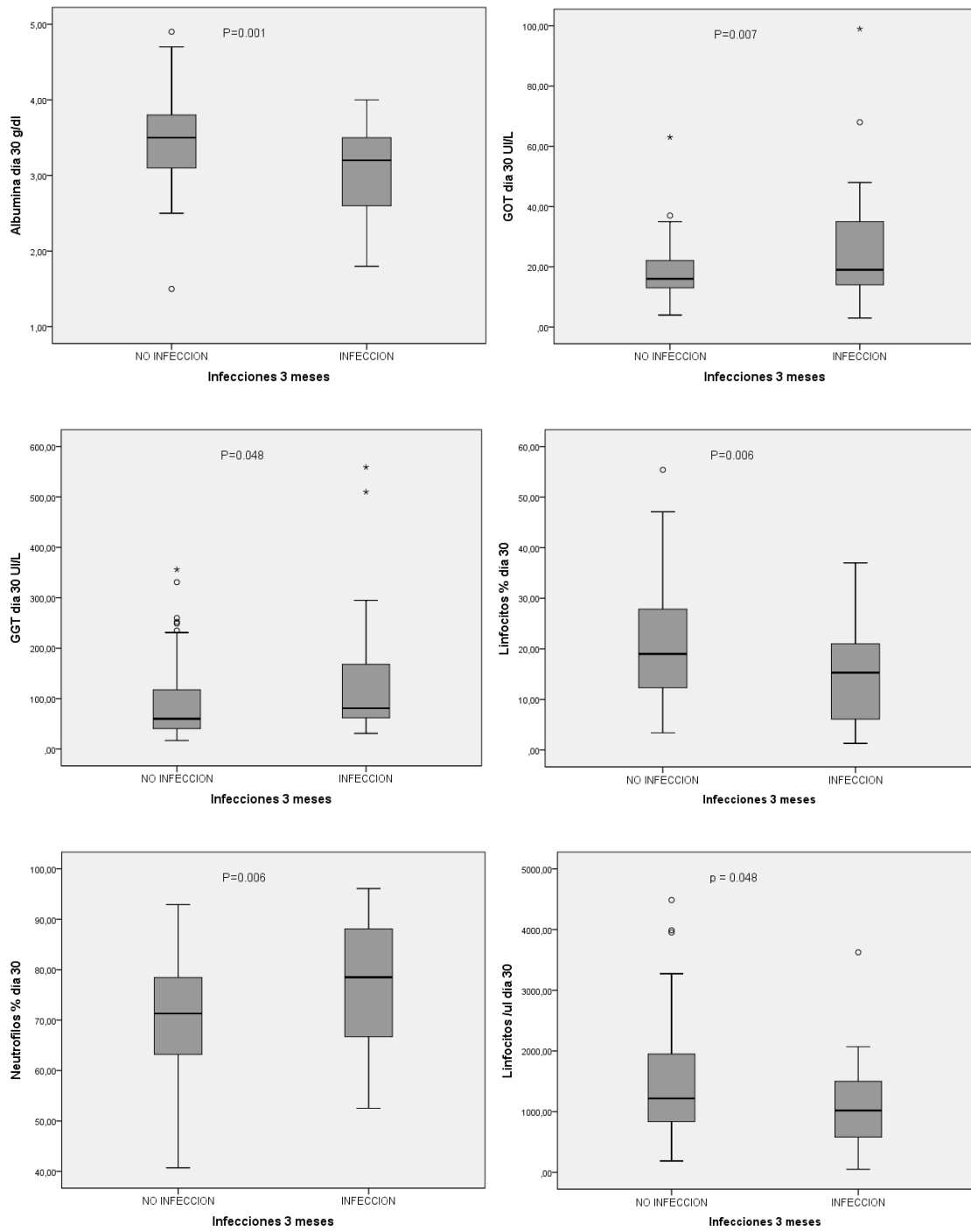


Figura 6: Asociación significativa entre variables a los 30 días post-trasplante e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (o)

