

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, OFTALMOLOGÍA Y
OTORRINOLARINGOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Estudio del estado de maduración del linfocito B y factores
solubles asociados a rechazo e infección en pacientes
sometidos a trasplante de órgano sólido**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Leticia Calahorra Melero

DIRECTORES

Javier Alberto Carbone Campoverde
Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese

Madrid, 2019



Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL

Facultad de Medicina

Ciudad Universitaria – 28040 Madrid

Inmunomed@med.ucm.es

***Javier Alberto Carbone Campoverde y Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese,
Facultativos especialistas del área del servicio de Inmunología del Hospital General
Universitario Gregorio Marañón,***

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación presentado por Leticia Calahorra Melero, realizado bajo nuestra dirección, y titulado: “Estudio del estado de maduración del linfocito B y factores solubles asociados a rechazo e infección en pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido”, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal que legalmente proceda.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a 10 de septiembre de 2018.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL



Tesis doctoral

**ESTUDIO DEL ESTADO DE MADURACIÓN DEL LINFOCITO B Y FACTORES SOLUBLES
ASOCIADOS A RECHAZO E INFECCIÓN EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE DE
ÓRGANO SÓLIDO**

Tesis presentada por Leticia Calahorra Melero para optar al grado de Doctora

Directores

Javier A. Carbone Campoverde y Elizabeth A. Sarmiento Marchese

Madrid, 2018

Leticia Calahorra Melero

Este trabajo se ha realizado gracias a
la financiación a cargo de los proyectos FIS 050839, FIS 081430, FIS 1101323, FIS 1501472

Con participación de Fondos FEDER, una manera de hacer Europa

Servicio de Inmunología
Hospital General Universitario Gregorio Marañón

“Hazlo lo mejor que puedas hasta que sepas más. Cuando sepas más, hazlo mejor”

Maya Angelou

Dar las gracias, ...

A todos los que me han ayudado, tanto académica como anímicamente, a que este proyecto saliese adelante. Porque ha habido momentos duros, en los que tirar la toalla era la opción más fácil, pero cada uno de vosotros hizo que mereciera la pena continuar. Gracias por confiar en mí.

Al Dr. Javier Carbone y la Dra. Elizabeth Sarmiento por guiarme en el camino de la investigación y darme la oportunidad de desarrollarme personal y científicamente. Por enseñarme lo que es la inmunología.

Al Dr. Javier Menárguez, jefe del servicio de anatomía patológica del hospital Gregorio Marañón, por permitirme realizar mi estancia en sus instalaciones y a todo su personal.

A los Dres. Antonio Gallego y Joaquín Navarro, por sus enseñanzas prácticas, sus buenos consejos y su comprensión durante los 6 años que he compartido con ellos. Porque no son sólo compañeros, también amigos.

Al Dr. Eduardo Fernández Cruz, por permitirme formar parte de este equipo y realizar esta tesis doctoral.

A la Dra. Laura Díaz, por enseñarme el mundo de la citometría, por sus ánimos, consejos y apoyo. Porque me llevo una amiga.

A los cardiólogos y nefrólogos del Gregorio Marañón, en especial al Dr. Iago Souza y la Dra. María Luisa Rodríguez. También al equipo de neumología del Hospital Marqués de Valdecilla, en especial al Dr. José Manuel Cifrián.

A mi tutora, la Dra. Narcisa Martínez, y a María Ángeles Vicente, responsable del programa de doctorado de la UCM, por facilitar tanto (¡tanto!) los trámites.

Agradezco a todos los centros colaboradores de los proyectos de investigación, cuyos datos son presentados en esta tesis doctoral, incluido el Gregorio Marañón.

Gracias en especial a las enfermeras del hospital de día de cardiología y a los técnicos de hematología y bioquímica por facilitarme la labor investigadora.

A mis colegas y amigos, Sonia, Laura, Raquel, Boris, Sergiu, Marisa, Françes, Sandra e Ikram, por acompañarme a diario y estar ahí para sacarme una sonrisa cuando hacía falta.

A mis amigas, Aitana, Clara, Elena, Laura, Vega, Vero y a “las del colegio”, por los ánimos. Por estar pendientes de mí. Por distraerme cuando lo necesitaba, porque los amigos son la familia que se elige.

Mención especial a Isabel y César, amigos y compañeros de aventuras. Porque nadie mejor que ellos sabe lo que significa este gracias.

A mi tribu, mi familia, porque sin ellos no sería lo que soy. En especial a mis padres, porque hicieron lo imposible para darme una buena educación, valores y enseñarme lo que era el sacrificio. Porque pusieron los cimientos. Porque sin su esfuerzo no estaría hoy aquí. A Inma, Jesús, Lidi, Mila, Aitor y Cris, mi otra familia. Gracias por apoyarme y darme ánimos para continuar.

A Ramiro, mi compañero, mi amigo. Por ser y estar, por darme seguridad y hacer de mí la mejor versión. Porque sin tu apoyo esto hubiese sido imposible.

Gracias a todos

	Págs.
<i>Summary</i>	17
<i>Resumen</i>	21
<i>Abreviaturas</i>	27
I. INTRODUCCIÓN	33
1. Consideraciones generales del trasplante de órgano sólido	35
1.1. Consideraciones generales del trasplante cardíaco	37
1.2. Consideraciones generales del trasplante pulmonar	41
1.3. Consideraciones generales del trasplante renal	45
2. Inmunología del trasplante	47
2.1. Antígenos de histocompatibilidad y aloantígenos	47
2.2. Papel del linfocito T en trasplante	48
2.3. Papel del linfocito B en trasplante	49
2.4. Estudio inmunológico de donante y receptor	53
2.4.1. Tipos de rechazo	54
3. Fármacos Inmunosupresores	57
3.1. Mecanismos moleculares	57
3.1.1. Glucocorticoides	57
3.1.2. Inhibidores de la Calcineurina: ciclosporina y Tacrolimus	58
3.1.3. Inhibidores de la síntesis de nucleótidos. Antimetabolitos	59
3.1.3.1. Azatioprina	59

3.1.3.2. Ácido micofenólico/ mofetil micofenolato	59
3.1.4. Anticuerpos monoclonales	60
3.1.4.1. Daclizumab	61
3.1.4.2. Basiliximab	61
3.1.5. Anticuerpos policlonales: ATG	62
3.1.6. Inhibidores de la señal de proliferación: mTOR. Everolimus	62
3.2. Regímenes de inmunosupresión en trasplante: inducción y mantenimiento	63
4. Problemas asociados a la terapia inmunosupresora. Infecciones	65
5. Monitorización inmunológica del paciente trasplantado	69
5.1. Marcadores asociados a infección postrasplante	69
5.2. Marcadores asociados a rechazo	71
5.3. Posibles marcadores estudiados en esta tesis doctoral	71
5.3.1. Adenosina 5'- trifosfato. ATP	71
5.3.2. Factor activador de célula B. BAFF	72
5.3.3. Factores de complemento: C3d y C4d	74
5.3.4. Interleucina- 10	74
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	79
1. Hipótesis	81
2. Objetivos	82
2.1. Objetivos generales	82
2.2. Objetivos específicos	82
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
1. Materiales	87

1.1.	Material de laboratorio	87
1.2.	Material biológico	88
1.3.	Soluciones, tampones y reactivos para ELISA	91
1.4.	Soluciones, tampones y reactivos para citometría de flujo	92
1.5.	Programas estadísticos e informáticos	93
2.	Métodos	95
2.1.	Métodos empleados sobre células	95
2.1.1.	Pacientes y controles	95
2.1.2.	Caracterización de subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica humana mediante citometría de flujo	96
2.1.3.	Cuantificación ATP sobre linfocitos T CD4+	103
2.2.	Estudio de marcadores solubles	106
2.2.1.	ELISA para la cuantificación de factor activador de célula B (BAFF/BLyS) ...	106
2.2.2.	ELISA para la cuantificación de interleucina 10	110
2.3.	Métodos aplicados sobre tejidos	113
2.3.1.	Marcaje de C3d y C4d en biopsias de pacientes trasplantados cardíacos	113
2.4.	Recogida de datos	114
IV.	RESULTADOS	117
1.	Estado del paciente antes del trasplante: Estudios pretrasplante	119
1.1.	Uso de asistencia circulatoria	119
1.2.	Etiología del trasplante	121
1.2.1.	Etiología en trasplante cardíaco	121
1.2.2.	Etiología en trasplante pulmonar	122
1.2.3.	Etiología en trasplante renal	123
2.	Evolución de las subpoblaciones linfocitarias en trasplante cardíaco	124
3.	Estudio de poblaciones con fenotipo B regulador	139
3.1.	Descriptivos de poblaciones con fenotipo B regulador en controles sanos	139
3.2.	Descriptivos de poblaciones con fenotipo B regulador en trasplante cardíaco	139

3.3.	Descriptivos de poblaciones con fenotipo B regulador en trasplante renal	142
4.	Cinéticas de factores solubles asociados a célula B	144
4.1.	Cinética del factor activador de célula B en trasplante cardíaco	144
4.2.	Cinética del factor activador de célula B en trasplante pulmonar	145
4.3.	Cinética del factor activador de célula B en trasplante renal	146
4.4.	Niveles de interleucina 10 en trasplante de órgano sólido	148
5.	Alteraciones en trasplante de órgano sólido asociadas con desarrollo de infección....	149
5.1.	Alteraciones en trasplante cardíaco asociadas a infección	149
5.2.	Alteraciones en trasplante pulmonar asociadas a infección	162
5.3.	Alteraciones en trasplante renal asociadas a infección	166
6.	Alteraciones en trasplante de órgano sólido asociadas a la aparición de episodios de rechazo	169
6.1.	Alteraciones en trasplante cardíaco asociadas a rechazo	169
6.1.1.	Poblaciones B reguladoras en pacientes con episodios de rechazo	180
6.1.2.	Poblaciones B reguladoras en enfermedad vascular del injerto	181
6.1.3.	Factor activador de célula B en enfermedad vascular del injerto	184
6.2.	Alteraciones en trasplante pulmonar asociadas a rechazo	185
6.3.	Alteraciones en trasplante renal asociadas a rechazo	188
7.	Estudio de los niveles de ATP intracelular en linfocitos TCD4+	192
7.1.	Niveles de ATP en enfermedad vascular del injerto	192
7.2.	Niveles de ATP en trasplantados cardíacos con infección	194
7.3.	Niveles de ATP en trasplantados cardíacos con rechazo	195
8.	Detección de C3d y C4d en biopsias cardíacas	196
V.	DISCUSIÓN	199
VI.	CONCLUSIONES	219
VII.	BIBLIOGRAFÍA	225
VIII.	ANEXOS	247
IX.	PUBLICACIONES	255

Organ transplantation is an approach for various end-stage heart, kidney and lung diseases. However, a mayor pitfall of transplantation is the requirement of immunosuppressive therapy necessary for organ rejection prevention, whereas it can also pose a risk for infection and tumor development. Specifically, infectious complications are the main cause of death during the first-year post-transplant.

Until now, CD3+ cells were the focus of transplantation studies with scarce research of the role of B cells, mostly limited to their role in antibody production. However, B cells also poses regulatory functions that they exert through production of different cytokines, such as interleukin 10 (IL-10), IL-35 or TGF- β . Depletion of B cells and their mediators may alter cellular homeostasis and cause a deleterious shift in the delicate inflammatory/regulatory balance.

Post-transplant monitoring of immune response is of crucial importance, given the fact that early detection and treatment of infection or transplant rejection leads to significant decrease in morbidity and mortality. However, reliable markers to detect patients at risk for development of these complications are lacking. One molecule with this capacity could be B-cell activating factor (BAFF). BAFF is a cytokine belonging to the tumor necrosis factor family and it has an important role in survival, proliferation and differentiation of B-cells. The absence of BAFF or its receptor causes profound lymphopenia, whereas increased levels of BAFF are associated with generation of autoreactive B lymphocytes. Several studies have already demonstrated a correlation between elevated BAFF levels and chronic graft versus host disease, as well as BAFF and autoimmune disease. Due to the complexity of immune response, different markers should be evaluated in conjunction.

Hypothesis: Patients undergoing solid organ transplantation present with both pre- and post-transplant immunological alterations. Monitoring of subsets of B cells and cytokines associated with B cell activation and survival could be an important strategy to identify patients at risk of infection or rejection and predict allograft outcome.

Objectives: Assessment of B cell immunophenotypic profile pre- and post-transplant, dynamics of alteration in B cells and associated soluble factors and relationship between these parameters and transplant-related complications.

Materials and Methods: We studied the kinetics of B lymphocyte subsets in whole blood of 217 heart transplant (HT) recipients pre- and post-transplantation, with 7 days, 30 days, 90 days, 180 days and one-year follow-up. Pre- and post-transplantation BAFF serum levels were also evaluated at various time points up to one year in HT (N= 131) patients and up to six months in lung and kidney transplant (KT, N=56) patients and lung transplant (LT, N=82), establishing a dynamic and comparison with the healthy control group (HC, N =51). In addition, Interleukin 10 (IL-10) serum levels were measured before transplantation in all three types of transplanted patients studied. Regulatory B cell phenotype was determined in whole blood of HC (N =23), HT (N =41) and KT recipients (N =17) within the established follow-up period, as well as in patients diagnosed with cardiac allograft vasculopathy (CAV, N =10). For CAV patient's intracellular adenosine triphosphate (ATP) levels in CD4+ cells were also quantified using commercial kit (N = 35). Fixation of complement factors C3d and C4d was determined in 78 cardiac biopsies in a group of transplant patients with rejection (N =59) by immunohistochemical analysis.

Results: During the pre-transplantation period, patients demonstrated to be immunocompromised, either by the etiology of the underlying disease requiring transplantation or by use of mechanical devices. HT recipients with mechanical circulatory assistance had lower levels of all humoral and hematologic markers compared to non-carriers, including BAFF, but demonstrated higher percentages of B lymphocytes compared to non-carriers. Higher numbers of IgG (1123.62 ± 386.92 mg/dl), IgG2 (4.21 ± 1.94 g/L) and IgG3 (0.69 ± 0.43 g/L) were found in patients with dilated cardiomyopathy (DCM) compared to the ischemic cardiomyopathy group (IC), (IgG: 992.53 ± 332.55 mg/dl; $p = 0.03$; IgG2: 3.25 ± 1.63 g/L; $p = 0.01$; IgG3: 0.48 ± 0.24 g/L; $P = 0.00$). The IC group presented higher values of complement C3 factors (123.00 ± 39.59 mg/dl; 113.76 ± 28.06 mg/dl; $p = 0.03$) and C4 (26.17 ± 11.08 mg/dl; 22.99 ± 14.25 mg/dl; $p = 0.01$), as well as platelet values ($232.28 \pm$

96.04*10³/μl; 218.40 ± 90.63*10³/μl; p = 0.03) compared to DCM group. LT recipients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) had lower levels of IgG (908,52 ± 309,23 mg/dl) compared to idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (1480.34 ± 707.02 mg/dl; p = 0.00) and cystic fibrosis (CF), (1562.50 ± 378.06 mg/dl; p = 0.00). Furthermore, IL-10 was significantly decreased in patients with COPD (26.38 ± 27.64 pg/ml) compared with CF patients (64.65 ± 56.62 pg/ml; p = 0.00).

All B cell subsets in HT recipients were at lower percentages compared to HC during pre-transplantation period, reaching highest numbers at day 7 post-transplant, with a further progressive decline during one year of follow-up, ultimately remaining below pre-transplantation values than HC. The only subset demonstrating different dynamics were the *B exhausted* (CD19 + CD27-IgD-IgM-) cells, that measured higher numbers and percentages compared to HC, with further increment during post-transplant period. Regarding regulatory B cells, their values in HT and KT were also lower than the values obtained from healthy population.

BAFF levels have been found elevated during pre-transplantation period in HT, LH and KT, proving to be a risk factor for the development of infections and rejection post-transplant. Patients with CAV also had higher BAFF serum levels compared to baseline levels. Another cytokine being found associated to infection is IL-10. KT patients with pre-transplant IL-10 levels higher than 29 pg/ml were found to have an increased risk of infection during post-transplant period.

HT recipients who had pre-transplant class- switched memory B cell (SW) percentages below 39%, and CD19+CD27- higher than >75% and memory B cells lower than 25% at six months, had a greater risk of developing infectious events in the post- transplant period.

Patients with cardiac transplant rejection had significantly lower levels of naïve CD19+ CD27- lymphocytes (R: 61.58 ± 16.46% vs. NR: 74.03 ± 12.80%; p = 0.02) and higher memory B cell levels (R: 36.49 ± 16.16 % vs. NR: 24.73 ± 12.28%; p = 0.02) at six months in comparison to non-rejectors. Regulatory B cells were found diminished in patients with rejection

compared to non-rejectors. On the other hand, patients with CAV had higher percentages of regulatory B cells compared to patients without rejection, but lower than HC. In addition, CAV patients had significantly higher basal ATP levels compared to surgical controls (CAV: 8.59 ± 6.72 ng/ml vs. Control: 4.02 ± 3.99 ng/ml; $p = 0.02$). Infection induced ATP levels in HT recipients measured significantly lower values compared to those without infectious complications (I: 180.89 ± 109.86 ng/ml vs. NI: 272.96 ± 111.52 ng/ml; $p = 0.02$), while in HT recipients with rejection basal ATP levels were higher than in those without rejection (R: 9.22 ± 6.80 ng/ml vs. NR: 4.40 ± 4.44 ng/ml; $p = 0.03$). Patients with rejection and positive C4d biopsies had higher SW percentages ($53.69 \pm 24.20\%$ vs. $35.22 \pm 18.47\%$; $p = 0.04$) and lower non-class-switched memory B cell (NSW) percentages (NSW: $22.09 \pm 15.28\%$ vs. $39.41 \pm 27.66\%$; $p = 0.03$) and higher levels of BAFF.

Conclusions: This study analysed pre- and post-transplantation immunological profiles of heart, kidney and lung transplant recipients through measurement of B cell subsets and their associated soluble factors. Immunophenotypic alterations were found both in the pre- and post-transplantation period, therefore proposing certain immunophenotypic profiles as novel biomarker candidates for infection and rejection, highlighting decreased memory B cell (SW) levels during pre-HT period as a risk factor for infection. Furthermore, alterations regarding different soluble factors, mainly BAFF were demonstrated. Additional multicentre studies are needed to confirm these findings, to position them as useful biomarkers in clinical practice.

El trasplante de órganos es la opción terapéutica de elección cuando se han agotado el resto de alternativas. Tras la intervención, el sistema inmunitario del receptor puede reaccionar frente a antígenos del donante causando rechazo. Para evitarlo, se recurre al uso de inmunosupresores que acaban provocando un mayor riesgo de desarrollo de infecciones y neoplasias de novo. En concreto, las complicaciones infecciosas son la principal causa de muerte durante el primer año post trasplante.

Hasta ahora el principal foco de estudio en medicina del trasplante se ha centrado en la rama efectora CD3+, hay pocos estudios sobre linfocitos B y se centran en su papel como célula productora de anticuerpos. La célula B, en trasplante de órganos, no se limita a célula plasmática sino que posee funciones reguladoras mediante producción de diversas citoquinas, como IL-10, IL-35 o TGF- β . La depleción de estas poblaciones podría tener un efecto negativo en los pacientes, ya que se producen alteraciones en la homeostasis celular. El restablecimiento del compartimento B podría favorecer un perfil inmunorregulador que facilitaría el control del eje regulador/ inflamatorio en trasplante de órganos.

La monitorización inmunológica postrasplante es de vital importancia para reducir la morbimortalidad, evaluando el estado del paciente durante el periodo de seguimiento para la detección temprana de eventos de rechazo o infección. El objetivo es conseguir una terapia individualizada, pero la falta de biomarcadores predictivos nos hace seguir investigando para su identificación y validación. Una de las moléculas que ha emergido con fuerza es el factor activador de linfocito B, BAFF, encargado de mantener la homeostasis de los linfocitos B. BAFF es requerido para la proliferación y supervivencia de los linfocitos B y su ausencia, o la de su receptor, se traduce en una profunda linfopenia. Por el contrario, niveles excesivos de BAFF se han asociado a la generación de linfocitos B autorreactivos, autoanticuerpos y aparición de desórdenes autoinmunes. Dada la complejidad de la respuesta del sistema inmunitario, varios marcadores deben evaluarse en conjunto.

Hipótesis: Los pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido muestran alteraciones inmunológicas tanto pre como postrasplante. Las anomalías en la distribución de subpoblaciones B y de factores solubles asociados pueden ser útiles para identificar a pacientes en riesgo de desarrollo de episodios de rechazo e infección.

Objetivos: Evaluar el estado de inmunocompetencia del paciente pre y postrasplante cardíaco (TC), pulmonar (TP) y renal (TR) mediante la cinética de células B y factores solubles asociados y relacionarlos con las posibles complicaciones postrasplante.

Materiales y Métodos: Se llevaron a cabo varios estudios prospectivos. En el primero evaluamos la cinética de subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica en 217 TC pre y postrasplante con seguimiento a los 7 días, 30 días, 90 días, 180 días y un año. También se evaluó BAFF en suero pre y post-TC hasta el año, en TP y TR hasta los seis meses, estableciéndose una cinética y comparativa con el grupo control sano (CS, N=51). Además, se cuantificaron los niveles de interleucina 10 (IL-10) pretrasplante en suero en los tres tipos de trasplante estudiados. El fenotipo B regulador se determinó en un estudio trasversal para CS (N=23), TC (N=41) y TC (N=17) dentro del periodo de seguimiento establecido y en pacientes con diagnóstico de enfermedad vascular del injerto (EVI, N=10). Para este último grupo también se cuantificaron los niveles de ATP intracelular de linfocitos CD4+ mediante kit *Immuknow* (N=35). Detectamos la fijación de factores de complemento C3d y C4d en un grupo de pacientes TC con rechazo (N=59) mediante inmunohistoquímica.

Resultados: El estado del paciente durante el pretrasplante se encuentra inmunocomprometido, ya sea por la etiología del trasplante o el uso de dispositivos mecánicos. Los pacientes de TC con asistencia circulatoria mecánica (ACM) tuvieron niveles inferiores de todos los marcadores humorales y hematológicos respecto a los no portadores, incluido BAFF. Por el contrario mostraron mayores porcentajes de linfocitos B respecto a los no portadores (ACM: $15,97 \pm 2,02$ vs No: $8,95 \pm 0,55\%$; $p < 0,05$). Los pacientes con miocardiopatía dilatada (MIDI) mostraron cifras superiores de IgG ($1123,62 \pm 386,92$ mg/dl), IgG2 ($4,21 \pm 1,94$ g/L) e IgG3 ($0,69 \pm 0,43$ g/L) respecto al grupo miocardiopatía isquémica (MIIS), (IgG: $992,53 \pm 332,55$ mg/dl; $p = 0,03$; IgG2: $3,25 \pm 1,63$ g/L; $p = 0,01$; IgG3:

0,48 ± 0,24 g/L; p= 0,00). El grupo MIIS presentó valores significativamente elevados de los factores de complemento C3 (123,00 ± 39,59 mg/dl; 113,76 ± 28,06 mg/dl; p= 0,03) y C4 (26,17 ± 11,08 mg/dl; 22,99 ± 14,25 mg/dl; p= 0,01) y plaquetas (232,28 ± 96,04*10³/μl; 218,40 ± 90,63*10³/μl; p= 0,03) comparados con el grupo MIDI. En cuanto al TP, los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) tuvieron niveles inferiores de IgG (908,52±309,23 mg/dl) comparados con los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (1480,34 ± 707,02 mg/dl; p= 0,00) y fibrosis quística (FQ), (1562,50 ± 378,06 mg/dl; p= 0,00). Así mismo, la IL-10 se encontró significativamente disminuida en pacientes con EPOC (26,38 ± 27,64 ng/ml) comparados con FQ (64,65 ± 56,62 ng/ml; p= 0,00).

Todas las poblaciones B en TC poseen cifras inferiores respecto a los CS en el punto pre-TC, que pasan por un máximo a los 7 días para disminuir progresivamente al año, quedando por debajo de los valores pre-TC y de CS. La única población con cinética contraria es la *B exhausted* (CD19+CD27-IgD-IgM-), con valores elevados respecto a los CS y aumentando con el tiempo postrasplante. Respecto a las poblaciones B reguladoras sus valores en TC y TR también se encuentran por debajo de los valores de la población sana sin observarse diferencias entre trasplante.

BAFF se ha encontrado elevado en el periodo pretrasplante en TC, TP y TR, resultando ser factor de riesgo para el desarrollo tanto de infecciones como de rechazo postrasplante. Los pacientes estudiados con diagnóstico de EVI también tuvieron niveles superiores de BAFF comparados con los niveles basales. Otra citocina que ha resultado tener asociación con infección es IL-10. Los pacientes de TP con niveles de IL-10 pretrasplante superiores a 29pg/ml poseen mayor riesgo de desarrollo de infecciones postrasplante.

Los pacientes de TC que muestran porcentajes de células B de memoria con cambio de isotipo (CCI) pre-TC por debajo de 39% y porcentajes de CD19+ CD27- superiores al 75% e inferiores al 25% en células B de memoria a los 6 meses, tienen un mayor riesgo de desarrollo de eventos infecciosos postrasplante.

Los pacientes de TC con rechazo tuvieron niveles significativamente inferiores de linfocitos naïve CD19+CD27- (R: $61,58 \pm 16,46$ % vs. NR: $74,03 \pm 12,80$ %; $p= 0,02$) y superiores de célula B de memoria (R: $36,49 \pm 16,16$ % vs. NR: $24,73 \pm 12,28$ %; $p= 0,02$) a los seis meses comparados con los no rechazadores. La población B reguladora se encontró disminuida en pacientes con rechazo respecto a no rechazadores. Por el contrario, en pacientes con EVI los niveles de células B reguladoras fueron superiores a los pacientes con TC sin rechazo, pero inferiores respecto a los CS. Además, los pacientes con EVI tuvieron niveles significativamente superiores de ATP basal respecto a los controles quirúrgicos (EVI: $8,59 \pm 6,72$ ng/ml vs. CQ: $4,02 \pm 3,99$ ng/ml; $p=0,02$). Los niveles de ATP estimulado en el grupo TC con infecciones mostró valores significativamente inferiores respecto a los que no tuvieron complicación infecciosa (I: $180,89 \pm 109,86$ ng/ml vs. NI: $272,96 \pm 111,52$ ng/ml; $p=0,02$), mientras que en aquellos TC con rechazo los niveles de ATP basal fueron superiores respecto a los que no tuvieron episodios de rechazo (R: $9,22 \pm 6,80$ ng/ml vs. NR: $4,40 \pm 4,44$ ng/ml; $p=0,03$). Los pacientes TC con rechazo y biopsias C4d positivas tuvieron mayores porcentajes de célula B de memoria CCI ($53,69 \pm 24,20$ % vs. $35,22 \pm 18,47$ %; $p=0,04$) y menores de B memoria sin cambio de isotipo (SCI: $22,09 \pm 15,28$ % vs. $39,41 \pm 27,66$ %; $p=0,03$) y mayores niveles de BAFF.

Conclusiones: En este trabajo se ha evaluado el estado inmunológico del paciente pre y postrasplante mediante la caracterización de linfocitos B y factores solubles asociados. Se han encontrado alteraciones inmunofenotípicas tanto en el periodo pretrasplante como en el postrasplante y se proponen varios inmunofenotipos como candidatos a biomarcador de infección y rechazo destacando un menor nivel de células B de memoria CCI en el pretrasplante como factor de riesgo de infección. Además, se han encontrado alteraciones asociadas a factores solubles destacando el rol de BAFF. Si estas alteraciones se validan en un estudio multicéntrico tienen posibilidades de ser utilizadas en la práctica clínica.

A

AC: Adenilato ciclasa

ACM: Asistencia circulatoria mecánica

AcMo: Anticuerpo monoclonal

ACV: Accidente cerebro vascular

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AMF: Ácido micofenólico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

B

BAFF: "*B cell activating factor*". Factor activador de célula B

BAFFR: Receptor de BAFF

Bcl-2: "*B cell lymphoma 2*". Linfoma de células B2

BCMA: "*B cell maturation antigen*". Antígeno de maduración de célula B

BCR: "*B cell receptor*". Receptor de célula B.

BEM: Biopsia endomiocárdica

BHE: Barrera hematoencefálica

BLyS: "*B Lymphocyte Stimulator*". Estimulador de linfocito B

BO: Bronquiolitis obliterante

B_{reg}: Célula B con fenotipo regulador

BSA: Suero de albúmina bovina

C

CaN: Calcineurina

CC. AA: Comunidades autónomas

CCI: Con cambio de isotipo

CEIC: Comité ético de investigaciones científicas

CMF: Citometría de flujo

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMV: Citomegalovirus

CPA: Célula presentadora de antígeno

CPH: Complejo principal de histocompatibilidad

CsA: Ciclosporina

c.s.p: Cantidad suficiente para (completar volumen)

CTL: Linfocito T citotóxico

D

DA: Donación en asistolia

DAAT: Déficit de alfa-1 anti-tripsina

DC: Célula dendrítica

DM: Diabetes mellitus

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNI: Documento nacional de identidad

DP: Diálisis peritoneal

DSA: Anticuerpos específicos de donante

E

EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental

ECG: Ecocardiograma

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ENAC: Entidad nacional de acreditación

EPID: Enfermedad pulmonar intersticial difusa

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

EE. UU: Estados Unidos

EVI: Enfermedad vascular del injerto

F

FPI: Fibrosis pulmonar idiopática

FQ: Fibrosis quística

FSC: "*Forward Scatter*". Detector de dispersión frontal

G

GAL: Globulina anti linfocitaria

GC: Glucocorticoides

GCR: Receptor de glucocorticoides

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos- macrófagos

GMP: Guanina monofosfato

H

HBV: Virus de la hepatitis B

HC: Hipocomplementemia

HCV: Virus de la hepatitis C
HD: Hemodiálisis
HGUGM: Hospital general universitario Gregorio Marañón
HGG: Hipogammaglobulinemia
HLA: Antígeno leucocitario humano
HSV: Virus Herpes Simplex
HTA: Hipertensión arterial
HTP: Hipertensión arterial pulmonar o idiopática

I

IC: Insuficiencia cardíaca
IDVC: Inmunodeficiencia variable común
IFN- γ : interferón gamma
IGIV: Inmunoglobulina intravenosa
Igs: Inmunoglobulinas
IL: Interleucina
IMP: Inosina monofosfato
IMPDH: Inosina monofosfato deshidrogenasa
IR: Insuficiencia renal
IRC: Insuficiencia renal crónica
ISHLT: “*International Society of Heart and Lung Transplantation*”. Sociedad internacional de trasplante de pulmón y corazón
ITU: Infección del tracto urinario

K

KIR: “Killer Inhibitory Receptor”. Receptor inhibidor de NK

L

LES: Lupus Eritematoso sistémico

M

MAP: *Mitogen-activated protein*
MFI: Intensidad media de fluorescencia
MIDI: Miocardiopatía Dilatada
MIHT: Miocardiopatía Hipertrófica
MIIS: Miocardiopatía Isquémica
MIRE: Miocardiopatía Restrictiva
MMF: Micofenolato mofetilo
MO: Médula ósea

MPS: Micofenolato sódico

N

NCI: Nefropatía crónica del injerto

NTA: Necrosis tubular aguda

NK: “*Natural Killer*” o célula asesina natural

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONT: Organización Nacional de Trasplantes

P

PBS: Buffer o tampón fosfato salino

PCP: Pneumococo

Pmp: Por millón de población

R

RA: Rechazo agudo

RC: Rechazo crónico

RETP: Registro español de trasplante pulmonar

RH: Rechazo humoral o mediado por anticuerpos

RHA: Rechazo hiperagudo

S

SCI: Sin cambio de isotipo

SEC: Sociedad Española de Cardiología

SET: Sociedad Española de Trasplantes

SI: Sistema Inmunitario

SLP- EB: Síndrome linfoproliferativos asociado a Epstein Barr

SPSS: “*Statistical Package for Social Sciences*”

SSC: “*Side Scatter*”. Detector de dispersión lateral

T

Tac: Tacrolimus

TACI: “*Transmembrane activator and CAML interactor*”. Activador transmembrana y conector del ligando CAM

TALL-1: “*TNF- and APOL-related leukocyte expressed ligand*”. Factor activador de célula B

TC: Trasplante cardíaco

Tc: Linfocito T citotóxico

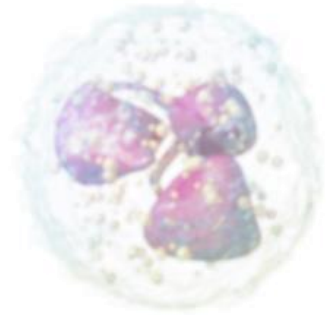
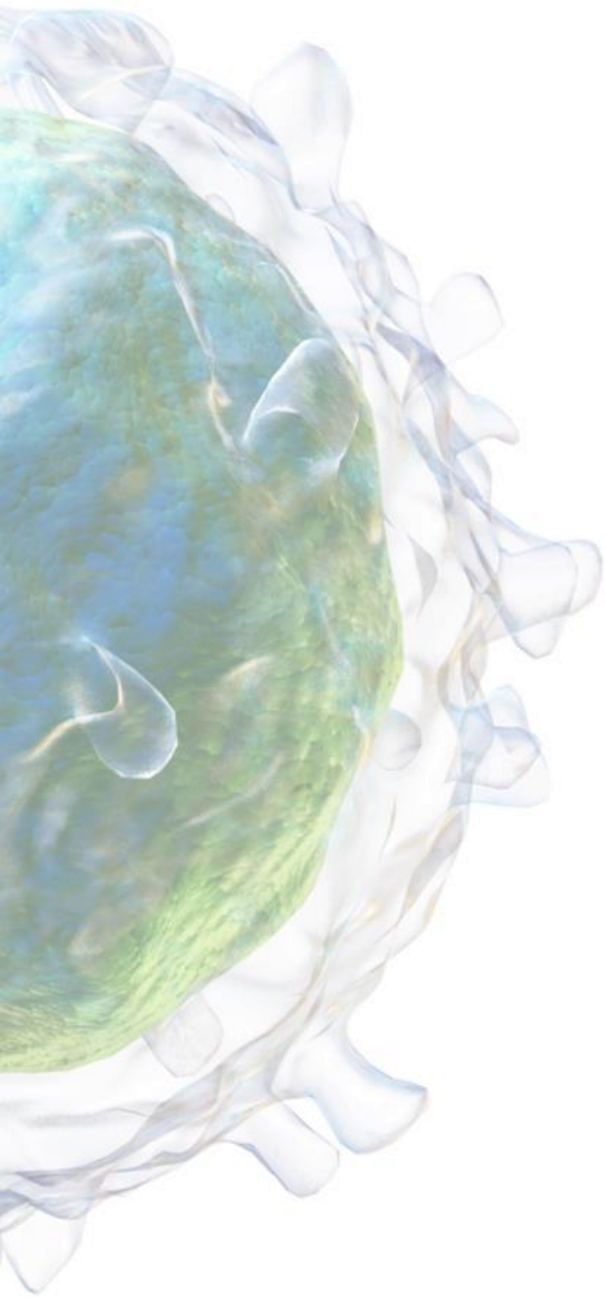
TCP: Trasplante cardiopulmonar
TCR: Receptor de célula T
TGF-β: *Transforming growth factor beta*
TH: Trasplante hepático
T_H: Linfocito T colaborador o *helper*
TLR: Receptor tipo Toll o *Toll- like receptor*
TNF: Factor de necrosis tumoral
TNFR: Receptor de TNF
TNFRSF: Superfamilia de receptores TNF
TO: Tolerancia operacional
TOS: Trasplante de órgano sólido
TP: Trasplante pulmonar
T_{reg}: Linfocito T regulador
TR: Trasplante renal

V

VEB: Virus Epstein Barr
VHS: Virus herpes simplex
VIH: Virus inmunodeficiencia Humana
VRS: Virus respiratorio sincitial
VVZ: Virus Varicela- Zoster

X

XMP: Xantosina monofosfato



I. INTRODUCCIÓN



1. CONSIDERACIONES GENERALES DEL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

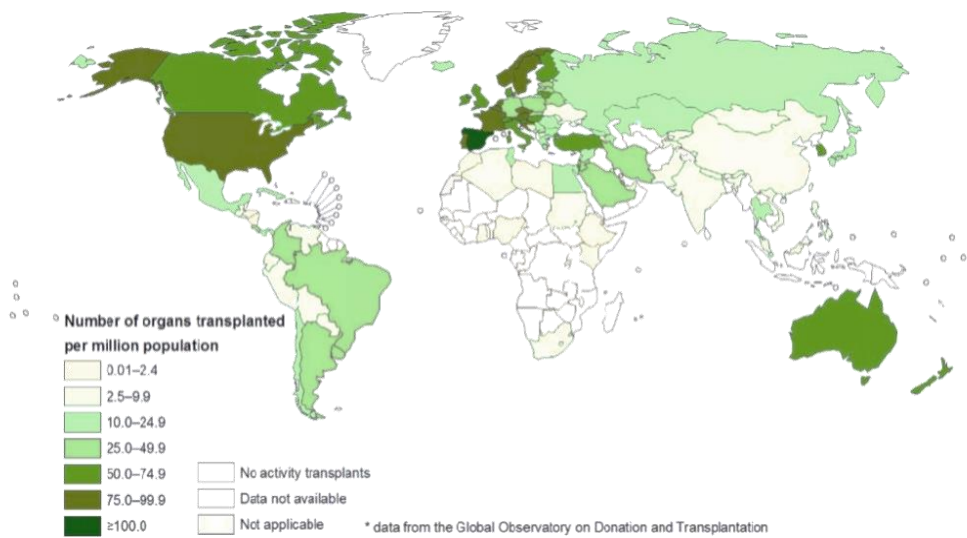
Actualmente el trasplante de órganos sólidos (TOS) constituye una técnica médica muy desarrollada que consigue resultados magníficos en sus receptores, pero no siempre fue así. Han hecho falta años de investigación y desarrollo en nuevas terapias, técnicas de laboratorio y tecnología para conseguir estos resultados. El primer trasplante pulmonar (TP) data de junio de 1963 y fue realizado por el Dr. Hardy y su equipo en Mississippi. El receptor fallecía 16 días después debido a una insuficiencia renal¹. Hubo que esperar 4 años para que se efectuase el primer trasplante cardíaco (TC) realizado de humano a humano. Fue en Ciudad del Cabo un 3 de diciembre de 1967 y ejecutado por el equipo del Dr. Barnard. Lograron mantenerlo con latido 18 días, pero el paciente falleció por neumonía. Respecto al trasplante renal (TR), no hay datos fiables sobre su realización, ni lugar, ni técnica utilizada, pero una de las primeras fechas históricas es 1954, cuando el Dr. Murray, quien recibiría el premio Nobel de Medicina en 1990, trasplantó a unos gemelos idénticos para evitar la incompatibilidad del sistema inmunitario (SI). El receptor fallecería 8 años después.

El TOS es la opción terapéutica de elección cuando se han agotado las alternativas restantes y no se presentan contraindicaciones. El avance en los métodos de inmunosupresión, el adecuado control de las infecciones y la minuciosa elección de donantes y receptores, han hecho que esta práctica sea un éxito. Una vez elegida esta opción, el mayor reto es prevenir el rechazo del injerto por parte del SI del receptor. No obstante, los pacientes sometidos a TOS siguen sufriendo un exceso de morbilidad a largo plazo respecto al resto de población derivado de los efectos deletéreos del tratamiento, que provoca un mayor riesgo de infecciones y neoplasias de novo². En concreto, las complicaciones infecciosas son la principal causa de muerte durante el primer año postrasplante.

Según datos del registro mundial de trasplantes que gestiona la organización nacional de trasplantes (ONT) junto con la organización mundial de la salud (OMS) desde hace 13 años, España es líder mundial en donación y trasplante 26 años consecutivos, batiendo su propio récord con 46,9 donantes por millón de población (pmp), superando el umbral de los 100 trasplantes pmp y con un aumento del 8.1% respecto al año anterior²

(Figura1). Asimismo, se han alcanzado máximos de actividad en TR, hepático (TH) y TP. Según la ONT, estos datos suponen 6 donantes y 14 trasplantes diarios. Durante el año 2017 se alcanzaron máximos históricos con 2183 donantes y 5261 órganos trasplantados, superando por primera vez en su historia los 5000 trasplantes. De estos, 3269 son renales (+9,1% más que en 2016), 1247 hepáticos (+7,6%), 363 pulmonares (+18,2%), 304 cardíacos (+ 8,2%), 70 pancreáticos (-4,1%) y 8 intestinales (+100%)³.

Figura 1. Número de órganos trasplantados por millón de población (pmp) durante el año 2017, actividad mundial global

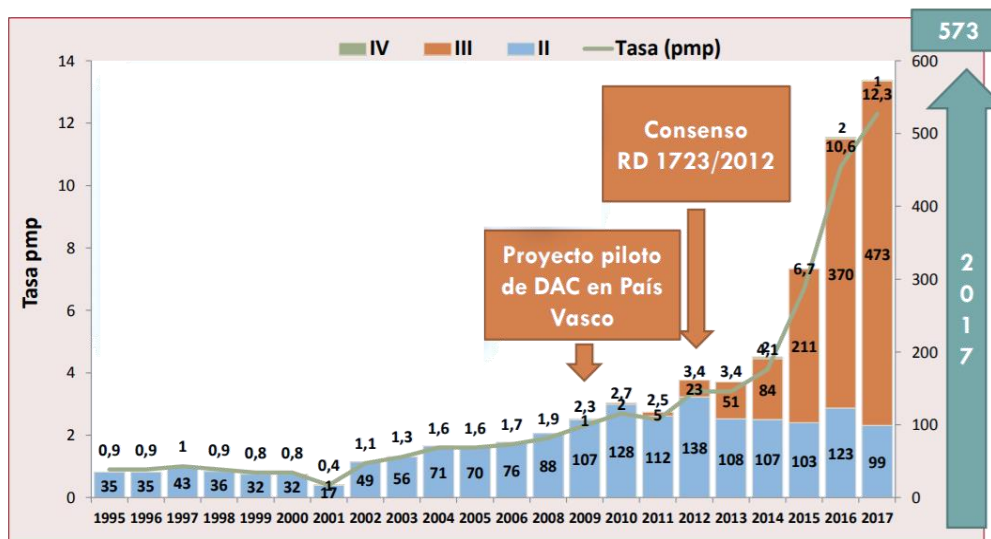


Issue of Newsletter Transplant Volume 22, September 2017. ISHLT

Una de las claves que explica este aumento progresivo en el número de TOS, sumada a la colaboración de los médicos de urgencia en la detección de posibles donantes, es la donación en asistolia (DA). La terminología asociada a la DA en el mundo anglosajón ha ido evolucionando a lo largo de los años, siendo actualmente reconocida como la más apropiada “*Donation after the Circulatory Determination of Death*”⁴. Se entiende que el fallecimiento del donante viene determinado por la pérdida irreversible de la función circulatoria y respiratoria y no por la pérdida irreversible de la función cardíaca y es una de las medidas aprobadas por el sistema español de trasplantes recogidas en la Estrategia del 2015. La DA se afianza como la opción más clara de expansión del número de TOS, con un total de 573 donantes (+16%) y un 12.3 pmp, lo que representa un 26% del total de donantes fallecidos (figura 2)⁵. 91 hospitales de todo el país, 16 comunidades

autónomas (CC. AA), ya están acreditados para este tipo de donación. En números absolutos, España es el tercer país del mundo en actividad de DA, tras EE. UU y Reino Unido. La donación en muerte encefálica también ha sufrido un aumento (+5.6%) tras llevar años estabilizada.

Figura 2. Evolución de los donantes en asistolia en España. Número absoluto y por millón de población



Fuente: Organización nacional de trasplantes (ONT). Datos 2017

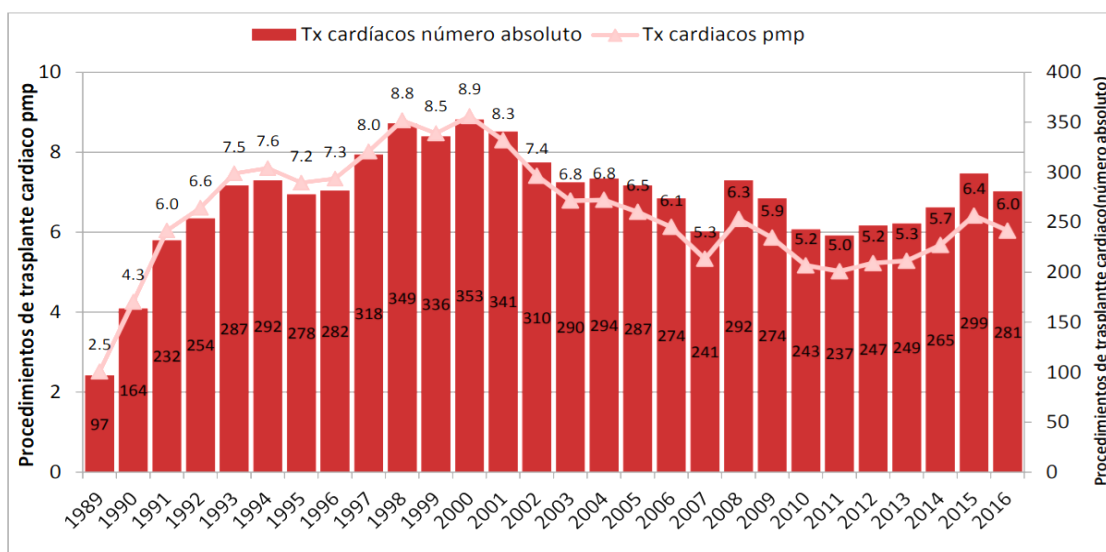
Las donaciones por accidente de tráfico se sitúan en un 4,2%, el porcentaje más bajo hasta la fecha y las negativas familiares consiguen mínimo histórico con un 12,9%. Cabe destacar el envejecimiento de los donantes, más de la mitad supera los 60 años, el 30% supera los 70 y un 9% supera los 80. El máximo se sitúa en 91 años, logrando efectuar un TH con éxito.

1.1. CONSIDERACIONES GENERALES DEL TRASPLANTE CARDÍACO

Se recurre al TC en casos de cardiopatías irreversibles en fase terminal, insuficiencia cardiaca grave (IC) o enfermedad de las arterias coronarias, que no presenten contraindicaciones. Se cumplen 50 años del primer TC y continúa siendo una terapia consolidada, de uso rutinario en muchos de nuestros hospitales y con ligero aumento año tras año. Esto podría deberse a factores como el aumento de la esperanza de

vida de la población y el mejor seguimiento y control de pacientes con cardiopatías crónicas que llegan a etapa terminal⁶. El número de TC durante el 2017 es el mejor dato desde el año 2002, pero sigue alejado de su máximo histórico del 2000. Según el último informe de la Sociedad Española de Cardiología (SEC), durante el 2016 se realizaron 281 TC, lo que supone una tasa de 6.0 pmp (Figura 3).

Figura 3. Actividad de trasplante cardíaco en España. 1989- 2016. Números absolutos y procedimientos por millón de población (pmp)



Fuente: Organización nacional de trasplantes (ONT). Datos 2016

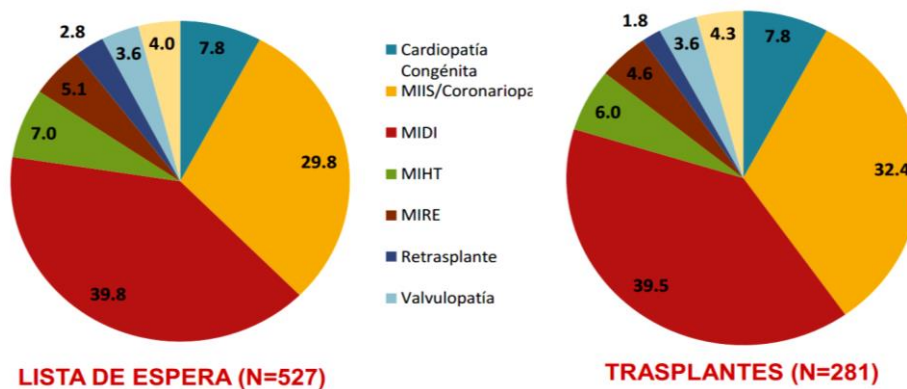
Esta variación de cifras puede deberse al cambio en el perfil del donante de órganos en nuestro país, que ha experimentado una flexibilización en los criterios de aceptación de corazones para TC, como ha ocurrido en el resto de TOS. Respecto a las características de los donantes, también han ido modificándose a lo largo de los años, la edad ha experimentado un ligero ascenso, situándose en 46.0 (± 12.6) años en donantes adultos, siendo masculinos un 58% del total.

Según informes de la ONT del año 2016, el número de pacientes en lista de espera fue de 11.3 pmp, 493 pacientes adultos, con variaciones significativas entre diferentes CC.AA. Del mismo modo que en 2015, la lista de espera durante el 2016 aumentó ligeramente, 71 pacientes se excluyeron de la lista, 281 se trasplantaron y 23 pacientes fallecieron. El porcentaje de pacientes fallecidos esperando el órgano ideal se ha

mantenido estable durante los últimos 7 años. Las principales causas del abandono de la lista de TC fueron, en primer lugar, el empeoramiento del paciente (38%), seguido de contraindicación médica (36.6%) y de la exclusión voluntaria del paciente (1.4%). El tiempo de permanencia en lista de espera también ha ido aumentando en los últimos años, pasando de 123 días de media en 2012, a un valor actual de 162 días.

La patología principal de indicación de TC de pacientes en lista de espera es la miocardiopatía dilatada (MIDI, 39.5%), seguida de la miocardiopatía isquémica (MIIS, 29.8%) (Figura 4).

Figura 4. Diagnóstico de los pacientes en lista de espera y de trasplante cardíaco. España 2016



* MIDI: Miocardiopatía Dilatada. MIHT, Miocardiopatía Hipertrófica, MIRE: Miocardiopatía Restrictiva MIIS: Miocardiopatía isquémica. Fuente: Informe ONT, datos 2016.

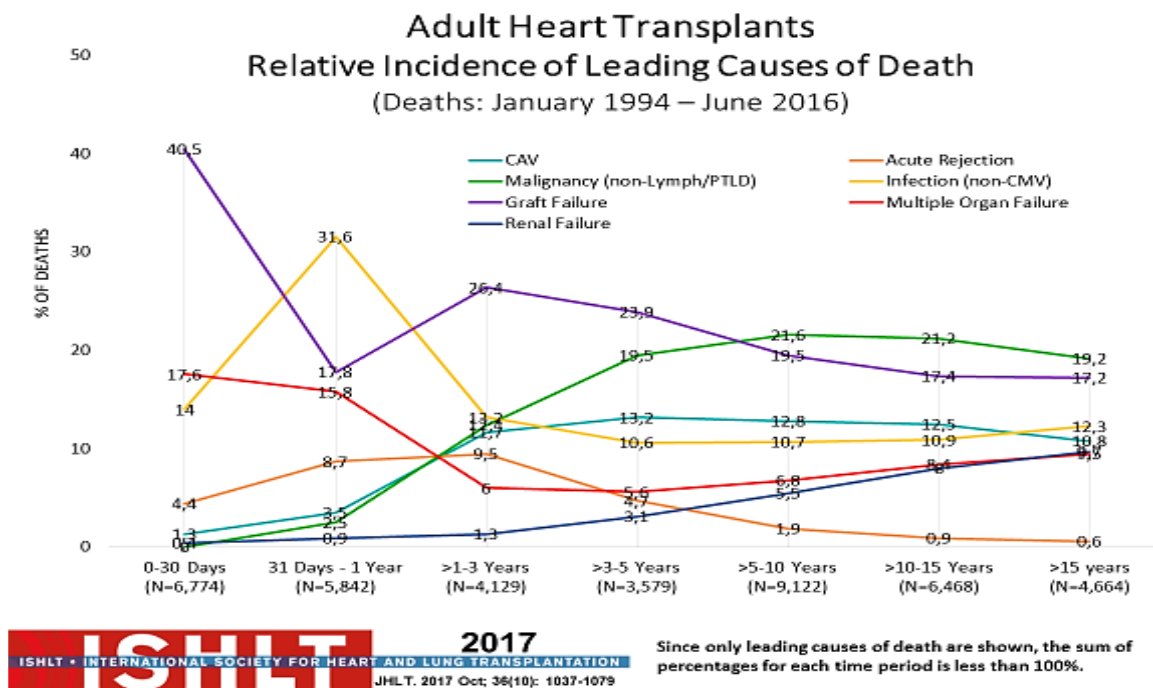
Un dato positivo es que el 43.8% de los pacientes TC a lo largo del 2016 recibieron el injerto en los dos primeros meses de espera, siendo un porcentaje inferior al de años previos.

Debido a los largos tiempos de espera y el aumento de pacientes con IC de mal pronóstico, se han desarrollado dispositivos de asistencia circulatoria mecánica (ACM). La ACM es un conjunto de dispositivos que pueden sustituir, de manera parcial o total, la función cardíaca. En ciertos casos van acompañados de un soporte de oxígeno para alimentar también el sistema respiratorio⁷. En pacientes con inestabilidad hemodinámica suele efectuarse un TC de urgencia, precedido o no de ACM. Los hay de tipo continuo y pulsátil, intra o extracorpóreos. Estos sistemas le añaden complejidad a la intervención, ya que, desde el punto de vista quirúrgico es una técnica de alto riesgo

y se debe vigilar, monitorizar y tratar de forma inmediata cualquier tipo de complicación. Las complicaciones suelen ser infecciones en primer lugar, 40-50% de los casos, llegando al 94% en un año, seguidas de posibles hemorragias (20-35%), tromboembolias, etc.⁸ Pese a esto, la ACM es eficaz a corto plazo como puente al TC y como soporte cardíaco permanente.

La supervivencia actual durante el primer año postrasplante se sitúa en un 76% disminuyendo de manera progresiva, lo que supone una mortalidad promedio de apenas un 2- 3% durante el primer año, dando lugar a una mediana de supervivencia del injerto de 11,2 años. Tras el TC y superado el primer mes, las principales causas de muerte durante el primer año son el rechazo e infección, mientras que a largo plazo son más relevantes las neoplasias de novo y la enfermedad vascular del injerto (EVI), (Figura 5). La vasculopatía del injerto durante mucho tiempo se denominó rechazo crónico (RC), representa junto con las neoplasias la principal causa de mortalidad en los pacientes a partir del tercer año de trasplante. Puede aparecer tras varios meses o años y su incidencia según la ISHLT es del 9% a 1 año, 34% a 5 años y 48% a 8 años ².

Figura 5: Incidencia de las principales causas de muerte postrasplante cardíaco por tiempo



Fuente: Informe ISHLT. 2017; 36 (10): 1037- 1079

1.2. CONSIDERACIONES GENERALES DEL TRASPLANTE PULMONAR

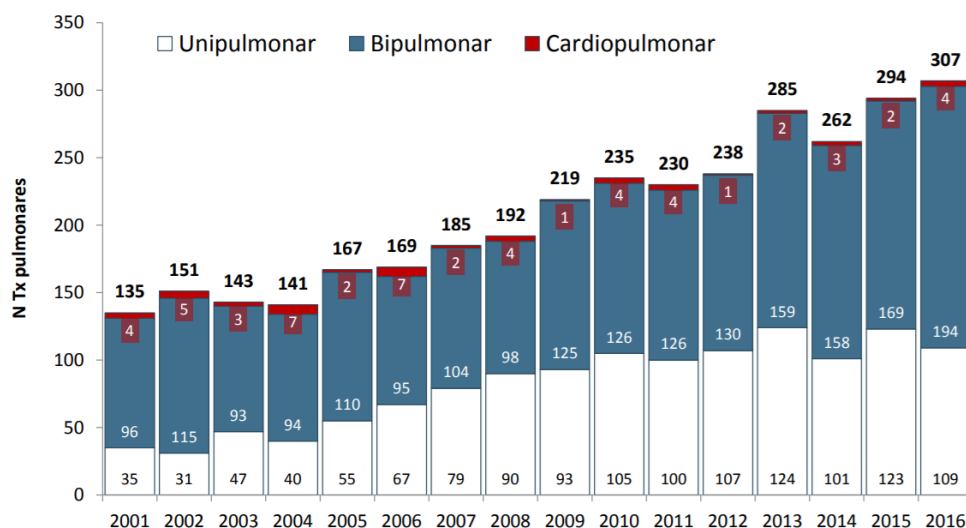
Las principales patologías subsidiarias de un TP son, por orden, la enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ), hipertensión pulmonar arterial o idiopática (HTP) y déficit de alfa-1 anti-tripsina (DAAT)^{9,10}. El TP consiste en la sustitución de unos pulmones que fracasan por uno (unilateral), dos pulmones (bilateral) o el conjunto de corazón y pulmones (cardiopulmonar, TCP). El TP unilateral es el más sencillo y el elegido en mayores de 55 años con EPOC. El TP bilateral es la opción principal cuando existen bronquiectasias que puedan actuar como reservorio de futuras infecciones, como en la FQ, aunque también en casos de patología obstructiva en pacientes jóvenes y con HTP¹¹. El TCP queda restringido a enfermos con patología pulmonar y grave disfunción del ventrículo izquierdo por sobrecarga debido a HTP.

El pulmón es un órgano muy vascularizado, de gran tamaño, con un aparato inmunitario propio y que está expuesto a múltiples agentes infecciosos procedentes del medio externo que entran en cada fase de inspiración respiratoria¹². Esta exposición hace que se produzca un aumento en la expresión de aloantígenos en el epitelio bronquial y activación de linfocitos T. Debido a esto, hacen falta dosis de inmunosupresión mayores que en otros TOS y llevar unos cuidados postrasplante muy estrictos, quizás por todo esto es el tipo de TOS con menor pmp^{12, 13}. La tasa de TP se ha ido incrementando notablemente desde que se realizó la primera intervención en 1963, pero fue en los años 80 donde esta práctica se popularizó gracias a tratamientos como la ciclosporina (CsA), llegando a alcanzar los 4000 TP anuales mundiales, cifra dada por la ISHLT en el 2016¹⁴. A pesar de estos datos, el TP está lejos de otros como el TR o el TC. El motivo podría ser la falta de donantes o las modestas cifras de supervivencia de los pacientes, siendo ésta de 6 años¹⁵.

Desde que se ejecutó el primer TP en España en el año 1990 se han realizado un total de 4088. En el último año se han realizado 307 TP, siendo 109 unipulmonares y 194 bipulmonares (Figura 6). Los hospitales que disponen de unidad de TP en España son siete y la media de TP realizados en estos 7 centros durante el 2016 ha sido de 43.8, consiguiendo una tasa de 6.6 pmp, superior a datos de años previos, incluyendo Europa

(3.6 pmp) y EE. UU (6.4 pmp)¹⁶. Aun así, los datos de TP siguen siendo significativamente menores al resto de TOS.

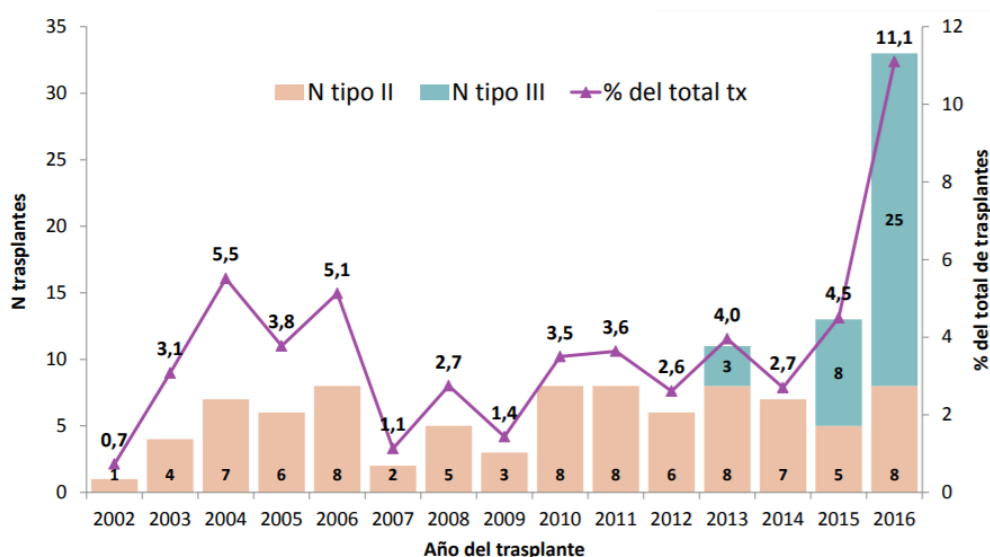
Figura 6. Número de trasplantes pulmonares en España por año y tipo de procedimiento



Fuente: Memoria anual RETP 2017

Una de las causas es la escasez en el número de donantes y el número de injertos. La primera se ha solucionado abriendo la opción del uso de donantes de mayor edad. La segunda, la falta de injerto, se está resolviendo gracias a la DA y manejo del órgano donante exvivo, representando un 11.1% del total de trasplantes realizados (Figura 7).

Figura 7. Número y porcentaje de trasplantes pulmonares en España a partir de donantes en asistolia



Fuente: Memoria anual RETP 2017

Durante el último año se extrajeron 340 pulmones de 427 donantes ofertados. Tanto los donantes como los receptores son en su mayoría masculinos, siendo un 54% en donantes y un 64% del total de trasplantados. La edad media de los donantes ha ido aumentando con los años situándose en la actualidad en 52.1 años, siendo el accidente cerebrovascular (ACV) la principal causa de muerte (62%).

En TP la tasa de pmp varía significativamente en las distintas CC. AA, con Cantabria a la cabeza, con una media de 14.4 pmp. La lista de espera ha descendido durante el último año, cambiando la tendencia seguida durante años previos debido a una menor indicación de trasplante unilateral. Por el contrario, el tiempo que un paciente permanece en lista sigue aumentando año tras año. En 2016 se ha calculado una media de 227 días, casi un mes y medio más que en el año 2012. El tiempo de los pacientes fallecidos en lista es menor al medio, lo que indicaría que el fallecimiento es independiente del tiempo que permanece un paciente en lista de espera.

Según la ISHLT se describe un promedio de supervivencia al TP entre los años 2001 y 2013 de 5,8 años con diferencias en los rangos de supervivencia dependiendo del tipo de TP, siendo de 7,1 años del bilateral frente a un 4.4 en TP unilateral. El porcentaje de supervivencia ha ido aumentando progresivamente con el paso del tiempo (Figura 8)¹⁴.

Figura 8. Tabla de supervivencia (N a riesgo) Kaplan- Meier de los pacientes trasplantados pulmonares por años (enero 2001- diciembre 2016) y por tipo de intervención

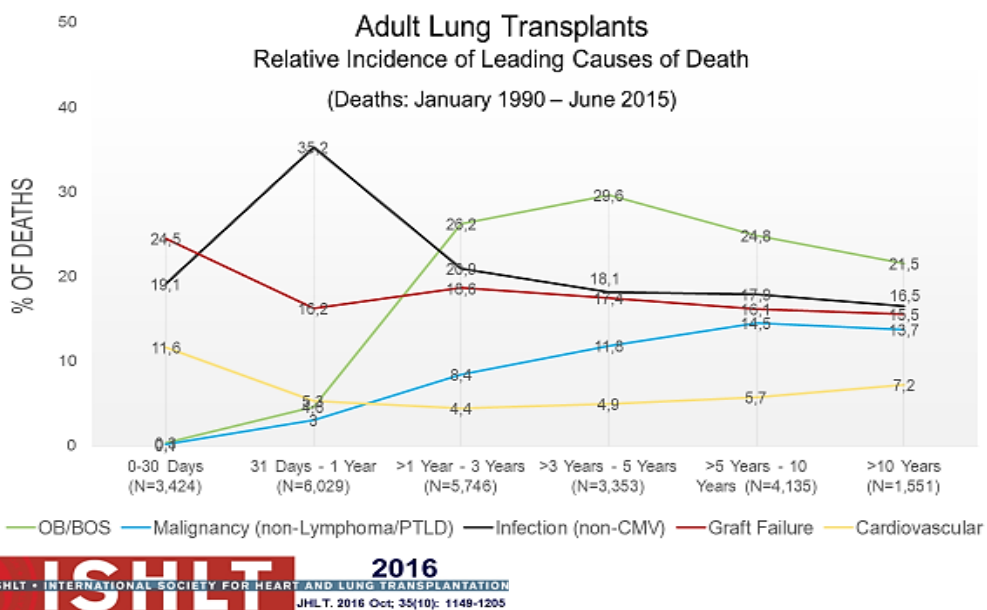
	1 año		5 años	
2001- 2005 (N= 681)	66.5 (N= 450)		44.4 (N= 289)	
2006- 2010 (N= 951)	70.5 (N= 664)		48.5 (N= 442)	
2011- 2016 (N= 1503)	81.4 (N= 1033)		62.2 (N= 104)	
	3 meses	1 año	5 años	10 años
Unilateral (N= 417)	86.2 (N= 350)	79.5 (N= 303)	51.9 (N= 104)	23.8 (N= 12)
Bilateral (N= 737)	84.8 (N= 608)	74.5 (N= 508)	51.6 (N= 198)	32.2 (N= 61)

Según el registro español de trasplante de pulmón (RETP), los datos de supervivencia de los pacientes adultos trasplantados no muestran diferencias significativas respecto a los datos de la ISHLT⁸. La principal causa de mortalidad durante el primer año postrasplante

son las infecciones, seguida de bronquiolitis obliterante (BO) a partir del primer año (figura 9). La BO es una enfermedad pulmonar obstructiva crónica y grave que puede aparecer tras el TP o tras un proceso infeccioso y se caracteriza por la oclusión parcial o total del lumen de los bronquiolos respiratorios y terminales por tejido inflamatorio y fibrosis. Es la expresión clínica del RC en TP¹⁷.

Las infecciones son la causa más común de fallecimiento durante el primer año postrasplante, siendo las bacterianas las causantes de hasta la mitad de las muertes y con el injerto como localización más frecuente. A ello contribuye la denervación pulmonar, con la inhibición del reflejo de la tos, la alteración del sistema mucociliar y la interrupción del linaje linfático, además de la terapia inmunosupresora administrada.

Figura 9: Incidencia de las principales causas de muerte en trasplante de pulmón en función del tiempo postrasplante



Fuente: Registro anual de la ISHLT. 2016; 35 (10): 1149- 1205

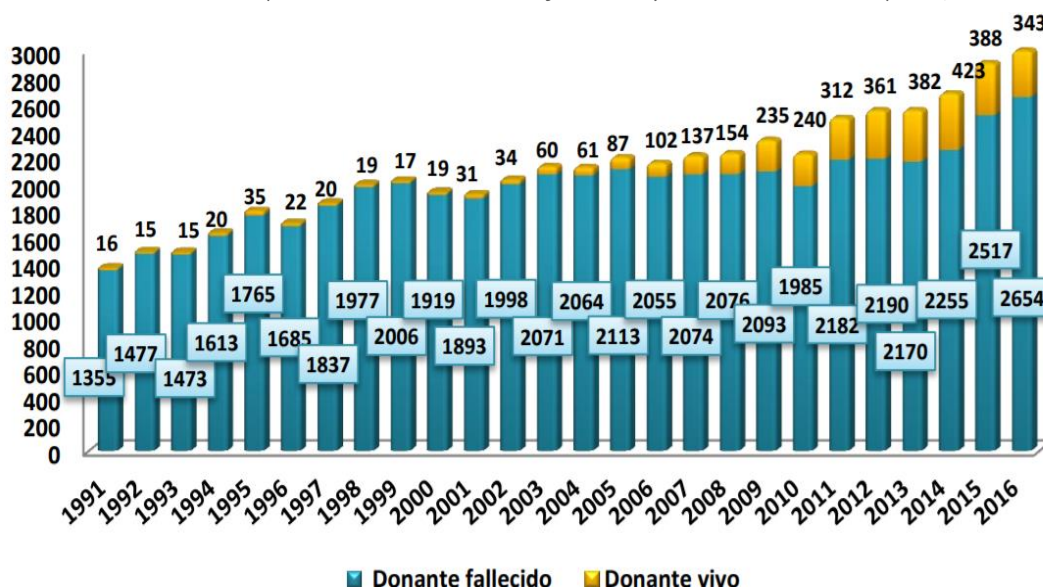
Los resultados del TP pueden optimizarse si seguimos unas pautas estrictas, como elegir el receptor apropiado, informar de forma correcta sobre los cuidados pre y postrasplante y realizar la intervención en el momento idóneo¹⁸.

1.3. CONSIDERACIONES GENERALES DEL TRASPLANTE RENAL

Para la mayoría de los enfermos con insuficiencia renal (IR) terminal en diálisis el TR es el tratamiento de elección, que consiste en la implantación de un riñón, o en ocasiones, los dos. El riñón injertado puede comenzar la diuresis en el mismo acto quirúrgico o tras días o semanas, cuando se recupera de la necrosis tubular aguda (NTA), alteración que requiere un tratamiento de diálisis durante los primeros días postrasplante¹⁹. Sólo hay dos casos donde se contraindica el TR, cuando el enfermo padece enfermedad tumoral maligna o padece arteriosclerosis generalizada y siendo también recomendables diferencias mínimas en la edad y el peso entre donante y receptor²⁰.

Según datos de la ONT, durante el 2016 en España se realizaron 2997 TR, de los cuales 53 fueron pediátricos. Este dato se ha incrementado en un 3% respecto al año anterior, situándose como el primer país del mundo con una tasa de 64.4 pmp en TR. Prioritariamente, la actividad de TR en España es a partir de donante fallecido, perteneciendo solamente un 11,4% del total de la actividad renal a donante vivo. Las donaciones a partir de donante vivo han experimentado un descenso en los últimos años debido a la aplicación de DA, que ya supone el 22.6% (Figura 10)⁵.

Figura 10. Actividad de trasplante renal de donante fallecido y donante vivo en España, 1991-2016

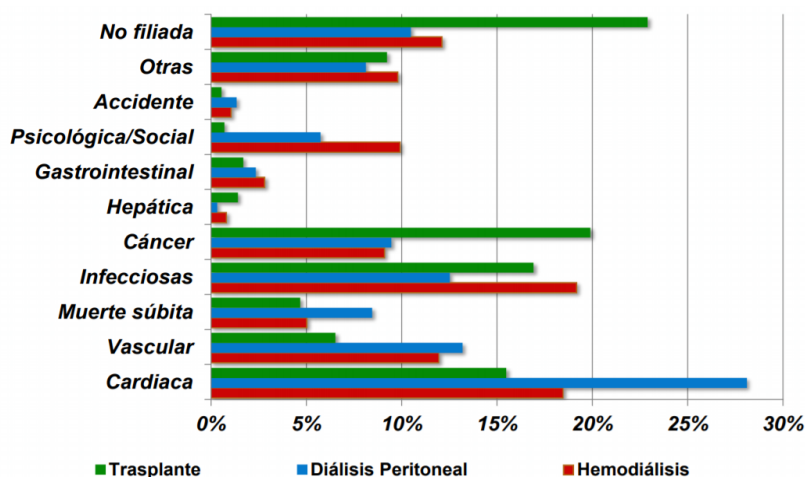


Fuente: Memoria de actividad renal. ONT 2016

Durante el 2016 hubo 495 trasplantes en DA, obteniéndose 964 riñones de los que llegaron a implantarse 677, el resto fueron desechados. La lista de espera durante este año también ha efectuado un ligero descenso, con un balance de -18. Al igual que en el resto de países de nuestro entorno y siguiendo la tendencia de años previos, el mayor porcentaje es masculino, siendo un 61% los receptores y un 59.5% los donantes fallecidos. Por el contrario, un 65% de los donantes vivos son mujeres. La edad media de los donantes es de 53.4 años versus los 44.7 de los receptores, que ha ido aumentando con los años, siendo de 76 años el receptor de máxima edad y de 75 años el donante. La relación más habitual entre donante y receptor es la conyugal (32%) seguida de cerca de la fraternal (22%). La tasa de mortalidad global de pacientes con IR se sitúa en un 8.2 %, correspondiendo un 2.3 % al TR y manteniéndose de forma estable y en mínimos. Un 15.2% de los fallecidos se encontraría en situación de hemodiálisis (HD) y un 9.5% en diálisis peritoneal (DP).

En conjunto, el motivo más común de fallecimiento se debe a accidente cardiovasculares, seguido de las infecciones como causa más frecuente. Si hablamos de pacientes trasplantados, la causa de muerte más frecuente es el cáncer, siendo ésta del 19.9% (Figura 11).

Figura 11. Causas de mortalidad postrasplante renal en función del tratamiento



Fuente: Memoria de actividad renal. ONT

La mortalidad global se mantiene en torno a un 8% anual, siendo un 15.2% en HD, 9.5% en DP y un estable 2.3% en TR. Esta mortalidad en TR es menor en todos los grupos de edad estudiados²⁰.

2. INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE

Desde el punto de vista de la inmunología, el término *trasplante* se entiende como el acto de transferir células, tejidos u órganos de un sitio a otro²¹. Los avances en medicina lo han hecho factible, pero todavía queda un obstáculo que superar, el SI del receptor. El SI se compone de dos ramas: una innata y otra adaptativa²²⁻²⁴. El sistema innato es la primera línea de defensa de nuestro organismo, de respuesta rápida e inespecífica, capaz de diferenciar lo propio de lo ajeno por reconocimiento de patrones a través de los receptores tipo Toll (del inglés *Toll like receptor*, TLR). Lo hace posible mediante barreras (piel, mucosas, etc.), proteínas que forman parte del sistema del complemento y células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, etc.). Su activación desencadena una respuesta inflamatoria con aumento de flujo sanguíneo local, aumento de la permeabilidad vascular y liberación de moléculas que contribuyen a eliminar los agentes extraños. Si esto no fuese suficiente, se activará la respuesta inmunitaria adaptativa, específica contra el agente invasor y compuesta por la rama celular (linfocitos T y B) y humoral (anticuerpos).

En el TOS, se desencadena una respuesta inmunitaria muy específica frente a los antígenos expresados por las células injertadas²²⁻²⁴. Después del TOS o tejido alogénico, la puesta en contacto del paciente con el injerto activará su SI. Esta activación será más intensa cuanto mayor sea la disparidad donante/ receptor. La sensibilización previa específica del receptor contra las células del donante puede dar lugar a una destrucción casi inmediata del injerto, lo que se conoce como rechazo hiperagudo (RHA).

2.1. ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y ALOANTÍGENOS

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) es un conjunto de genes muy polimórficos que poseen una gran variabilidad y que actúan como una especie de DNI personal de cada célula, debido a la baja probabilidad de encontrar dos iguales^{25,26}. Los genes que codifican las proteínas que forman este SI en el ser humano (HLA, *human leukocyte antigen*) se encuentran en el cromosoma 6. Dos son los de mayor importancia y poseen diferentes funciones: clase I (locus A, B y C) y clase II (locus DP, DQ y DR). Los de clase I están presentes en todas las células nucleadas del organismo, mientras que

los de clase II se limitan a células cuya función es la presentación antigénica (CPA): linfocitos B, células dendríticas (DC) y monocitos- macrófagos, principalmente. La base de la alorreactividad es el reconocimiento de estas moléculas por parte de los linfocitos T CD4+, convirtiéndose así en antígenos.

Las moléculas MHC pueden ser reconocidas por el receptor mediante dos mecanismos distintos. Se habla de presentación directa cuando se reconocen las moléculas HLA del donante presentadas por sus propias CPA. Posee una respuesta precoz y muy intensa, ya que entre el 1 y 10% de los linfocitos T del receptor son capaces de reconocer moléculas HLA alogénicas, pero es breve debido a la sustitución de las CPA del donante por las del receptor al cabo de poco tiempo^{27, 28}. Si la célula CPA reconocida es la del propio receptor se habla de presentación indirecta. Es una respuesta menos intensa y precoz que la presentación directa pues sólo uno de cada 1000- 10000 linfocitos T reconocen péptido extraño^{27, 28}.

Existen otros aloantígenos diferentes a los MHC, son los sistemas ABO y Rh del grupo sanguíneo²⁹. Son capaces de provocar rechazo en pocas horas debido a la presencia de anticuerpos preformados. Los aloanticuerpos anti ABO son naturales, existen antes del primer contacto con el injerto. En cambio, en el sistema Rh son inducidos para personas Rh- en caso de transfusión sanguínea o embarazos previos. Son peligrosos para tejidos que expresan este tipo de aloantígenos. Por ejemplo, los aloanticuerpos anti-A y/o anti-B son importantes en el TR y las transfusiones, ya que tanto los endotelios como los hematíes expresan dichos antígenos. Los anticuerpos anti-Rh, en cambio, sólo son perjudiciales para las transfusiones, ya que el riñón no expresa Rh²⁷.

2.2. PAPEL DEL LINFOCITO T EN TRASPLANTE

El linfocito T ejerce un papel fundamental en el rechazo de TOS. Existen dos subtipos de células T, las que expresan CD8 en superficie, denominadas linfocitos T citotóxicos (T_c o CTL) que reconocen MHC-I y cuya misión es destruir células patológicas^{30, 31}. El otro subgrupo expresa CD4 y se denominan linfocitos T colaboradores (T_H), que a su vez pueden ocasionar dos tipos celulares: T_{H1}, los primeros en ser activados y productores mayoritariamente de interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ), y los T_{H2}, de activación más tardía y cuya secreción es mayoritariamente IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y

colaboran con los linfocitos B³². Estos linfocitos T_{H1} y T_{H2} son capaces de reconocer MHC-II a través de la molécula CD4. La activación del linfocito T es un proceso complejo que requiere, al menos, de tres señales:

- Señal 1: El reconocimiento del antígeno mediante el complejo TCR/CD3 + MHC, proceso conocido como sinapsis inmunológica.
- Señal 2: La unión de moléculas complementarias como son CD80-CD86/CD28, que inducen la activación celular.
- Señal 3: Interacción mediada por IL-2/IL-2R (CD25) encargada de la proliferación celular y desencadenada por 3 vías de activación intracelular como son la vía Ca²⁺-Calcineurina (CaN), MAPs quinasas y la vía C-factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). La activación de estas vías intracelulares induce la expresión de genes de citocinas como la IL-2, CD154 (CD40L) o CD25 (IL-2R).

Las células T efectoras tienen varias funciones, la primera es la inducción de muerte por parte de los CTL y la activación de macrófagos por las T_{H1}, que juntas forman la inmunidad mediada por células. Las T_{H2} son las encargadas de activar a los linfocitos B para la producción de anticuerpos, lo que se conoce como respuesta humoral^{33, 34}. Existe otro fenotipo de célula T CD4+ que no es eliminada por selección negativa cuando entra en contacto con antígenos propios, sino que evoluciona a un fenotipo regulador (Treg) caracterizado por la expresión de CD25 en superficie. Su función es mantener la homeostasis del SI con carácter inmunosupresor, de ahí el interés en la terapia para TOS³⁵.

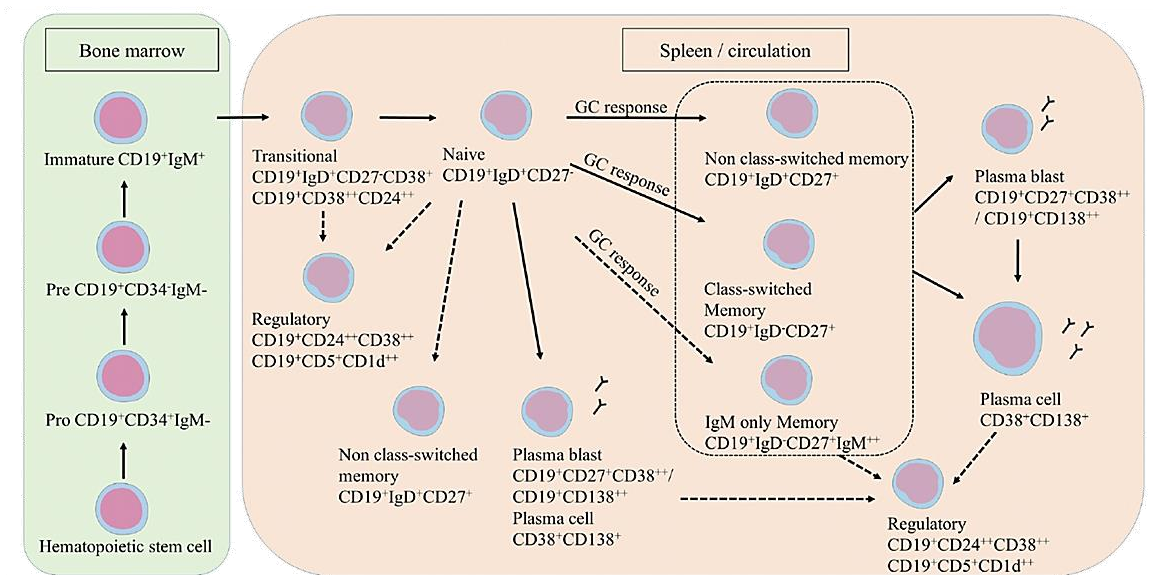
2.3. PAPEL DEL LINFOCITO B EN TRASPLANTE

En el contexto de TOS, las células B son principalmente conocidas por su habilidad para madurar y diferenciarse a células plasmáticas capaces de producir anticuerpos con cambio de isotipo²⁹. Las células B foliculares o inmaduras B Naïve sufren el proceso de hipermutación somática, un paso crítico en la generación de anticuerpos específicos de donante de alta afinidad (DSA), cuya presencia puede utilizarse para medir la actividad de la vía indirecta de alorreconocimiento^{36, 37}. Estas células también sufren cambio de isotipo y pasan a formar células B memoria y células plasmáticas, productoras de

anticuerpos³⁸. Este proceso sólo ocurre cuando las señales que recibe el receptor de célula B (BCR) son suficientemente fuertes (Figura12).

La activación puede darse de forma independiente o dependiente de los linfocitos T. La vía dependiente la efectúan los T_{H2} liberando citoquinas que activan al linfocito B hacia la producción de IgG, IgA e IgE por cambio de isotipo (CCI), perdiendo las moléculas de superficie IgD e IgM. Aunque se acepta que para evaluar los linfocitos B de memoria que han hecho cambio de isotipo no se requiere el uso concomitante de IgM e IgD, y que la expresión de IgD es suficiente, en este estudio se sugiere incluir la evaluación de ambos marcadores. La vía T- independiente la desencadenan microorganismos a través de epítomos mediante el reconocimiento de TLR, que desvían la respuesta hacia la producción de IgM sin provocar maduración de afinidad, ni memoria, ni cambio de clase (SCI). Normalmente, el desarrollo de la respuesta adaptativa inmune humoral requiere al menos una semana y resulta en la producción de anticuerpos específicos de alta afinidad como IgM y posteriormente IgG²³.

Figura 12. Fases del desarrollo del linfocito B



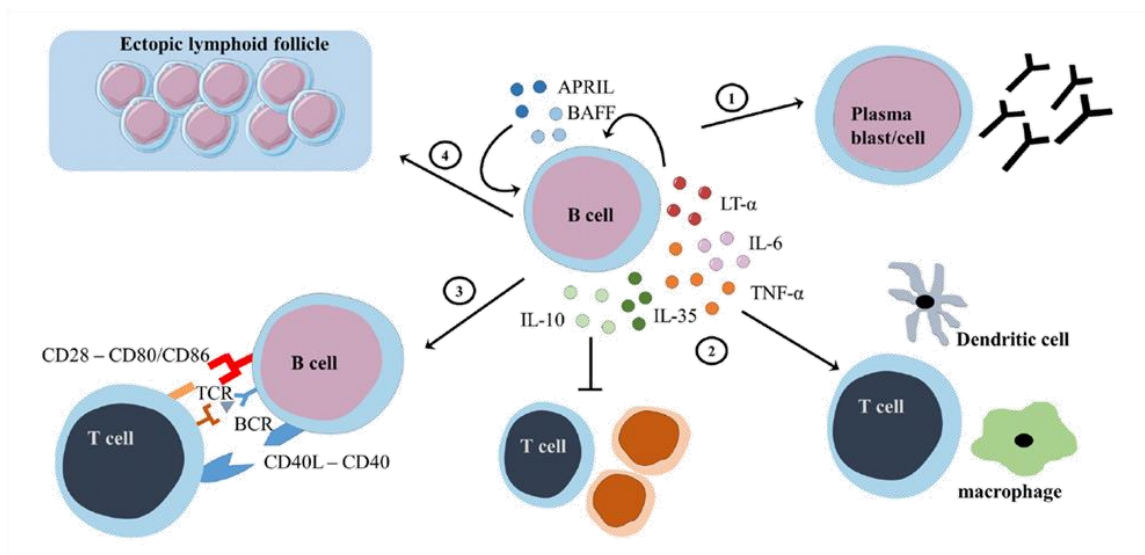
GC: Centros germinales; Fuente: doi: 10.3389/fimu.2015.00642; 2015

Hasta el momento se ha asociado la célula B en el rechazo crónico como productora de anticuerpos³⁹, lo que se conoce como teoría humoral del trasplante, pero en los últimos

años ha ganado fuerza la teoría que implica al linfocito B de otras muchas formas, pudiendo actuar como CPA y productora de factores linfoangiogénicos, dirigiendo así la expansión del tejido y vasos linfáticos requeridos para soportar una respuesta inmunitaria. Además, la célula B puede ser activadora de otros linajes celulares como son los linfocitos T, DC y macrófagos a través de la producción de citoquinas y anticuerpos reguladores (Figura 13). Podemos hablar entonces de una interacción recíproca entre linfocitos T y B y de la implicación del linfocito B tanto en la respuesta innata como en la adaptativa^{40,41}.

De manera reciente en la historia de la inmunología ha emergido una nueva función B denominada reguladora⁴². Las células B reguladoras (Breg) representan una pequeña población dentro del linaje B y numerosos estudios muestran sus propiedades como capaces de controlar la autoinmunidad e inflamación⁴³⁻⁴⁵. El mecanismo que ha hecho posible la identificación del fenotipo regulador ha sido la producción de citoquinas antiinflamatorias, como son la interleucina 10 (IL-10), IL-35 o TGF- β ^{46,47}.

Figura 13. Diferentes implicaciones de los linfocitos B en el sistema inmunitario



Fuente: doi: 10.3389/fimu.2015.00642; 2015

La primera vez que se habló de una reacción inmunosupresora independiente de anticuerpos fue en la década de los setenta. El tema se retomó a finales de los noventa

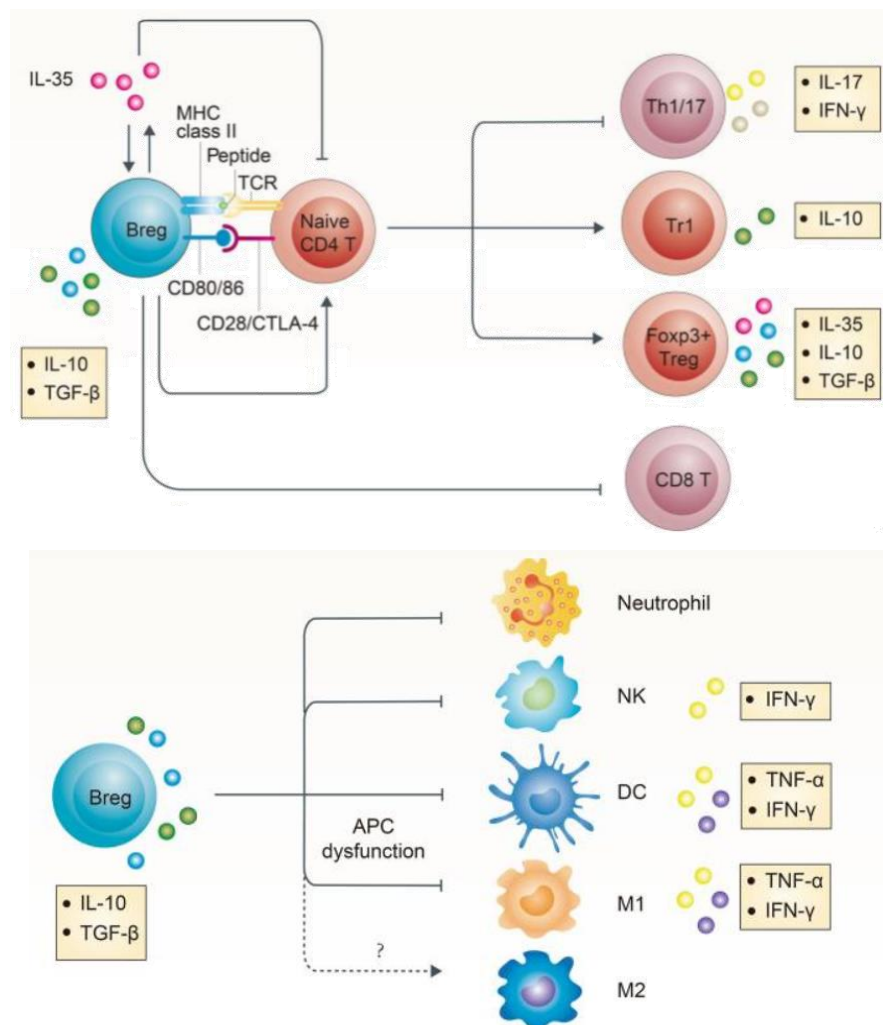
cuando se observó inmunomodulación en un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune (EAE)⁴⁸, y un año después se repetían resultados similares en un modelo de colitis crónica⁴⁹. A partir de este momento se comenzó a estudiar la función de la célula B como reguladora del SI y fue denominada linfocito Breg. Todavía se desconoce si estas células provienen de un progenitor concreto o se desarrollan a partir de un subconjunto de células B, debido a que comparten gran parte de sus marcadores de superficie. En humanos se han descrito dos subpoblaciones principales, B Reguladoras que expresan CD24^{hi} y CD38^{hi} en superficie y células B10, CD24^{hi} CD27⁺^{50,51}. Estas células efectúan su acción a través de la producción de IL-10, inhibiendo o suprimiendo así la respuesta efectuada por los linfocitos T, especialmente sobre la respuesta T_{H1}/T₁₇ y favoreciendo la maduración de linfocitos T CD4+ a Treg.

Otro de los mecanismos en estudio es la producción de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), citoquina antiinflamatoria que participa en diversas funciones en la célula como el control del crecimiento celular, proliferación, diferenciación y apoptosis. Dentro del SI juega un papel importante como inhibidor de otras citoquinas como interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y varias interleucinas (Figura 14). Uno de los mecanismos esenciales es la disminución de los niveles de expresión del receptor de IL-2 (CD-25), presente principalmente en la membrana de linfocitos T y B activadas⁵².

La primera vez que se estudiaron estas células en el TOS fue tras asociarlas a inmunodeficiencias, ya que el TOS no deja de ser una inmunodeficiencia secundaria⁵³. Se trasladaron estudios al campo del TOS obteniendo resultados en lo que se denomina tolerancia operacional (TO)^{54,55}, que se conoce como la aceptación del injerto alogénico en ausencia de tratamiento inmunosupresor. Es reciente la implicación del linfocito B en este terreno, ganando fuerza con el descubrimiento de las Breg y con la investigación básica centrada en este hito.

De manera concreta, ensayos clínicos demuestran que el uso de anticuerpos monoclonales (AcMo) anti- CD20 para eliminar el linaje B provoca efectos perjudiciales en las tasas de rechazo celular agudo⁵⁶.

Figura 14. Efectos pleiotrópicos de los linfocitos B reguladores en células del sistema inmunitario innato y adaptativo



Fuente: Peng et al. *Cell Death and Disease* (2018) 9:10

Entender los mecanismos de la regulación de la alorespuesta es clave si queremos conseguir TO después de un trasplante⁵⁷.