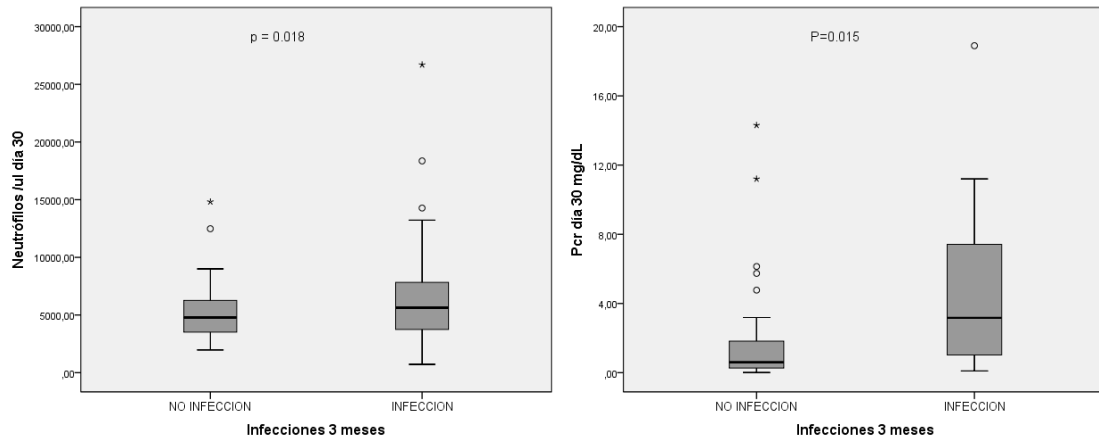


Figura 7: Asociación significativa entre variables a los 30 días post-trasplante e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (o)

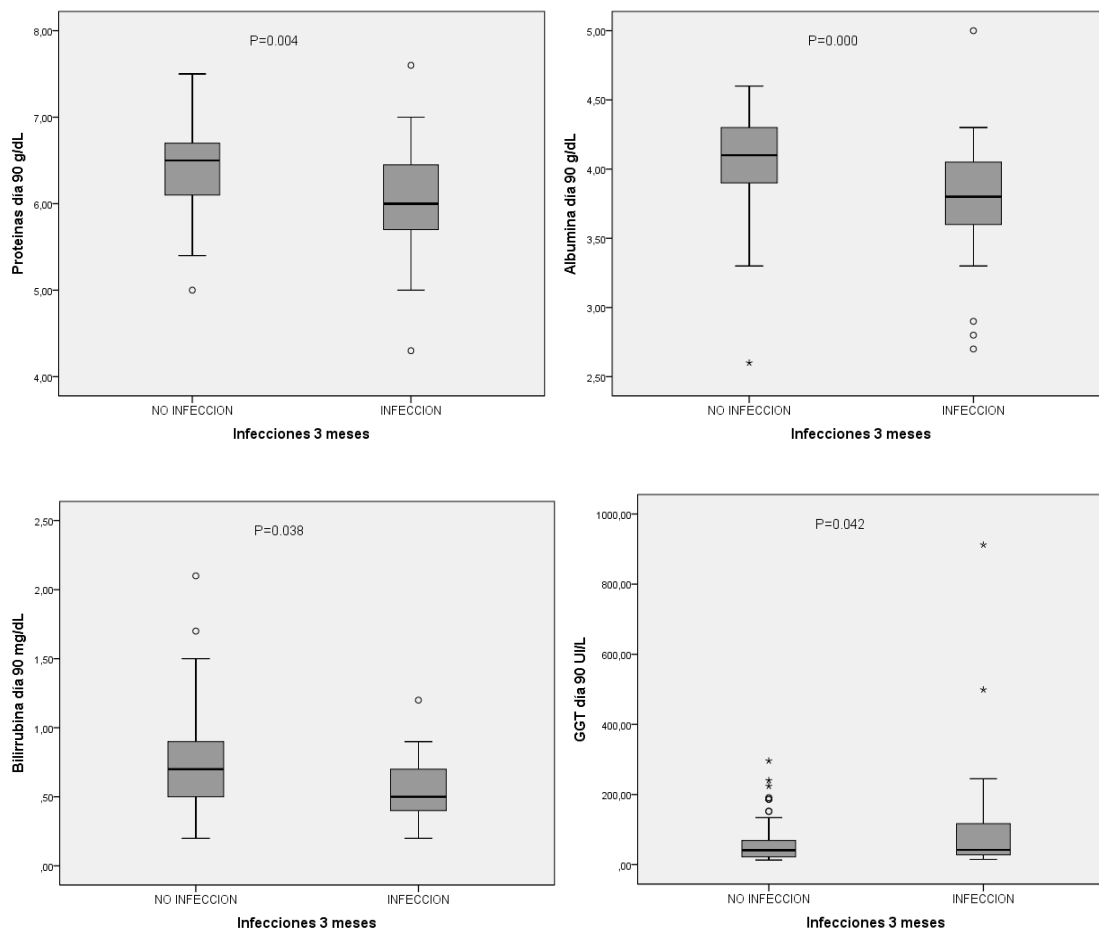


Figura 8: Asociación significativa entre variables a los 90 días post-trasplante e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (o)

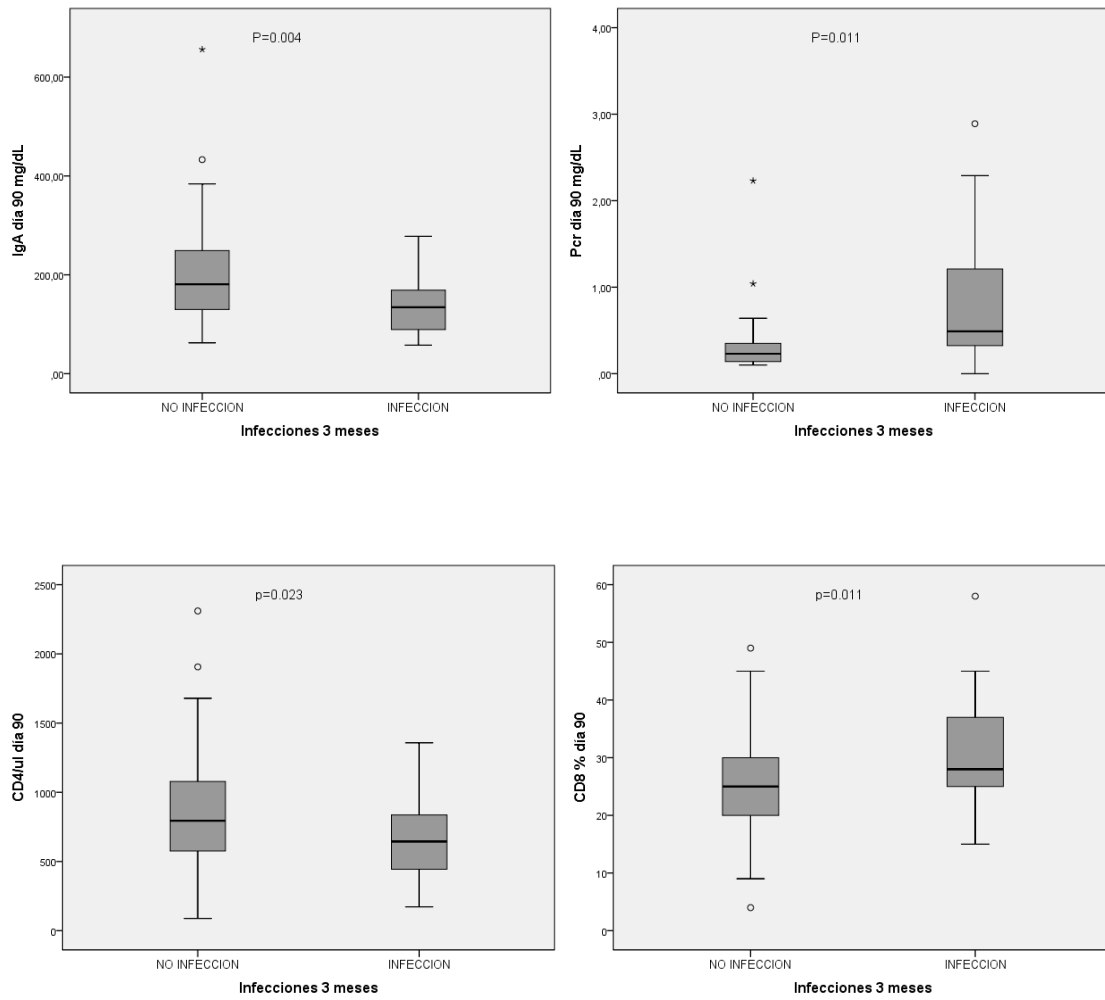


Figura 9: Asociación significativa entre variables a los 90 días post-trasplante e infección. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