2.4. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE DONANTE Y RECEPTOR

El TOS no habría sido posible de no identificar los factores inmunológicos que ponen en marcha la maquinaria del SI de reconocimiento celular para diferenciar lo propio de lo ajeno y su posterior destrucción. Es necesario realizar una determinación inmunológica previa a la intervención para obtener unos resultados óptimos. Estos estudios tienen en

cuenta la compatibilidad entre donante y receptor tipificando genéticamente las moléculas HLA y el grupo sanguíneo ABO/Rh. Esta prueba se denomina *Cross-match* o prueba cruzada, y consiste en enfrentar células vivas del donante con suero del receptor. Si las células mueren, prueba positiva, el TOS estará contraindicado. No se aplica al TH, órgano poco susceptible a la acción de los anticuerpos y una prueba cruzada positiva no contraindica la intervención. Además de esto, se comprueba la presencia de anticuerpos citotóxicos anti-HLA, que una vez realizado el trasplante se sabrá si son DSA o no⁵⁸⁻⁶⁰. La presencia de anticuerpos puede deberse a varias causas, como embarazos o abortos, transfusiones sanguíneas o la existencia de trasplantes previos. Con la puesta en marcha de esta prueba, la optimización de su detección cada vez más sensible y con la posibilidad de desensibilizar al paciente se ha logrado reducir la frecuencia del rechazo hiperagudo.

2.4.1. Tipos de rechazo

En el rechazo, además de la respuesta inmunitaria local, existe una sistémica en la que intervienen células B, T, asesinas naturales (NK), macrófagos y múltiples citoquinas. Basándonos en esto se clasifican en²⁷:

- **Rechazo Hiperagudo (RHA):**

Está causado por la presencia de anticuerpos preformados capaces de reaccionar contra el órgano donado en el momento del trasplante. Se produce de forma rápida, minutos u horas, e intensa que provoca microtrombosis masiva del injerto y el deterioro de la función del órgano, lo que puede llevar al explante del injerto. En la actualidad aunque es poco frecuente sigue siendo un problema de gran relevancia, requiriendo la realización de pruebas previas al TOS.

- **Rechazo Agudo (RA):**

También conocido como rechazo celular debido a la acción de las células T del receptor frente a antígenos alogénicos del donante, HLA, provocando la liberación de IL-1 e IL-2, causantes de la activación y proliferación de linfocitos T_{H1} y CTL. Habitualmente estos

episodios de rechazo se producen en los primeros meses postrasplante. Se detecta ante la sospecha de alteración funcional del órgano, como aumento en los niveles de creatinina plasmática, elevación de enzimas pancreáticos o alteración en el ecocardiograma cardíaco (ECG). Se confirma el diagnóstico mediante biopsia del órgano trasplantado en la que se observa un infiltrado intersticial con presencia de polimorfonucleares y eosinófilos, monocitos y macrófagos. Todos los rechazos se clasifican de manera anatomopatológica según su severidad, lo que permite su gradación y la aplicación de un tratamiento adecuado. Estas lesiones suelen ser reversibles, pero si se mantienen, pueden evolucionar a formas de rechazo crónico.

- **Rechazo mediado por anticuerpos o humoral (RH):**

Basado en la producción de anticuerpos DSA dirigidos contra antígenos HLA o endoteliales del donante. Este tipo de rechazo se puso de manifiesto al observarse la presencia de episodios de rechazo con compromiso hemodinámico importante, pero sin evidencia de infiltración en la biopsia. Mediante inmunofluorescencia se observó la presencia de depósitos de inmunoglobulinas (Igs), complemento y fibrinógeno a nivel de la pared vascular⁶¹. Estos DSA se unen a los antígenos dando lugar a la activación de la cascada del complemento, responsable del daño tisular. El RH implica otras vías independientes de complemento, como son células endoteliales que expresan molecular de adhesión que determinan la liberación de citoquinas y la aparición de infiltrados celulares de leucocitos y plaquetas. Este tipo de rechazo aparece en fases precoces del TOS, aunque también puede aparecer tras varios años⁶². En tratamiento consiste en la eliminación de los DSA mediante técnicas de plasmaféresis o inmunoadsorción y en la reducción de la producción de dichos anticuerpos con diversos fármacos como inmunoglobulinas endovenosas (IGIV) o AcMo.

- **Rechazo Crónico (RC):**

El tipo de rechazo más desconocido hasta el momento se considera cuando la función del órgano trasplantado está crónicamente deteriorada y pudiese perderse el injerto. El

término RC se introdujo por primera vez en 1960 en un modelo animal de rechazo de injerto de piel. Se denominó así porque ocurría tardíamente y se caracterizaba por atrofia y fibrosis. Caracterizado por la aparición de cambios clínicos y funcionales en el órgano trasplantado, acompañado de alteraciones histopatológicas específicas en el mismo. Se trata de un rechazo lento, progresivo y gradual que tiene lugar meses o años postrasplante, cuyo inicio suele ser asintomático en la mayoría de los casos. Dependiendo del órgano trasplantado adopta nombres específicos, siendo EVI en cardíaco, nefropatía crónica del injerto (NCI) en riñón o BO en TP⁶³⁻⁶⁵. Este tipo de rechazo está ganando importancia con los años debido a que problemas como el RA y las infecciones, graves hasta ahora, se van controlando. Emerge como la causa principal de pérdida del injerto a largo plazo. Se han encontrado una serie de factores de riesgo que favorecen la aparición del RC, como infección por CMV, nefrotoxicidad crónica por el uso de drogas inmunosupresoras, alteraciones lipídicas, hipertensión arterial (HTA), etc. Actualmente no existe un tratamiento específico para este tipo de rechazo, por tanto, es de vital importancia prevenir y controlar estos factores con el objetivo de disminuir el fracaso del órgano trasplantado^{66,67}.

3. FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES

3.1. MECANISMOS MOLECULARES

El objetivo de la terapia inmunosupresora es garantizar la supervivencia del injerto el máximo tiempo posible. Este tratamiento consiste en modular la respuesta del SI, disminuyendo así la capacidad de respuesta frente a las células del órgano trasplantado, sirviendo como prevención y también como terapia, puesto que se tomarán de por vida^{68,69}. Algunas terapias pueden también contribuir a generar un entorno de tolerancia inmunológica. La inmunosupresión ideal no se ha alcanzado todavía y existen variaciones respecto al tiempo de administración, la dosis de corticoides y los fármacos utilizados. El principio básico de los fármacos inmunosupresores es la capacidad de suprimir el reconocimiento allogénico, inhibiendo generalmente los mecanismos de activación de linfocitos T en cualquiera de las tres señales (Apartado 2.2). De este modo podemos agrupar los fármacos en 7 grupos⁷⁰:

- I. Glucocorticoides
- II. Anticalcineurínicos: inhiben la síntesis de IL-2
- III. Inhibidores de la síntesis de nucleótidos: Antimetabolitos
- IV. Inhibidores de la señal de proliferación: mTOR
- V. Anticuerpos bloqueantes de IL-2 Receptor (CD-25)
- VI. Anticuerpos anti CD3: dificultan el reconocimiento antigénico
- VII. Agentes que destruyen los linfocitos circulantes y los existentes en órganos linfoides: AcMo y preparaciones anti linfocitarias policlonales.

3.1.1. Glucocorticoides

Además de su participación como reguladores del metabolismo de los carbohidratos, los glucocorticoides poseen actividad inmunosupresora. Son capaces de reducir de manera drástica la inflamación provocando un descenso en la concentración de linfocitos y monocitos en sangre⁷¹. Se administran en las fases de inducción y mantenimiento,

también en casos de RA. Estos agentes bloquean la producción de citocinas y sustancias vasoactivas, entre las que se incluyen la IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , quimiocinas, prostaglandinas, MHC- II y proteasas⁷². Actúan como agonistas del receptor de glucocorticoides, pero, a altas dosis, tienen efectos de forma independiente. Los receptores se encuentran en el citoplasma de forma inactiva formando un complejo. La unión de los glucocorticoides al receptor provoca la activación de éstos y la formación de un dímero que migrará al núcleo, donde se unirá a las secuencias promotoras del DNA de ciertos genes induciendo o inhibiendo la transcripción^{73,74}. Los corticoides más utilizados en trasplante son la prednisolona o prednisona oral y la metilprednisolona intravenosa. Los efectos secundarios más habituales son osteoporosis, necrosis avascular, cataratas, intolerancia a la glucosa, infecciones, HTA, pancreatitis, etc. Estos fármacos son metabolizados por el hígado y excretados como forma inactiva por el riñón. El pico de absorción es a las 6 horas posteriores a la toma, desapareciendo en sangre 24 horas después de la ingesta^{75, 76}.

3.1.2. Inhibidores de la Calcineurina: Ciclosporina y Tacrolimus

En esta sección se encuentran la CsA y el tacrolimus (Tac). Son moléculas muy liposolubles que inhiben la actividad de la enzima fosfatasa de la CaN, interfiriendo en la transcripción génica de citocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , e inhibiendo la proliferación de linfocitos T CD4⁺^{77,78}. De esta manera se reduce la respuesta celular suprimiendo o reduciendo el rechazo de injertos o trasplantes. Tac es entre 10 a 100 veces más potente que CsA, explicando la diferencia entre dosis de ambos fármacos. CsA se absorbe en el tramo proximal del intestino delgado mientras que Tac lo hace a lo largo del tracto gastrointestinal. CsA se une principalmente a lipoproteínas mientras que Tac lo hace a albúmina y a α 1-glicoproteína.

Al ser liposolubles se distribuyen por todo el organismo, pero se concentran en tejidos grasos como hígado, riñón, ciertas glándulas endocrinas, nódulos linfáticos, pulmón, bazo, páncreas y médula ósea (MO). También atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) y la placentaria. Entre sus efectos adversos se destaca la nefrotoxicidad, que guarda relación con la dosis, y se contraindica la administración de los dos fármacos al

mismo tiempo. Los casos más graves se asocian a CsA. También pueden aparecer síntomas neurológicos (mareos, desorientación, coma, ataxia, psicosis...), disminuyen la secreción de insulina provocando cuadros de diabetes mellitus (DM) postrasplante que requiere tratamiento, más frecuente en el uso de Tac^{79, 80}.

El metabolismo lipídico también se ve modificado, causando un aumento de colesterol y triglicéridos y, aunque se han descrito casos de linfomas y alteraciones linfoproliferativas, no son mutagénicos, sino que se asocia a la propia inmunosupresión del SI, igual que el riesgo de presentar infecciones. Tampoco son teratogénicos, pero su uso durante el embarazo conlleva riesgo para el feto, como prematuridad, bajo peso, retraso en el crecimiento intrauterino, y en la madre, HTA y riesgo de diabetes gestacional⁸¹.

3.1.3. Inhibidores de la síntesis de nucleótidos. Antimetabolitos

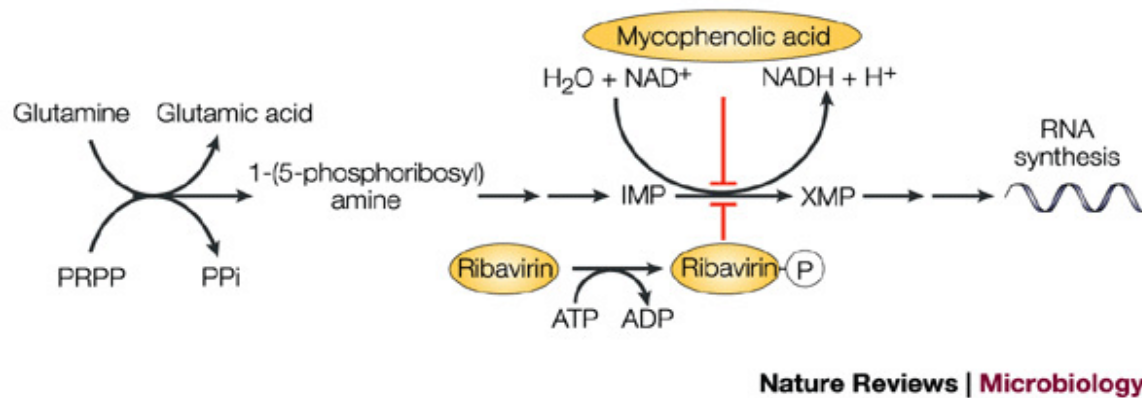
3.1.3.1. Azatioprina

Se trata de un derivado imidazólico de la 6- mercaptopurina que actúa inhibiendo la síntesis de purinas (adenina y guanina) y, por tanto, la proliferación de los linfocitos T. Se administra vía oral en dosis única de 1.5 -2 mg/kg cada 24 horas, aunque también es posible por vía endovenosa. Es metabolizada por el hígado y tras las primeras semanas postrasplante se recomienda bajar la dosis a 1- 1.5 mg/Kg/día para evitar toxicidad hepática^{82, 83}. Actualmente en desuso aunque en ocasiones se sigue utilizando cuando otros fármacos de este grupo no se pueden utilizar.

3.1.3.2. Ácido micofenólico/ mofetil micofenolato

El fármaco más utilizado de los antimetabolitos en TOS es el ácido micofenólico. Su mecanismo de acción es la inhibición de la proliferación de los linfocitos T y B activados mediante la inhibición selectiva, reversible y no competitiva de la enzima inosina-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)^{84,85}. La función de la IMPDH es la hidrogenación del nucleótido inosina monofosfato (IMP) para dar lugar a xantosina monofosfato (XMP) que posteriormente formará guanina monofosfato (GMP), precursor de la síntesis de nucleótidos (Figura 15)⁸⁶.

Figura 15. Mecanismo de acción del micofenolato de mofetilo (MMF)



Se administra en forma de sales: micofenolato de mofetilo (MMF) y micofenolato sódico (MPS) que se prepara en comprimidos de liberación retardada con cubierta entérica^{87,88}. El MMF es un profármaco que, al ser hidrolizado por las esterasas de las paredes gástrica e intestinal, la sangre, el hígado y otros tejidos, libera el producto activo. En sangre, el ácido micofenólico, se encuentra unido a la albúmina en un 97%. Cuando hay una situación de hipoalbuminemia, insuficiencia hepática e IR grave aumenta la fracción libre. Su excreción es fundamentalmente renal en forma de metabolitos, por procesos de secreción tubular activa. El MMF no se elimina mediante hemodiálisis. La fracción de excreción biliar experimenta circulación enterohepática por acción de las glucosidasas intestinales y se aprecia un segundo pico en la concentración plasmática a las 6- 12 horas desde su administración. La inmunosupresión varía en función del tipo de TOS, lo que hace que haya diferentes protocolos de actuación. La utilización de CsA o Tac incluidas en el régimen de doble (corticoides), triple (corticoides y micofenolato) o cuádruple (corticoides, micofenolato y globulina anti linfocitaria (GAL)) terapia constituye la clave de la inmunosupresión⁸⁹⁻⁹¹.

3.1.4. Anticuerpos Monoclonales

Las ventajas frente a los anticuerpos policlonales es que son específicos de un antígeno concreto. Estos actúan específicamente frente a linfocitos T sin causar una linfopenia generalizada, lo que conlleva un menor riesgo de desarrollo de infecciones o tumores.

Si se obtienen como quimeras ratón- humano se denominan con el sufijo “-ximab”, si son humanizados, con el sufijo “-zumab”^{92,93}.

Atendiendo a su mecanismo de acción se agrupan en:

- Inmunomoduladores: inhiben la célula blanco de forma temporal.
- Inmunodepresores: elimina una población específica de linfocitos que tardará en recuperarse tras el tratamiento.
- Bloqueantes: actúan sobre los linfocitos T reguladores.

3.1.4.1. Daclizumab

Es uno de los AcMo humanizados, bloquea específica y antagónicamente CD25, subunidad α del receptor de IL-2, impidiendo la unión de IL-2 e impidiendo su acción biológica. Su uso en la fase inductora en TOS se basa en la capacidad de inhibir la expansión clonal de los linfocitos T alorreactivos que median el RA⁹⁴. Una dosis de 1 mg/Kg cada 15 días, con un máximo de cinco dosis, mantiene los niveles séricos de IL-2R saturados durante más de 3 meses posteriores al TOS. Se recomienda aplicar la primera dosis en las 24 horas previas al TOS. El tiempo de vida medio del Daclizumab en el organismo es de 270 a 919 horas, parecido a la IgG humana^{95,96}. Está contraindicado en casos de embarazo y lactancia por traspasar la BHE. Algunos estudios evidencian que el uso prolongado de Daclizumab podría tener efectos negativos en la inducción de tolerancia, ya que CD25 caracteriza a las Treg cuya función principal es el mantenimiento de ésta^{97,98}. Además, el sistema IL-2/IL-2R media la muerte celular inducida por activación, uno de los mecanismos encargados de eliminar células autorreactivas⁹⁹. En nuestro hospital, Gregorio Marañón (HGUGM), se retiró el uso de este anticuerpo en 2011 sustituyéndose por Basiliximab ante la falta de comercialización de este producto.

3.1.4.2. Basiliximab

AcMo IgG1 quimérico murino- humano indicado como terapia de inducción en TOS y combinado con otros inmunosupresores para la prevención del RA. Su mecanismo de acción es igual a Daclizumab, actuando contra la cadena α del IL-2R (CD25). Su administración es por vía parenteral o como perfusión intravenosa durante 20 - 30

minutos. Puede producir reacciones de hipersensibilidad severas y agudas tanto en exposición inicial como reexposición a tratamiento. También puede causar desórdenes linfoproliferativos e infecciones oportunistas como CMV. Su uso está contraindicado en embarazo y lactancia por poseer efectos potencialmente peligrosos para los lactantes¹⁰⁰.

3.1.5. Anticuerpos policlonales: ATG

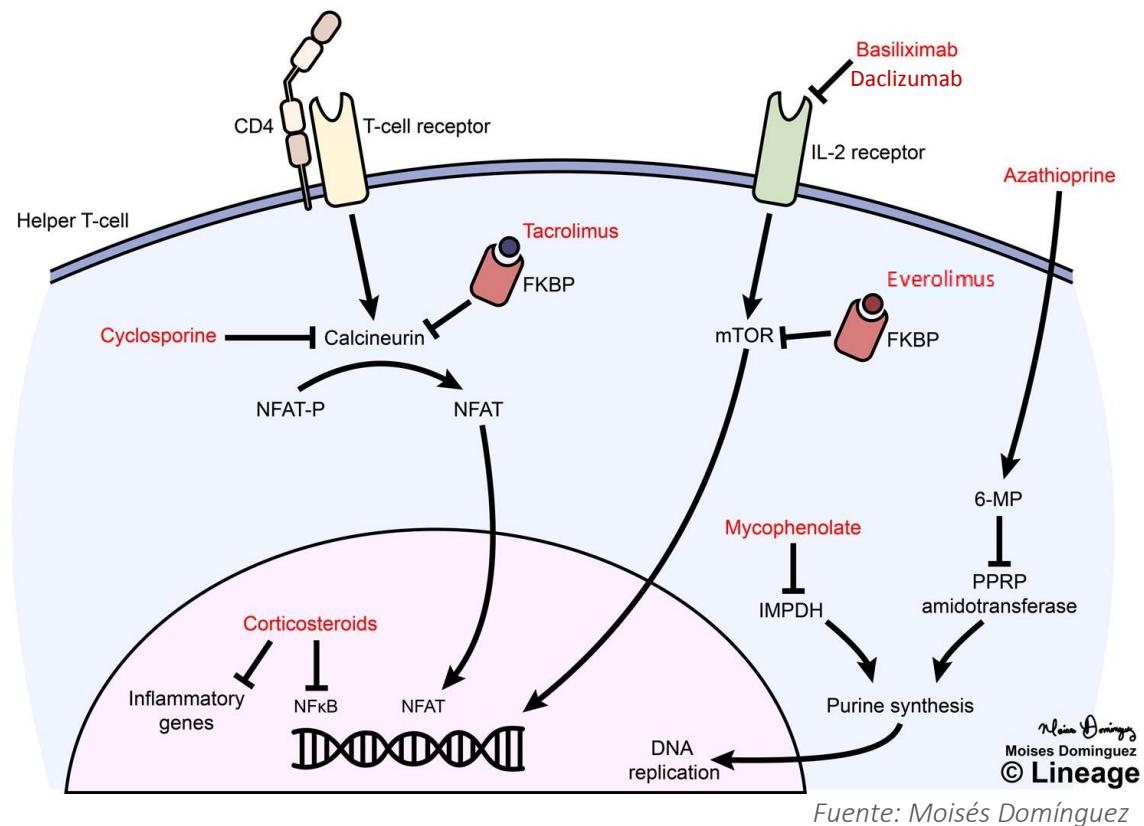
Actúa contra timocitos provocando una depleción casi total de los linfocitos T. Provoca la lisis de esta población por activación del sistema del complemento y posterior fagocitación de las células T opsonizadas. Una pequeña porción de estos linfocitos puede sobrevivir mediante una adaptación y son capaces de regular negativamente la expresión del CD3 de membrana¹⁰¹. La dosis suele variar entre 1.5 -5 mg/Kg/día con una duración oscilante entre 7 y 14 días postrasplante. Se administra a través de un catéter venoso central diluido en suero salino o glucosado de forma lenta, unas 6-8 horas. Actualmente el uso de ATG está generalizado en TC, se reserva para situaciones específicas en TR y es excepcional en TH¹⁰².

3.1.6. Inhibidores de la señal de proliferación: mTOR. Everolimus

Everolimus actúa como inhibidor de la señal de proliferación mTOR provocando la alteración en la traducción de ciertos RNA mensajeros que codifican proteínas importantes del ciclo celular, glucólisis y en la adaptación a la hipoxia. Produce una redistribución de los linfocitos T y B disminuyendo en sangre periférica y se acumulan en los nódulos linfáticos y placas de Peyer^{70,71}. De este modo se reduce la infiltración linfocitaria del injerto mediante la modificación de los receptores de las quimiocinas de los linfocitos.

En la actualidad normalmente se usa la terapia combinada, generalmente triple terapia, en la que habrá un corticoide, un inhibidor de la CaN y un tercer fármaco de otro grupo, lo que permite actuar a tres niveles diferentes y reducir la dosis de cada uno de ellos debido a un efecto sinérgico¹⁰³. En la Figura 16 se muestra un esquema en la que se puede observar en punto en el que interviene cada inmunosupresor.

Figura 16. Representación esquemática de los diferentes inmunosupresores utilizados en trasplante de órgano sólido



3.2. REGÍMENES DE INMUNOSUPRESIÓN EN TRASPLANTE: INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO

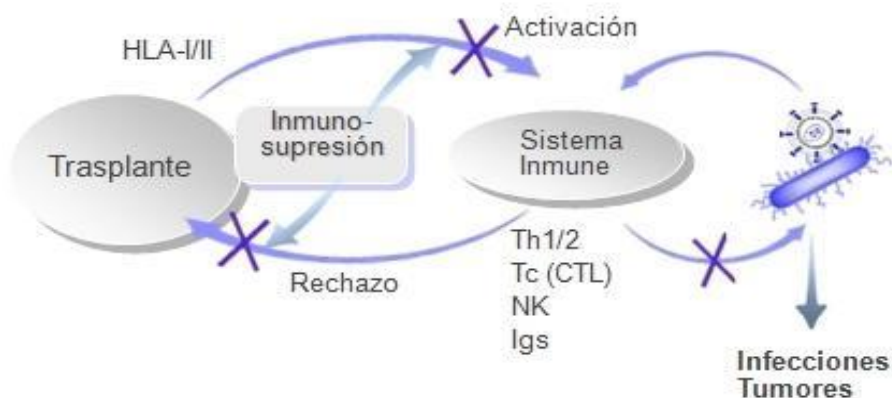
Existen varios regímenes en el uso de inmunosupresores, el primero es el de inducción. Consiste en la aplicación del tratamiento en los primeros momentos del TOS, con el objetivo de evitar el RA. Durante este periodo se emplean dosis más altas de fármacos, su duración no está establecida y se administran varias drogas, lo que ha dado lugar a la realización de varios protocolos que dependen del centro, de las características del enfermo y del tipo de trasplante, logrando una terapia individualizada. Estas dosis de inmunosupresores se van disminuyendo con el tiempo, lo que da lugar a un nuevo periodo, llamado de mantenimiento. En esta nueva fase lo más importante es evitar el rechazo sin poner en riesgo la vida del paciente¹⁰³. La individualización de la fase de inducción consiste en conseguir el equilibrio entre eficacia y baja nefrotoxicidad. La fase

de rescate se aplica cuando ha habido fallo del injerto, rechazo o ha fracasado el tratamiento inmunosupresor que se le estaba aplicando. Si esto ocurre, se modifica la dosis o el tipo de terapia. Lo óptimo es lograr una inmunosupresión que reduzca al máximo el RA y no genere infección ni lleve a una neoplasia¹⁰⁴.

4. PROBLEMAS ASOCIADOS A LA TERAPIA INMUNOSUPRESORA. INFECCIONES

Al debilitar el SI del receptor por el uso de inmunosupresores se produce un aumento del riesgo de padecer infecciones y favorecer la aparición de procesos neoplásicos al quedar bloqueada la respuesta inmunitaria (Figura 17).

Figura 17. Balance del efecto del uso de terapia inmunosupresora en trasplante de órganos



Fuente: *Inmunología del trasplante; La inmunosupresión*

Las infecciones presentes durante el primer mes postrasplante son las habituales que podrían darse en cualquier intervención quirúrgica: neumonía, infección del catéter intravenoso o herida quirúrgica e infecciones del tracto urinario (ITU). Exceptuando posibles reactivaciones del virus de herpes simple (VHS), durante este mes no se observan infecciones relacionadas con la depleción de los linfocitos T. Es a partir del primer mes cuando aparecen infecciones oportunistas relacionadas con la célula T^{105} . A partir de los 6 meses postrasplante pueden aparecer reactivaciones virales o infecciones virales crónicas. Las infecciones causadas por el virus varicela zoster (VVZ) pueden darse en cualquier momento. También pueden aparecer síndromes linfoproliferativos asociados al virus de Epstein Barr (SLP-EB) a más largo plazo. Los SLP son alteraciones que pueden variar desde una expansión policlonal benigna de células B hasta diversas neoplasias originadas en células linfoides en diferentes estados madurativos (gammopatías monoclonales, linfomas, leucemias)¹⁰⁶. Las infecciones más frecuentes

son las bacterianas, seguidas de las víricas y en menor proporción las causadas por hongos y protozoos. Estas infecciones aparecen principalmente en los 3 meses posteriores al trasplante.

a. INFECCIONES BACTERIANAS

Las infecciones ocasionadas por bacterias son las más comunes y las que provocan una mayor mortalidad. La incidencia de éstas en TC es entre un 21- 30%, aumentando a un 47% en TR y a un 54% en TP. El diagnóstico se torna complicado debido a la atenuación de las manifestaciones clínicas causado por la inmunosupresión.

I. Infecciones bacterianas en trasplante cardíaco

Después del TC, la infección es la primera causa de mortalidad durante el primer año, siendo la bacteriana la etiología más común con la mitad de los pacientes trasplantados afectados. La neumonía es la infección con mayor prevalencia (28% de los casos). En la mitad de los casos, la neumonía está ocasionada por organismos nosocomiales^{106,108}. Una de las complicaciones propias de este tipo de trasplante es la mediastinitis o complicación de la herida, un hecho grave y de difícil diagnóstico que pone en riesgo la vida de los pacientes y que es agravado por el estado de inmunosupresión¹⁰⁹.

II. Infecciones bacterianas en trasplante pulmonar

Los pulmones son órganos con contacto directo con el medio exterior, por lo que las complicaciones infecciosas son frecuentes en pacientes trasplantados, siendo una de las causas más importantes de mortalidad temprana y tardía. Además del pulmón, la cavidad torácica también se ve afectada ya que, durante el postrasplante, la integridad de la pleura se ve afectada, no se recupera y el mediastino deja de existir al perderse el espacio pleural¹¹⁰. En la actualidad, y gracias a la profilaxis, se ha reducido la incidencia y han disminuido los periodos de aparición de infecciones causadas por diferentes organismos, principalmente virus y hongos¹¹¹. La transmisión de bacterias a través del injerto es muy alta en este tipo de trasplante debido a la colonización bronquial, llegando a darse en un 50% de los casos. Para evitarlo se recomienda hacer cultivos de secreciones respiratorias del donante para poder establecer un tratamiento antibiótico profiláctico. Este fenómeno es raro en el resto de TOS¹¹².

III. Infecciones bacterianas en trasplante renal

La infección bacteriana es la primera causa de infección durante el primer mes postrasplante, y la segunda tras la vírica pasados los 60 días. Las ITU son las infecciones más habituales, con una etiología similar a pacientes no trasplantados, causadas por *E. coli*, *pseudomonas* y levaduras¹⁰⁷. Si llegan a ser recidivantes, hay que buscar la causa como estenosis y reflujo uretral o vejiga neurógena. La neumonía bacteriana es más típica de otros TOS y menor que la causada por CMV. Las infecciones cuyo foco es la herida quirúrgica son poco probables, pero si ocurren son un problema grave, todavía mayor si se ve afectado el espacio perinéfrico¹¹³⁻¹¹⁵.

b. INFECCIONES VÍRICAS

Las infecciones víricas en TOS tienen diversas consecuencias. En primer lugar, está el hecho en sí de la infección, pero por otra parte, poseen un efecto inmunomodulador que favorece la aparición de episodios de rechazo o infecciones recurrentes con el posible desarrollo de neoplasias. La seronegatividad específica del paciente frente a virus antes del trasplante es un factor de riesgo para contraer primoinfección postrasplante, siendo la mayoría reactivaciones de virus latentes. Este riesgo todavía es mayor si el donante presenta seropositividad. El uso de anticuerpos antifocitarios facilita las infecciones virales oportunistas. El virus más frecuente en TOS es VHS, pero también existe una gran susceptibilidad a CMV, adenovirus, virus respiratorio sincitial (VRS) o influenza.

I. Infección por CMV

Es la complicación vírica más frecuente en TOS. Se ha observado que entre un 60 y un 90% de los trasplantados sufren infección por CMV en torno al segundo o tercer mes postrasplante¹¹⁶. Cuando se aísla CMV en una muestra no implica que haya enfermedad activa ya que, al igual que el resto de los virus tipo herpes, puede permanecer latente en los tejidos durante largos periodos de tiempo y reactivarse cuando la inmunocompetencia se ve comprometida. Cuando el receptor es seronegativo y el donante seropositivo la infección puede adquirirse a través del órgano trasplantado o por contaminación con los productos sanguíneos durante el proceso quirúrgico, lo que

provoca en el paciente un alto riesgo de desarrollo de enfermedad^{117,118}. La infección por este virus es infrecuente a partir del 6 mes y puede causar enfermedad directa provocando fiebres, mialgia y mal estado general, o puede progresar y hacerse órgano-específica. Si ocurre esta progresión los síntomas son de mayor gravedad y dependen del órgano trasplantado: hepatitis, nefritis, carditis, etc.

II. Infección por VHS

La infección por VHS es el resultado de una reactivación latente. Su clínica es leve y aparece en las primeras semanas postrasplante. Suele manifestarse como herpes labial, pero debido al estado inmunológico del paciente puede complicarse y cursar con clínica más severa pudiendo ocasionar úlceras graves en piel y mucosas, o viscerales (neumonitis, hepatitis...)¹¹⁸.

III. Infección por VVZ

Cursa con dos clínicas diferentes, primoinfección como varicela y reactivación como herpes zoster. La mayoría de los pacientes trasplantados, adultos, son seropositivos y no se han observado evidencias de que este tipo de infección llegue a través del injerto trasplantado. La varicela es una infección diseminada que cursa con neumonía hemorrágica, hepatitis o encefalitis. El TOS más afectado por este tipo de infección es el TP, que cursa con una clínica de neumonía de 3 a 7 días postrasplante tras lesiones cutáneas. En cambio, la infección por Herpes Zoster aparece a partir del sexto mes con una incidencia entre 5 - 13%¹¹⁹.

IV. Infección por VEB

Cursa con mononucleosis infecciosa similar a la de personas inmunocompetentes. Se asocia directamente al desarrollo de SLP-EB, con una incidencia del 1- 14%^{106, 118}. Posee una clínica muy variada y multifocal que incluye afectación visceral y del órgano trasplantado. Se han identificado factores de riesgo en el desarrollo de SLP-EB como la seronegatividad del paciente, el uso de Tac o enfermedad por CMV.

5. MONITORIZACION INMUNOLÓGICA DEL PACIENTE TRASPLANTADO

En la práctica clínica se han implementado estrategias de monitorización inmunológica durante el periodo de seguimiento postrasplante cuyo objetivo es el ajuste del tratamiento con arreglo al estado global de inmunosupresión de cada paciente¹²⁰.

Hasta la fecha, la estrategia con un grado significativo de implantación asistencial se limita a la monitorización de los niveles plasmáticos de fármacos inmunosupresores. La búsqueda de biomarcadores sensibles y específicos cuya determinación sea sencilla y reproducible desde un punto de vista técnico es de vital importancia para poder tomar decisiones terapéuticas^{115,121,122}. Los esfuerzos se han centrado en la búsqueda de marcadores de rechazo, pero en los últimos años han aumentado el número de trabajos dedicados a la búsqueda de marcadores capaces de identificar el riesgo de desarrollo de infecciones en pacientes trasplantados. El objetivo es la elaboración de un *score* o escala multidimensional que incorpore varios biomarcadores que permitan asociar un riesgo concreto de infección y rechazo a cada paciente¹²⁴.

5.1. MARCADORES ASOCIADOS A INFECCIÓN POSTRASPLANTE

Las estrategias de monitorización inmunológica actuales se centran en la naturaleza no patógena específica, es decir, que no está centrada en un determinado microorganismo¹¹⁸.

- **Niveles séricos de inmunoglobulinas**

Numerosos estudios relacionan los niveles bajos de Igs con un mayor riesgo de infección. En concreto, la hipogammaglobulinemia (HGG) asociada a IgG ha sido evaluada y recientemente ha sido publicado un meta- análisis donde la coloca como factor de riesgo en TOS¹²³. La HGG se define como leve (500- 700 mg/dl), moderada (350- 500 mg/dl) o severa (<350 mg/dl)^{124,125}. Estos resultados coinciden con los obtenidos por nuestro grupo en el HGUGM en un estudio prospectivo multicéntrico realizado en 170 pacientes TC donde un 31,2% de ellos desarrollaba al menos una infección severa. Aquellos

pacientes con valores de IgG < 600 mg/dl en la semana post- trasplante tenían un mayor riesgo de desarrollo de infecciones en general, bacterianas en particular y enfermedad por CMV¹²⁶. Estos resultados también se han observado en TP, donde un estudio multicéntrico prospectivo de 82 pacientes trasplantados asocia niveles bajos de IgG (<600 mg/dl) a la semana post- trasplante a un riesgo mayor de infección por CMV e infecciones fúngicas¹²⁷. En un metaanálisis realizado a partir de 579 TR la prevalencia de HGG IgG a lo largo del primer año postrasplante fue del 40%, siendo grave hasta en el 8% de los casos¹²³. Otro estudio demuestra que los receptores de TR con HGG de cualquier clase (IgG, IgA, IgM) en el primer mes postrasplante presentan una mayor incidencia de infección bacteriana a lo largo de los meses siguientes¹²⁸.

- **Niveles séricos de componentes de factores del complemento**

En TC se ha observado que los niveles disminuyen tras el trasplante. Debido a la posición clave que ocupa C3 en la cascada del complemento se ha revelado como marcador más útil que C4. En concreto, en un estudio de 270 TR la hipocomplementemia C3 (HCC3 < 80 mg/dl) en el primer mes estuvo presente en el 20% de los pacientes y fue identificada como factor de riesgo independiente de infección global o bacteriana en el periodo postrasplante¹²⁹⁻¹³¹. Esta tendencia también se ha demostrado en TC y trasplante hepático.

- **Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica**

El recuento de linfocitos CD4+ se realiza desde hace décadas para detectar el riesgo de infecciones oportunistas en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y ajustar la profilaxis¹³². También se ha descrito que niveles de células T CD4+ menores a 350 células/ μ L son factor de riesgo de infecciones en TC¹²⁴. En este trabajo la presencia de linfopenia CD4 a la semana combinada con otras deficiencias como hipogammaglobulinemia, hipocomplementemia y/o nivel bajo de células NK configuraban un score inmunológico de riesgo de infección¹²⁴.

5.2. MARCADORES ASOCIADOS A RECHAZO

El diagnóstico de rechazo ha sido, y es, un tema controvertido por lo complicado de la detección de signos de rechazo incluso antes de que se produzcan manifestaciones clínicas debido al uso de terapia inmunosupresora. La monitorización clásica de rechazo consiste en la realización de biopsias seriadas y establecidas en el tiempo por protocolo¹³³. Una biopsia no deja de ser un método invasivo que conlleva sus riesgos y que además, no sirve para predecir el rechazo, sino para confirmarlo. Dos marcadores establecidos desde los años noventa por P. Terasaki^{134,135} para la detección de RH o mediado por anticuerpos es el depósito de C4d y C3d en tejido. Los depósitos en biopsias de estos marcadores sirvieron para que se establecieran los criterios de RH¹³⁶. La detección de anticuerpos DSA postrasplante en sangre, marcadores bioquímicos como creatinina o el conteo de linfocitos totales también han permitido conocer el estado del paciente. La búsqueda actual está centrada en la identificación de marcadores de tolerancia en pacientes que han desarrollado TO⁵⁰.

5.3. POSIBLES MARCADORES ESTUDIADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL

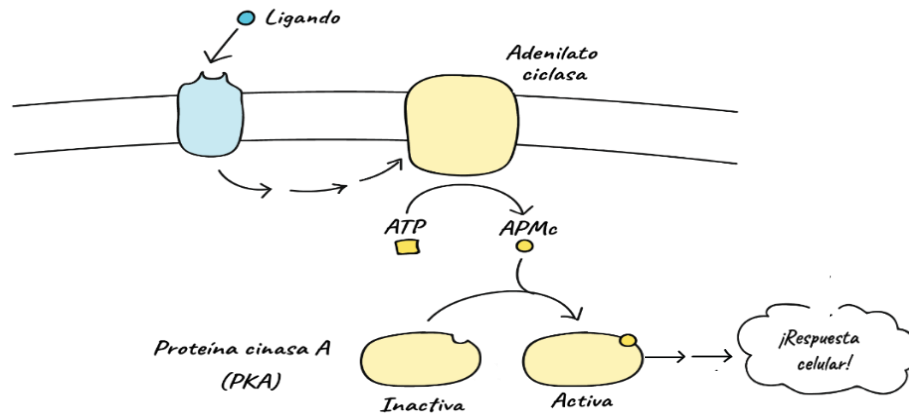
5.3.1. Adenosina 5'-trifosfato (ATP)

El adenosín 5'-trifosfato, adenosina trifosfato o ATP se considera una molécula esencial en procesos energéticos y metabólicos de las células y precursora de una serie de enzimas esenciales como el NAD⁺ o la coenzima A¹³⁷. El ATP está formado por una base de adenina, una ribosa y tres grupos fosfato. Su fórmula molecular es C₁₀H₁₆N₅O₁₃P₃, posee una masa molecular de 507.18 g/mol y tiene carácter ligeramente ácido (pH= 6.5). Las células son capaces de mantener una proporción ATP a ADP miles de veces superior, garantizando así la obtención de energía.

Actúa de este modo como señalizador extra e intracelular, papel importante tanto en el sistema nervioso central como el periférico además, está involucrada en una de las vías de activación más importantes a través del aumento de AMPc y de calcio intracelular a través del adenilato ciclasa (AC), (Figura 18)¹¹⁴. El ATP es liberado por las células de forma basal y aumenta por estímulos como inflamación o hipoxia. La cuantificación de

ATP en las células del SI en TOS nos permitirá conocer el estado inmunocompetente del paciente, como recientemente ha demostrado un ensayo clínico.

Figura 18. Esquema de activación de la Adenilato ciclasa y transmisión de señales a través de AMPc



Fuente: Khan Academy; Vías de transmisión de señal

5.3.2. Factor activador de célula B. BAFF

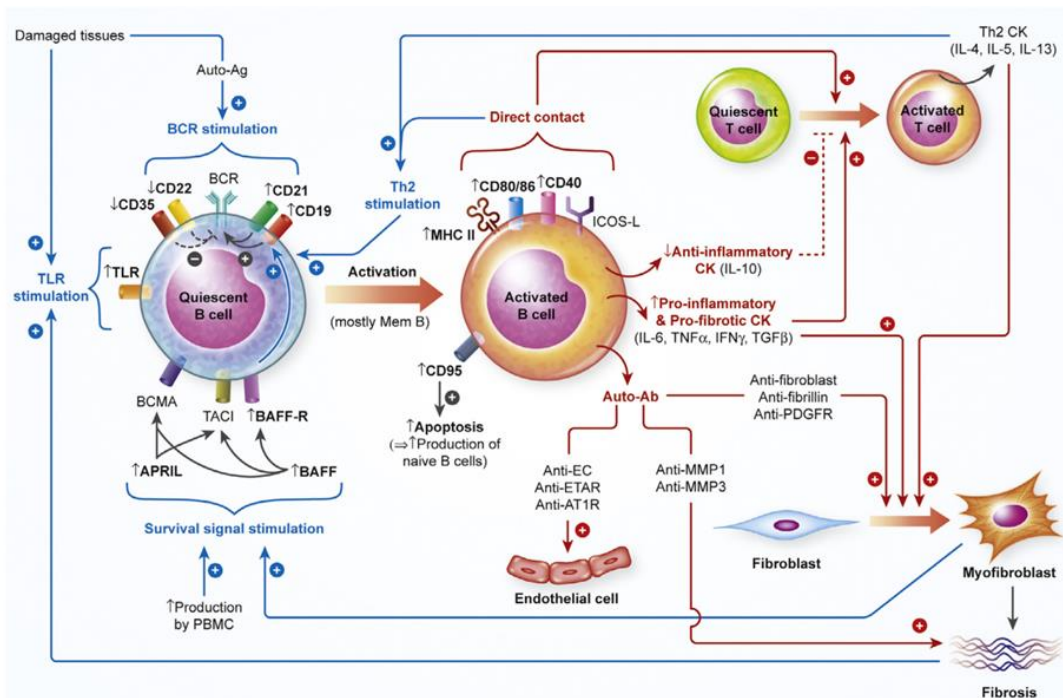
BAFF (*B cell activating factor*), también conocido como BLyS, TALL-1 and TANK, es un miembro de la superfamilia TNF conocido por su papel en la supervivencia y maduración de las células B¹³⁸. Su gen codifica una proteína de membrana tipo II de 185 aminoácidos. Una forma de 152 aminoácidos puede ser procesada de la membrana y encontrarse en suero humano de forma soluble¹³⁹⁻¹⁴². Existe una isoforma alternativa conservada capaz de formar hetero-multímeros con BAFF y actuar como regulador negativo de su secreción¹⁴³. BAFF es producido por numerosos tipos de células y tejidos, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, DC, linfocitos T, bazo, nódulo linfático y MO¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.

BAFF es ligando de los últimos tres receptores TNF de los miembros de la superfamilia (TNFRSF): Antígeno de maduración B (BCMA/TNFRSF17), activador de membrana, modulador de Calcio y ligando de la Ciclofilinas (TACI/TNFRSF13B) y receptor de BAFF (BAFFR)¹⁴⁸⁻¹⁵⁴. TACI y BCMA son receptores de BAFF y APRIL, mientras que BAFFR es específico de BAFF¹⁵⁴, (Figura 19).

Estudios en ratones genéticamente modificados evidencian que BAFF juega un papel importante en la maduración y supervivencia de los linfocitos B. Ratones Knockout exhiben una pérdida de células B foliculares y *marginal zone* en bazo y nódulos linfáticos, mientras que las células de la MO y las B1 del peritoneo generalmente no se ven afectadas¹⁵⁵. BAFF es necesario para la transición óptima de las fases T1 a T2 y puede incluir procesos de sobre regulación o infra regulación de miembros anti o proapoptóticos de la familia Bcl-2, respectivamente¹⁵⁶.

La sobreexpresión de BAFF en ratones transgénicos conlleva un aumento en el número de células B en bazo y nódulo linfático acompañado de expansión folicular e incremento del número y tamaño de los centros germinales¹⁵⁷. Estos ratones exhiben un fenotipo similar a trastornos autoinmunes, incluyendo elevado número de autoanticuerpos, depósito de Igs en riñones y glomerulonefritis acompañada de disfunción renal, similares a las encontradas en lupus eritematoso sistémico (LES)¹⁵⁸.

Figura 19. Efectos del exceso del factor activador de célula B, BAFF



Fuente: Role of B cells in the pathogenesis of systemic sclerosis.

[ps://doi.org/10.1016/j.revmed.2016.02.016](https://doi.org/10.1016/j.revmed.2016.02.016)

BAFF se encuentra elevado en el suero de pacientes con LES y síndrome de Sjögren y en pacientes con artritis reumatoide los niveles de BAFF en suero se correlacionan con el

título de anticuerpos^{139,142}. En la inmunodeficiencia variable común (IDVC) en donde existe una deficiencia en la producción de anticuerpos se han encontrado niveles de BAFF superiores a las concentraciones normales¹⁵⁹. Consecuentemente, BAFF podría actuar como diana potencial en terapia autoinmune. Estos estudios indican que valores anormales de BAFF pueden, no sólo estar implicados en desórdenes autoinmunes, sino también involucrados en el curso inmutopatológico de RA y RC en TOS. Recientemente se han encontrado niveles de BAFF pretrasplante renal significativamente superiores en pacientes sensibilizados¹⁶⁰.

5.3.3. Factores de complemento: C3d y C4d

El RH se caracteriza por la presencia de depósito de complemento C4d y C3d en biopsias endomiocárdicas (BEM) y el hallazgo de anticuerpos citotóxicos anti HLA circulantes. Se ha introducido el término de rechazo mixto basándose en la identificación de componentes celulares y humorales simultáneamente. Se propone el estudio de estos componentes en biopsias para ampliar el perfil de evaluación del paciente trasplantado¹⁶². C3d y C4d son moléculas producto de la lisis de los factores de complemento C3 y C4 que se unen de manera covalente a los tejidos y actúan como opsoninas implicadas en rechazo del injerto. C4d suele indicar activación por la vía clásica y es más duradero en el tejido. Su utilidad ha sido demostrada en biopsias renales, pero en cardíacas suele dar falsos positivos, resultando no ser útil en seguimiento. Por ello, algunas instituciones utilizan habitualmente CD68 o C3d como parte de su investigación de rechazo mediado por anticuerpos. El componente C3 del complemento juega un papel esencial en la activación del sistema de complemento, necesario para las vías clásica y alternativa¹⁶³. La detección de C3d en biopsias es indicativo de RA con alta probabilidad de posterior pérdida del injerto por RC¹⁶⁴.

5.3.4. Interleucina-10

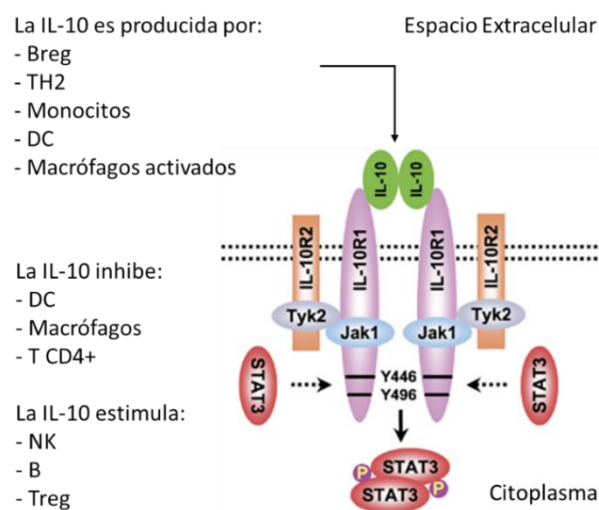
IL-10 es una citocina pleiotrópica de tipo II que juega un papel importante como reguladora de la función de las células mieloides y linfoides. La IL-10 es producida por distintos tipos de células del SI y ha ganado importancia al asociarse a la población

celular B10/ Breg (Figura 20), pero también se observa en queratinocitos de la piel, ciertas células tumorales y epiteliales.

La proteína cuenta con 160 aminoácidos que le confieren una masa de 18.5 kDa¹⁶⁵⁻¹⁷² y se encuentra como homodímero en solución, con una masa molecular de 39 kDa¹⁷¹. El gen de la IL-10 en humanos se encuentra en el cromosoma 1 y presenta una única copia en el genoma¹⁷³.

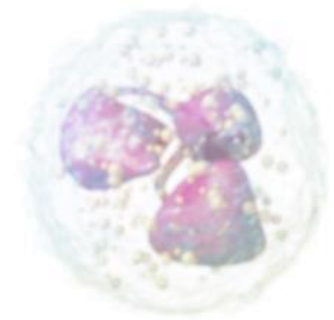
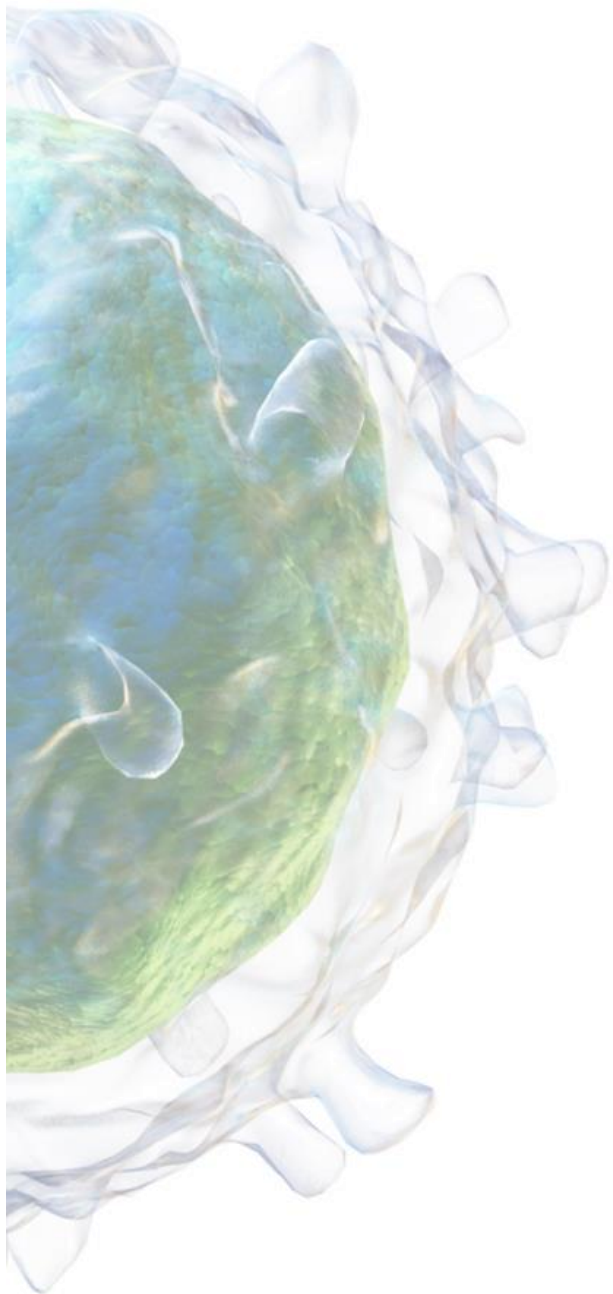
Su principal función es disminuir y regular la respuesta inflamatoria producida por DC y macrófagos, actuando como potente supresor de las funciones efectoras y reduciendo las respuestas adaptativas de los linfocitos CD4+¹⁷⁴. Su producción está perjudicada por citocinas como IL-4, IL-13 e IFN- γ , y también por su propia autorregulación. Se considera un potente inhibidor de la presentación antigénica, pues reduce la expresión del MHC-II y de las moléculas accesorias de coestimulación CD80 y CD86 en DC. Esta inhibición en la maduración de las DC provoca la disminución de citocinas inflamatorias como IFN- γ , IL-4 e IL-5 producidas por las células T, o TNF- α e IL-1 producidas por macrófagos. Además, IL-10 participa regulando la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, mastocitos y timocitos¹⁶⁶, por lo que su acción no es siempre inhibitoria.

Figura 20. Interleucina-10 (IL-10), Receptor de IL-10 y células del sistema inmunitario relacionadas con esta citocina.



Fuente: Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev. 226: 205-218

IL-10 es secretada en grandes cantidades por tejidos mucosos como el intestino o los pulmones, lugares donde las respuestas inmunológicas indeseadas o incontroladas pueden llegar a causar daños grandes. Su capacidad inmunosupresora sobre las células Th1 la hace posible candidata a uso clínico en TOS como prevención del rechazo¹⁷⁴. Datos publicados en *Journal Immunology* y en *Transplantation*, demuestran que es posible prolongar la sobrevida del corazón trasplantado, en ratas, si se usa un vector retroviral que codifica para IL-10. IL-10 también se ha mostrado elevada en infecciones parasitarias como *Schistosoma mansoni*¹⁷⁵, *Leishmania*¹⁷⁶, *Toxoplasma gondii*¹⁶⁹ y *Trypanosoma*¹⁷⁰ y, además, en infecciones por micobacterias y VIH¹⁶⁷.



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1. HIPÓTESIS

Desde el punto de vista de la inmunología del trasplante no existe un protocolo definido para la monitorización del paciente, con la excepción de los estudios de aloinmunidad. Nuestra experiencia en inmunología clínica nos demuestra que el estado de inmunocompetencia de los pacientes se puede evaluar y que además, muestra rasgos característicos e individuales de susceptibilidad a complicaciones postrasplante.

Considerar el estado de inmunocompetencia del paciente normal es un error, puesto que vienen con patologías de base que afectan al estado de salud de su sistema inmunológico.

Tras el trasplante se asumen alteraciones inmunológicas que comprometen su estado inmunocompetente aumentando el riesgo de episodios de infección y rechazo, pero rutinariamente no se cuantifican más allá de un hemograma, pruebas de tuberculina o de serologías a virus.

La ausencia de biomarcadores validados que permitan realizar una intervención oportuna que permita anticiparnos al evento y disminuir la morbimortalidad en estos pacientes es una de las principales razones de este estudio.

En base a estas consideraciones sugerimos que:

- En el trasplante de órgano sólido la terapia inmunosupresora causa alteraciones cuantitativas y funcionales tanto en la inmunidad celular como en la humoral, y que éstas comprometen el estado inmunocompetente del paciente.
- La identificación de alteraciones inmunológicas en el periodo pretrasplante y postrasplante en distintos tiempos podría indicarnos mayor o menos riesgo de desarrollo de complicaciones postrasplante, como las infecciones y/o el rechazo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

2.1.1. Evaluar el estado de inmunocompetencia del paciente pre y postrasplante mediante el estudio de distintos biomarcadores inmunológicos relacionados con el linfocito B, como factores solubles y subpoblaciones linfocitarias.

2.1.2. Identificar marcadores inmunológicos relacionados con el linfocito B como factores de riesgo de desarrollo de infecciones y rechazo en TOS.

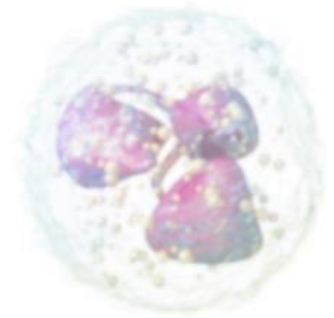
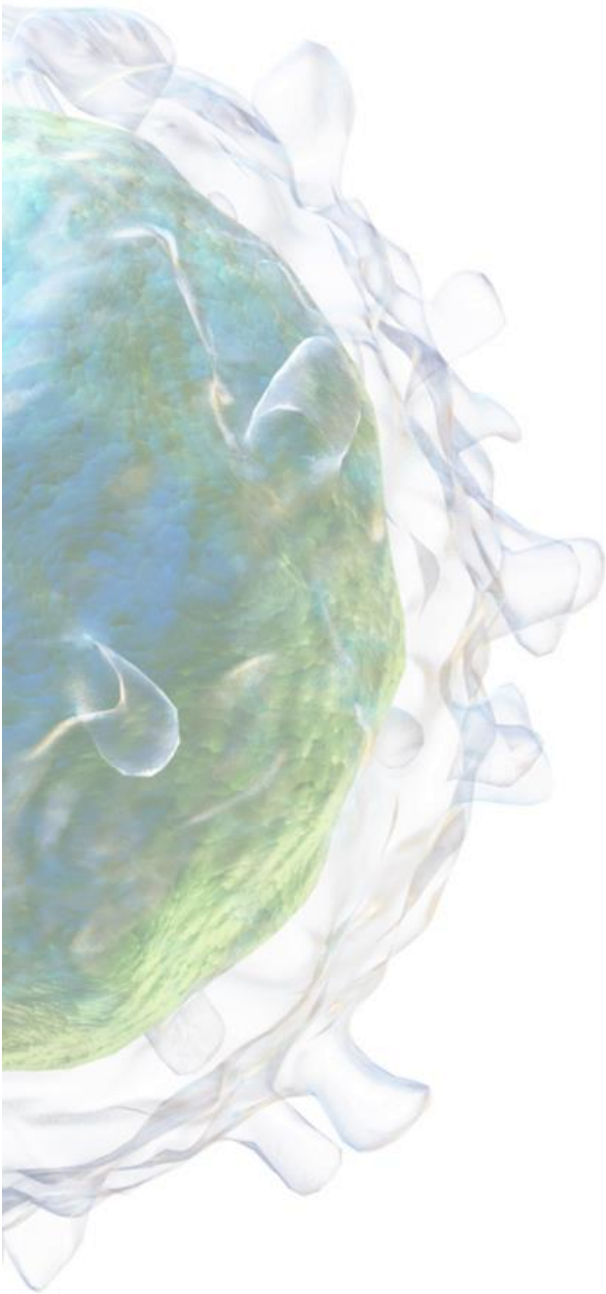
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Descripción de poblaciones linfocitarias y de los niveles de parámetros de inmunidad humoral pre y postrasplante en los diferentes tiempos de estudio.

2.2.2. Establecer la asociación existente entre las alteraciones fenotípicas de subpoblaciones linfocitarias en distintos tiempos y el desarrollo de eventos infecciosos y de rechazo en el periodo postrasplante.

2.2.5. Establecer la asociación existente entre las alteraciones de inmunidad humoral en distintos tiempos pre y postrasplante y el desarrollo de eventos infecciosos y rechazo.

2.2.6. Cuantificar los niveles de ATP en un grupo de trasplantados cardíacos y su asociación con el desarrollo de enfermedad vascular del injerto



III. MATERIALES Y MÉTODOS



1. MATERIALES

1.1. MATERIAL DE LABORATORIO

- **Material estéril**
 - Puntas blancas, amarillas y azules
 - Pipetas de 5, 10, 20 y 50 ml
 - Eppendorfs de plástico
 - Tubos de plástico para centrífuga de 10 ml
 - Placas de 96 pocillos de plástico de fondo plano (*Deltalab*)
- **Material no estéril**
 - Puntas blancas, amarillas y azules
 - Frascos de vidrio para almacenar disoluciones/ tampones
 - Eppendorfs de plástico
 - Tubos de plástico para citometría de flujo
 - Erlenmeyer de vidrio
 - Probeta de vidrio
 - Tubos de plástico de centrífuga
 - Tubos de suero de plástico
 - Pipeta Pasteur 3 ml
 - Tubos de polipropileno
- **Maquinaria empleada**
 - Centrífuga
 - Campana de flujo laminar
 - Citómetro de flujo Gallios (*Beckman Coulter, BC*)
 - Estufa de CO₂ al 5% y 37°C
 - Lector de placas (*Labtech LT 4000, Labtech, Inc., Massachusetts, EE. UU*)
 - Agitador de placas horizontal
 - Aspirador de placas (Lavador automático)
 - Pipetas automáticas
 - Inmunohistoquímica (BenchMark Ultra de Roche)

1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

- **Pacientes y controles**

El presente trabajo ha sido realizado bajo la aprobación del comité de ética e investigación clínica (CEIC) del HGUGM. Todos los pacientes que han formado parte de este estudio han sido informados y se les solicitó un consentimiento informado para la publicación de los datos, siempre y cuando éstos sean de forma anónima. El proyecto plantea varios estudios independientes que se detallarán más adelante.

Para establecer valores de referencia de los estudios sobre suero y plasma se contó con 58 controles sanos (Tabla 1) y un grupo de 95 para el estudio de poblaciones celulares, con una distribución de sexo y edad similar y comparable con el grupo de estudio.

Para el estudio se analizaron muestras de 217 pacientes trasplantados cardíacos, con fechas desde el 2006 hasta el 2015; 97 trasplantados renales desde el año 2014 al 2016 y 82 trasplantados pulmonares desde 2009 a 2012 (Tabla 2).

También contamos con un estudio transversal en el que se incluye un grupo de pacientes TC de larga duración con diagnóstico de EVI (N= 21) en diferentes grados y otro grupo de pacientes sin complicaciones postrasplante cardíaco denominados controles quirúrgicos con tiempos postrasplante similares (CQ, N= 10).

Tabla 1. Características demográficas del grupo control sano

	CS Células	CS Solubles
N	95	58
Edad (rango)	54.68 (25-67)	49.68 (28-63)
Hombre/Mujer (%)	63.8/ 36.2	46.2/ 53.8

CS. Controles Sanos.

Tabla 2: Características demográficas de los pacientes de estudio de trasplante de órgano sólido

	TC	TP	TR
N	217	123 ⁽⁵⁾	97
Edad (rango)	54.65 (20-73)	52.71 (16-69)	54.59 (20-81)
Hombre/ Mujer (%)	73.3/ 26.7	64.7/35.3	67/33
TOS Urgente (%)	25.7	9.8	5.4
Infección previa al TOS ⁽¹⁾ (%)	10.8	40.2	20.6
Infecciones seguimiento ⁽²⁾ (%)	49.1	50.0	40.0
Infecciones CMV ⁽³⁾ (%)			
Sistémica	9.5	9.8	14.9
Específica órgano	4.7	SD	SD
Infección CMV asintomática	34.8	SD	SD
Serología CMV receptor- positiva	87.6	83.5	87.9
Serología CMV donante- positiva	85.5	77.1	86.5
Otras infecciones (%)			
Bacteriana	61.8	67.3	54.1
Vírica	24.9	9.4	25.7
Fúngica	10.3	10.9	19.5
Parasitaria	2.8	1.9	0.0
Rechazo (%)			
Rechazos primer año	18.6	39.0	21.5
Rechazos en seguimiento ⁽⁴⁾	21.6	36.6	SD
Rechazo humoral	3.2	SD	8.1
Rechazo crónico	11.2	14.7	9.0

(1) Infección en la semana previa al TOS o bien con tratamiento antibiótico intravenoso por fiebre.

(2) Infecciones durante los primeros 6 meses en trasplante pulmonar y renal y primer año en cardíaco. (3) Al menos dos antigenemias positivas. (4) Episodio clínico, ecocardiográfico o anatomopatológico tratado con corticoides. (5) Estudio pre trasplante de pulmón, 82 de los cuales se trasplantaron. SD: Sin datos.

Los tiempos de seguimiento son pretrasplante, obteniéndose la muestra cuando el paciente entró en lista de espera, semana, mes, tres meses, 6 meses y año postrasplante para TC. Para TR y TP el seguimiento se detiene a los 6 meses. En el caso del grupo CS fue suficiente una única determinación para establecer los valores basales.

- **Muestras sanguíneas**

De cada paciente se recogieron 5 ml de sangre periférica, por punto de estudio, en tubos tratados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de *Vacurette*. Las muestras para el estudio de citometría de flujo (CMF) deben mantenerse a temperatura ambiente y manipularse el mismo día de la extracción.

- **Suero**

Las muestras para la construcción de la seroteca se obtuvieron al mismo tiempo que las extraídas por protocolo clínico, evitando así nuevas extracciones. La sangre periférica se extrajo en tubo seco de 5 ml (*Z Serum Sep Clot Activator, Vacurette*) por parte de distintas unidades de enfermería del hospital. El suero se obtuvo mediante centrifugación a 1600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se recolectaron dos alícuotas de 500 µl del mismo almacenadas a -80°C hasta su utilización. Las muestras de TP de los centros participantes en el estudio multicéntrico fueron enviadas al centro coordinador, el HGUGM, donde se testaron todos los parámetros inmunológicos incluidos en esta tesis. El laboratorio está acreditado por norma 15189 de ENAC, responsable de controlar los procesos analíticos y la calidad de los resultados.

- **Plasma**

Ciertos ELISAS (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizados en esta tesis admitían un uso indiferenciado entre muestras de plasma o suero. En estos casos preferimos extraer el plasma mediante centrifugación a 1000 x g durante 30 minutos de las muestras sanguíneas, evitando así una nueva extracción. Estas muestras fueron tratadas de igual manera que los sueros, quedando almacenadas en alícuotas a -80°C hasta su utilización.

- **Biopsias cardíacas**

El estudio incluye 78 BEM procedentes de pacientes trasplantados cardíacos que sufrieron rechazo celular agudo según la ISHLT (Tabla 3). El grupo control incluyó 24 biopsias obtenidas de 24 pacientes sin signos de rechazo durante el primer año postrasplante. Las muestras histológicas fueron recogidas del archivo del departamento de anatomía patológica del servicio del hospital Gregorio Marañón.

Tabla 3. Nueva clasificación del rechazo celular por la ISHLT¹³³

GRADO	ISHLT	CARACTERÍSTICAS
0	0	Ausencia de rechazo
1	1A	Rechazo celular agudo. Infiltrado perivascular o intersticial focal de grandes linfocitos sin necrosis
	1B	Rechazo agudo leve con infiltrado linfocitario difuso sin necrosis
2	2	Rechazo celular agudo con infiltrado linfocitario focal. Puede existir daño miocítico
	3A	Infiltrado agresivo multifocal con o sin daño miocítico
3	3B	Proceso inflamatorio difuso severo con necrosis miocítica
	4	Infiltrado inflamatorio polimorfo difuso, con edema, hemorragia, vasculitis. Existe necrosis miocítica

1.3. SOLUCIONES, TAMPONES Y REACTIVOS PARA ELISA

- **1x PBS** (Buffer de reconstitución)

1 sobre de tampón fosfato salino (PBS) P3813, Sigma, St. Louis. MO. EE. UU.

(Almacenar a temperatura ambiente). Agua destilada cantidad suficiente para (c.s.p) 1000 ml.

Ajustar pH a 7,2- 7,4. Conservar a 4°C

- **PBS1X/ Tween20 ,0.05%** (Buffer de lavado)

Tween 20: 125 µl

PBS1X: c.s.p. 250 ml

Conservar a 4°C en nevera

- **PBS1X/ BSA ,1%** (Buffer de dilución de anticuerpos)

Albúmina bovina (BSA): 2 g

PBS1X: c.s.p. 200 ml

Conservar a 4°C en nevera.

PBS1X/ BSA ,5% (Buffer de bloqueo)

BSA: 5 g

PBS1X: c.s.p. 100 ml

Conservar a 4°C en nevera.

- **PBS1X/ Azida ,0.09% (Buffer de reconstitución)**

Azida sódico (10%): 0.5 µl

PBS1X c.s.p. 55 ml

Conservar en nevera a 4°C

- **BS1X/ BSA ,1%/ Tween20 ,0.1%. (Buffer diluyente de HRP)**

BSA: 1 g

Tween 20: 0.1 ml

PBS1X c.s.p. 100 ml

Conservar en nevera a 4°C

- **Reactivo de frenado para ELISA (H₂SO₄, 1M)**

H₂SO₄ (98%, d= 1.84 g/ml): 54 ml

Agua destilada: c.s.p. 1000 ml

1.4. SOLUCIONES, TAMPONES Y REACTIVOS PARA CITOMETRÍA DE FLUO

- **PBS1X**

1 sobre de PBS P3813, Sigma, St. Louis. MO. EE. UU. (Almacenar a temperatura ambiente)

Agua destilada c.s.p. 1000 ml.

Ajustar pH a 7,2- 7,4. Conservar a 4°C

- **Reactivo de lisis (*Facslaying solution*, Becton Dickinson, San José, CA).**

1.5. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS E INFORMÁTICOS

○ **Análisis y adquisición de Datos en Citometría de Flujo**

Los archivos LMD se adquieren y analizan empleando:

- ***Kaluza Flow Cytometry Analysis Software (Beckman Coulter)***

Se empleó para el análisis de los todos los datos obtenidos por CMF de esta tesis doctoral, determinación de porcentajes de células positivas y negativas para cada marcador estudiado, así como la intensidad media de fluorescencia (MFI). También se empleó para la construcción de *Dot- Plots* e Histogramas presentados en esta tesis.

- ***Infinicyt™ Flow Cytometry Software (Cytognos)***

Se trata de otro programa de análisis de datos obtenidos mediante CMF. Está dotado de todas las características para el análisis de datos y creación de *Dot-Plots* e histogramas, pero tiene un uso más orientado a la clínica y el análisis de enfermedades hematológicas.

- ***Flowing Software***

Flowing Software es un programa de libre acceso para el análisis de datos obtenidos mediante CMF. Surge como resultado de un proyecto de investigación llevado a cabo por Perttu Terho en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Turku (Finlandia).

○ **Programas estadísticos**

- ***SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU)***

SPSS es un programa estadístico utilizado y reconocido a nivel mundial. Permite el análisis y manejo de grandes bases de datos y posee una interfaz de fácil manejo. Incorpora la herramienta de construcción de gráficos y tablas.

- ***GloRunner™ DXL Software (Turner Biosystems, CA, EE. UU)***

Programa específico del luminómetro con exportación directa de datos a Excel. Diseñado para la obtención, almacenamiento e interpretación de datos. Permite crear

protocolos distintos para múltiples ensayos. Mide la cantidad de luz emitida de una reacción química con una sensibilidad de 5×10^{-18} moles luciferasa, ajustando la recta de calibrado y estableciendo la concentración exacta de ATP en las muestras de estudio.

2. MÉTODOS

Los métodos y técnicas empleadas en esta tesis doctoral fueron:

- CMF. Empleada sobre células sanguíneas humanas.
- ELISA para la detección de BAFF e IL-10 en suero y/o plasma.
- Immuknow (Kit comercial para la detección de ATP en T CD4+).
- Inmunohistoquímica para la detección de C3d y C4d en biopsias cardíacas.

A continuación, procedemos a su descripción más detallada.

2.1. MÉTODOS EMPLEADOS SOBRE CÉLULAS

2.1.1. Pacientes y controles

- **Estudio de maduración B**

Se llevó a cabo un análisis prospectivo longitudinal en 217 pacientes trasplantados cardíacos estudiados entre el año 2006 y el 2015 (Tabla 2). Durante ese tiempo también se reclutó una población de controles sanos (N=95) para establecer los valores basales de todas las variables de estudio.

Se analizaron las distintas subpoblaciones B en porcentaje relativo a los linfocitos totales y en números absolutos, siendo posible gracias a la determinación del recuento linfocitario por el servicio de hematología del HGUGM el mismo día de estudio.

Los resultados incluyen la media, el error típico de la media, mediana, desviación típica, valores mínimo y máximo y percentil 5 y 95.

- **Estudio de fenotipo B regulador**

Estudio transversal realizado durante los meses de julio y agosto del 2016. En este tiempo se pudieron reclutar pacientes TC, TR y CS cuyas características se muestran en la siguiente tabla 4.

Tabla 4. Variables demográficas de los pacientes incluidos en el estudio del fenotipo de células B reguladoras

	CS	Pre_TC	TC	EVI	TR
N	23	13	28	10	17
Edad	45.23 (32- 66)	47.92 (29-67)	55.89 (29-73)	70.00(40-79)	54.12 (26- 72)
Días post-TOS	–	–	306.00	6081.89	442.29
Sexo % (H/M)	34/66	65/35	88.9/ 11.1	70/30	70.6/ 29.4

CS: Controles sanos; Pre-TC: Pacientes en estudio pretrasplante; TC: Trasplantados cardíacos; EVI: Pacientes con enfermedad vascular del injerto; TR: Trasplantados renales.

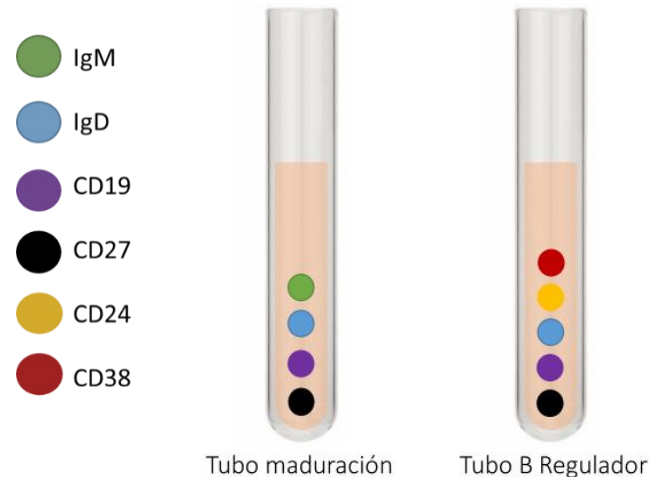
Como en el caso anterior, los datos de las distintas subpoblaciones se expresan en frecuencias relativas y valores absolutos en referencia al recuento linfocitario absoluto obtenido en la analítica de la visita del mismo día de estudio.

2.1.2. Caracterización de subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica humana mediante citometría de flujo

Las células B se caracterizaron mediante CMF evaluando la presencia o ausencia de marcadores de superficie que se muestran con detalle en la tabla 5. Se establecieron dos tubos de estudio con distintos marcadores, uno denominado tubo de maduración B (tubo 1) y tubo B regulador (tubo 2). Las muestras se marcaron mediante fluorescencia directa en combinaciones de hasta cinco colores.

Tabla 5. Marcadores y fluorocromos en el diseño fenotípico de las poblaciones de linfocitos

	FITC	PE	PerCP	APC	PC7	PC5
Tubo 1						
Maduración B	CD27	IgD	CD19	IgM	–	–
Tubo 2						
B reguladoras	CD38	IgD	–	CD19	CD27	CD24



A. Anticuerpos monoclonales empleados

En el estudio se emplearon los siguientes AcMo:

- ***FITC Mouse anti- Human CD27 (BD Pharmigen) / PC7 Mouse anti- Human CD27 (Beckman Coulter)***. Se une específicamente a la molécula CD27, una proteína transmembrana tipo I de 110 KDa. Está presente en timocitos y linfocitos, en su mayoría linfocitos T maduros, células B activadas y células NK. Se expresa en alta concentración en linfocitos T que han sido estimulados a través del TCR. CD27 se une a CD70, también conocido como CD27 ligando (CD27L), y puede estar implicado en la interacción de linfocitos T y B.
- ***PE Mouse anti- Human IgD (BD Pharmigen)***. Se une específicamente a la cadena pesada de la inmunoglobulina D (IgD). IgD pertenece a la familia de las Igs y existe como glucoproteína soluble o proteína transmembrana tipo I (mIgD). mIgD se expresa en linfocitos maduros B naïve, junto con IgM, y sirve como BCR. En asociación con otras moléculas señalizadoras puede traducir señales intracelulares al linfocito B.
- ***PerCP Mouse anti- Human CD19 (BD)/ APC Mouse anti- Human CD19 (BD)***. Este anticuerpo se une de forma específica a la proteína transmembrana CD19. Perteneciente a la familia de las Igs se expresa de forma específica en células B. Su función biológica es unirse a moléculas como CD21 y CD81 y actuar como correceptor de las células B (BCR).
- ***APC Mouse anti- Human IgM (BD Pharmigen)***. Se une de manera específica a la cadena pesada de la inmunoglobulina humana M (IgM). Es expresada por la

mayoría de linfocitos B maduros. Este anticuerpo no reacciona con otros isotipos de cadena pesada de las Igs.

- ***FITC Mouse anti- Human CD38 (BD Pharmigen)***. Se une de modo específico a CD38. El antígeno CD38 es una glicoproteína de membrana tipo II de 45KDa presente en timocitos, células T activadas y células B diferenciadas (Células Plasmáticas). CD38 se expresa también en otras células como monocitos, macrófagos, DC, NK, precursores eritrocíticos y algunas células epiteliales. Actúa como enzima que cataliza la síntesis e hidrólisis del ion Calcio (Ca^{2+}). Este promoviendo el crecimiento celular, apoptosis y diferenciación. Se une a CD31 actuando como molécula de adhesión a células endoteliales.
- ***PC5 Mouse anti- Human CD24 (Beckman Coulter)***. Este AcMo se une a la molécula CD24, una sialoglicoproteína expresada en granulocitos maduros y células B. Modula el crecimiento y diferenciación de estas células.

B. Tinción de marcadores de superficie

La muestra sanguínea para el tubo de maduración debe ser lavada en un paso previo a la tinción. Este proceso se realiza para eliminar la IgM presente en suero, ya que puede interferir en el marcaje de la IgM de membrana por inhibición competitiva del AcMo anti-IgM.

Se lava 1 ml de sangre total con 9 ml de PBS1X, se vortea y centrifuga a 1700 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante por decantación y se repite el lavado en las mismas condiciones. Una vez la sangre total está lavada, queda lista para el marcaje con los AcMo.

El protocolo utilizado se describió por Feery et al. en 2005¹⁷⁷. De forma resumida:

- 100 μ l de sangre se incuban con 5 μ l de cada uno de los monoclonales presentes en el tubo, en concentración saturante.
- Se incuba la mezcla durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
- Se añaden 2 ml de solución de lisis para eliminar los eritrocitos, células no nucleadas de la sangre. Esta solución lleva paraformaldehído que tiene la función de fijar las muestras a la vez que las lisa.

- Se incuba 15 minutos de nuevo, en oscuridad y a temperatura ambiente.
- Se centrifuga (1600 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente).
- Se elimina el sobrenadante y lava el sedimento con 2 ml de PBS1X para eliminar el exceso de AcMo sin fijar. Centrifugar y lavar en las mismas condiciones.
- Se decanta el sobrenadante y resuspende las células fijadas y marcadas en 200 μ l de PBS1X.
- Se lleva al citómetro de flujo para su adquisición.

C. Adquisición de datos

La calibración, compensación y adquisición de los datos se realizó en la unidad de CMF del pabellón experimental de la fundación biomédica Gregorio Marañón. El citómetro de flujo Gallios está dotado de tres láseres con el que se pueden medir hasta 12 parámetros.

- Láser Azul (488 nm, 22 mW): 5 fotomultiplicadores, capaz de medir también los parámetros dispersión de luz lateral (SSC) y frontal (FSC).
- Láser Rojo (638 nm, 25 mW): 3 fotomultiplicadores
- Láser Violeta (405 nm, 40 mW): 2 fotomultiplicadores.

Como condición para un análisis óptimo se estableció la adquisición de 50 000 eventos en la región correspondiente a los linfocitos, determinada por tamaño y complejidad (FSC vs. SSC). A partir de esta población se establecen las demás mediante porcentajes relativos.

D. Análisis de datos

Los datos generados mediante CMF se analizaron con *Kaluza Software e Infinicyt Software*, y se realizaron un mínimo de 2 veces cada uno. El histograma y el *Dot Plot* fueron los formatos empleados con más frecuencia por su sencillez y porque permiten una rápida y clara visualización de los datos. Con la combinación de AcMo se es capaz de analizar hasta 16 poblaciones distintas de células B en función a la expresión de moléculas de superficie (Tabla 6).

Tabla 6. Fenotipo de las subpoblaciones B de estudio

	CD19	CD27	CD24	CD38	IgD	IgM
Maduración						
B totales	+					
CD19+ CD27-	+	-				
B naïve	+	-			+	+
B naïve IgD	+	-			+	-
B naïve IgM	+	-			-	+
B agotada o <i>exhausted</i>	+	-			-	-
B memoria	+	+				
B memoria SCI	+	+			+	+
B memoria CCI	+	+			-	-
B memoria IgD	+	+			+	-
B memoria IgM	+	+			-	+
B Reguladoras						
B reguladoras	+		<i>high</i>	<i>high</i>		
B memoria reguladora	+		<i>high</i>	<i>low</i>		
B maduras	+		<i>int</i>	<i>Int</i>		
B10	+	+	<i>high</i>			
B transicionales	+	-		<i>high</i>	+	

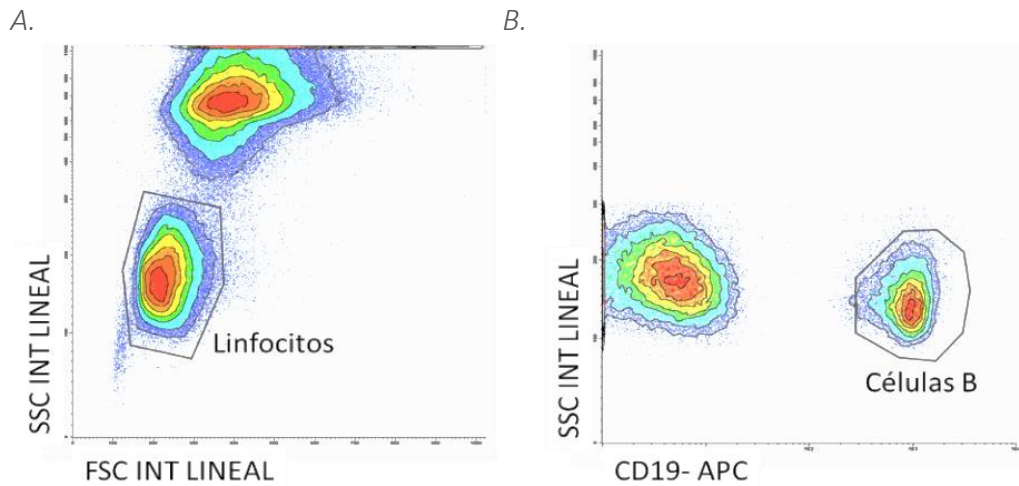
SCI: Sin cambio de isotipo; CCI: Con cambio de isotipo

El porcentaje de algunas poblaciones B (CD19⁺, CD19⁺ CD27⁻ y memoria) es definido directamente en la adquisición. El porcentaje de las poblaciones restantes será deducido con respecto a las poblaciones anteriores.

En primer lugar, se seleccionan los linfocitos totales en función de las características de complejidad (FSC) y tamaño (SSC). Posteriormente, del total de linfocitos seleccionados,

se escogen aquellas células que expresan CD19⁺, consideradas linfocitos B totales (figura 21) y de las que se obtendrán el resto de subpoblaciones de estudio.

Figura 21. A. Selección de linfocitos en sangre periférica mediante los parámetros de dispersión de luz frontal (FSC) y lateral (SSC). B. Selección de células CD19⁺ sobre la selección de linfocitos totales



A partir de la selección de linfocitos B se distinguieron el resto de las poblaciones. Las poblaciones B naïve y B memoria se establecen a partir de la expresión o no de CD27. La estrategia de análisis para los dos tubos de estudio se muestra en las figuras 22 y 23.

Figura 22. A. Selección de linfocitos que expresan o no CD27 a partir de la población CD19⁺. B. Identificación de las subpoblaciones B memoria a partir de CD27⁺. C. Identificación de la población B Naïve a partir de la región CD27⁻

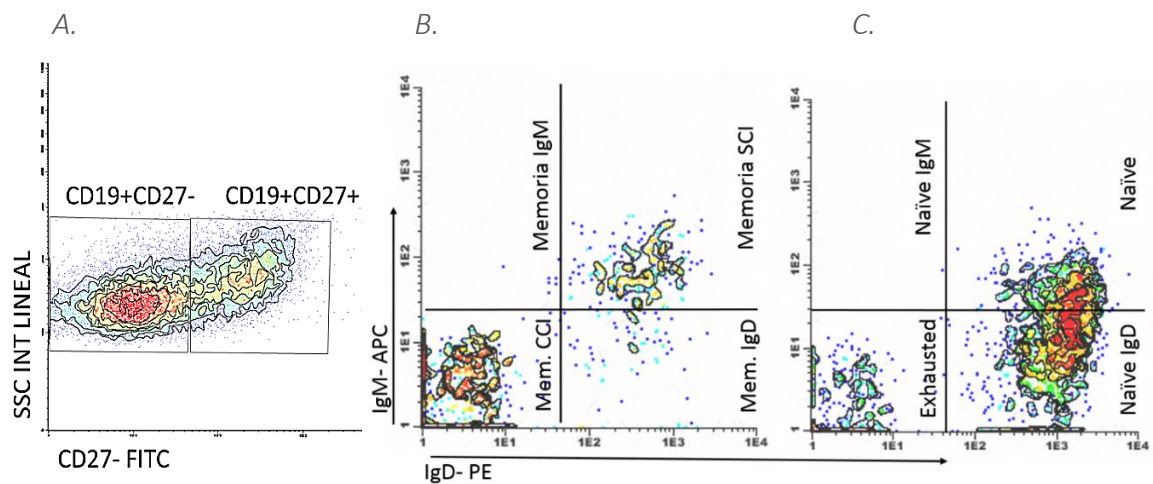
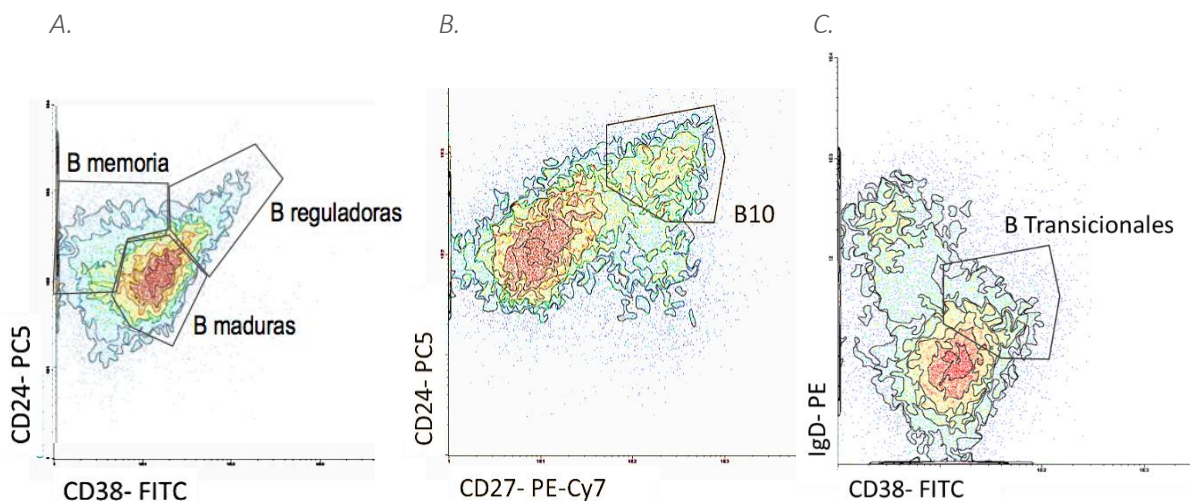


Figura 23. Todas las poblaciones mostradas se obtienen a partir de los linfocitos B totales, CD19+. A. Obtención de tres poblaciones reguladoras a partir de la selección previa CD27- en función de CD24 y CD38. B. Definición de B10 respecto a los marcadores CD24 y CD27. C. Obtención de B transicionales a partir de CD27- mediante la expresión de IgD y CD38.



E. Análisis estadístico

Todos los datos recogidos se volcaron en una base de datos y analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU). Los estadísticos descriptivos se expresaron como frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas, y como medias y desviación típica para las variables continuas (mínimo N=10). También se expresaron los datos como número absoluto respecto al número de linfocitos totales establecidos en el hemograma del día.

La prueba de comparación de medias fue el ANOVA con corrección de Bonferroni para más de dos grupo y la prueba T de Student para los casos en los que los grupos eran dos. El nivel de significación asumido fue de $p < 0.05$.

En los resultados que fueron significativos se realizó curva ROC para establecer punto de corte y posterior comparativa de grupos mediante χ^2 . La asociación de biomarcadores en variable dicotómica con variables clínicas de resultado (infección o rechazo) se realizó mediante regresión logística y se realizó curva de supervivencia Kaplan- Meier para calcular el Log- Rank

2.1.3. Cuantificación de ATP sobre linfocitos T CD4⁺

A. Muestras biológicas y pacientes

Las muestras de sangre total son recogidas en tubo de heparina sodio con anticoagulante a través del personal del HGUGM en las visitas al hospital de día de cardiología bajo la aceptación del consentimiento informado por parte de los pacientes. La muestra debe procesarse en un máximo de 5 horas posteriores a la extracción.

Se realizó un estudio retrospectivo trasversal de pacientes trasplantados de larga duración con diagnóstico de EVI en distinto grado (N=21) y pacientes trasplantados sin EVI con tiempos postrasplante similares denominados controles quirúrgicos (CQ, N=10). Las características demográficas y clínicas se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio de cuantificación ATP en pacientes con enfermedad vascular del injerto y trasplantados cardíacos sin desarrollo de EVI denominados controles quirúrgicos

	CAV1	CAV2	CAV3	Control
N	8	8	9	10
Edad	61	66	65	61
Sexo (H/M)	7/1	8/0	8/1	8/2
Causa del Trasplante (%)				
MIIS/Coronariopatía	25,0	37,5	55,6	80,0
MIDI	37,5	25,0	33,3	10,0
Valvulopatía	25,0	12,5	11,1	10,0
MITH	12,5	–	–	–
Re-TC	–	25,0	–	–
Tiempo Post TC (días)	5420	4258	5628	4538

MIIS: Miocardiopatía isquémica; MIDI: Miocardiopatía dilatada; MITH: Miocardiopatía hipertrófica. Re_TC: Retrasplante cardíaco. CAV: Cardiac allograft vasculopathy o EVI (enfermedad vascular del injerto)

B. Reactivos del kit

El kit viene estandarizado para la realización de 12 determinaciones.

- Placa de 96 pocillos con tapa
- Diluyente de muestra
- Estimulante: Fitohemaglutinina (PHA)

- *Dynabeads- CD4*
- *CD4 Buffer* de lavado
- Reactivo de lisis
- Panel de calibración
- Luciferin/ Luciferasa
- Placa de medida de 96 pocillos

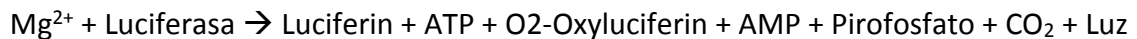
Observaciones: guardar las placas de ensayo y de medida entre 2- 28°C.