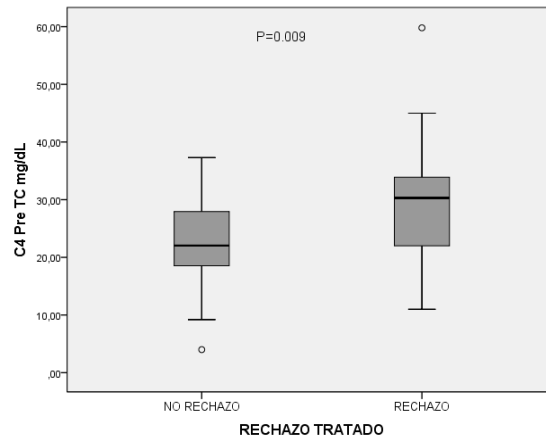


Figura 10: Asociación significativa entre variables en el punto pre-trasplante y rechazo agudo del injerto. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°). TC: Trasplante cardiaco

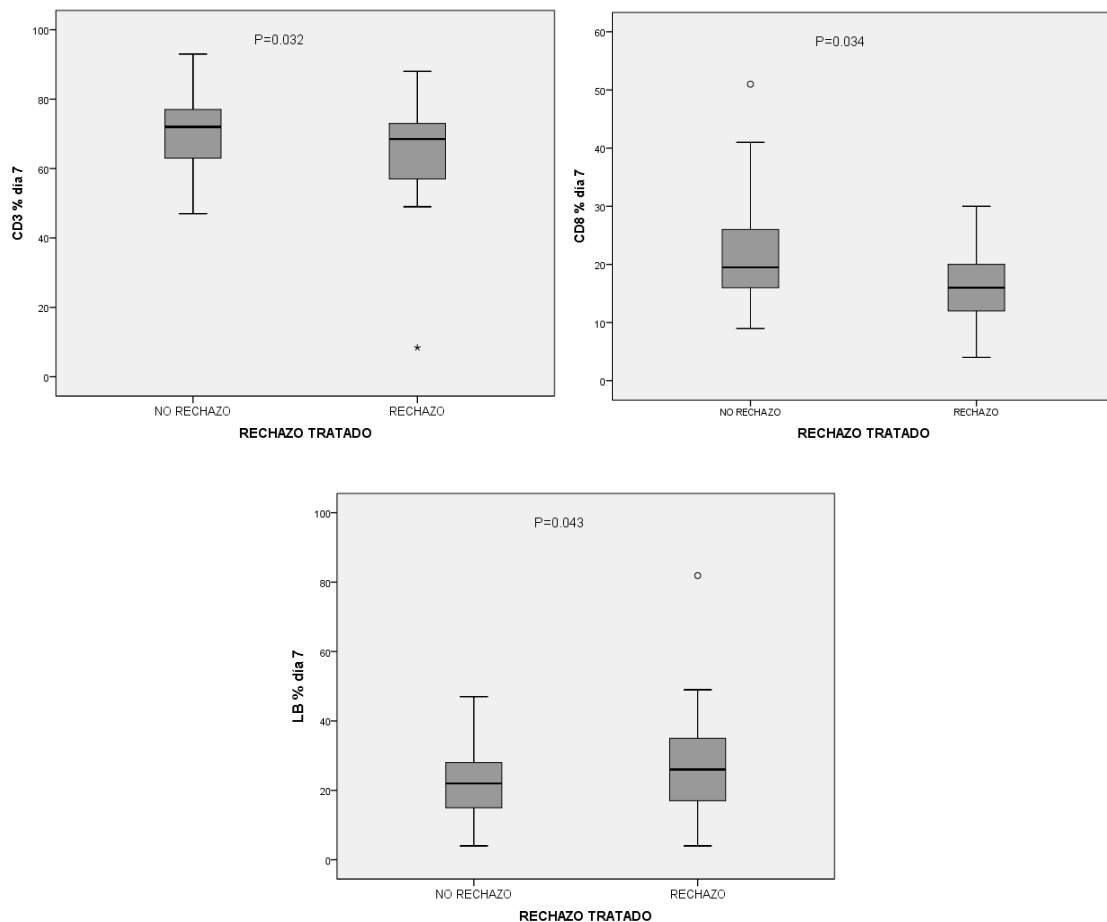


Figura 11: Asociación significativa entre variables a los 7 días post-trasplante y rechazo agudo del injerto. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)