C. Protocolo de trabajo

Se han establecido unos rangos en la concentración de ATP considerándose:

- Baja respuesta inmunitaria: $ATP \leq 225$ ng/ml
- Moderada respuesta inmunitaria: $226 < ATP < 524$ ng/ml
- Fuerte respuesta inmunitaria: $ATP \geq 525$ ng/ml

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



El protocolo de trabajo viene esquematizado en la figura 24, siendo de gran importancia que todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente:

Día 1:

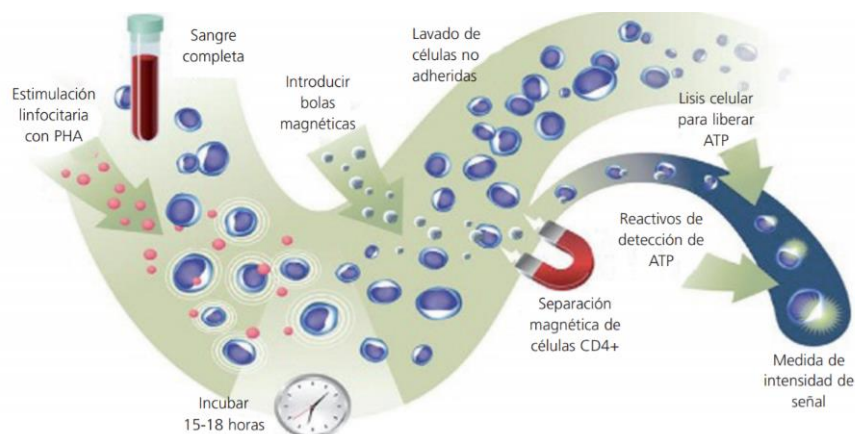
- Diluir la sangre (1:4), 250 μ l de sangre + 750 μ l de diluyente.
- En placa de 96 pocillos se añaden 25 μ l diluyente a los cuatro primeros pocillos de la fila y 25 μ l de estimulante a los cuatro restantes.
- Añadir 100 μ l de sangre diluida a cada uno de los pocillos. Agitar la placa cubierta durante 30 segundos e incubar de 15 a 18 horas a 37°C y 5% de CO₂

Día 2:

- Agitar la placa durante 30 minutos a 200 rpm.
- Añadir 50 μ l de *Dynabeads CD4* y agitar la placa durante 15 segundos a 200 rpm.
- Incubar durante 30 minutos haciendo una nueva agitación pasados 15 minutos en las

- mismas condiciones
- Colocar la placa en la tira magnética y esperar 1 minuto.
 - Aspirar sin agitar las partículas magnéticas.
 - Lavar la placa tres veces:
 - Añadir 200 µl del Buffer de lavado, esperar 1 min y aspirar.
 - Añadir 200 µl del Buffer de lavado, quitar los posibles restos de sangre, aspirar.
 - Añadir 200 µl del Buffer de lavado, quitar la gradilla y agitar 1 min para lavar correctamente, colocar la gradilla en la base magnética, esperar 1 min. Aspirar.
 - Añadir 200 µl del reactivo de lisis. Quitar la gradilla de la base magnética y agitar durante 5 minutos a 200 rpm.
 - Colocar la gradilla en la base magnética, esperar 1 min. Traspasar 50 µl desde la placa de ensayo a la placa de medición.
 - Añadir 50 µl de cada calibrador en los pocillos correspondientes de la placa de medición.
 - Añadir 150 µl de reactivo de luminiscencia y agitar durante 30 segundos a 200 rpm.
 - Leer la placa entre los 3 – 10 minutos posteriores a la adición de la luciferasa.
 - Calcular resultados y revisar el análisis de control de calidad.

Figura 24. Esquema explicativo del ensayo de medición *in vitro* de la función global de las células T CD4+ sanguíneas mediante la producción de ATP



*ATP: Adenosina 5'-trifosfato; PHA: mitógeno Fitohemaglutinina.

Nefrología 2013;33(3):381-8 doi:10.3265

b. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó una base de datos y se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU). La prueba de comparación de medias fue el ANOVA con corrección de Bonferroni para comparación de más de dos grupos, y la prueba T de Student para comparar dos grupos. El nivel de significación asumido fue de $p < 0.05$. En los resultados que fueron significativos se realizó curva ROC para establecer punto de corte y posterior comparativa mediante χ^2 . La asociación de biomarcadores se realizó mediante regresión logística y se efectuó curva de supervivencia Kaplan- Meier para calcular el Log- Rank.

2.2. ESTUDIO DE MARCADORES SOLUBLES

2.2.1. ELISA para la cuantificación de factor activador de célula B (BAFF/BLyS)

Quantikine ELISA Human BAFF/ BLyS/ TNFSF13B Immunoassay (R&D Systems, Inc. Minneapolis, EE. UU) es un ELISA que detecta cuantitativamente la concentración del factor activador de célula B (BAFF) en sobrenadante de cultivos, suero y/o plasma. Su uso debe ser destinado a la investigación, nunca como diagnóstico clínico.

A. Muestras biológicas y pacientes

Las muestras destinadas a este estudio son sueros obtenidos tal y como se indica en el apartado 2.1. Estas muestras se almacenaron como alícuotas de 500 μ l en cámara fría a -80° hasta el momento de montaje de la técnica, descongelándose de forma controlada hasta temperatura ambiente. En este estudio volvimos a contar con 51 controles sanos para establecer los niveles basales de BAFF (pg/ml). Los tiempos de recogida de muestra volvieron a establecerse como visita pretrasplante, semana, mes, 3 meses, 6 meses y año para TC, pretrasplante, 7d y mes para TP y pretrasplante y mes para TR. El tamaño muestral viene reflejado en la siguiente tabla 8.

Tabla 8. Tamaño muestral por tiempos de los pacientes trasplantados incluidos en estudio BAFF

N	Pre-TOS	7 d	30 d	90 d	180 d	360 d
TC	131	39	34	34	37	29
TP	88	63	53	–	–	–
TR	56	–	55	–	–	–

* TC: Trasplante cardíaco; TP: Trasplante pulmonar; TR: Trasplante renal; Pre-TOS: Tiempo pretrasplante; d: Días; El grupo CS cuenta con un tamaño muestral de N=51

B. Reactivos del kit

- Human BAFF/BLyS microplaca de 96 pocillos
- AcMo conjugado Human BAFF/BLyS (21 ml de AcMo específico para BAFF)
- Estándar liofilizado recombinantes de BAFF (40.000 pg/ml)
- Diluyente de ensayo RD1- 111
- Diluyente de calibración RD6Q (Diluir 1:2)
- Wash Buffer concentrado (Diluir 1:25)
- Color Reagent A*
- Color Reagent B*
- Stop Solution (H₂SO₄, 2N)

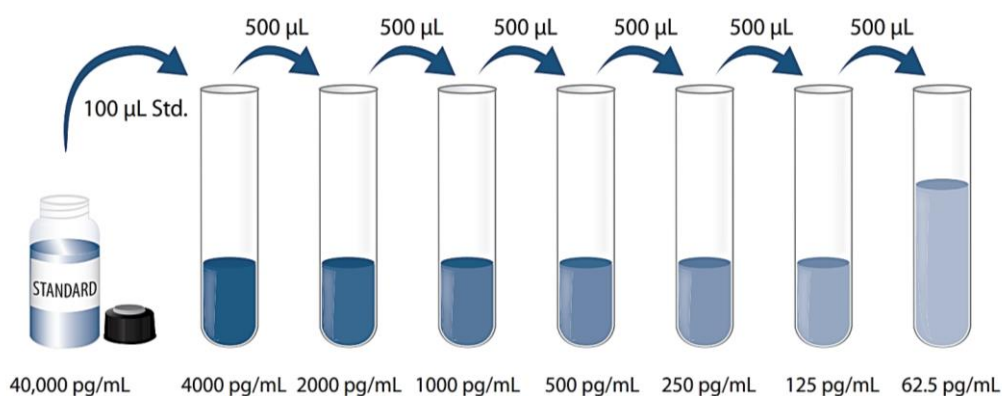
Todos los reactivos deben ser almacenados de 2 a 8 °C. *Los reactivos A y B deben ser mezclados en volúmenes iguales 15 minutos antes de usarse.

C. Protocolo de trabajo

Se trata de un ELISA tipo sándwich, donde un AcMo específico para BAFF/BLyS está prefijado en los pocillos de la microplaca. Las muestras, ya sean sobrenadantes de cultivo, suero o plasma, deben diluirse 1:2. Se recomienda 100 µl de muestra + 100 µl de diluyente RD6Q (Diluido 1:2). Las muestras cuyos valores salían del rango de detección de la recta de calibrado fueron diluidas 1:4 y determinadas de nuevo. Las muestras y reactivos deben ensayarse a temperatura ambiente y realizarse por duplicado, incluida la recta patrón.

- La preparación de la recta de la recta de calibrado se realiza con el diluyente de calibrado RD6Q diluido y el estándar de 40000 pg/ml, mediante diluciones seriadas se consiguen 7 concentraciones diferentes (Figura 25).

Figura 25. Método de preparación de la recta de calibrado del ELISA BAFF



Como blanco usaremos el pocillo de diluyente RD6Q para corregir posibles interferencias en el ensayo.

- Añadir 100 µl de diluyente de ensayo RD1-111 a cada pocillo.
- Añadir 50 µl de estándar o muestra por pocillo. Cubrir con la banda adhesiva e incubar 3 horas a temperatura ambiente en agitador horizontal a 500 ± 50 rpm.
- Aspirar cada pocillo y lavar, repitiendo el proceso 3 veces con un total de cuatro lavados. Lavar añadiendo 400 µl por pocillo. Para eliminar cualquier resto invertir la placa sobre una pila de papel absorbente.
- Añadir 200 µl de AcMo conjugado BAFF a cada pocillo. Cubrir con la banda adhesiva e incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
- Repetir el proceso de lavado.
- Añadir 200 µl de *Substrate Solution* (mezcla A+B) por pocillo. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Proteger de la luz.
- Añadir 50 µl de disolución Stop a cada pocillo. El color cambiará de azul a amarillo. Agitar suavemente para que el color sea uniforme.

- Determinar la densidad óptica antes de 30 minutos, usando un lector de microplacas a 450 nm. Si es posible, corregir la densidad óptica midiendo a 540 o 570 nm. Esta corrección elimina imperfecciones ópticas debidas a la placa.

D. Cálculo de resultados

La curva de calibrado se construye enfrentando concentración (eje X) con densidad óptica (eje Y), y ajustándose a una recta mediante análisis de regresión. La concentración leída y dada por la recta de calibrado mediante interpolación deberá ajustarse o corregirse multiplicando por el factor de dilución aplicado a las muestras (x2, o x4 en las muestras más diluidas). La recta de calibrado cubre un rango de concentración de 0 pg/ml hasta 4000 pg/ml. Los valores basales considerados por el kit se muestran en la siguiente tabla 9.

Tabla 9. Media de valores de BAFF en controles sanos en diferentes tipos de muestra

Sample Type	Mean (pg/mL)	Range (pg/mL)	Standard Deviation (pg/mL)
Serum (n=36)	850	584-1186	155
EDTA plasma (n=36)	790	501-1078	147
Heparin plasma (n=36)	765	528-1073	143

E. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo en SPSS por tipo de trasplante y en función de los tiempos pre y postrasplante, en el que se incluían medias y medianas, error típico de la media, desviación típica, mínimo y máximo y percentil 5 y 95. La comparación de medias se realizó mediante prueba ANOVA (N> 2 grupos) con corrección de Bonferroni o prueba T para comparar dos grupos. Se compararon medias intragrupo e inter-grupos, considerándose diferencia significativa aquella con $p < 0.05$.

Posteriormente se estableció punto de corte mediante curva ROC (especificidad 80%), análisis χ^2 para las proporciones, ajuste mediante recta de regresión y análisis de supervivencia Kaplan- Meier.

2.2.2. ELISA para la cuantificación de Interleucina 10

Human IL-10 ELISA Set (*Diaclone SAS, Besancon Cedex, Francia*) permite la cuantificación de IL- 10 (pg/ml) en muestras de suero y/o plasma. Su uso está destinado a investigación y no para uso diagnóstico.

A. Muestras biológicas y pacientes

Las muestras para este ensayo incluyen plasma y suero y se recolectaron tal y como se indica en el punto 1.2. Para este ensayo contamos con pacientes trasplantados cardíacos, pulmonares y renales cuyo tamaño muestral se muestra en la tabla 10. La cuantificación se realizó en el punto pre- TOS, para TR se cuantificaron también los valores al mes postrasplante. Para establecer los valores basales se cuantifican 51 muestras de CS.

Tabla 10. Tamaño muestral de los pacientes estudiados en el ensayo de IL-10

N	TC	TP	TR
Pre_TOS	16	87	35

B. Reactivos del kit

- Estándares de IL-10: 400 pg/ml
- Anticuerpo de captura
- Anticuerpo de detección biotinilado anti-IL-10
- Estreptavidina- HRP
- Reactivo TMB

Todos los reactivos del kit deben almacenarse entre 2 y 8°C y guardar a esa misma temperatura inmediatamente después de usarse.

C. Protocolo de trabajo

a. Fijación del anticuerpo a la placa

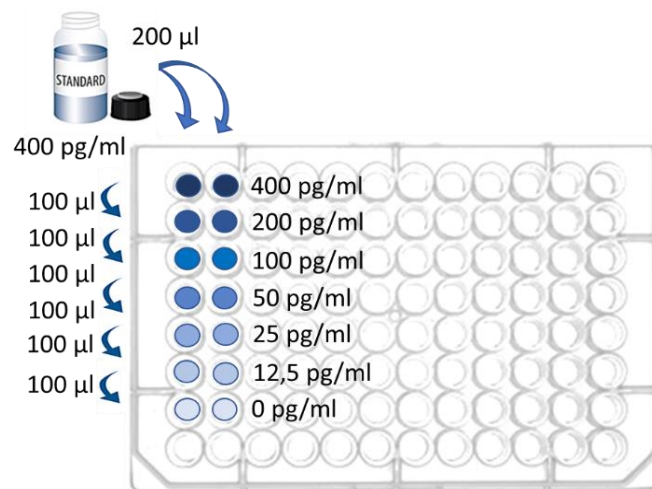
- Añadir 100 µl de AcMo de captura diluido a cada pocillo
- Cubrir con la tapa de plástico e incubar toda la noche a 40°C.

- Retirar la tapa y lavar:
 - Aspirar el líquido de cada pocillo
 - Dispensar 0.4 ml de disolución de lavado a cada pocillo
 - Aspirar
 - Repetir los dos pasos previos.
- Añadir 250 μ l de Buffer de bloqueo a cada pocillo, cubrir con la tapa e incubar a temperatura ambiente (18- 250C) durante 2 horas.
- Repetir el lavado en las mismas condiciones

b. Preparación de la curva de calibrado

El vial del estándar se debe reconstituir justo antes de usar y proporcionará una concentración de IL-10 de 400 pg/ml. El resto de los estándares se realizarán mediante diluciones seriadas como se muestra a continuación y directamente en placa (figura 26).

Figura 26. Esquema de diluciones seriadas en placa, construcción de la recta de calibrado para IL-10



c. Método de cuantificación de muestras

- Añadir 100 μ l de estándar, muestra y blanco a cada pocillo por duplicado.
- Cubrir y dejar incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Lavar en las mismas condiciones que anteriormente.
- Añadir 50 μ l de AcMo de detección diluido a todos los pocillos, cubrir e incubar

a temperatura ambiente durante una 1 hora.

- Lavar
- Añadir 100 μ l de disolución estreptavidina- HRP a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Lavar
- Añadir 100 μ l de la disolución lista para usar de TMB a cada pocillo e incubar a oscuridad durante 5- 15 minutos, a temperatura ambiente.
- Añadir 100 μ l de disolución de parado a cada pocillo.

Medir la absorbancia de cada pocillo inmediatamente después de terminar la técnica, usando una longitud de onda de 450 nm y una corrección opcional a 620 nm (siendo aceptable entre 610 – 650 nm).

D. Cálculo de resultados

La curva de calibrado se construye enfrentando concentración de IL-10 (eje X) con densidad óptica (eje Y) y ajustándose a una recta mediante un análisis de regresión. La concentración es determinada mediante extrapolación de los valores de densidad óptica frente a la concentración de los estándares de IL-10 de la curva de calibrado. En aquellos casos donde se hayan realizado diluciones, se debe multiplicar por el factor de dilución.

E. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo en SPSS por tipo de trasplante en el tiempo de estudio pretrasplante en el que se incluían medias y medianas, error típico de la media, desviación típica, mínimo y máximo y percentil 5 y 95.

También se realizó comparación de medias mediante un ANOVA ($N > 2$ grupos) con corrección de Bonferroni o prueba T si la comparación era de dos grupos. Se compararon medias intragrupo e inter-grupos, considerándose diferencia significativa aquella con $p < 0.05$. Posteriormente se estableció punto de corte mediante curva ROC (especificidad 80%), análisis χ^2 para las proporciones, ajuste mediante recta de regresión y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para calcular log- Rank.

2.3. MÉTODOS APLICADOS SOBRE TEJIDOS

2.3.1. Marcaje de C3d y C4d en biopsias de pacientes trasplantados cardíacos

A. Pacientes y Controles

Se seleccionaron 59 pacientes trasplantados cardíacos con diagnóstico de rechazo y 19 pacientes trasplantados sin rechazo como grupo control (tabla 11).

Tabla 11. Características demográficas de los pacientes trasplantados cardíacos con rechazo incluidos en el estudio de fijación de complemento

	Pacientes con rechazo	Grupo Control
N	59	19
Edad	53.67 (21- 69)	52.55 (20- 66)
Sexo % (H/M)	78/22	73/ 27

H: Hombre, M: Mujer

B. Reactivos del kit

- Anticuerpo policlonal de conejo C3d de laboratorios *Roche*. 50 test.
- Anticuerpo policlonal de conejo C4d de laboratorios *Roche*. 50 test.

C. Protocolo

Las 78 muestras histológicas de BEM protocolizadas, se desparafinaron y se realizó la inmunohistoquímica con inmunoperoxidasa y anticuerpos de conejo anti-factores del complemento C4d y C3d. El método está automatizado mediante sistemas de tinción robotizados que aplican los anticuerpos específicos y el resto de reactivos sobre los cortes de los tejidos.

D. Análisis estadístico

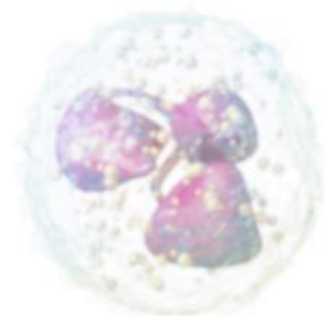
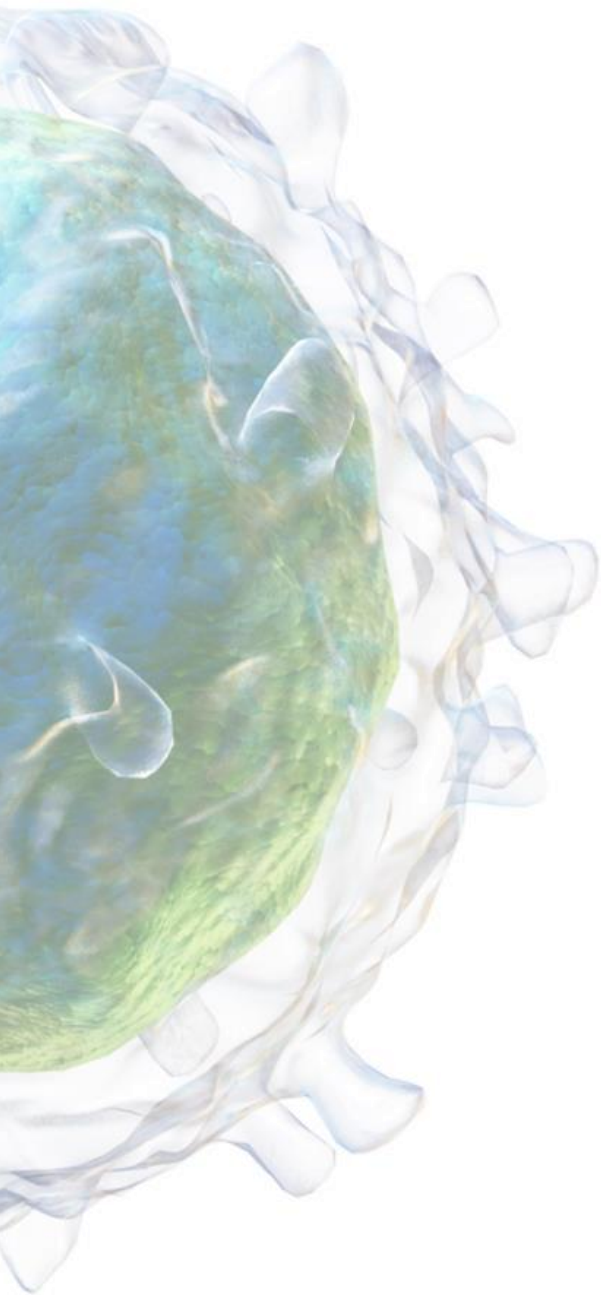
Todos los datos recogidos se volcaron en una base de datos y se analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU). La prueba de

comparación de muestras relacionadas fue el ANOVA con corrección de Bonferroni para comparación de más de dos grupos y la prueba T de Student para los casos en los que los grupos eran dos. El nivel de significación asumido fue de $p < 0.05$.

2.4. RECOGIDA DE DATOS

La obtención de los datos referentes al seguimiento de los pacientes se efectuó mediante el análisis retrospectivo transversal de la ficha de seguimiento de cada uno de ellos. Los datos obtenidos fueron completados y contrastados con:

- La historia clínica, en referencia a los eventos clínicos asociados al seguimiento, así como los datos analíticos de cada revisión.
- Los datos de rechazo fueron categorizados en base al informe clínico y contrastados con el informe emitido de las biopsias por el servicio de anatomía patológica.
- Los datos de infección se detectaron por el informe clínico y contrastados con el servicio de cardiología, nefrología y neumología.



IV. RESULTADOS

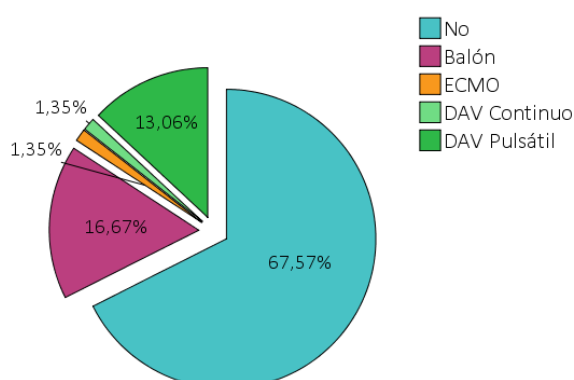


1. ESTADO DEL PACIENTE ANTES DEL TRASPLANTE: ESTUDIOS PRETRASPLANTE

1.1. USO DE ASISTENCIA CIRCULATORIA

Antes del trasplante el paciente debe someterse a una serie de estudios que valorarán su condición y preparación para encontrarse en las mejores condiciones de cara a la intervención. En el trasplante se manejan ciertos procedimientos que pueden actuar como factores de riesgo, uno de ellos es el uso de soportes de asistencia circulatoria mecánica (ACM), necesarios como terapia puente hacia el trasplante en casos de patología cardíaca terminal muy grave. Evaluamos a N= 217 pacientes en lista de espera de TC durante el periodo pretrasplante. La relación de pacientes con uso de ACM queda reflejada en la figura 27.

Figura 27. Relación de pacientes trasplantados cardíacos (%) y uso de las diferentes asistencias circulatorias mecánicas en el periodo pretrasplante

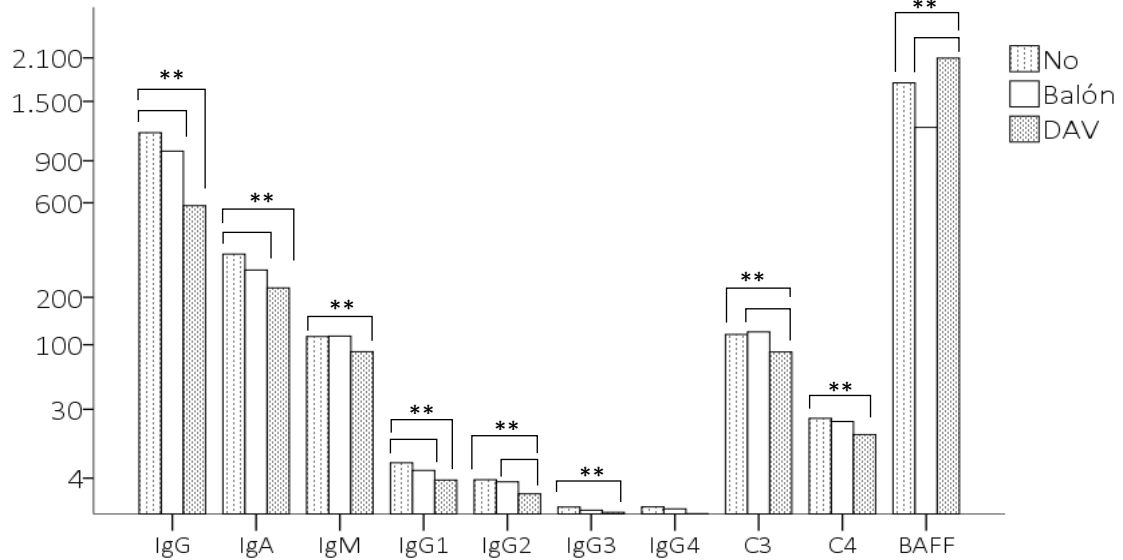


No: No usó ACM; Balón: Balón de contrapulsación intraaórtico; ECMO: Oxigenador extracorpóreo de membrana; DAV: Dispositivo de Asistencia Ventricular

Se realizó un análisis comparativo entre pacientes que portaron ACM pretrasplante por tipo, y los que no. Los portadores de DAV se agruparon en un único grupo y se estudiaron los tres grupos de mayor tamaño, excluyendo a los ECMO. Se analizaron variables inmunológicas, hematológicas y subpoblaciones linfocitarias. Los resultados muestran que, en el aspecto inmunológico, los pacientes que no portaron ACM tienen niveles significativamente superiores de todas las variables, excepto para IgG4 (Figura 28). También se observan diferencias significativas entre los dos tipos de ACM. Para las variables hematológicas ocurre algo similar, los no portadores de ACM muestran valores

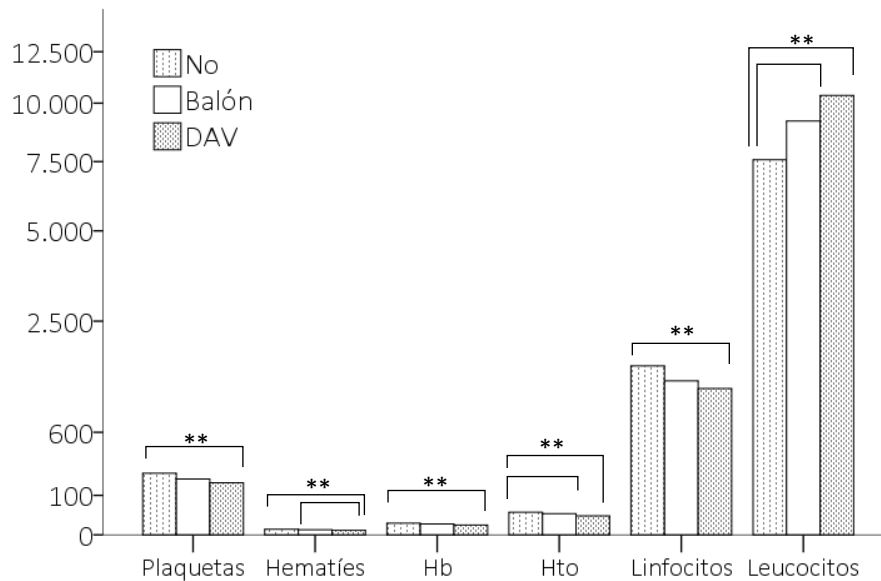
significativamente superiores en todos los casos excepto para el número de leucocitos, que son significativamente inferiores al resto (Figura 29).

Figura 28. Medias de las variables inmunológicas pretrasplante cardíaco en pacientes con asistencia circulatoria mecánica previa al trasplante versus pacientes que no portaron



Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl), IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, (g/L)); factores del complemento (C3, C4), (mg/dL); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 29. Medias de las variables hematológicas pretrasplante cardíaco en pacientes con asistencia circulatoria mecánica previa al trasplante versus pacientes que no portaron



Plaquetas (103/ μ L); Hematíes (106/ μ L); Hb: Hemoglobina (g/dL); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos (103/ μ L); Leucocitos (103/ μ L); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

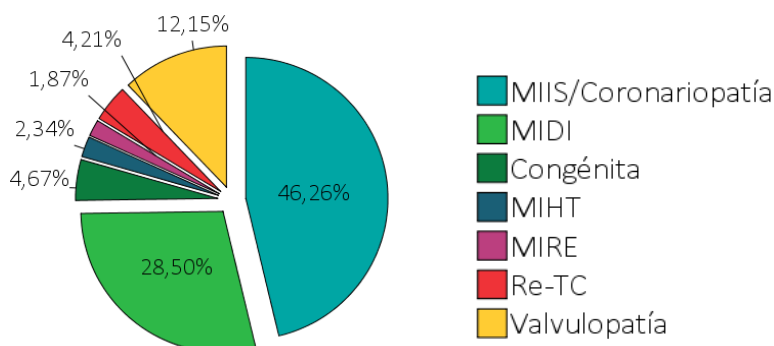
Las medias de los porcentajes de subpoblaciones B también muestran cambios en el estudio pretrasplante en los portadores de ACM respecto a los que no, y al tipo, pero no cuando nos referimos a ellas en números absolutos. El porcentaje de linfocitos B totales es significativamente superior en pacientes con DAV respecto a los que no usan (DAV: $15,97 \pm 2,02$ vs No: $8,95 \pm 0,55\%$; $p < 0,05$), pero no en los portadores de balón ($11,30 \pm 1,73\%$) que siendo superiores no llegan a ser significativos ($p = 0,47$).

1.2. ETIOLOGÍA DEL TRASPLANTE

1.2.1. Etiología en trasplante cardíaco

En nuestro estudio contamos con 217 trasplantados cardíacos con una distribución de causa de TC como se muestra en la siguiente imagen. El motivo de trasplante (Figura 30) puede asociarse a variaciones en el estado inmunológico de los pacientes en el punto pretrasplante.

Figura 30. Etiología de trasplante cardíaco (%)



MIIS: miocardiopatía isquémica o coronariopatías; MIDI: miocardiopatía dilatada; MIHT: miocardiopatía hipertrófica; MIRE: miocardiopatía restrictiva; Re-TC: retrasplante.

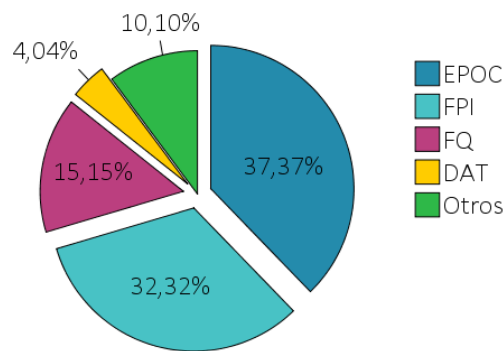
Las variables inmunológicas, hematológicas y subpoblaciones B pretrasplante en los grupos mayoritarios, MIIS (N=91) y MIDI (N=58), fueron comparadas mediante prueba T. Los pacientes con MIDI mostraron cifras superiores de IgG ($1123,62 \pm 386,92$ mg/dl), IgG2 ($4,21 \pm 1,94$ g/L) e IgG3 ($0,69 \pm 0,43$ g/L) respecto al grupo MIIS (IgG: $992,53 \pm 332,55$ mg/dl; $p = 0,03$; IgG2: $3,25 \pm 1,63$ g/L; $p = 0,01$; IgG3: $0,48 \pm 0,24$ g/L; $p = 0,00$). El grupo MIIS presentó valores significativamente elevados de los factores de complemento C3 ($123,00 \pm 39,59$ mg/dl; $113,76 \pm 28,06$ mg/dl; $p = 0,03$) y C4 ($26,17 \pm$

11,08 mg/dl; $22,99 \pm 14,25$ mg/dl; $p= 0,01$) y plaquetas ($232,28 \pm 96,04 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; $218,40 \pm 90,63 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; $p= 0,03$) comparados con el grupo MIDI. Respecto a la variabilidad en subpoblaciones B no se observaron diferencias significativas, ni en porcentajes ni en números absolutos.

1.2.2. Etiología en trasplante pulmonar

Contamos con 123 pacientes trasplantados pulmonares en estudio pretrasplante. La etiología del trasplante se muestra en la siguiente figura 31.

Figura 31. Etiología de trasplante pulmonar (%)



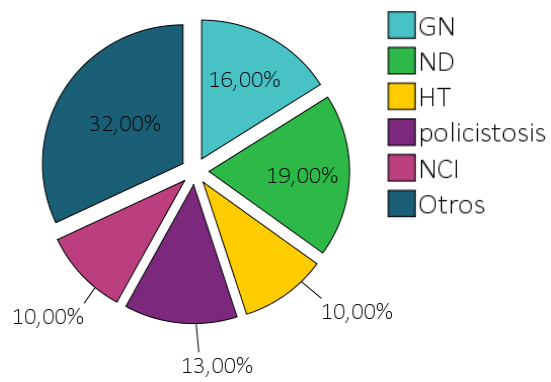
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; FPI: Fibrosis pulmonar idiopática; FQ: fibrosis quística; DAT: Déficit de alfa1- anti-tripsina

Los niveles de IgG pretrasplante fueron significativamente inferiores en pacientes con EPOC ($908,52 \pm 309,23$ mg/dl) si los comparamos con FPI ($1480,34 \pm 707,02$ mg/dl; $p= 0,00$) y FQ ($1562,50 \pm 378,06$ mg/dl; $p= 0,00$). Así mismo, la IL-10 se encontró significativamente disminuida en pacientes con EPOC ($26,38 \pm 27,64$ pg/ml) comparados con FQ ($64,65 \pm 56,62$ pg/ml; $p= 0,00$). El resto de variables no mostraron diferencias significativas.

1.2.3. Etiología en trasplante renal

El estudio en trasplante renal cuenta con 97 pacientes, cuya etiología de trasplante se muestra en la figura 32. Al comparar los grupos por etiología ninguna de las variables de estudio mostró diferencias significativas.

Figura 32. Etiología de trasplante renal (%)



GN: Glomerulonefritis; ND: Nefropatía diabética; HT: Hipertensión; NCI: Nefropatía crónica intersticial

2. EVOLUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN TRASPLANTE CARDÍACO

Todas las subpoblaciones de estudio se muestran en tablas separadas por frecuencias relativas y valores absolutos.

Tabla 12. Estadísticos descriptivos del porcentaje de linfocitos B totales por tiempo de estudio en trasplante cardíaco

Linfocitos B totales (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre-TC	183	10,53	0,59	8,00	8,09	0,42	41,00	1,65	29,00
7d	160	21,93	1,10	20,09	14,01	1,71	81,90	5,10	48,06
30d	142	13,08	0,74	12,00	8,77	0,89	58,77	1,90	30,44
90d	130	7,03	0,40	6,05	4,55	0,48	23,76	1,19	15,81
180d	119	5,29	0,34	4,00	3,72	0,65	21,00	1,08	12,00
1 año	96	4,35	0,31	3,75	3,04	0,00	15,85	0,97	11,41
CS	95	6,55	0,37	6,04	3,58	0,80	19,90	2,06	12,97

DT: Desviación típica. ET: Error típico de la media; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Tabla 13. Estadísticos descriptivos de linfocitos B totales por tiempo en trasplante cardíaco en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos B totales (Números absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre-TC	176	147,55	10,18	103,56	135,09	1,30	846,16	14,41	416,60
7d	140	188,34	14,40	138,44	170,39	8,00	1050,40	25,96	487,36
30d	117	148,58	11,27	117,54	121,91	3,22	668,88	18,10	374,41
90d	106	110,90	8,28	93,80	85,26	9,90	427,68	14,56	290,64
180d	92	89,77	8,34	67,26	79,96	7,25	399,00	12,22	262,68
1 año	78	77,57	7,13	56,00	63,41	4,27	285,30	7,20	231,00
CS	23	160,70	18,56	141,74	89,03	56,52	477,20	57,54	434,86

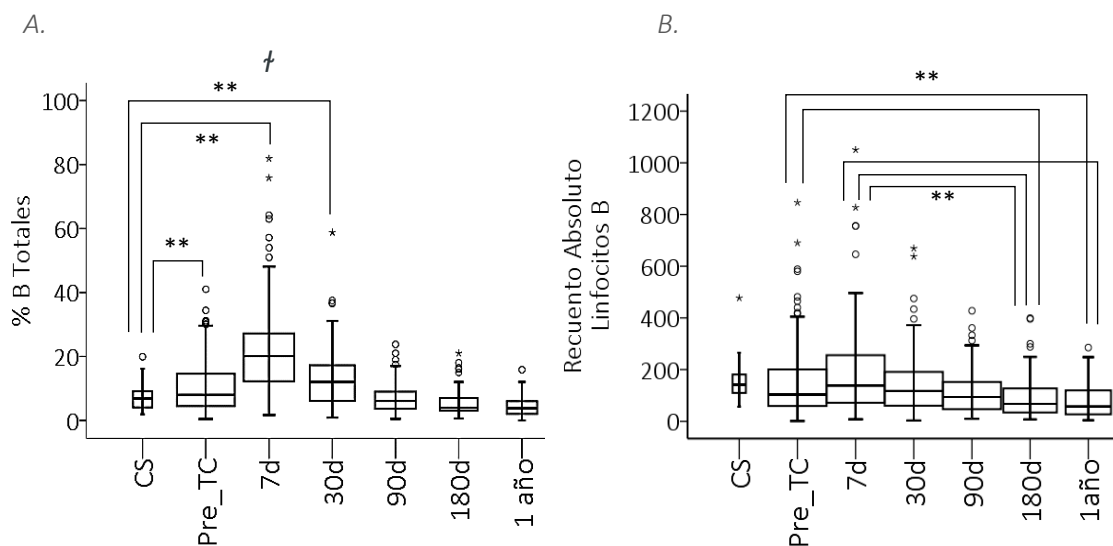
ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Los 7d y 30d son los puntos donde las subpoblaciones sufrieron una mayor variación. En frecuencias relativas, se establecieron diferencias significativamente más altas del punto 7d con todos los puntos de estudio restantes, incluidos CS. Comparados con los CS, los puntos pre-TC y 30d también mostraron valores significativamente superiores. Si observamos la cinética en porcentaje (figura 33), los valores sufren un aumento hasta la semana, descendiendo progresivamente hasta el año y restableciéndose los valores llegando a ser similares a los CS.

Los valores absolutos de linfocitos B a la semana también son significativamente superiores comparados con el punto 90 d, 180 d y año post-TC, pero no respecto a CS ni al pre-TC.

El punto pre-TC mostró valores significativamente más altos que 180 d y año. Su cinética presenta un aumento hasta la semana postrasplante y un descenso progresivo hasta el año, pero no se restablecen los valores respecto al basal.

Figura 33. Representación de la variación de linfocitos B por tiempo. A. Valores en porcentaje. B. Recuento absoluto ($10^3/\mu\text{L}$)



†. El punto 7 días es significativamente superior al resto de puntos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

En relación con el marcador de maduración CD27, la población celular $\text{CD19}^+ \text{CD27}^-$ no presentó variaciones significativas en su cinética en frecuencias relativas, pero sí cuando

nos fijamos en sus valores absolutos. Los puntos 180d y año mostró valores significativamente inferiores a los CS. La forma de su cinética vuelve a repetirse con un pico a los 7d postrasplante, siendo significativamente superior a los valores 180d y año (Figura 34).

Tabla 14. Estadísticos en frecuencias relativas de linfocitos B CD19+ CD27- por tiempo en trasplante cardíaco

Linfocitos CD19 ⁺ CD27 ⁻ (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre-TC	70	64,93	2,45	66,17	20,51	19,00	96,30	22,82	91,23
7d	47	66,20	2,36	68,27	16,22	23,62	90,11	30,63	88,16
30d	44	68,12	2,10	67,23	13,93	40,15	88,73	42,69	88,03
90d	44	68,22	2,03	69,01	13,45	38,46	92,62	44,07	88,72
180d	44	62,48	2,57	65,21	17,07	3,41	85,62	34,02	85,15
1 año	35	68,69	2,63	71,87	15,56	34,22	92,81	36,44	90,14
CS	95	60,30	1,71	62,78	16,75	16,39	88,66	27,37	83,51

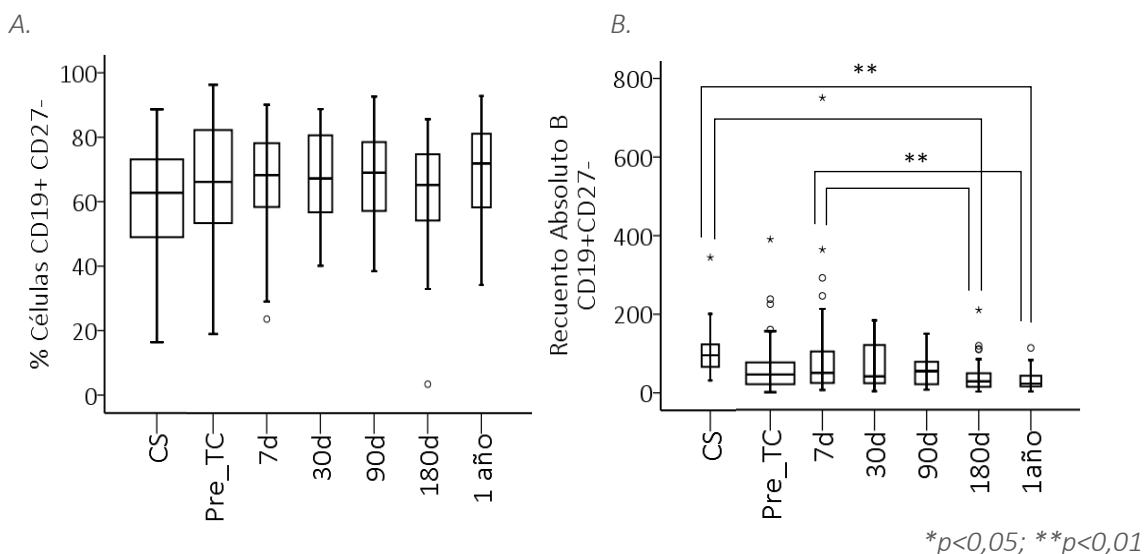
ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Tabla 15. Estadísticos de linfocitos B CD19+ CD27- por tiempo en trasplante cardíaco en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos CD19 ⁺ CD27 ⁻ (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre-TC	65	60,77	8,03	45,28	64,75	0,27	389,63	6,56	205,21
7d	31	105,87	26,71	49,43	148,74	6,00	750,51	8,15	518,38
30d	28	68,08	10,46	40,54	55,35	2,61	183,18	3,92	172,70
90d	31	55,11	6,85	53,76	38,13	6,54	149,35	7,06	145,86
180d	32	41,31	7,69	27,84	43,52	1,63	209,47	4,04	150,37
1 año	28	29,74	4,65	18,68	24,82	2,19	113,00	1,09	97,52
CS	23	111,04	14,23	95,74	68,26	31,64	344,49	32,53	315,78

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Figura 34. Variación de linfocitos B CD19+ CD27- por tiempo. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



La población B naïve no mostró variaciones significativas en cuanto a porcentajes, pero sí en valores absolutos, donde los CS tuvieron valores significativamente superiores a los puntos pre- TC, 30 d, 90 d, 180 d y año postrasplante (Figura 35).

Tabla 16. Estadísticos del porcentaje de linfocitos B naïve por tiempo de estudio en trasplante cardíaco

Linfocitos B naïve (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre-TC	70	47,81	2,77	48,69	23,17	0,13	95,71	6,65	84,45
7d	47	51,04	2,55	54,93	17,50	2,47	82,10	7,66	75,54
30d	44	55,60	2,98	57,23	19,78	2,14	95,18	11,77	93,56
90d	44	56,18	2,66	55,50	17,64	24,10	92,17	28,91	88,05
180d	42	50,94	2,55	51,71	16,52	11,93	91,55	23,56	85,94
1 año	35	47,46	2,67	47,54	15,82	18,73	88,55	19,57	85,24
CS	71	57,13	2,05	59,44	17,28	11,20	94,65	20,19	84,59

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

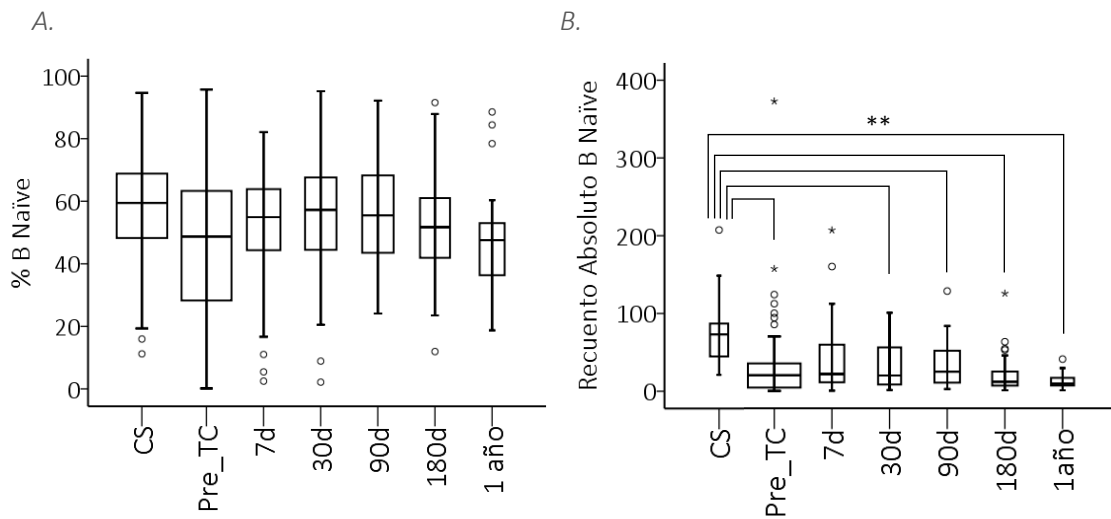
Tabla 17. Estadísticos de linfocitos B naïve por tiempo de estudio en trasplante cardíaco en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos B naïve (Valores absolutos)

Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre-TC	64	34,02	6,76	20,26	54,10	0,03	372,9	0,35	121,1
7d	30	44,26	9,09	21,75	49,80	0,33	206,9	2,08	181,2
30d	28	34,04	5,90	19,93	31,23	1,19	100,7	1,26	96,45
90d	31	32,98	5,10	24,84	28,42	2,53	128,6	2,72	101,6
180d	31	21,51	4,58	11,81	25,51	0,81	125,6	1,51	88,25
1 año	29	12,45	1,78	8,95	9,57	0,92	41,00	0,46	35,21
CS	22	76,64	9,29	72,99	43,55	21,04	207,4	21,85	198,6

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Figura 35. Representación de la cinética de linfocitos B naïve en trasplante cardíaco. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

La población B *exhausted* exhibió porcentajes al año significativamente superiores a los de los CS. En números absolutos no se observaron diferencias significativas en ningún punto de estudio, siendo los valores son similares en todos los casos (figura 36).

Tabla 18. Estadísticos del porcentaje de linfocitos B exhausted por tiempo de estudio en trasplante cardíaco

Linfocitos B exhausted (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre-TC	35	16,80	2,26	13,79	13,37	0,00	53,62	1,87	46,12
7d	40	12,32	2,34	9,29	14,79	0,00	91,44	1,19	32,56
30d	42	10,82	1,17	8,53	7,61	1,96	35,81	2,32	27,42
90d	42	13,02	1,81	7,88	11,73	0,00	52,33	0,78	37,12
180d	42	14,23	1,79	10,92	11,62	2,25	51,37	2,49	48,32
1 año	33	17,41	2,44	12,50	14,01	1,64	51,41	2,52	49,08
CS	37	8,77	1,09	6,66	6,62	0,78	30,82	0,93	25,19

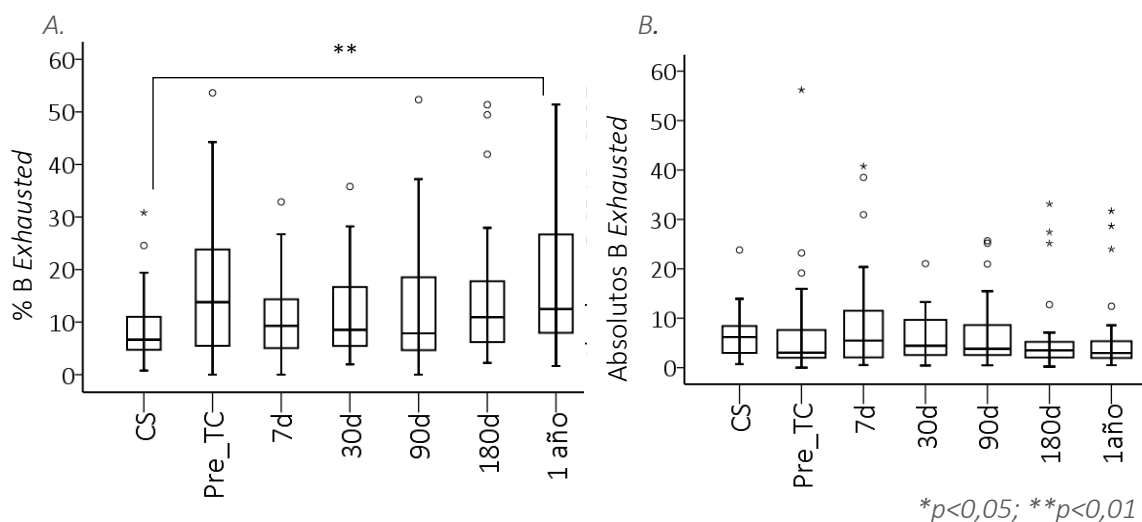
ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Tabla 19. Estadísticos de linfocitos B exhausted en trasplante cardíaco por tiempo en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos B exhausted (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	31	7,29	1,95	3,03	10,85	0,00	56,22	0,40	36,42
7d	26	9,75	2,23	5,42	11,38	0,00	40,76	0,19	39,97
30d	27	6,28	0,96	4,43	5,01	0,44	21,06	0,46	17,95
90d	31	6,77	1,24	3,82	6,88	0,00	25,68	0,30	25,38
180d	31	6,01	1,43	3,50	7,95	0,22	33,12	0,55	29,71
1 año	27	6,33	1,62	2,72	8,43	0,00	31,71	0,21	30,49
CS	22	6,70	1,07	6,20	5,02	0,72	23,80	0,98	22,32

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Figura 36. Representación de la variación de linfocitos B exhausted por tiempo en trasplantados cardíacos. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



Los números absolutos de células B naïve IgD fueron significativamente inferiores a los seis meses y al año al compararlos con el valor a la semana (figura 38). En el caso de las células B naïve IgM, mostraron valores absolutos significativamente superiores al de los CS en el punto 90d y 180d (Figura 37).

En porcentaje no se observaron variaciones significativas en ninguna de las dos subpoblaciones.

Tabla 20. Estadísticos del porcentaje de linfocitos B naïve IgD en trasplante cardíaco por tiempo

Linfocitos B naïve IgD (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	37	33,03	3,49	31,21	21,26	0,00	95,39	0,64	76,62
7d	42	31,92	2,37	30,71	15,35	0,37	92,38	3,05	51,49
30d	43	30,24	2,62	30,95	17,16	0,00	91,75	0,83	54,58
90d	43	27,89	2,04	29,67	13,37	0,00	65,36	2,44	49,57
180d	40	34,40	2,48	32,42	15,71	3,11	96,00	5,23	56,68
1 año	35	31,42	2,20	30,91	13,00	7,74	62,17	9,50	54,32
CS	37	24,17	2,07	22,19	12,59	0,47	65,90	7,61	45,24

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Tabla 21. Estadísticos de linfocitos B naïve IgD en los distintos puntos de estudio en trasplante cardíaco en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos B naïve IgD (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	32	21,82	5,61	11,83	31,74	0,00	167,40	0,35	102,86
7d	26	57,35	26,29	20,97	134,05	0,15	693,32	1,41	490,08
30d	28	27,41	6,32	13,51	33,45	0,00	168,07	0,36	118,34
90d	30	14,69	1,81	15,37	9,92	1,21	33,41	1,45	32,93
180d	30	13,14	2,83	7,91	15,48	1,12	77,94	1,36	58,28
1 año	29	10,15	2,19	6,83	11,81	0,00	58,67	0,25	45,74
CS	22	26,98	5,65	21,51	26,49	0,43	112,17	1,04	106,00

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Tabla 22. Estadísticos del porcentaje de linfocitos B naïve IgM por tiempo en trasplante cardíaco

Linfocitos B naïve IgM (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	37	5,02	1,65	1,14	10,02	0,00	39,21	0,00	36,46
7d	39	1,27	0,16	0,81	1,02	0,02	3,66	0,00	3,47
30d	41	1,76	0,29	1,16	1,87	0,00	10,00	0,04	6,87
90d	42	2,39	0,84	1,15	5,43	0,00	35,69	0,00	6,20
180d	40	2,47	1,07	0,77	6,77	0,00	43,39	0,00	3,90
1 año	33	3,08	1,07	1,23	6,12	0,15	26,71	0,00	25,83
CS	37	2,29	0,38	1,50	2,31	0,19	9,47	0,23	8,96

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Tabla 23. Estadísticos de linfocitos B naïve IgM por tiempo en trasplante cardíaco en valor absoluto ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos B naïve IgM (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	33	1,10	0,31	0,36	1,74	0,00	6,58	0,47	2,89
7d	25	1,38	0,39	0,49	1,97	0,01	8,34	0,02	7,51
30d	27	1,19	0,25	0,62	1,30	0,00	4,57	0,00	4,33
90d	30	0,82	0,15	0,61	0,83	0,00	3,95	0,04	2,99
180d	26	0,52	0,09	0,37	0,48	0,00	1,68	0,00	1,61
1 año	26	0,95	0,38	0,23	1,96	0,00	7,58	0,01	7,48
CS	22	2,13	0,36	1,73	1,70	0,08	6,10	0,12	5,89

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

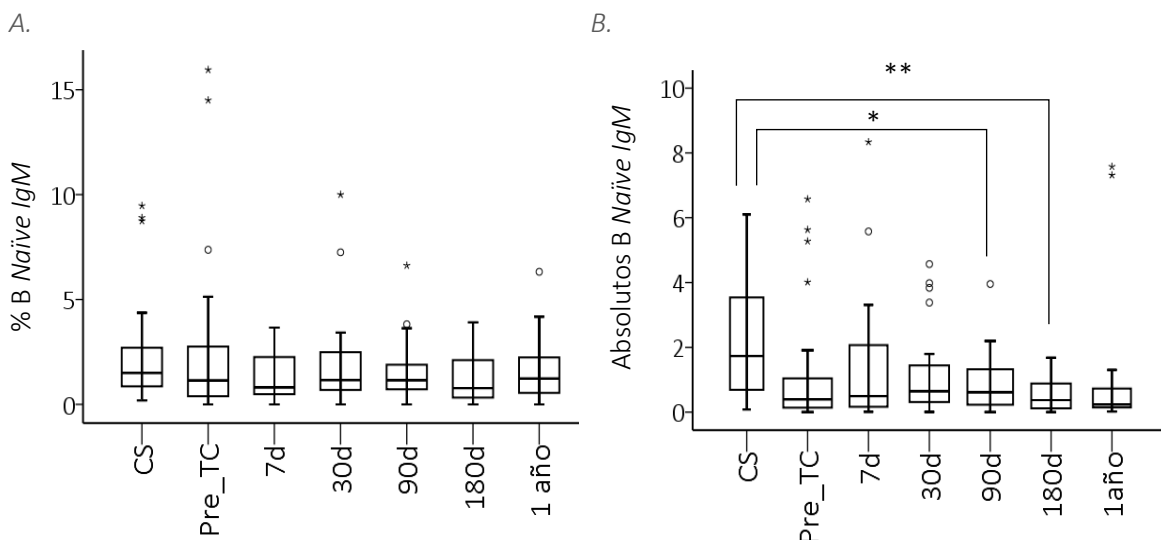
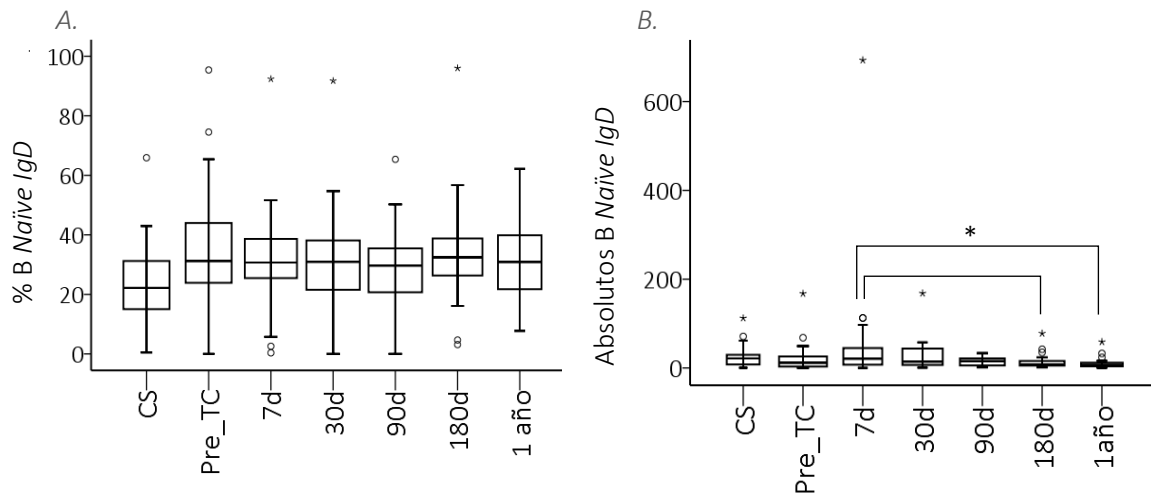
Figura 37. Representación de linfocitos B naïve IgM en trasplante cardíaco por tiempo. A. Porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Figura 38. Representación de la variación de linfocitos B naïve IgD respecto al tiempo de estudio en trasplante cardíaco. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Las células B memoria en porcentaje relativo oscilaron en valores similares durante todo el tiempo de seguimiento, sin variaciones significativas. En cuanto a los valores absolutos, su cinética sí experimentó cambios, teniendo valores menores al año post-TC al compararlos con el valor a la semana y con los CS (figura 39).

Tabla 24. Estadísticos del porcentaje de linfocitos B memoria en los distintos puntos de estudio en trasplante cardíaco

Linfocitos B memoria (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	70	33,13	2,47	28,34	20,63	3,58	81,00	6,19	75,64
7d	47	33,20	2,36	31,30	16,17	9,67	75,59	11,29	69,37
30d	44	31,02	2,08	32,28	13,80	11,00	56,82	11,95	56,06
90d	44	30,85	1,98	30,03	13,11	7,38	61,54	10,34	55,33
180d	44	36,46	2,54	34,24	16,83	12,00	96,04	13,40	62,05
1 año	35	29,77	2,54	26,01	15,05	6,97	63,90	9,58	63,18
CS	95	39,33	1,70	37,41	16,58	10,30	83,23	15,91	71,72

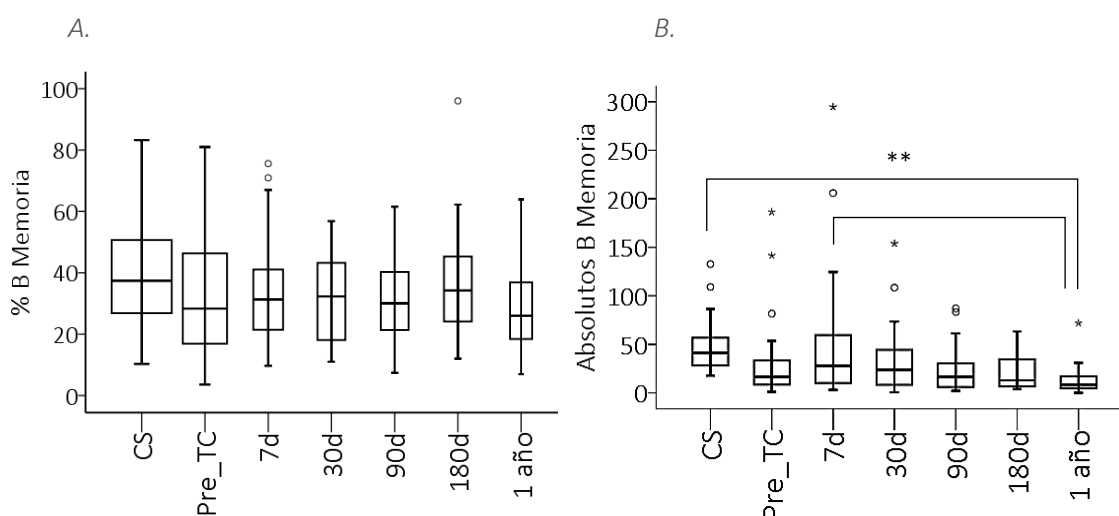
ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Tabla 25. Estadísticos de linfocitos B memoria en los distintos puntos de estudio en trasplante cardíaco en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos B memoria (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	65	24,94	3,69	16,43	29,77	1,00	186,38	2,41	73,24
7d	31	47,24	11,49	27,92	63,95	3,04	294,64	3,80	241,35
30d	28	31,99	6,48	23,73	34,30	0,52	153,89	1,64	133,38
90d	31	22,94	3,87	16,63	21,56	1,94	86,99	2,89	84,79
180d	32	22,30	3,27	12,90	18,49	3,96	63,30	3,96	58,36
1 año	29	13,23	2,62	8,43	14,12	0,00	71,89	0,70	51,37
CS	23	49,46	5,97	41,13	28,64	17,85	132,71	18,37	127,99

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Figura 39. Representación de la variación de linfocitos B memoria respecto al tiempo de estudio en trasplante cardíaco. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Las células B memoria SCI en frecuencias relativas presentó un mínimo valor pretrasplante y un máximo al mes postrasplante. Los porcentajes fueron significativamente inferiores en el pre- TC comparado con el mes, mientras que en valores absolutos exhibieron cifras significativamente inferiores en todos los puntos respecto a la población sana (Figura 40).

Tabla 26. Estadísticos del porcentaje linfocitos B memoria SCI en los distintos puntos de estudio en trasplante cardíaco

Linfocito B memoria SCI (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	71	23,51	2,03	20,66	17,30	0,59	88,60	1,82	59,81
7d	48	28,73	2,26	27,37	15,64	1,03	56,86	3,77	53,54
30d	44	34,67	2,90	32,07	19,21	0,89	98,05	6,86	83,19
90d	43	33,49	2,29	34,20	15,19	0,00	72,73	6,68	55,88
180d	43	31,32	2,50	27,96	16,40	6,07	67,15	7,34	53,22
1 año	35	28,30	2,22	26,92	13,15	5,86	51,63	8,56	48,45
CS	72	31,29	2,04	30,11	17,31	0,00	77,19	6,59	65,69

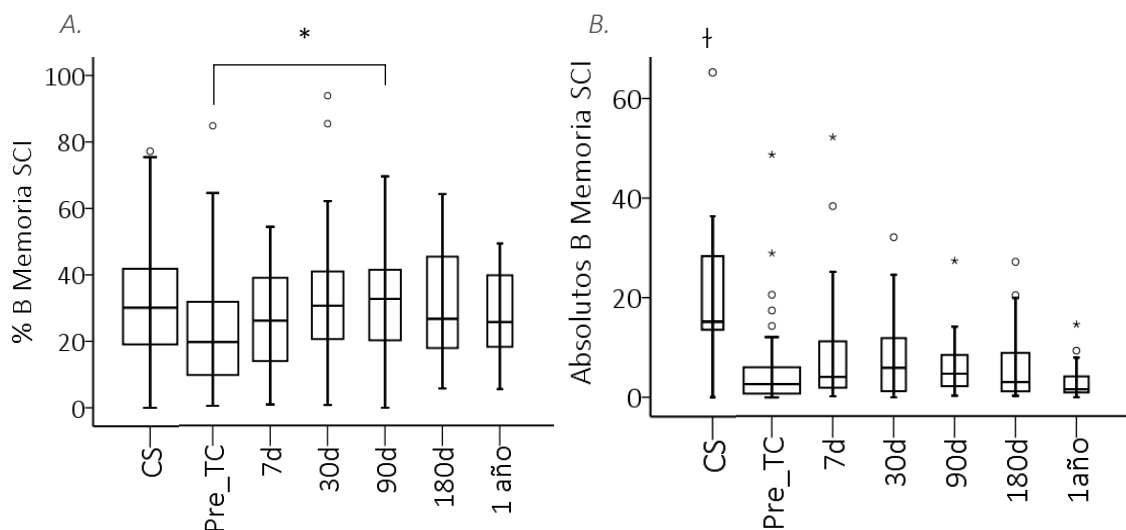
ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Tabla 27. Estadísticos de linfocitos B memoria SCI en valores absolutos en los distintos puntos de estudio en trasplante cardíaco ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocito B memoria SCI (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	Error típ. Media	Mediana	Desv. típ.	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	65	5,82	1,03	3,00	8,34	0,12	52,59	0,24	21,30
7d	31	9,98	2,26	4,55	12,58	0,38	56,39	0,62	47,44
30d	28	8,62	1,59	6,53	8,42	0,16	34,76	0,41	31,10
90d	30	6,79	1,08	5,27	5,90	0,52	29,67	0,59	21,83
180d	32	6,96	1,30	3,45	7,39	0,47	29,44	0,79	24,75
1 año	29	3,55	0,67	1,87	3,62	0,00	15,93	0,09	13,09
CS	23	20,15	2,92	15,17	14,00	0,00	65,24	1,08	59,46

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Figura 40. Representación de la variación de linfocitos B memoria SCI respecto al tiempo de estudio en trasplante cardíaco. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; †: $p < 0,05$ respecto al resto de puntos de estudio

Las frecuencias de las células B memoria CCI se mantuvieron más o menos constantes en todos los puntos de estudio. Por el contrario, la cinética en valores absolutos mostró un máximo a la semana siendo significativo respecto al año, el de menor valor (Figura 41).

Tabla 28. Estadísticos del porcentaje de linfocitos B memoria CCI en los distintos puntos de estudio en trasplante cardíaco

Linfocito B memoria CCI (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	71	46,02	2,85	49,14	24,06	0,00	85,00	1,74	79,88
7 d	48	46,63	2,99	46,57	20,76	4,20	91,96	9,40	88,73
30 d	44	47,48	2,64	50,06	17,53	0,51	75,07	9,32	72,74
90 d	44	48,52	2,41	48,67	16,02	20,00	79,69	20,15	77,63
180 d	43	44,68	2,87	42,32	18,82	5,56	82,19	13,03	74,50
1 año	35	45,91	3,25	46,37	19,25	2,13	84,53	9,79	77,54
CS	71	38,60	2,69	39,33	22,71	4,71	90,65	8,06	84,03

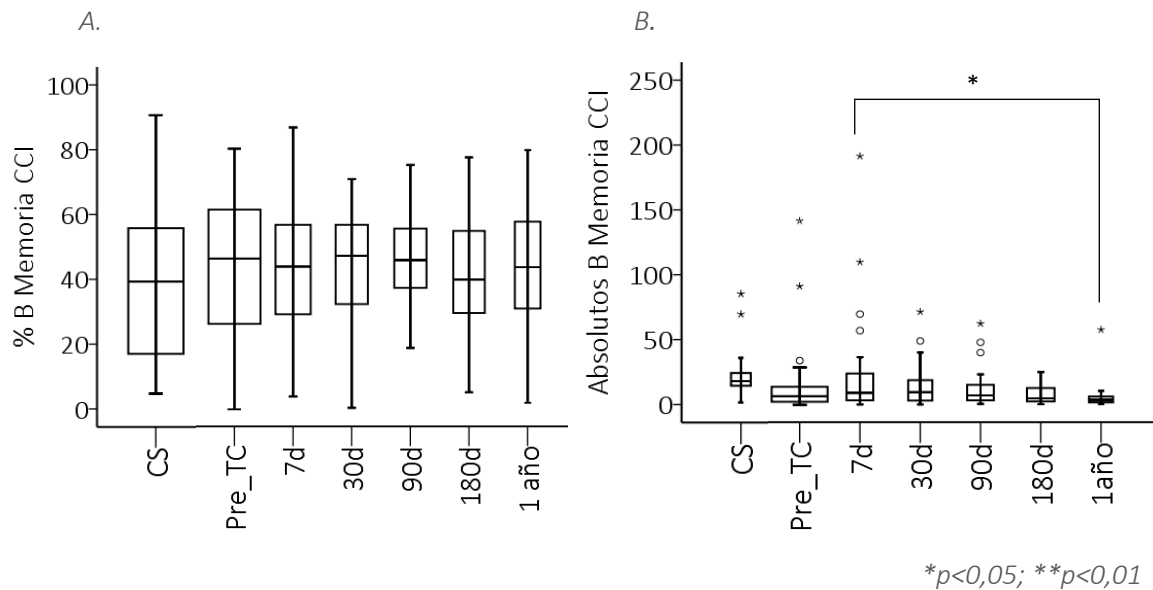
ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Tabla 29. Estadísticos de linfocitos B memoria CCI en valores absolutos por tiempo en trasplante cardíaco ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocito B memoria CCI (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	65	12,60	2,71	7,03	21,82	0,00	148,54	0,12	34,09
7 d	31	24,93	7,38	9,77	41,11	0,31	200,74	0,92	149,46
30 d	28	15,58	3,32	10,21	17,56	0,32	75,16	0,88	64,55
90 d	31	13,09	2,71	7,69	15,11	0,84	65,68	0,98	56,56
180 d	32	9,14	1,41	5,32	7,99	0,57	26,47	0,97	25,33
1 año	29	6,43	2,03	3,89	10,95	0,69	60,77	0,35	36,05
CS	22	23,84	4,06	17,99	19,05	1,56	85,27	2,80	82,91

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Figura 41. Representación de la variación de linfocitos B memoria CCI respecto al tiempo de estudio en trasplante cardíaco. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



Las poblaciones definidas como IgD o IgM positivas no muestran variaciones significativas en recuento absoluto, no se observaron variaciones en ninguno de los puntos de estudio a lo largo del tiempo. En cambio, sí exhibieron diferencias significativas en frecuencias relativas, pero sólo las B memoria IgD, cuyos valores fueron significativamente superiores en el punto pre-TC, 180d y año al compararlos con los CS (Figura 42).

Tabla 30. Estadísticos del porcentaje linfocitos B memoria IgD por tiempo en trasplante cardíaco

Linfocitos B memoria IgD (%)								Percentiles	
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	5	95
Pre_TxC	37	15,86	2,72	11,81	16,57	0,00	69,64	0,38	56,82
7d	42	14,17	1,37	12,88	8,90	0,49	32,39	1,77	30,39
30d	43	12,86	1,51	11,27	9,88	0,00	50,08	0,37	28,04
90d	43	13,72	1,37	11,50	9,01	0,19	33,48	0,70	31,76
180d	43	17,36	2,58	12,88	16,89	0,00	83,06	1,37	70,65
1 año	33	20,20	3,67	13,24	21,12	1,22	91,98	1,48	71,76
CS	37	6,36	0,95	4,89	5,77	0,43	28,81	0,96	22,99

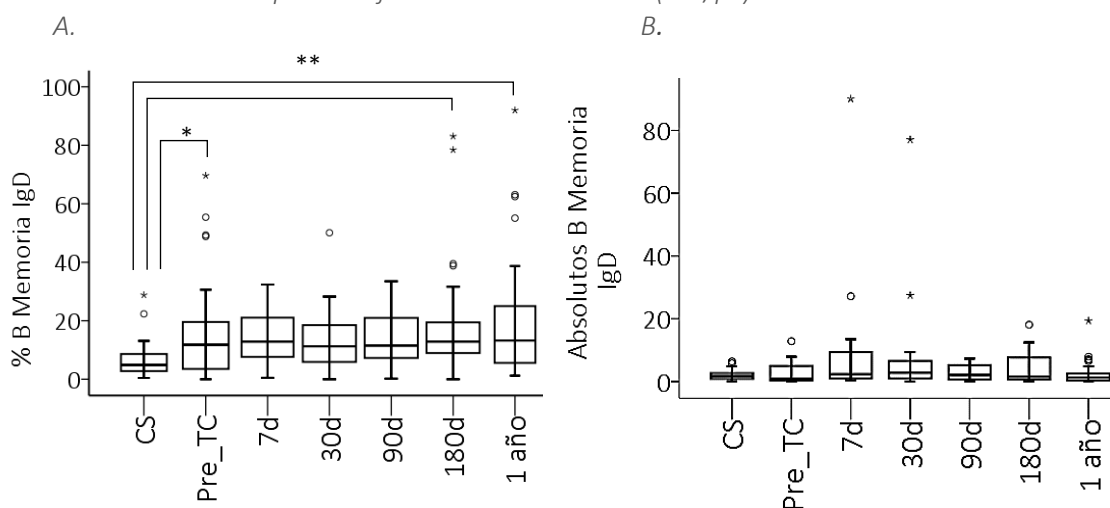
ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; d: Días; CS: Control sano

Tabla 31. Estadísticos de linfocitos B memoria IgD en trasplante cardíaco por tiempo en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos B memoria IgD (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	32	2,75	0,57	0,94	3,25	0,00	12,84	0,02	9,61
7d	26	8,15	3,49	2,34	17,78	0,35	90,07	0,37	68,06
30d	28	6,82	2,79	2,84	14,75	0,00	77,07	0,01	54,74
90d	30	2,86	0,44	2,14	2,41	0,04	7,31	0,05	7,07
180d	32	4,09	0,80	1,52	4,63	0,00	18,09	0,13	14,13
1 año	28	2,76	0,76	1,28	4,03	0,00	19,34	0,04	14,20
CS	22	2,04	0,36	1,72	1,71	0,08	6,42	0,10	6,33

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Figura 42. Representación de la variación de linfocitos B memoria IgD por tiempo en trasplante cardíaco. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabla 32. Estadísticos del porcentaje linfocitos B memoria IgM por tiempo en trasplante cardíaco

Linfocitos B memoria IgM (%)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TxC	37	7,13	2,77	2,10	16,86	0,00	75,65	0,22	71,67
7d	42	7,52	2,80	2,16	18,12	0,27	86,34	0,32	64,77
30d	43	4,08	1,58	2,05	10,34	0,00	68,14	0,04	12,25
90d	43	5,28	2,22	1,87	14,57	0,00	70,21	0,00	57,69
180d	43	6,63	2,49	2,59	16,32	0,00	77,47	0,00	64,64
1 año	33	7,11	2,96	1,61	17,01	0,00	71,58	0,00	67,72
CS	37	6,38	0,74	5,11	4,83	0,00	27,80	1,04	15,05

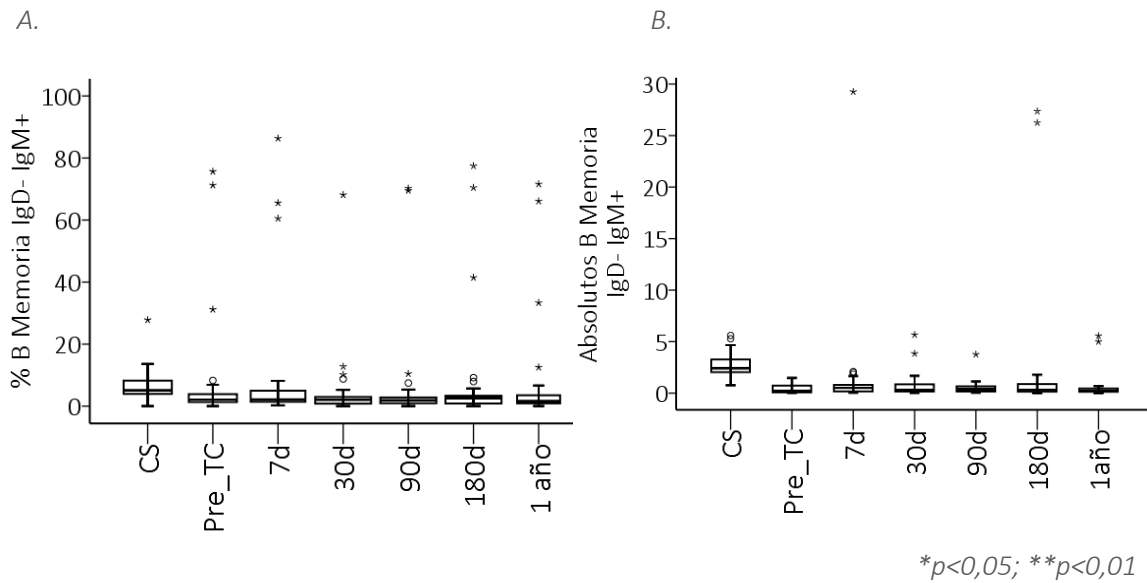
ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Tabla 33. Estadísticos de linfocitos B memoria IgM en trasplante cardíaco por tiempo en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

Linfocitos B memoria IgM (Valores absolutos)									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TC	32	1,66	1,26	0,24	7,11	0,03	40,54	0,03	15,15
7d	26	1,75	1,11	0,52	5,64	0,04	29,25	0,04	19,74
30d	27	0,78	0,24	0,33	1,24	0,030	5,66	0,03	4,93
90d	27	0,56	0,14	0,38	0,72	0,04	3,77	0,04	2,71
180d	30	2,24	1,22	0,31	6,69	0,00	27,36	0,01	26,74
1 año	26	0,68	0,27	0,19	1,38	0,00	5,56	0,00	5,36
CS	21	2,72	0,28	2,42	1,27	0,76	5,60	0,80	5,56

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; d: Días; CS: Control sano

Figura 43. Representación de la variación de linfocitos B memoria IgM en trasplante cardíaco respecto al tiempo de estudio. A. Valores en porcentaje. B. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)



3 ESTUDIO DE POBLACIONES CON FENOTIPO B REGULADOR

3.1. DESCRIPTIVOS DE POBLACIONES CON FENOTIPO B REGULADOR EN CONTROLES SANOS

Para establecer si existían variaciones en las poblaciones definidas como B reguladoras entre los pacientes trasplantados y la población sana tuvimos que establecer los valores de normalidad para estos últimos (N=23). Los descriptivos se muestran en las siguientes tablas, en frecuencias (tabla 34) y recuento absoluto (tabla 35). Los valores del grupo CS los consideraremos basales.

Tabla 34. Descriptivos de los porcentajes de los linfocitos con fenotipo B regulador en controles sanos

	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	10,48	0,78	10,63	3,75	3,09	19,57	3,27	18,67
B memoria reguladora	21,49	2,09	20,06	10,04	6,08	37,59	6,18	37,38
B maduras	43,19	4,07	49,63	19,53	10,90	69,50	11,79	68,98
B10	24,26	2,01	21,89	9,63	7,98	44,15	8,36	42,97
B transicionales	20,98	3,89	13,84	18,67	0,25	62,47	0,59	60,39

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica

Tabla 35. Descriptivos del fenotipo B regulador en valores absolutos en controles sanos ($10^3/\mu\text{L}$)

	Media	ET	Mediana	DT	Mín	Máx	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	21,83	4,14	17,69	19,84	6,12	98,48	6,28	88,46
B memoria reguladora	43,04	8,14	27,81	39,03	13,65	163,39	13,83	160,12
B maduras	89,63	15,82	64,86	75,88	17,40	239,42	19,53	238,94
B10	46,89	5,76	44,87	27,61	13,12	116,23	13,63	109,37
B transicionales	24,80	4,41	17,01	21,14	0,21	73,97	0,59	72,00

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica

3.2. DESCRIPTIVOS DE POBLACIONES CON FENOTIPO B REGULADOR EN PACIENTES TRASPLANTADOS CARDÍACOS

Se decidió estudiar los linfocitos B con fenotipo regulador en un estudio trasversal durante un periodo de tres meses. Se consiguió reclutar 13 pacientes en estudio pre-TC,

10 con EVI y 28 trasplantados cardíacos en diferentes puntos postrasplante dentro del periodo de seguimiento de un año (Tabla 4).

Tabla 36. Descriptivos del fenotipo B regulador en porcentaje en el punto pretrasplante cardíaco

	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	9,88	2,44	7,34	8,78	0,87	26,75	0,87	.
B memoria reguladora	16,84	3,01	12,02	10,84	8,65	40,11	8,65	.
B maduras	48,05	5,07	51,40	18,28	22,50	82,84	22,50	.
B10	16,26	2,74	16,99	9,87	3,62	30,97	3,62	.
B transicionales	11,39	1,82	10,79	6,57	0,00	21,65	0,00	.

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica

Tabla 37. Descriptivos del fenotipo B regulador en valores absolutos en el punto pretrasplante cardíaco ($10^3/\mu\text{L}$)

	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	8,42	3,75	2,89	11,85	0,38	38,52	0,38	.
B memoria reguladora	21,20	8,80	8,27	27,82	2,21	93,26	2,21	.
B maduras	135,98	86,05	40,44	272,10	2,72	893,16	2,72	.
B10	18,12	7,57	6,25	23,93	2,52	62,69	2,52	.
B transicionales	7,84	3,65	2,87	11,54	0,00	34,26	0,00	.

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica

Se observaron porcentajes significativamente inferiores en el pre-TC respecto a los mostrados en los CS para la población B10 (PreTC: $16,26 \pm 9,87\%$ vs. CS: $24,26 \pm 9,63\%$; $p=0,02$).

Los números absolutos mostraron valores significativamente inferiores para la población B10 (PreTC: $18,12 \pm 23,93 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ vs. CS: $46,89 \pm 27,61 \cdot 10^3/\mu\text{L}$; $p=0,047$), B reguladoras (PreTC: $8,42 \pm 11,45 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ vs. CS: $21,83 \pm 19,84 \cdot 10^3/\mu\text{L}$; $p=0,01$) y B transicionales (PreTC: $7,84 \pm 11,54 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ vs. CS: $24,80 \pm 21,14 \cdot 10^3/\mu\text{L}$; $p=0,02$) (Figura 44).

Figura 44. Diferencia de medias de poblaciones con fenotipo regulador en el punto pretrasplante cardíaco versus población sana. A. Valores en porcentaje. B. Números absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

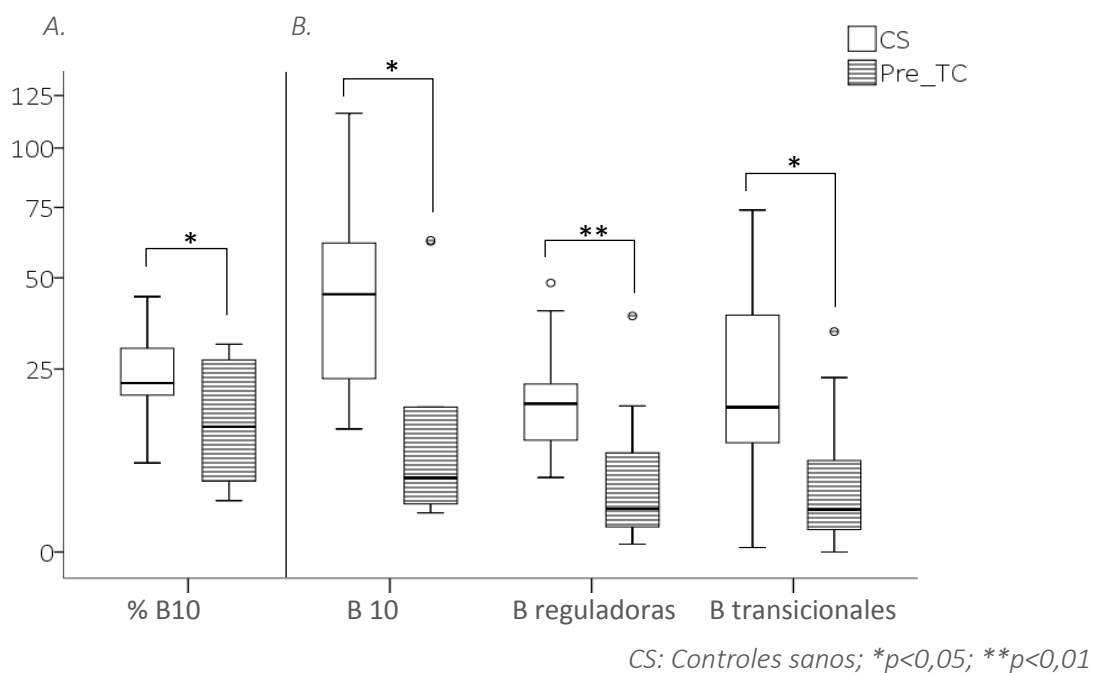


Tabla 38. Descriptivos en porcentaje del fenotipo B regulador postrasplante cardíaco

	Media	ET	Mediana	DT	Mínimo	Máximo	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	6,11	1,49	4,25	6,30	0,74	27,53	0,74	.
B memoria reguladora	21,40	3,80	16,47	16,14	5,82	64,87	5,82	.
B maduras	40,35	4,96	39,26	21,03	10,54	73,66	10,54	.
B10	20,82	3,36	16,34	14,25	5,56	53,14	5,56	.
B transicionales	5,74	0,94	4,68	4,00	0,37	12,98	0,37	.

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica

Tabla 39. Descriptivos del fenotipo B regulador postrasplante cardíaco en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	3,37	0,93	2,43	3,93	0,19	16,69	0,19	.
B memoria reguladora	10,67	1,77	10,54	7,51	2,18	32,09	2,18	.
B maduras	24,40	5,18	16,94	21,99	4,32	81,84	4,32	.
B10	9,71	0,94	4,68	4,00	0,37	12,98	0,37	.
B transicionales	2,36	0,67	1,45	2,83	0,16	11,84	0,16	.

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica

3.3. DESCRIPTIVOS DEL FENOTIPO B REGULADOR EN PACIENTES TRASPLANTE RENAL

Los estadísticos descriptivos de las medias de las poblaciones con capacidad reguladora en pacientes trasplantados renales (N=17) se muestran en las siguientes tablas, expresados como frecuencias relativas (tabla 40) y valores absolutos (tabla 41).

Tabla 40. Descriptivos del fenotipo B regulador postrasplante renal en porcentaje

	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	4,87	1,24	3,03	5,09	0,00	18,66	0,00	.
B memoria reguladora	19,52	2,92	17,06	12,05	5,04	54,48	5,04	.
B maduras	44,77	3,90	52,41	16,09	9,58	61,82	9,58	.
B10	23,50	3,48	21,38	14,37	0,00	57,04	0,00	.
B transicionales	8,44	2,03	5,38	8,13	1,72	28,57	1,72	.

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica

Tabla 41. Descriptivos del fenotipo B regulador postrasplante renal en valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$)

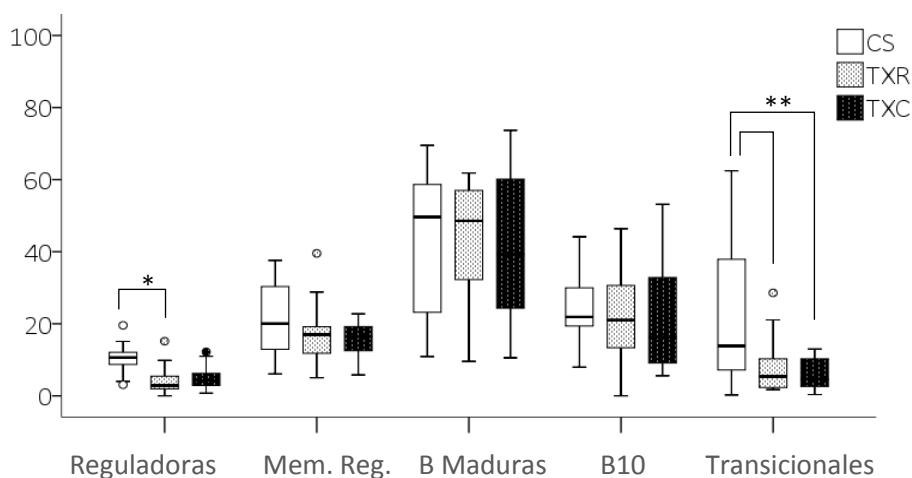
	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	5,38	2,98	2,07	12,29	0,00	52,34	0,00	.
B memoria reguladora	15,41	2,82	12,20	11,62	0,15	38,89	0,15	.
B maduras	46,01	11,30	30,17	46,57	0,66	147,01	0,66	.
B10	24,74	5,48	13,94	22,60	0,00	71,19	0,00	.
B transicionales	6,53	2,99	1,99	11,99	0,05	46,65	0,05	.

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica

El porcentaje de linfocitos B reguladoras fue significativamente inferior al de los CS (TR: $4,87 \pm 5,10\%$ vs. CS: $10,48 \pm 3,75\%$; $p=0,05$) al igual que en B transicionales (TR: $8,44 \pm 8,13\%$ vs. CS: $20,98 \pm 18,67\%$; $p=0,01$) (figura 45).

Respecto al tipo de intervención, no se observaron diferencias significativas entre los valores celulares en TC y TR.

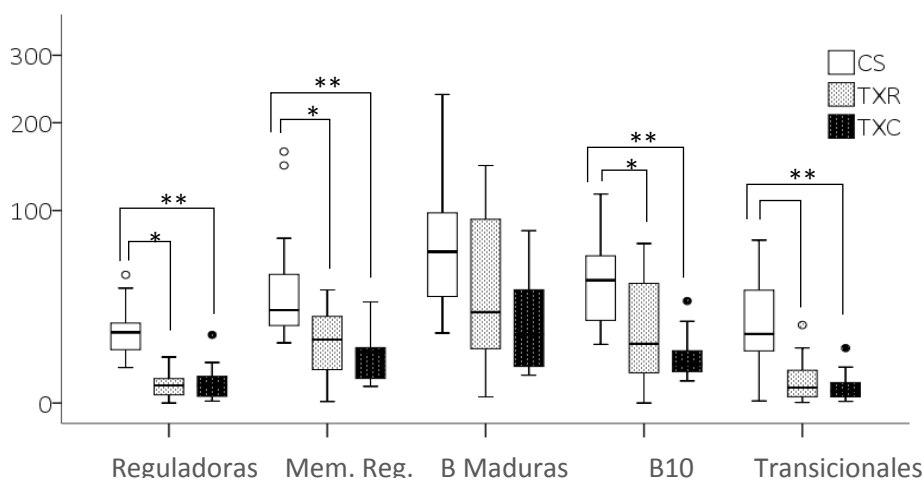
Figura 45. Representación de la diferencia de medias de los linfocitos B con fenotipo regulador en porcentaje en pacientes trasplantados renales, cardíacos y controles sanos



Mem. Reg: B Memoria Reguladora; CS: Controles sanos; TXR: Trasplantados renales; TXC: Trasplantados cardíacos; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

En valores absolutos, los TR mostraron valores significativamente disminuidos de las poblaciones B reguladoras (TR: $5,38 \pm 12,29 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ vs. CS: $21,83 \pm 19,84 \cdot 10^3/\mu\text{L}$; $p = 0,02$), B reguladoras memoria (TR: $15,41 \pm 11,62 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ vs. CS: $43,04 \pm 39,03 \cdot 10^3/\mu\text{L}$; $p = 0,02$), B10 (TR: $24,74 \pm 22,60 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ vs. CS: $46,89 \pm 27,61 \cdot 10^3/\mu\text{L}$; $p = 0,04$) y B transicionales (TR: $6,53 \pm 11,99 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ vs. CS: $24,80 \pm 21,14 \cdot 10^3/\mu\text{L}$; $p = 0,00$) respecto a los CS (figura 46).

Figura 46. Variación de los valores absolutos de linfocitos con fenotipo B regulador en pacientes trasplantados renales, cardíacos y controles sanos ($10^3/\mu\text{L}$)



Mem. Reg: B Memoria Reguladora; CS: Controles sanos; TXR: Trasplantados renales; TXC: Trasplantados cardíacos; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4. CINÉTICAS DE FACTORES SOLUBLES ASOCIADOS A CÉLULA B

Se presentan los datos cuantitativos de los niveles de BAFF en pg/ml en suero y /o plasma para los tres tipos de trasplante por separado. Los datos se expresan en media junto con error típico de la media, mediana, desviación típica, valores mínimo y máximo y percentil 5 y 95.

4.1. CINÉTICA DEL FACTOR ACTIVADOR DE CÉLULA B EN TRASPLANTE CARDÍACO

Se cuantificaron los niveles de BAFF en los puntos de seguimiento establecidos, pre-TC, 7d, 30d, 90d, 180d y año. Para establecer valores basales se analizaron un total de 51 muestras de controles sanos (tabla 42).