ANEXO 4

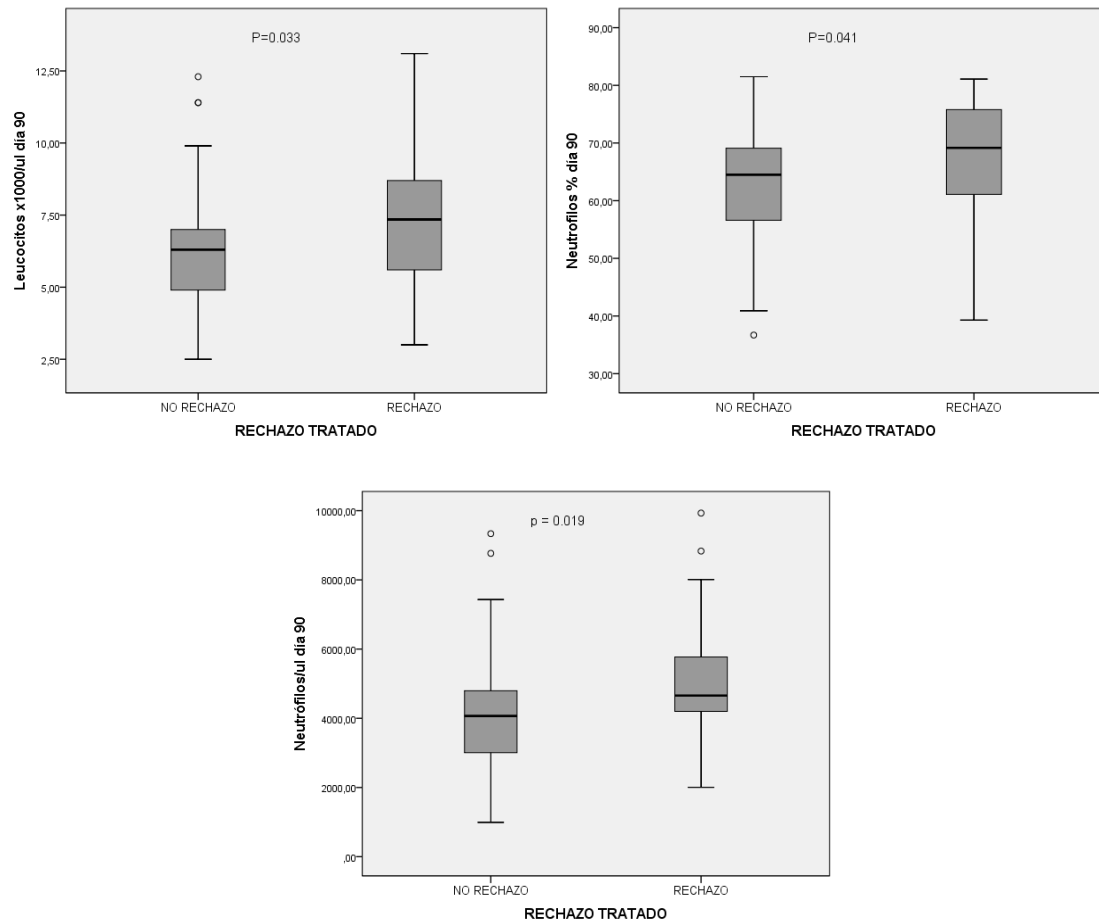


Figura 12: Asociación significativa entre variables a los 90 días post-trasplante y rechazo agudo del injerto. Análisis de comparación de medias T de Student bilateral, diagrama de cajas representa mediana, percentiles 25, 75, valores extremos, casos extremos (*) y casos atípicos (°)