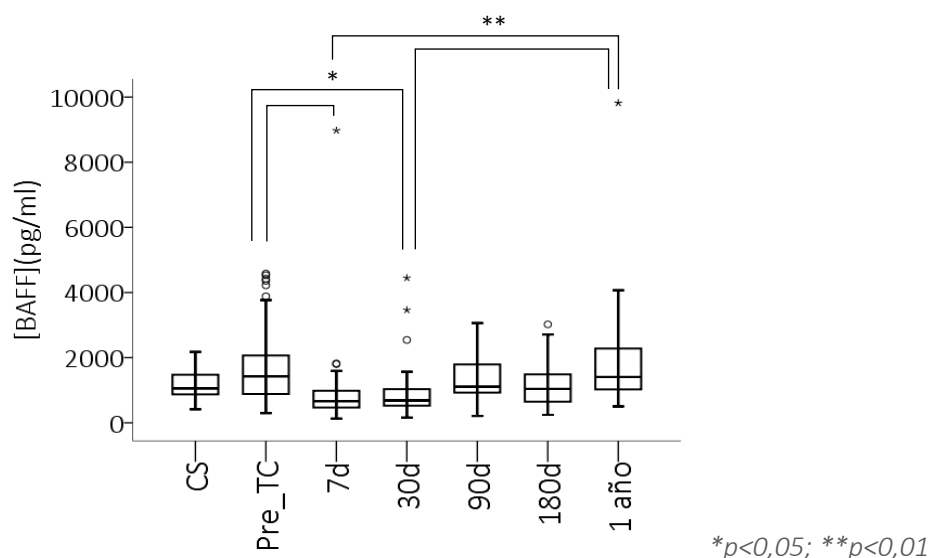
Tabla 42. Cinética del factor activador de célula B en trasplante cardíaco (pg/ml)

Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
								Pre_TC	131
7 d	39	951,21	221,36	663,69	1382,40	127,69	8975,69	183,69	1823,69
30 d	34	959,87	153,14	687,64	892,95	159,69	4447,69	207,69	3709,69
90 d	34	1391,85	129,48	1108,55	754,98	207,40	3063,70	342,40	3017,87
180 d	37	1175,65	113,66	1039,69	691,36	242,75	3021,69	283,19	2742,69
1 año	29	1892,68	324,64	1407,58	1748,23	503,69	9818,96	511,69	6944,65
CS	51	1161,99	56,45	1056,84	403,14	414,99	2175,91	536,86	1803,22

ET: Error típico de la media; D.T: Desviación típica; Pre_TC: Pretrasplante cardíaco; CS: Control sano

Su cinética describió una curva con un mínimo a los 7d, para aumentar progresivamente hasta el año, colocándose en niveles similares a los previos al trasplante (Figura 47). Los niveles pre-TC fueron significativamente superiores al punto 7d y 30d. Del mismo modo, los niveles al año resultaron significativamente superiores a los mostrados a los 7d y a los 30d.

Figura 47. Cinética de los niveles del factor activador de célula B en trasplante cardíaco y comparativa con controles sanos



4.2. CINÉTICA DEL FACTOR ACTIVADOR DE CÉLULA B EN TRASPLANTE PULMONAR

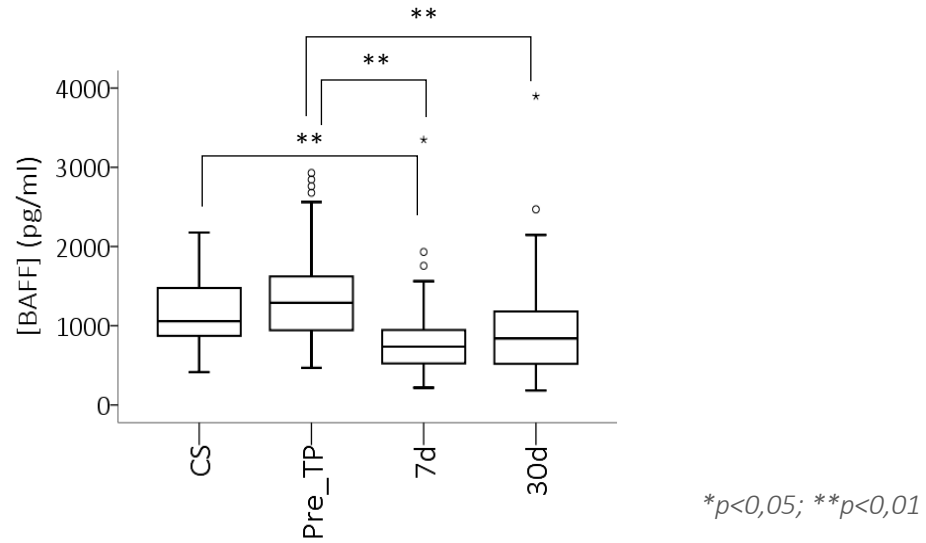
Los descriptivos obtenidos para TP se muestran en la tabla 43. Su cinética repite el comportamiento de TC, disminuyendo a los 7d y aumentando ligeramente al mes. Los niveles en el punto Pre-TP fueron superiores al de los CS, como ya ocurría en TC, siendo significativos respecto al punto 7d y 30d (figura 48).

Tabla 43. Cinética del factor activador de célula B en trasplante pulmonar (pg/ml)

BAFF									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TP	88	1345,18	60,20	1289,56	564,75	468,10	2928,29	533,99	2625,56
7 d	63	813,30	61,49	735,23	488,07	218,60	3346,71	306,21	1717,63
30 d	53	942,00	88,77	840,00	646,28	183,30	3897,00	247,20	2242,90
CS	51	1161,99	56,45	1056,84	403,14	414,99	2175,91	536,87	1803,23

ET: Error típico de la media; D.T: Desviación típica; Pre_TP: Pretrasplante pulmonar; CS: Control sano; d: Días

Figura 48. Cinética de los niveles del factor activador de célula B en trasplante pulmonar y comparativa con controles sanos



4.3. CINÉTICA DEL FACTOR ACTIVADOR DE CÉLULA B EN TRASPLANTE RENAL

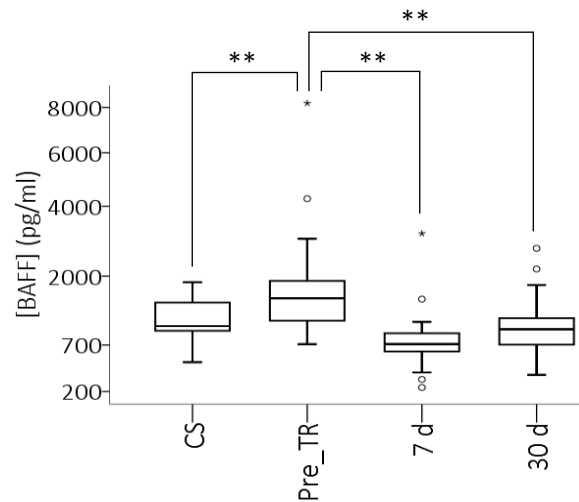
La cinética vuelve a ser similar al resto de trasplantes, teniendo un máximo en el punto pre-TR y un mínimo a los 7d para ir incrementándose sin llegar a reestablecerse en valores similares al punto previo al trasplante. El punto pre-TR presentó valores significativamente superiores al resto de puntos de estudio, incluyendo los CS. (Figura 49, tabla 44).

Tabla 44. Cinética del factor activador de célula B en trasplante renal (pg/ml)

BAFF									
Tiempo	N	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
								5	95
Pre_TR	71	1700,01	126,37	1516,52	1064,85	543,75	8207,76	665,95	3434,57
7 d	45	868,28	108,81	687,04	729,93	189,44	3567,22	218,77	3008,85
30 d	74	1064,20	67,13	980,82	577,47	240,46	4023,21	342,86	2178,57
CS	51	1161,99	56,45	1056,84	403,14	414,99	2175,91	536,87	1803,23

ET: Error típico de la media; D.T: Desviación típica; Pre_TR: Pretrasplante renal; CS: Control sano; d: Días

Figura 49. Cinética de los niveles del factor activador de célula B en trasplante renal y comparativa con controles sanos

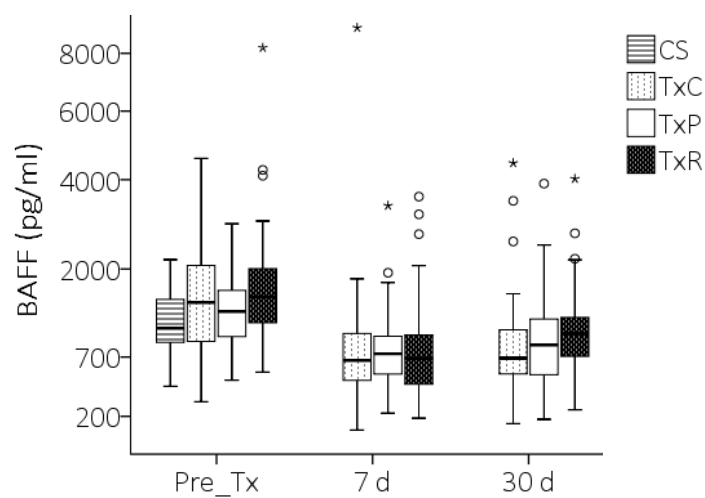


* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Aprovechando los datos de los tres tipos de intervenciones se realizaron comparativas Inter trasplante.

En la figura 50 se muestran cómo varía la cinética de BAFF en los tres tipos de trasplante, con el valor de los CS como referencia. Se observó que los tres tipos de trasplante siguieron la misma cinética, no existiendo diferencias significativas entre ellos.

Figura 50. Cinética del factor activador de linfocito B en los establecidos puntos de seguimiento para trasplante cardíaco, pulmonar y renal y población sana



Pre_Tx: Pretrasplante. CS. Controles sanos; TxC: Trasplante cardíaco; TxP: Trasplante pulmonar; TxR: Trasplante renal

4.4. NIVELES DE INTERLEUCINA 10 EN TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

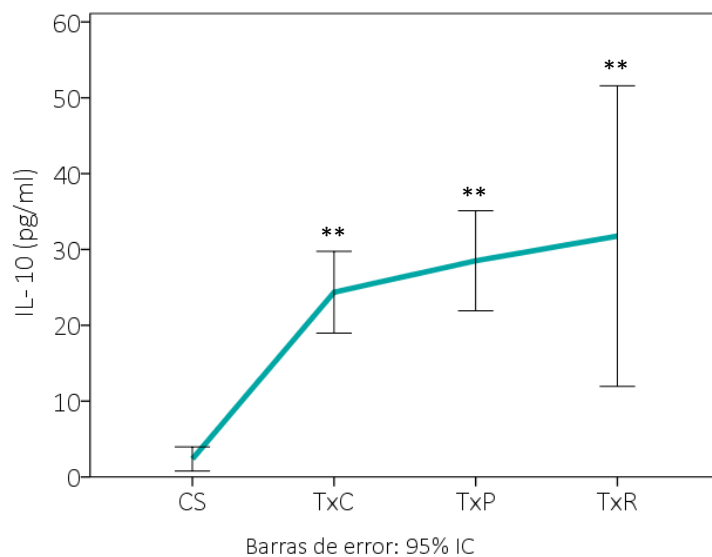
Los valores de IL-10 se midieron en el punto pretrasplante para TC (N=18), TP (N=87) y TR (N=35). El grupo de controles sanos (N=40) nos permitió determinar los niveles basales. Los descriptivos se muestran en la tabla 45. Los pacientes trasplantados exhibieron niveles muy superiores a los CS, siendo éstos significativos en los tres tipos de trasplante (figura 51).

Tabla 45. Estadísticos descriptivos de los niveles de interleucina 10 en el estudio pretrasplante cardíaco, pulmonar, renal y controles sanos (pg/ml)

IL-10						
Tiempo	N	Media	DT	ET	Mín.	Máx.
CS	40	2,37	4,96	0,78	0,10	19,66
TC	18	28,36	10,12	2,53	9,17	45,37
TP	87	28,51	30,96	3,32	0,00	168,07
TR	35	31,76	57,72	9,76	0,00	292,99

ET: Error típico de la media; DT: Desviación típica; TC: Trasplante cardíaco; TP: Trasplante pulmonar; TR: Trasplante renal; CS: Control sano

Figura 51. Representación de las medias de interleucina 10 en pg/ml en el punto pretrasplante para trasplante cardíaco, pulmonar, renal y controles sanos



† $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5. ALTERACIONES EN TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO ASOCIADAS CON EL DESARROLLO DE INFECCIÓN

5.1. ALTERACIONES EN TRASPLANTE CARDÍACO ASOCIADAS A INFECCIÓN

Durante el periodo de seguimiento del año postrasplante, 104 pacientes (47.9%) desarrollaron algún episodio de infección que requirió el uso de tratamiento intravenoso antimicrobiano específico (Tabla 46). La media de aparición del evento fue de 67 días postrasplante, habiéndose infectado un total de 31 pacientes durante la primera semana postrasplante, 27 entre la semana y el mes, 24 entre el mes y los tres meses, 12 entre los tres meses y seis meses y 10 más en el periodo de los seis meses al año.

Tabla 46. Datos demográficos y clínicos de pacientes trasplantados cardíacos con o sin infecciones severas durante el primer año postrasplante

Variables	Infección (N=104)	No infección (N=113)	p
Edad, media (rango)	56,42 (22-70)	52,95 (20-73)	0,44
Sexo (Hombre/ mujer) (%)	71/29	76/24	0,47
Asistencia circulatoria (%)			
Balón	17,6	16,2	0,48
ECMO	1,9	–	
DAV	17,6	10,8	0,10
Tratamiento Inductor (%)			
Daclizumab	47	64	0,48
Basiliximab	51	35	0,52
ATG	2	1	-
Ventilación mecánica (%)	17,6	13,5	0,41
T Circulación extracorpórea (min)	152,15	165,94	0,16
T Isquemia (min)	218,11	230,97	0,18
MIIS/Coronariopatía (N)	46	52	0,86
MIDI (N)	34	27	0,60
MIHT (N)	3	2	0,77
Congénita (N)	2	8	0,68
Valvulopatía (N)	14	12	0,58
Re-TC (N)	5	4	0,72
MIRE (N)	1	2	0,43
Exitus (%)	27,8	33,3	0,91

ECMO: Oxigenación por membrana extracorpórea; DAV: Dispositivo de asistencia ventricular; ATG: Anticuerpo anti timoglobulina; T: Tiempo; MIIS: Miocardiopatía isquémica; MIDI: Miocardiopatía dilatada; Re-TC: Retrasplante cardíaco; MIRE: Miocardiopatía restrictiva

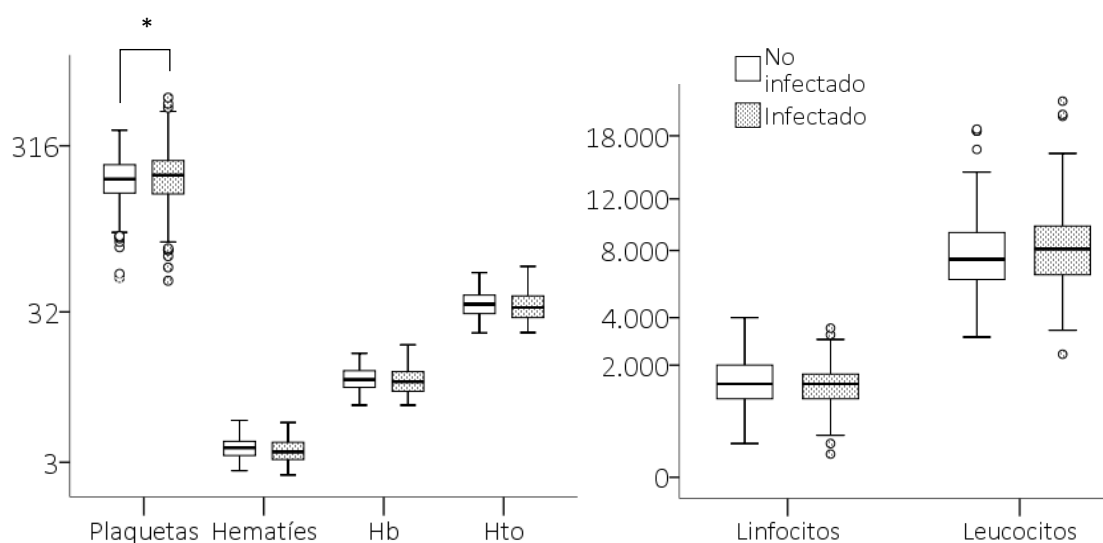
La distribución de los agentes infecciosos aislados por cultivo fue principalmente bacteriana (67%), seguida de la vírica (24%), principalmente CMV, y por último las causadas por hongos (10%).

- **Estudio del estado del paciente en el punto pretrasplante**

Para la evaluación del estado del paciente en el punto pretrasplante cardíaco realizamos una comparativa entre el grupo de pacientes que desarrollaron infección severa (N=104) versus aquellos que no tuvieron ninguna complicación infecciosa (N=113) con el objetivo de encontrar un marcador asociado a riesgo de desarrollo de infecciones.

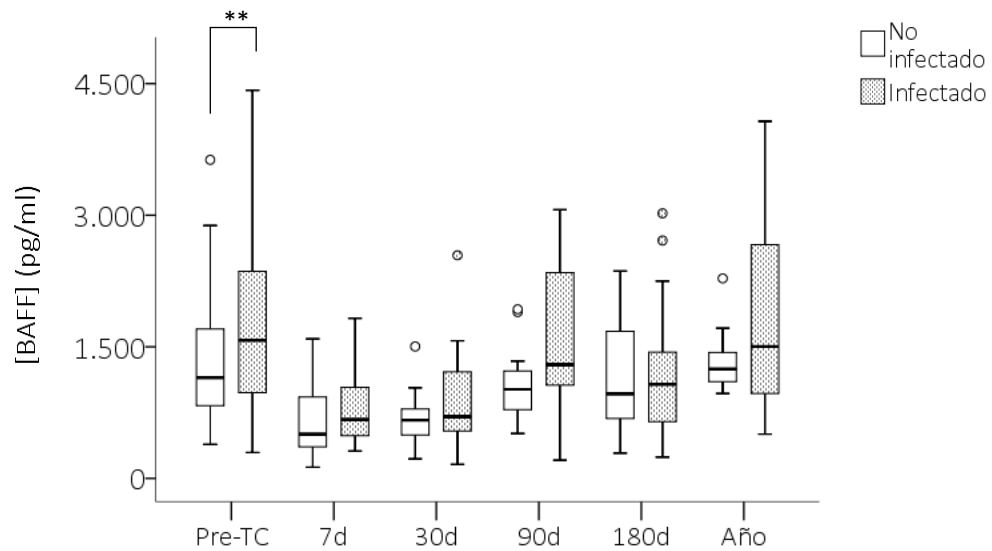
Los pacientes con infecciones presentaron valores superiores de plaquetas (I: $226,52 \pm 111,33 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. No I: $199,77 \pm 73,97 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; $p= 0,04$; Figura 52) y BAFF (I: $1768,42 \pm 1005,22 \text{ pg/ml}$ vs. No I: $1346,24 \pm 843,34 \text{ pg/ml}$; $p= 0,01$; Figura 53) frente a los no infectados. En cuanto a las poblaciones celulares, los pacientes con evento infeccioso mostraron un menor porcentaje de células B memoria CCI respecto a los no infectados (I: $39,69 \pm 20,20\%$ vs. No I: $54,98 \pm 22,93\%$; $p=0,00$; Figura 55).

Figura 52. Media de las variables hematológicas pretrasplante cardíaco en pacientes con infecciones versus no infectados durante el periodo de seguimiento de un año



Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$); Hb: Hemoglobina (g/dL); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

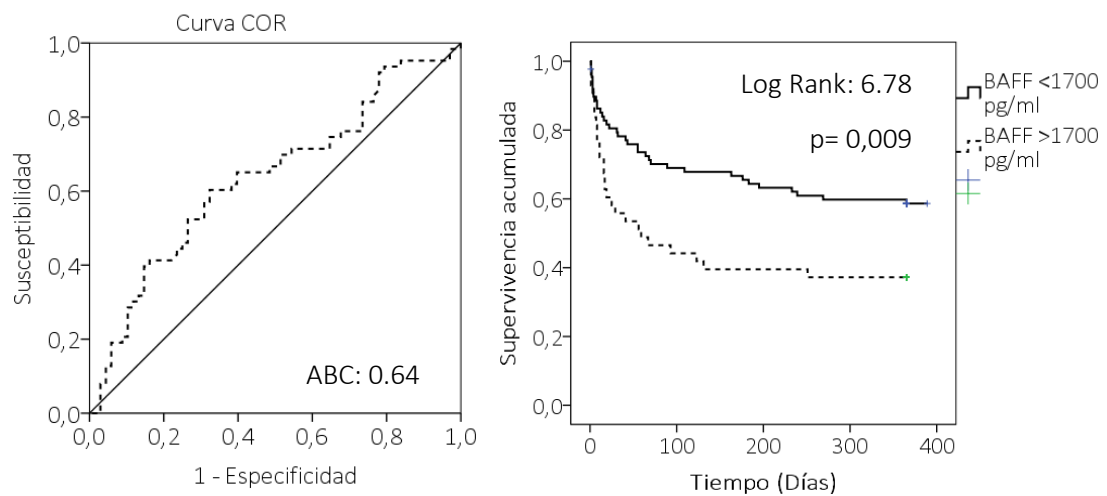
Figura 53. Media del factor activador de célula B en pacientes con infecciones versus no infectados durante todo el periodo de seguimiento (pg/ml)



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Al realizar curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80% de asociación entre los niveles de BAFF pretrasplante y la variable infección, 1700 pg/ml. Los pacientes con niveles de BAFF > 1700 pg/ml tuvieron un riesgo 2.44 ($p = 0,02$; IC 95%: 0,194- 0,869) veces mayor de desarrollo de infecciones (Figura).

Figura 54. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para niveles de factor activador de célula B pretrasplante cardíaco y asociación con riesgo de desarrollo de infección severa



ABC: Área bajo la curva. Especificidad: 80%. Punto de corte: 1700 pg/ml

Figura 55. Medias en porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias pretrasplante cardíaco en pacientes con desarrollo de infecciones versus no infectados

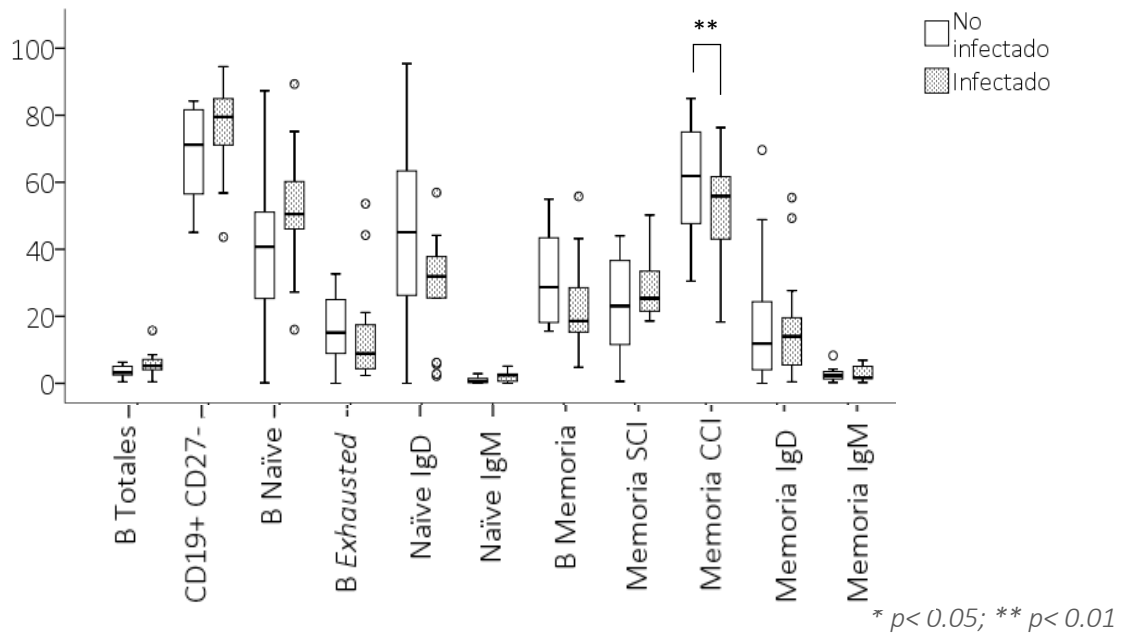


Figura 56. Medias de las subpoblaciones linfocitarias pretrasplante cardíaco en pacientes con desarrollo de infección versus no infectados. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)

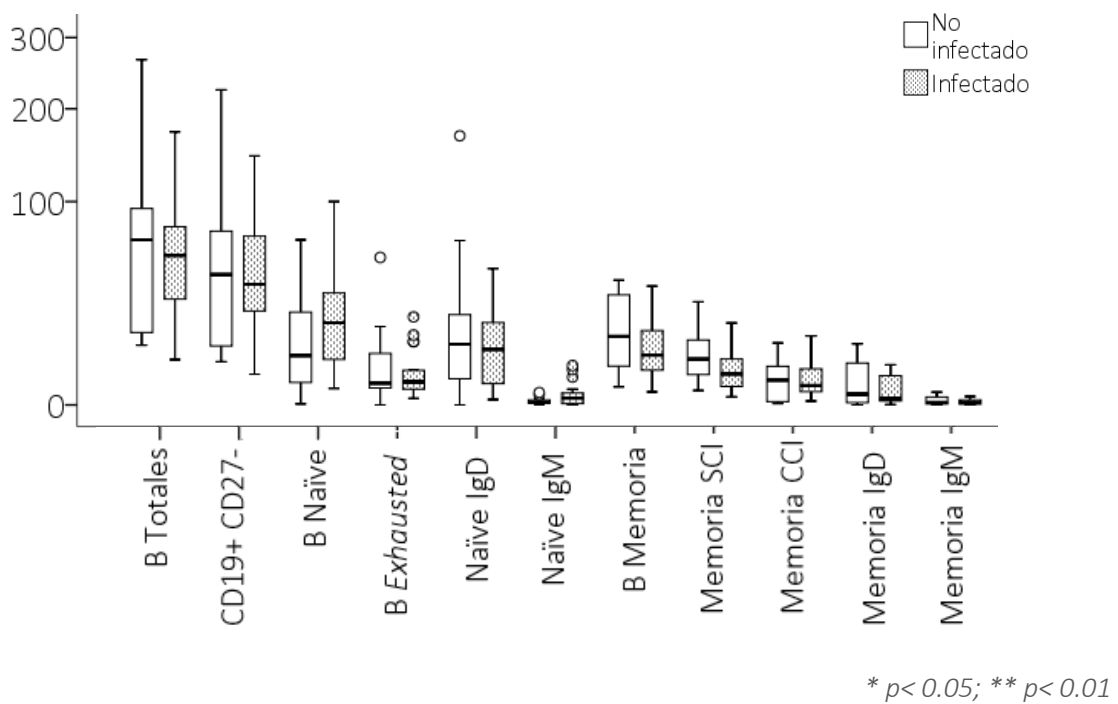
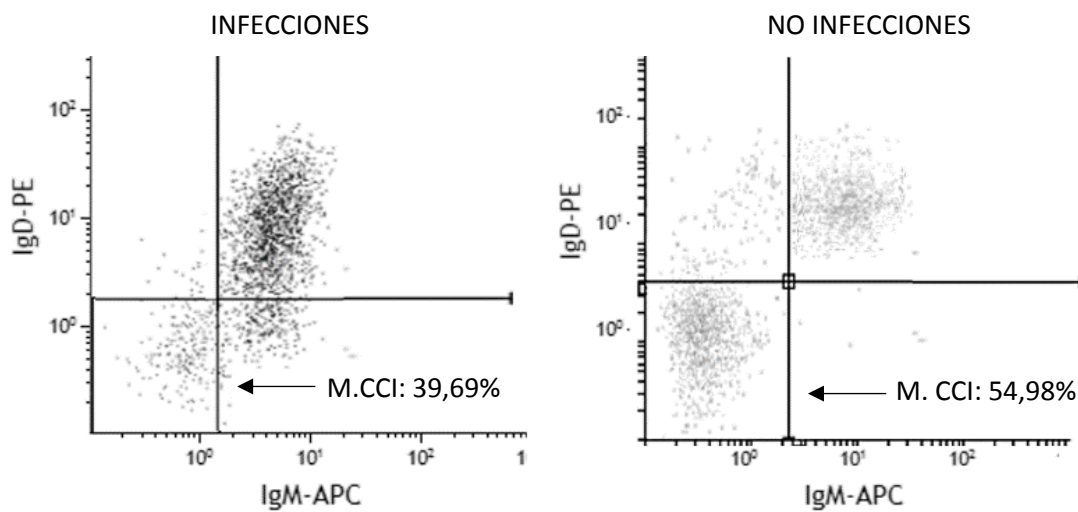


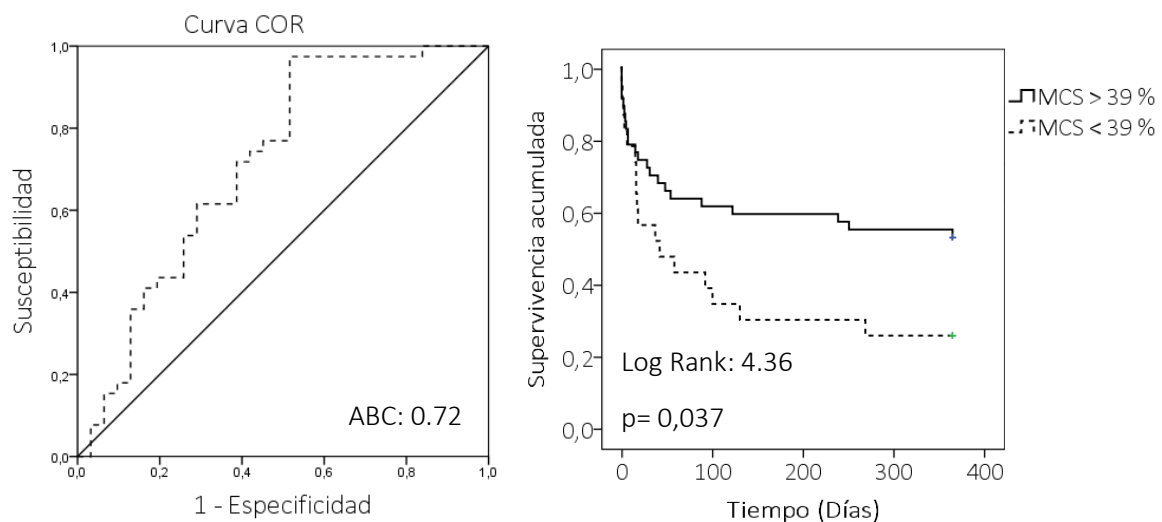
Figura 57. Diagrama Dot Plot de B memoria CCI en pacientes trasplantados cardíacos con episodios de infección versus no infectados durante el primer año de seguimiento postrasplante



M.CCI: Memoria B con cambio de isotipo

Al realizar curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80% de asociación entre el porcentaje de células B CCI y la variable infección, 39%. Los pacientes con niveles de linfocitos B memoria CCI < 39% tuvieron un riesgo 3,22 ($p=0,02$; IC 95%: 0,104- 0,926) veces mayor de desarrollo de infecciones (Figura).

Figura 58. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para desarrollo de infección severa según niveles de porcentaje de linfocitos B memoria CCI pretrasplante cardíaco



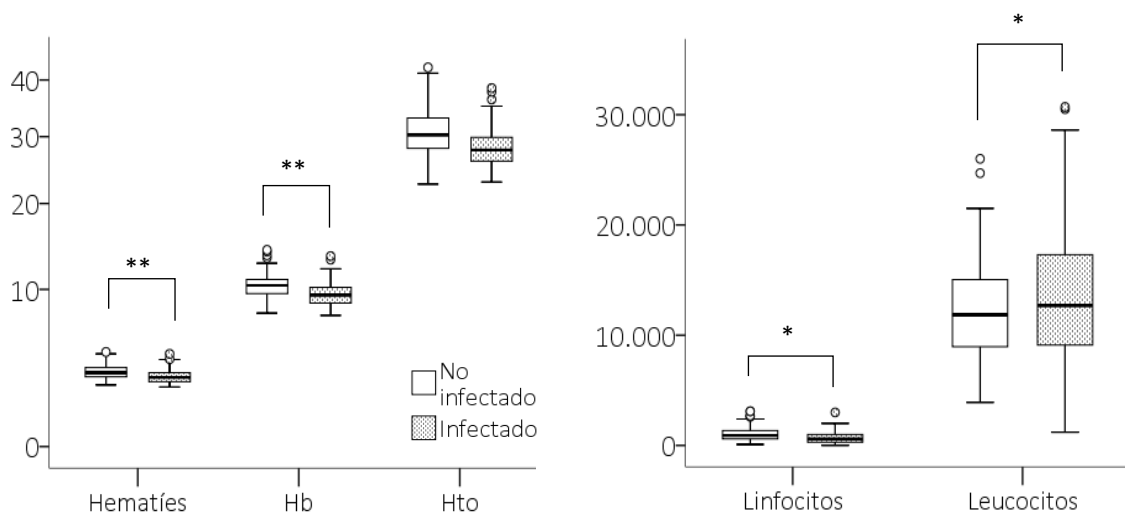
ABC: Área bajo la curva. Especificidad: 80%. Punto de corte: 39%

- **Estudio del paciente a la semana postrasplante cardíaco**

Se realizó un análisis prospectivo donde se seleccionaron dos grupos, aquellos que tuvieron complicación infecciosa después de la semana postrasplante (N= 69) y los que no tuvieron complicaciones infecciosas durante el periodo de seguimiento del año.

Los valores hematológicos del día 7 fueron menores en pacientes con infecciones comparados con los pacientes sin infección, llegando a ser significativos para hematíes (I: $3,18 \pm 0,43 *10^6/\mu\text{l}$ vs. NI: $3,44 \pm 0,44*10^6/\mu\text{l}$; $p=0,001$), hemoglobina (I: $9,73 \pm 1,15$ g/dl vs. NI: $10,45 \pm 1,26$ g/dl; $p=0,000$) y linfocitos (I: $840,34 \pm 514,13*10^3/\mu\text{l}$ vs. NI: $1099,68 \pm 759,90*10^3/\mu\text{l}$; $p=0,019$). Los valores de leucocitos se mostraron elevados al ser comparados con los pacientes no infectados (I: $13897,61 \pm 6669,89 *10^3/\mu\text{l}$ vs. NI: $12074,30 \pm 4264,79*10^3/\mu\text{l}$; $p=0,048$), (Figura 59).

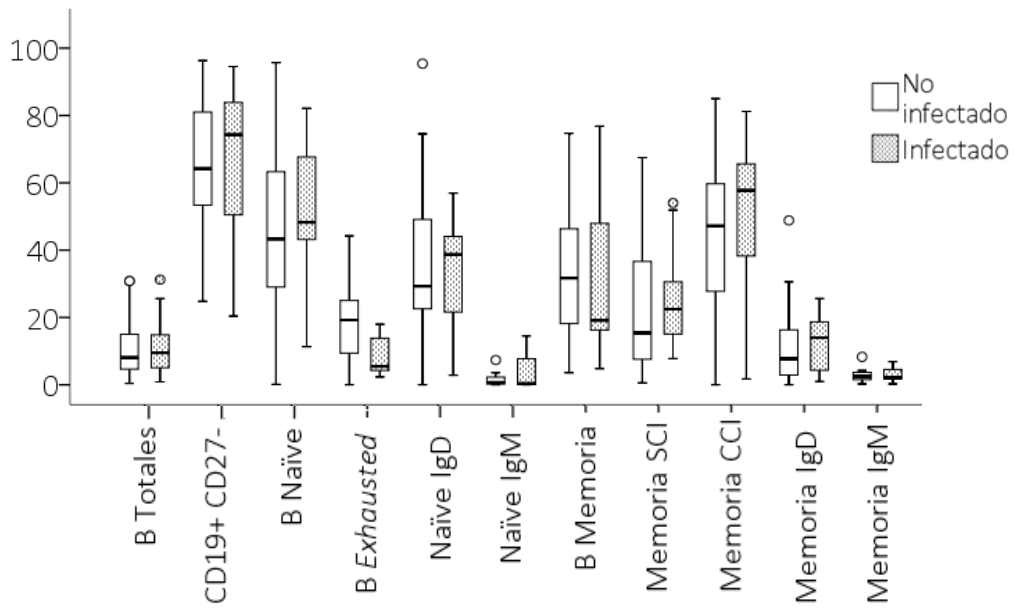
Figura 59. Media de las variables hematológicas a la semana postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones posteriores a la semana versus no infectados



Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$); Hematíes ($10^6/\mu\text{l}$); Hb: Hemoglobina (g/dl); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{l}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$

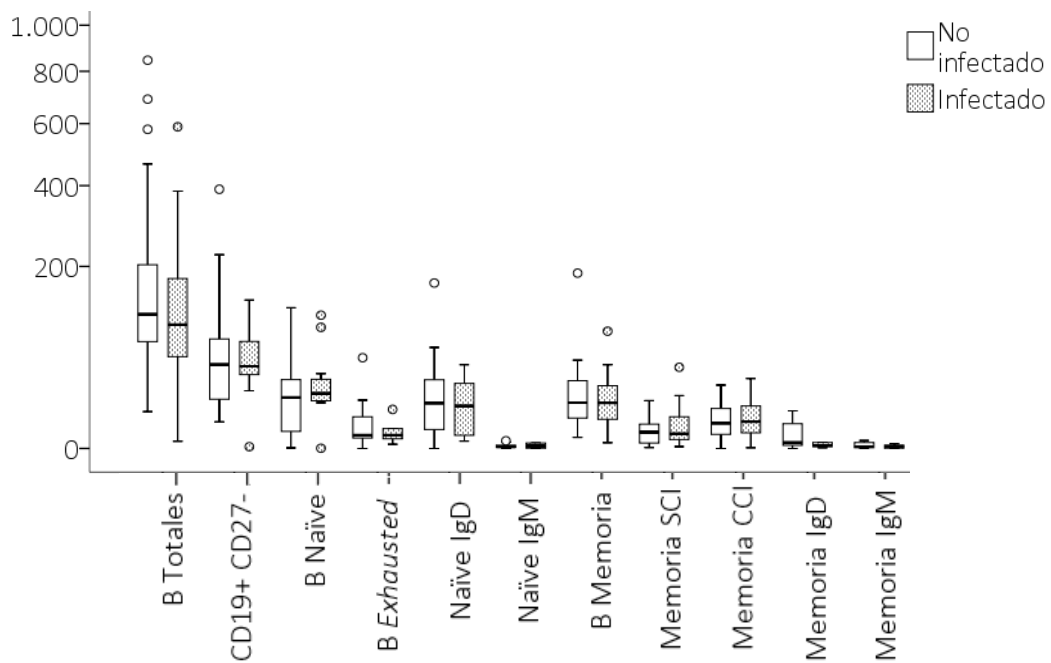
Respecto a las poblaciones linfocitarias no se observaron diferencias significativas en ninguna de ellas, ni en frecuencias ni en valores absolutos (Figuras 60 y 61).

Figura 60. Diferencias en los porcentajes de las subpoblaciones B a la semana postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones posteriores a la semana versus no infectados en todo el periodo de seguimiento



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 61. Diferencias de las subpoblaciones B a la semana postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones posteriores a la semana versus no infectados en todo el periodo de seguimiento. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

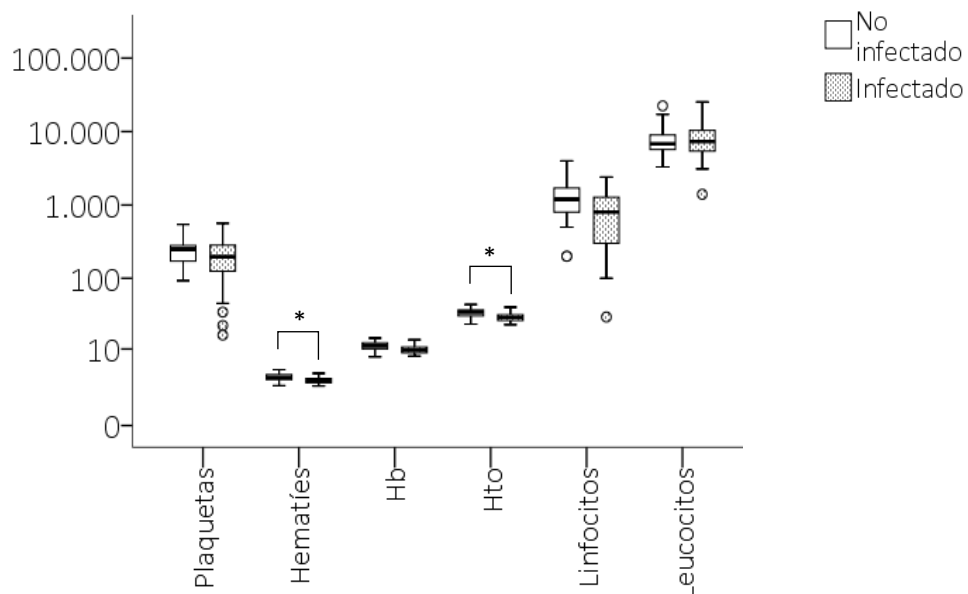
- **Estudio del paciente al mes postrasplante cardíaco**

Para buscar marcadores predictivos de infección en el punto 30d, se escogió a un grupo de pacientes que desarrollaron infecciones pasado el primer mes postrasplante (N=43) versus pacientes que no tuvieron ningún episodio infeccioso (N=80).

El grupo de pacientes con infección presentó cifras significativamente inferiores de hematíes (I: $3,38 \pm 0,45 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ vs. NI: $3,57 \pm 0,50 \cdot 10^6/\mu\text{l}$; $p= 0,048$) y hematocrito (I: $31,42 \pm 4,01\%$ vs. NI: $33,36 \pm 4,51\%$; $p= 0,029$) comparado con el grupo de no infectados (Figura 62).

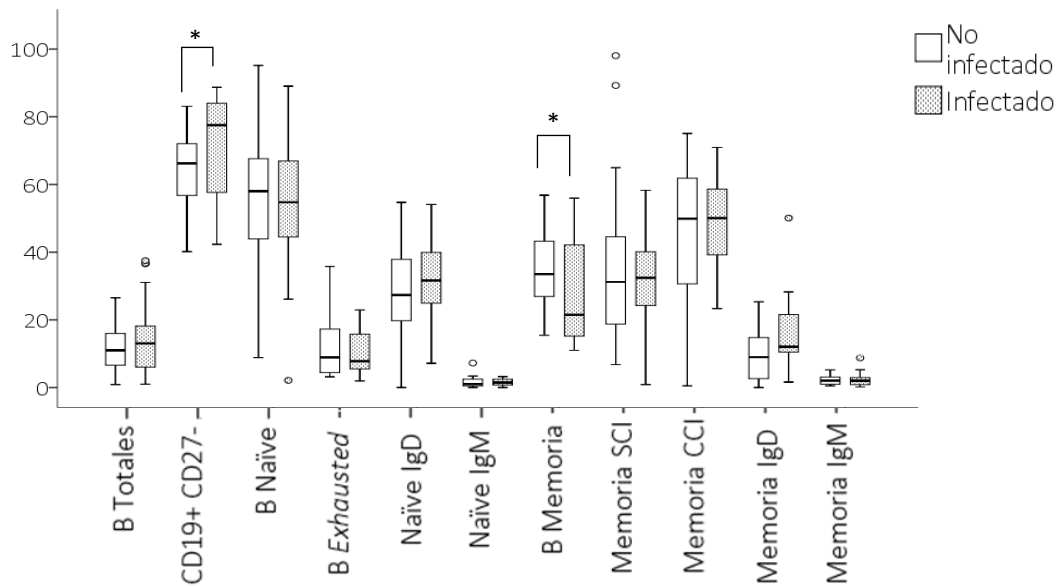
Respecto a las subpoblaciones linfocitarias, el grupo infectados obtuvo mayores frecuencias relativas de CD19⁺CD27⁻ (I: $75,65 \pm 13,33\%$ vs. NI: $63,86 \pm 11,40\%$; $p= 0,014$) y menores de B memoria (I: $23,50 \pm 13,48\%$ vs. NI: $35,29 \pm 11,43\%$; $p= 0,014$) (Figura 63).

Figura 62. Media de las variables hematológicas al mes postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones posteriores al mes frente a pacientes sin infección



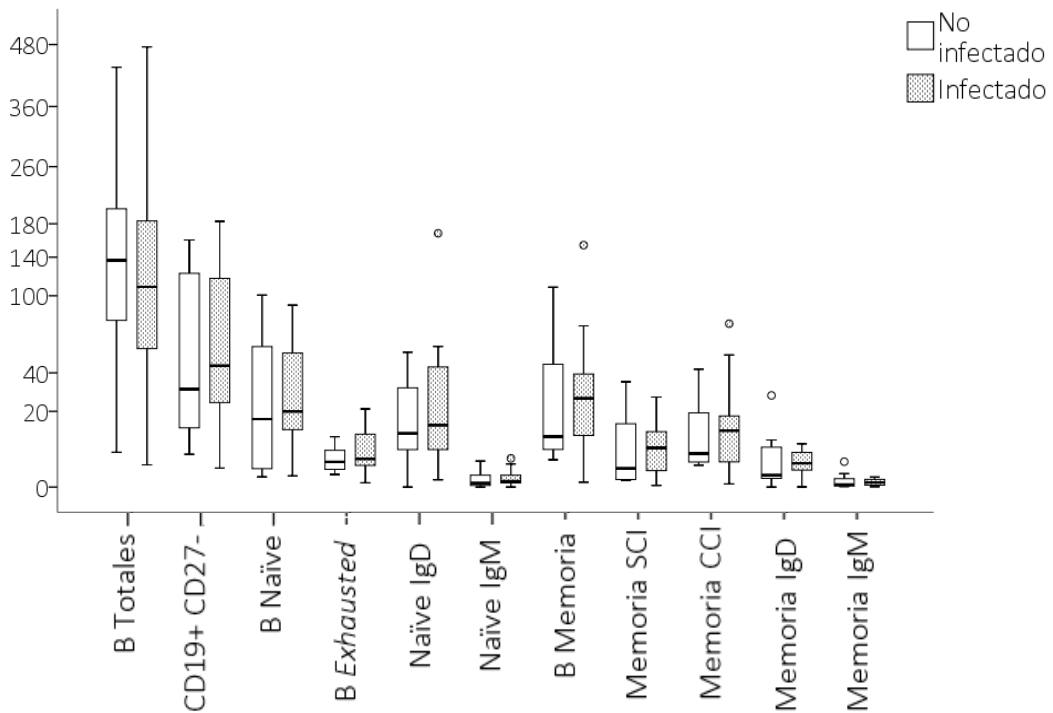
Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$); Hematíes ($10^6/\mu\text{l}$); Hb: Hemoglobina (g/dl); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{l}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Figura 63. Diferencias en los porcentajes de las subpoblaciones B al mes postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones posteriores a la semana versus no infectados en todo el periodo de seguimiento



*p<0,05; **p<0,01

Figura 64. Diferencias de las subpoblaciones B al mes postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones posteriores a la semana versus no infectados en todo el periodo de seguimiento. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)

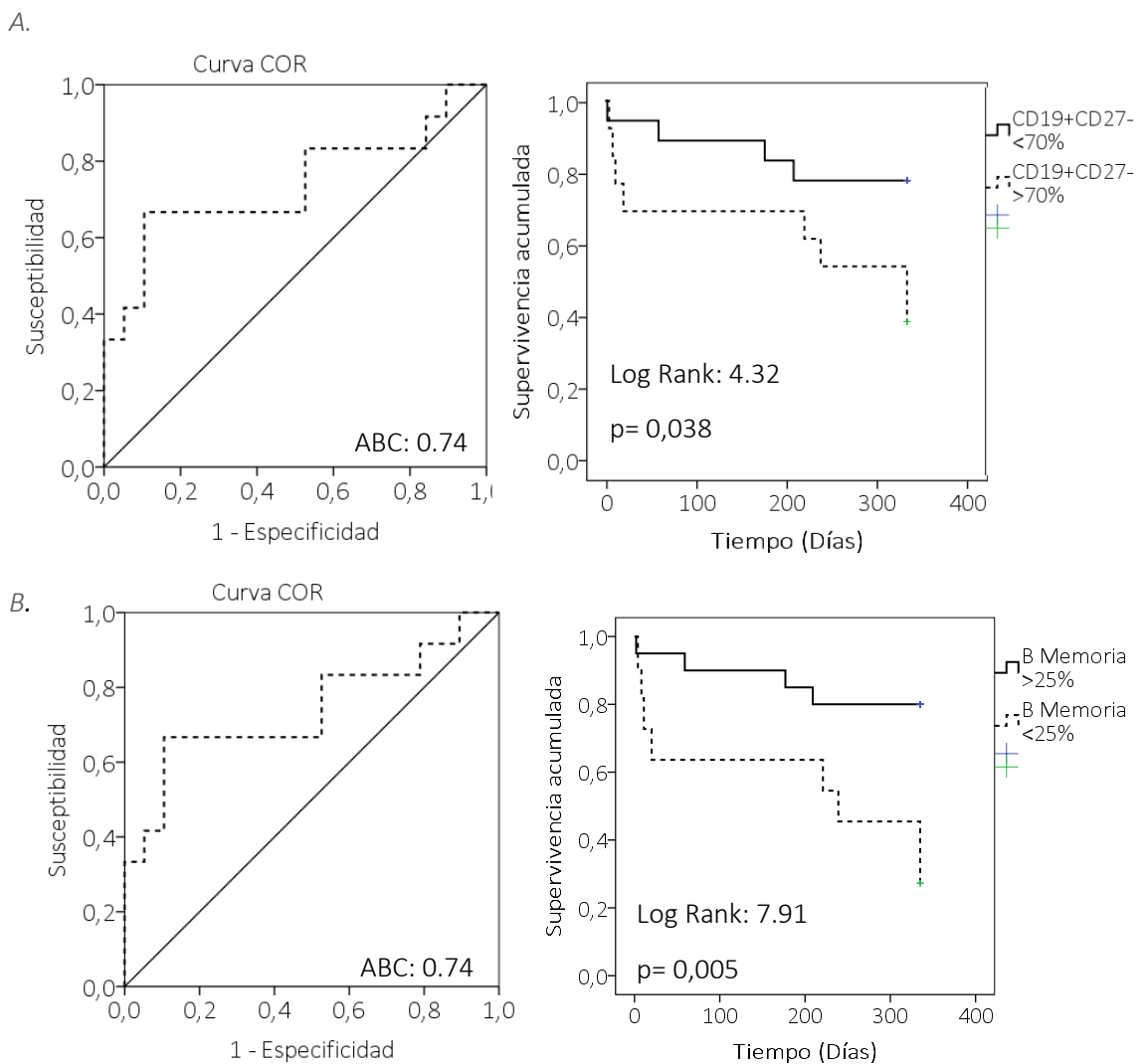


*p<0,05; **p<0,01

Al realizar curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80%, de asociación entre el porcentaje de células B CD19⁺ CD27⁻ y la variable infección en 70% y en 25% para las B memoria.

Los pacientes con niveles de linfocitos B CD19⁺ CD27⁻ > 70% tuvieron un riesgo 5,60 (p= 0,032; IC 95%: 1,158- 27,06) veces mayor de desarrollo de infecciones. Los pacientes con niveles de linfocitos B memoria < 25% tuvieron un riesgo 10,67 (p= 0,007; IC 95%: 1,91- 59,62) veces mayor de desarrollo de infecciones (Figura 65).

Figura 65. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para evaluación del riesgo de desarrollo de infección según porcentaje de linfocitos B CD19⁺ CD27⁻ (A) y B memoria (B) al mes postrasplante cardíaco

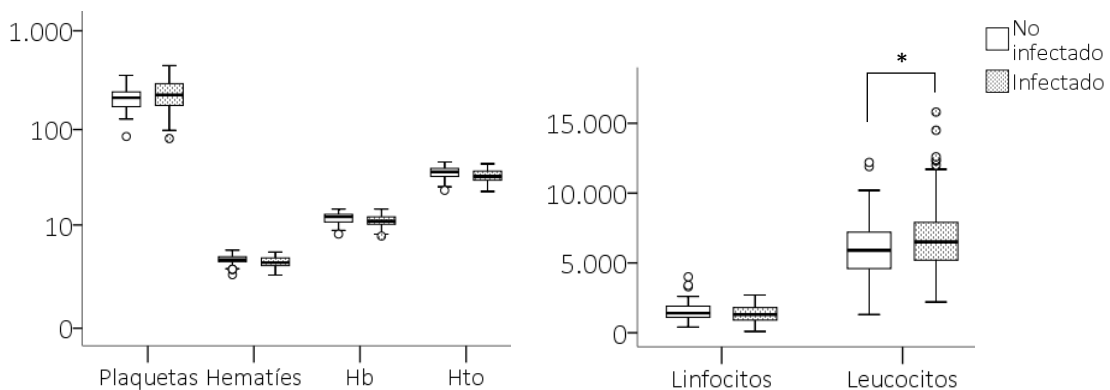


ABC: Área bajo la curva. Especificidad: 80%.

- **Estudio del paciente a los tres meses postrasplante cardíaco**

El grupo de pacientes con aparición de evento infeccioso pasado el tiempo 90d postrasplante (N=22) fue comparado con aquellos pacientes que no desarrollaron infecciones en todo el periodo de seguimiento (N=73). Los pacientes con infecciones mostraron niveles significativamente elevados de leucocitos (I: 7419,05 ± 3610,07 *10³/μl vs. NI: 6041,18 ± 2000,09*10³/μl; p= 0,028) comparados con aquellos no infectados (figura 66). El resto de variables no mostró variaciones significativas.

Figura 66. Media de las variables hematológicas a los tres meses postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones pasado este tiempo versus pacientes sin infección



Plaquetas (10³/μl); Hematíes (10⁶/μl); Hb: Hemoglobina (g/dl); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos (10³/μl); Leucocitos (10³/μl). *p<0,05; **p<0,01.

Figura 67. Medias de los porcentajes de subpoblaciones linfocitarias B a los tres meses postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones pasado este periodo versus no infectados.

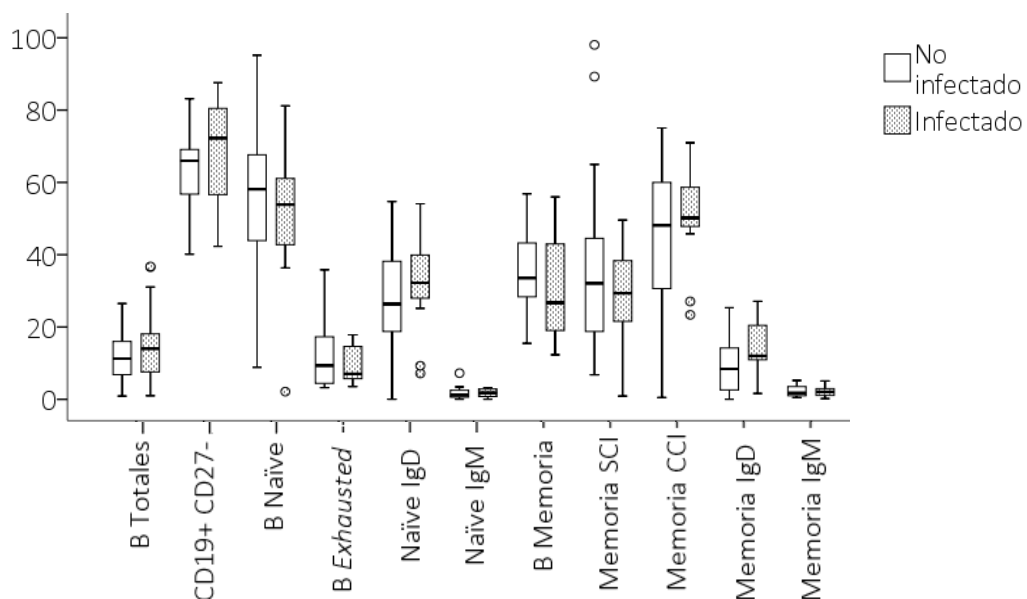
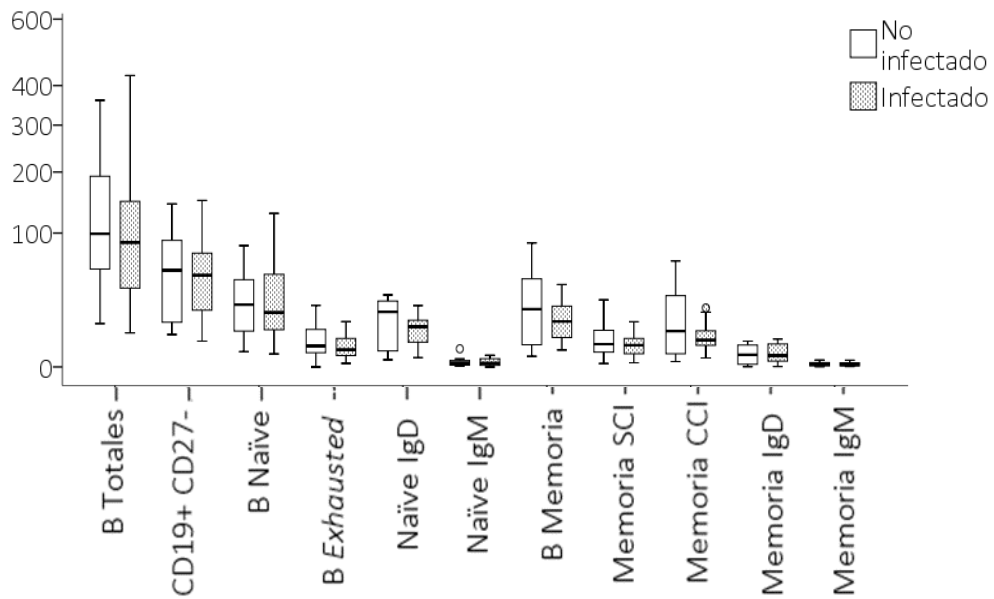


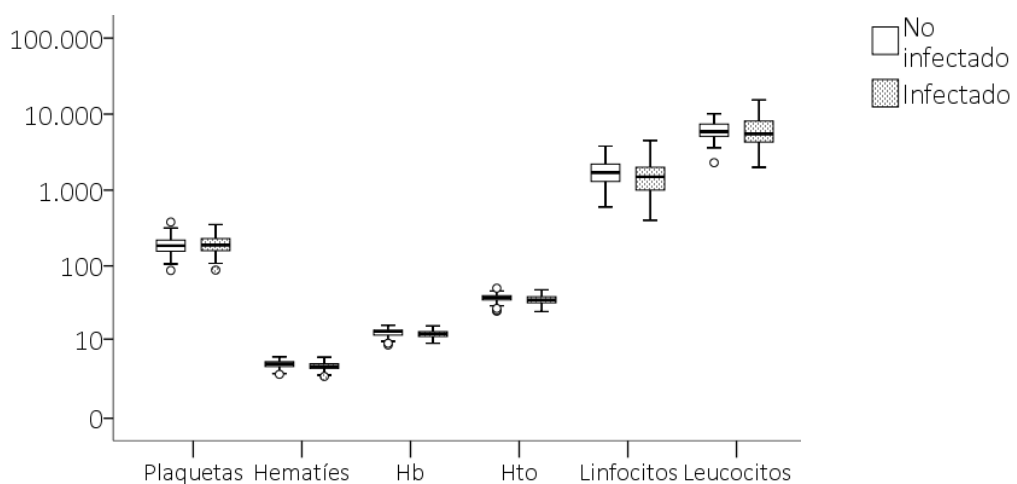
Figura 68. Medias de subpoblaciones linfocitarias B a los tres meses postrasplante cardíaco en pacientes con infecciones pasado este periodo versus no infectados. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)



• **Estudio del paciente a los seis meses postrasplante cardíaco**

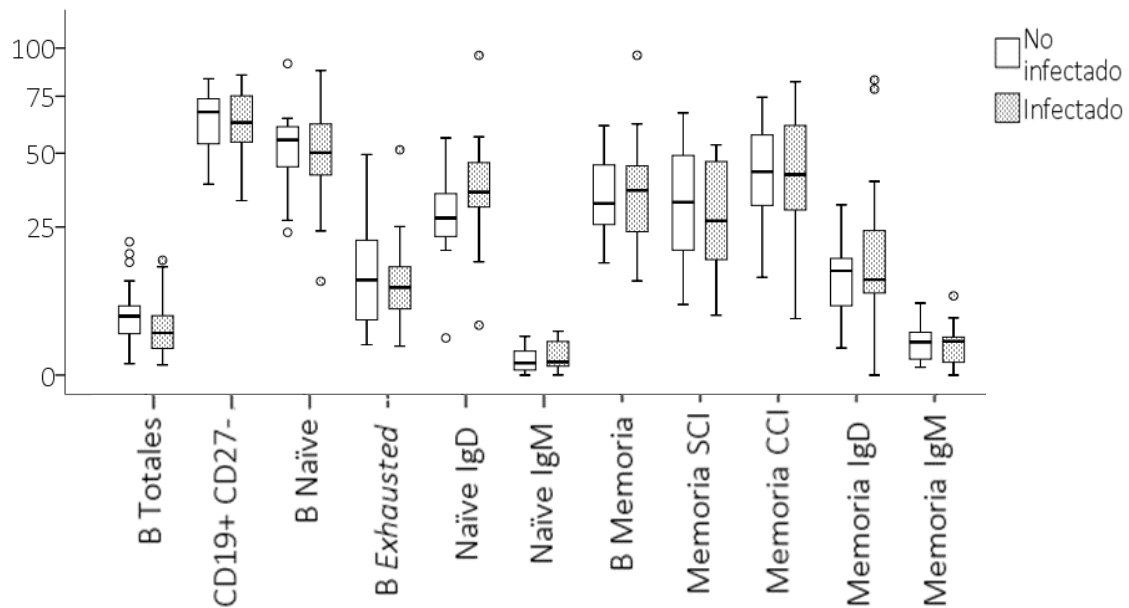
Los pacientes que desarrollaron infección pasados los seis meses postrasplante (N=12) fueron comparados con aquellos que no presentaron ningún evento infeccioso a lo largo del año de seguimiento (N=64). No se observan diferencias significativas el resto de las variables estudiadas.

Figura 69. Media de las variables hematológicas a los seis meses postrasplante en pacientes con infecciones posteriores a este periodo y pacientes no infectados



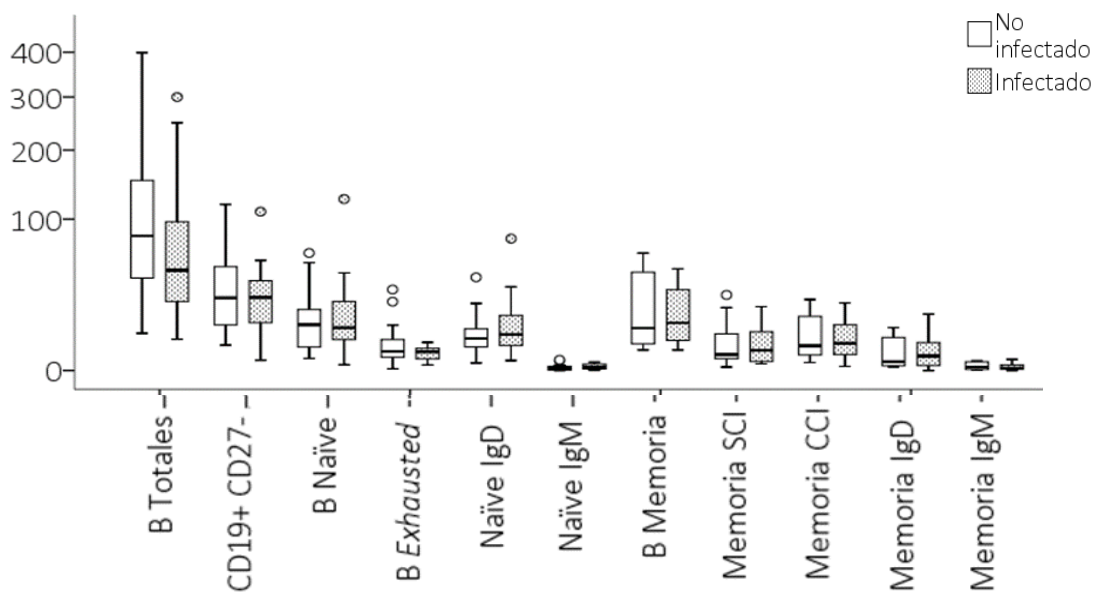
Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$); Hematíes ($10^6/\mu\text{l}$); Hb: Hemoglobina (g/dl); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{l}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 70. Medias del porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias B a los seis meses postrasplante cardíaco entre pacientes con infecciones posteriores a ese tiempo versus no infectados



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 71. Medias de las subpoblaciones linfocitarias a los seis meses postrasplante cardíaco entre pacientes con infecciones posteriores a ese tiempo versus pacientes no infectados. Números absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5.2. ALTERACIONES EN TRASPLANTE PULMONAR ASOCIADAS A INFECCIÓN

Durante el periodo de seguimiento de seis meses tras el trasplante pulmonar, un total de 41 pacientes, un 50.0%, desarrollaron algún tipo de infección que requirió tratamiento antibiótico intravenoso (tabla 47). La media de aparición del evento infeccioso fue de 53,11 días postrasplante. Durante el seguimiento el 22% de los pacientes trasplantados desarrolló infecciones recurrentes definidas como dos o más episodios.

Tabla 47. Datos demográficos y clínicos de pacientes trasplantados pulmonares con o sin infecciones durante los primeros seis meses postrasplante

Variable	Infección (N=41)	No infección (N=41)	p
Edad, media (rango)	54,28 (16-67)	51,64 (20-69)	0,78
Sexo (Hombre/ mujer) (%)	68/42	82/18	0,26
Tx Urgente (%)	7,8	11,1	0,69
Tipo Tx (Uni/Bilateral) (%)	37/63	29/71	0,60
Duración del Tx (h)	9,3	6,6	0,49
Ventilación mecánica (%)	7,3	7,1	0,79
Tiempo en UCI (Días)	34,83	22,27	0,60
Tiempo Intubado (Días)	16,39	9,90	0,32
EPOC (N)	16	11	0,75
Fibrosis (N)	16	22	0,07
Déficit α - tripsina (N)	2	2	0,82
Sarcoidosis (N)	2	1	-
HT Pulmonar (N)	1	1	-
Exitus (%)	31,4	22	0,39

Tx: Trasplante; CEC: Circulación extracorpórea; UCI: Unidad de cuidados intensivos; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HT: Hipertensión

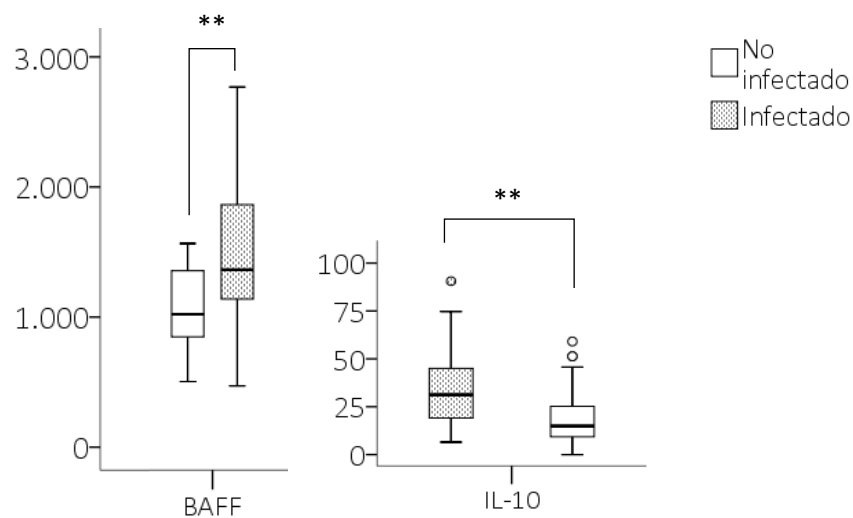
Durante los seis meses postrasplante la mayoría de infecciones fueron de tipo bacteriano (67,35%), seguidas de las causadas por hongos (20,41%), y luego las víricas (10,20%), teniendo en el 82% de los casos el CMV con agente causante.

- **Estudio del paciente en el pretrasplante pulmonar**

Para la evaluación del estado del paciente en el punto pre- TP realizamos una comparativa entre el grupo de pacientes que desarrollaron infección severa (N=41) versus aquellos que no tuvieron ninguna complicación infecciosa (N=41) con el objetivo de encontrar un marcador asociado a riesgo de desarrollo de infecciones.

Los pacientes con infecciones presentaron valores significativamente elevados de IL-10 (I: $43,26 \pm 39,55$ pg/ml vs. NI: $21,70 \pm 23,34$ pg/ml; $p=0,00$) respecto a los pacientes sin infección (figura 72). El resto de variables no mostró diferencias significativas. La asociación de BAFF pretrasplante con desarrollo de infecciones se ha descrito en un trabajo previo¹²⁸.

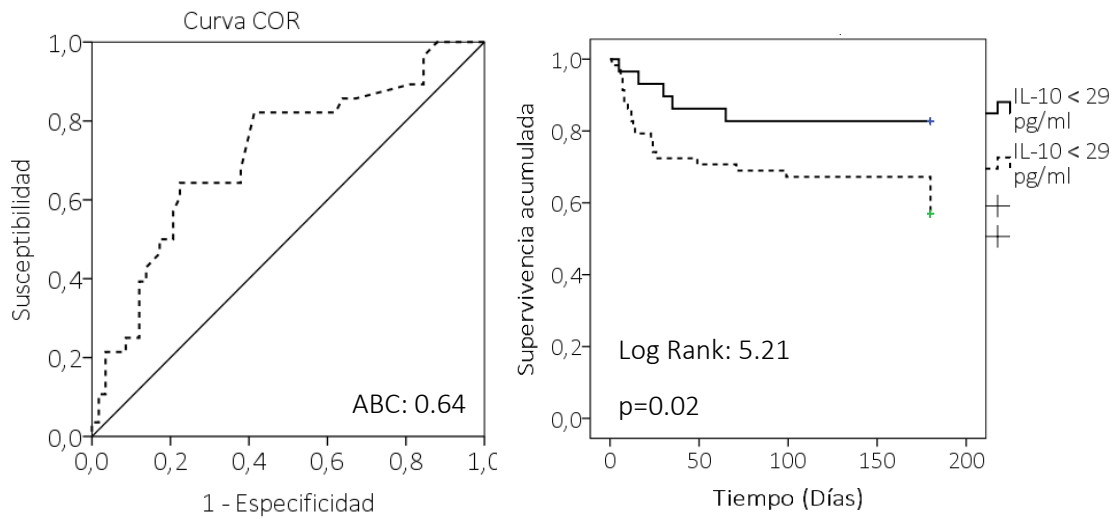
Figura 72. Media del factor activador de célula B e interleucina 10 pretrasplante pulmonar en pacientes con infecciones versus no infectados



Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); Interleucina 10 (IL-10, pg/ml); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Para IL-10 pretrasplante, mediante curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80%, de asociación entre los niveles de IL-10 pretrasplante y la variable infección en 29 pg/ml. Los pacientes con niveles de IL-10 > 29 pg/ml tuvieron un riesgo 3,64 ($p = 0,021$; IC 95%: 1,28- 10,87) veces mayor de desarrollo de infecciones (Figura 73).

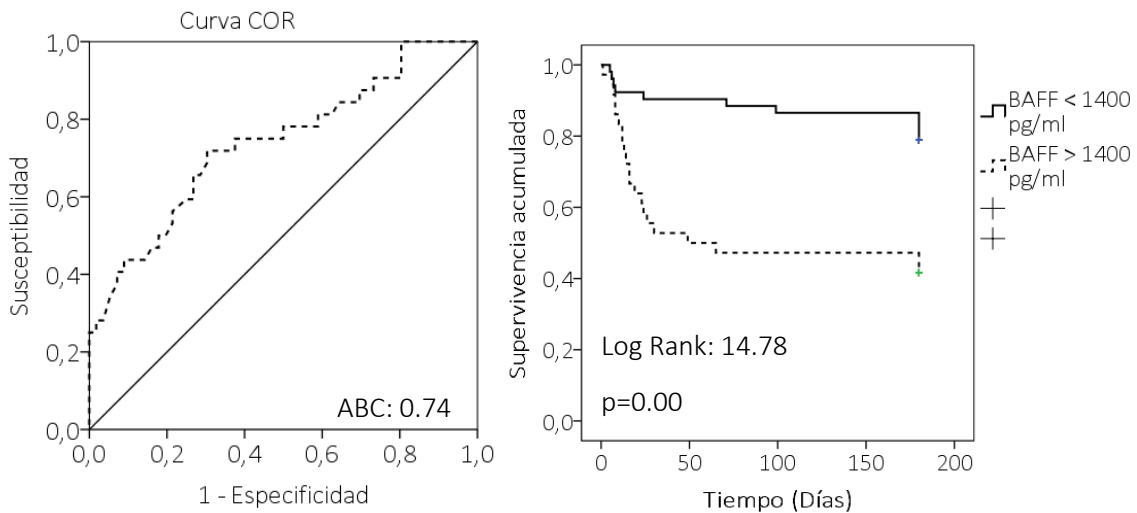
Figura 73. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para cálculo del riesgo de desarrollo de infección severa según niveles interleucina 10 en pretrasplante pulmonar



ABC: Área bajo la curva. Especificidad del 80%. Punto de corte: 29 pg/ml

Al realizar curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80%, de asociación entre los niveles de BAFF pretrasplante y la variable infección recurrente en 1400 pg/ml. Los pacientes con niveles de BAFF > 1400 pg/ml tuvieron un riesgo 4,84 (p= 0,018; IC 95%: 1,31- 17,89) veces mayor de desarrollo de infecciones recurrentes (Figura 74).

Figura 74. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para cálculo del riesgo de desarrollo de infección severa según niveles del factor activador de célula B pretrasplante pulmonar



ABC: Área bajo la curva. Especificidad del 50%. Punto de corte: 1400 pg/ml.

- **Estudio del paciente a la semana postrasplante pulmonar**

El grupo de pacientes con aparición de evento infeccioso pasada la semana postrasplante (N=26) se comparó con aquellos pacientes que no desarrollaron infecciones en todo el periodo de seguimiento (N=56).

Las variaciones entre grupos no fueron significativas en ninguno de los marcadores estudiados.

- **Estudio del paciente al mes postrasplante pulmonar**

El grupo de pacientes con aparición de evento infeccioso posterior al mes postrasplante (N=15) fue comparado con aquellos pacientes que no desarrollaron infecciones en el periodo de seguimiento de seis meses (N=67).

5.3. ALTERACIONES EN TRASPLANTE RENAL ASOCIADAS A INFECCIÓN

Durante el seguimiento, 51 pacientes requirieron tratamiento antimicrobiano intravenoso específico. Las características demográficas se muestran en la tabla 48.

Tabla 48. Datos demográficos y clínicos de pacientes trasplantados renales con o sin infecciones durante los primeros seis meses postrasplante

Variable	Infección (N=48)	No infección (N=49)	P
Edad, media (rango)	55,37 (20-81)	53,77 (25-79)	0,63
Sexo (Hombre/ mujer) (%)	44,6/20,3	52,5/27,9	0,72
Pretrasplante previo (%)	16,2	3,3	0,01
Inmunoterapia pre_TR (%)	13,5	3,3	0,02
Basiliximab	50	47,5	0,43
ATG	14,9	9,8	0,35
Terapia Pretrasplante (%)			
Hemodiálisis	60,8	70,5	0,64
Diálisis peritoneal	13,5	18,0	0,69
Infección pretrasplante (%)	13,5	8,9	0,25
Bacteriana (%)	9,5	6,7	0,25
Viral (%)	4,0	2,2	0,08
Tiempo isquemia (h)	9,8	10,9	0,46
Glomerulonefritis (N)	6	10	0,24
Nefropatía diabética (N)	6	13	0,06
Hipertensión (N)	8	1	0,09
Policistosis (N)	9	4	0,17
Nefropatía crónica intersticial(N)	6	5	0,55
Otros (N)	13	16	0,66

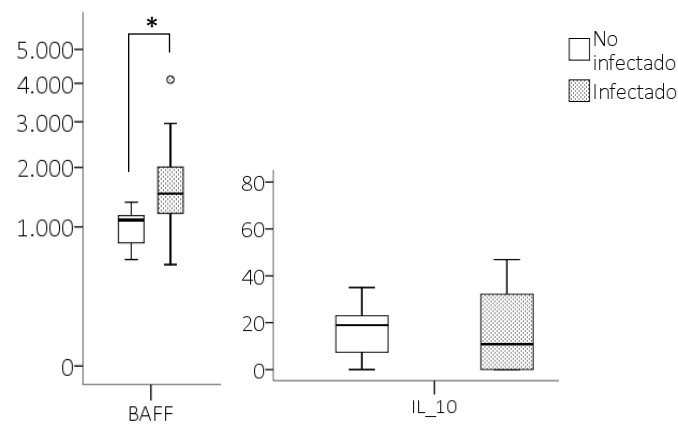
Pre_TR: Pretrasplante renal; ATG: Anticuerpo anti timoglobulina

Los microorganismos causantes de los casos de infección fueron en un 54,5% bacterias, un 25,7% virus, siendo por CMV en un 55,9%, y un 19,5 % por hongos.

- **Estudio del paciente en el pretrasplante renal**

Los pacientes que requirieron terapia específica por infección severa (N=48) tuvieron niveles superiores de BAFF en el estudio pretrasplante (I: 1768,24 ± 1270,03 pg/ml vs. NI: 1114,73 ± 246,33 pg/ml; p=0,03) respecto a los no infectados (N=49), (figura 75).

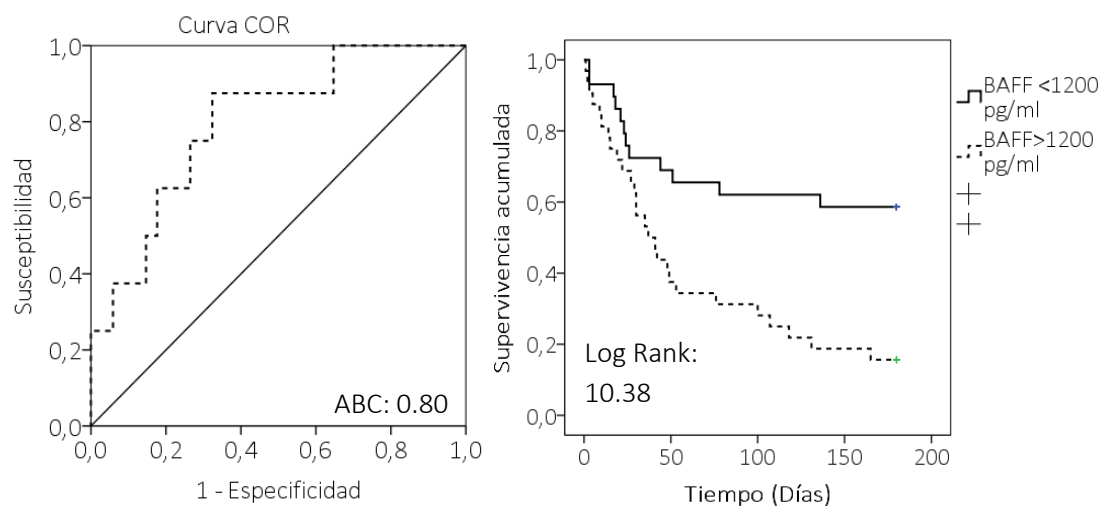
Figura 75. Media del factor activador de célula B e interleucina 10 pretrasplante renal en pacientes con infecciones versus no infectados



Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); Interleucina- 10 (IL-10, pg/mL); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Mediante curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80%, de asociación entre los niveles de BAFF pretrasplante y riesgo de desarrollo de infecciones en 1200 pg/ml. Los pacientes con niveles de BAFF > 1200 pg/ml tuvieron un riesgo 7,65 ($p = 0,01$; IC 95%: 2,29- 25,58) veces mayor de desarrollo de infecciones tras el trasplante (Figura 76).

Figura 76. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para cálculo del riesgo de desarrollo de infección severa postrasplante renal según niveles pretrasplante de factor activador de célula B



ABC: Área bajo la curva. Especificidad del 80%. Punto de corte: 1200 pg/ml

- **Estudio del paciente a la semana postrasplante renal**

El grupo de pacientes que presentaron infecciones posteriores al punto 7d (N=42) se comparó con los que no tuvieron complicaciones por infección (N=49). Ninguna de las variables de estudio mostró diferencias significativas.

- **Estudio del paciente al mes postrasplante renal**

De los pacientes trasplantados renales, un total de 22 desarrollaron infecciones a partir del mes postrasplante, frente a los 49 que no.

Sus variables al mes no mostraron ninguna variación Inter grupos significativa.

6. ALTERACIONES EN TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO ASOCIADAS CON LA APARICIÓN DE EPISODIOS DE RECHAZO

6.1. ALTERACIONES EN TRASPLANTE CARDÍACO ASOCIADAS A RECHAZO

Durante el periodo de seguimiento, 48 pacientes (21,4%) desarrollaron algún episodio de rechazo que requirió intervención y el uso de tratamiento específico. La media de aparición del evento fue de 32,56 días postrasplante (tabla 49).

Tabla 49. Datos demográficos y clínicos de pacientes trasplantados cardíacos con o sin episodios de rechazo durante el primer año postrasplante

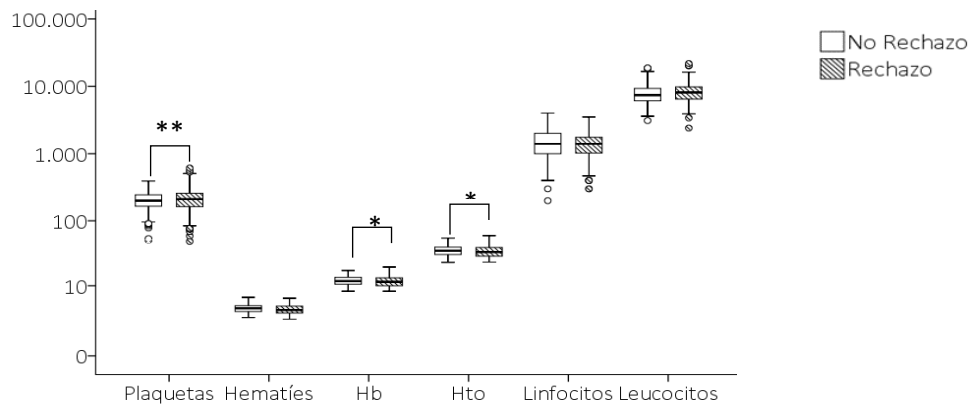
Variable	Rechazo (N=43)	No rechazo (N=174)	P
Edad, media (rango)	54,04 (22-69)	58,00 (20-73)	0,72
Sexo (Hombre/ mujer) (N)	32/11	128/46	0,90
Balón (%)	8,5	19,9	0,00
ECMO (%)	1,7	0,6	0,03
DAV (%)	6,8	16,7	0,02
Ventilación mecánica (%)	11,9	16,8	0,80
T CEC (min±DT)	146,14 ± 45,05	163,84 ± 80,21	0,21
Tiempo Isquemia (min±DT)	231,92 ± 68,27	221,50 ± 70,87	0,48
MIIS/Coronariopatía (N)	16	60	0,10
MIDI (N)	19	64	0,11
MIHT (N)	1	8	0,07
Congénita (N)	1	9	0,00
Valvulopatía (N)	3	22	0,00
Re-TC (N)	2	6	0,20
MIRE (N)	1	2	0,99
Depósito C3d	17,9	5,0	0,13
Depósito C4d	69,2	66,7	0,91
Exitus (%)	22,0	33,5	0,99

ECMO: Oxigenación por membrana extracorpórea; DAV: Dispositivo de asistencia ventricular; T: Tiempo; MIIS: Miocardiopatía isquémica; MIDI: Miocardiopatía dilatada; MIHT: Miocardiopatía hipertrófica; Re-TC: Retrasplante cardíaco; MIRE: Miocardiopatía restrictiva.

• **Estudio del paciente en el pretrasplante cardíaco**

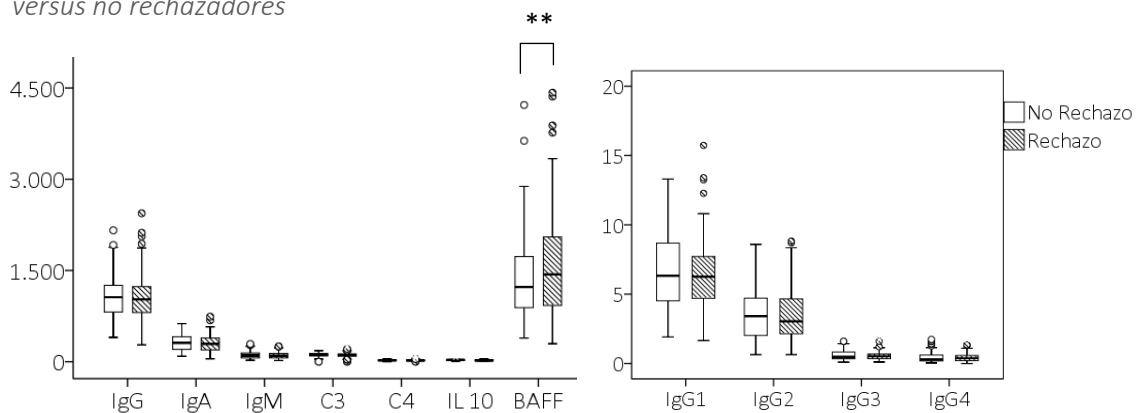
Los pacientes que sufrieron episodios de rechazo durante el seguimiento del año (N=43) mostraron durante el estudio pretrasplante niveles significativamente superiores de plaquetas (R: $245,88 \pm 102,36 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. NR: $204,28 \pm 90,96 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; $p= 0,01$), hemoglobina (R: $12,52 \pm 2,38 \text{ g/dl}$ vs. NR: $11,69 \pm 2,15 \text{ g/dl}$; $p= 0,03$), hematocrito (R: $37,22 \pm 7,49\%$ vs. NR: $34,73 \pm 6,59\%$; $p= 0,04$) y BAFF (R: $2068,43 \pm 1134,33 \text{ pg/ml}$ vs. NR: $1432,82 \pm 861,19 \text{ pg/ml}$; $p= 0,00$), (figuras 77 y 78). No se observaron diferencias en las subpoblaciones linfocitarias.

Figura 77. Media de las variables hematológicas pretrasplante cardíaco en pacientes con rechazo versus no rechazadores



Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); Hematías ($10^6/\mu\text{L}$); Hb: Hemoglobina (g/dL); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

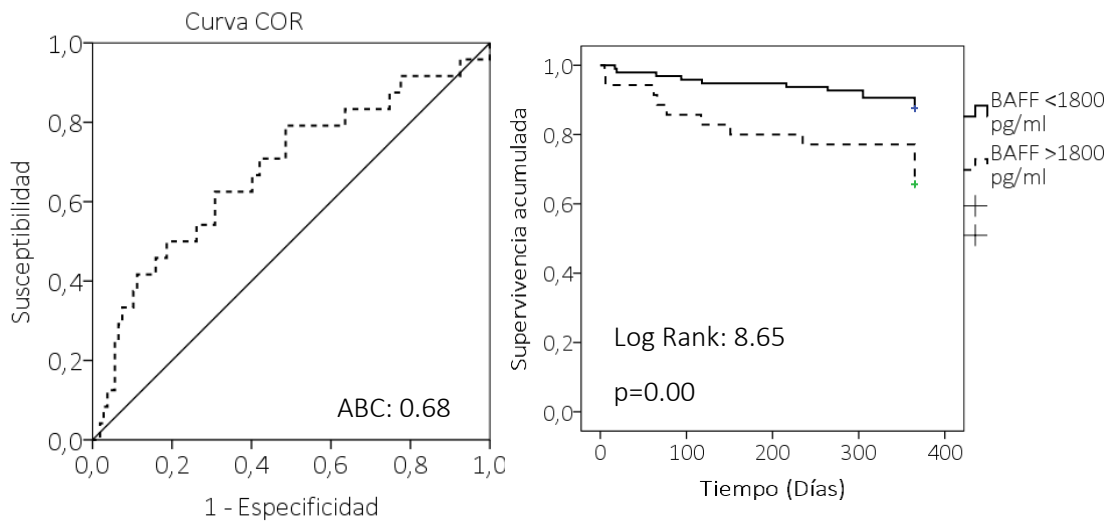
Figura 78. Media de las variables inmunológicas pretrasplante cardíaco en pacientes con rechazo versus no rechazadores



Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (g/L); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); Interleucina 10 (IL-10, pg/ml); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Mediante curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80%, de asociación entre los niveles de BAFF pretrasplante y la variable rechazo en 1800 pg/ml. Los pacientes con niveles de BAFF > 1800 pg/ml tuvieron un riesgo 3,65 ($p=0,01$; IC 95%: 1,45 -9,20) veces mayor de sufrir episodios de rechazo (Figura 79).

Figura 79. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para cálculo del riesgo de desarrollo de rechazo según niveles de factor activador de célula B en pretrasplante cardíaco



ABC: Área bajo la curva. Especificidad del 80%. Punto de corte: 1800 pg/ml

Figura 80. Medias de los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias B pretrasplante cardíaco entre pacientes con rechazo y sin rechazo

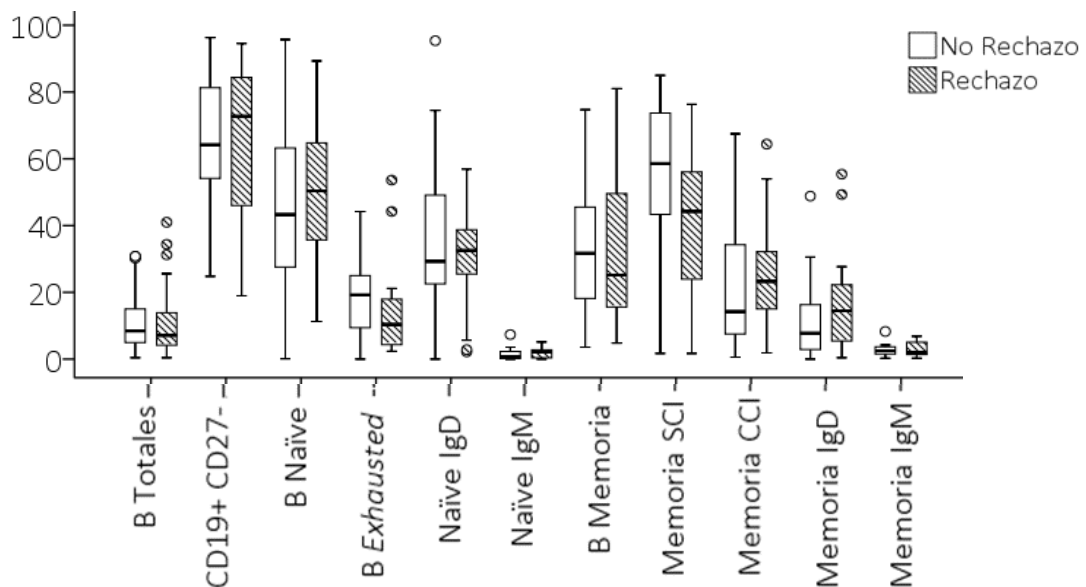
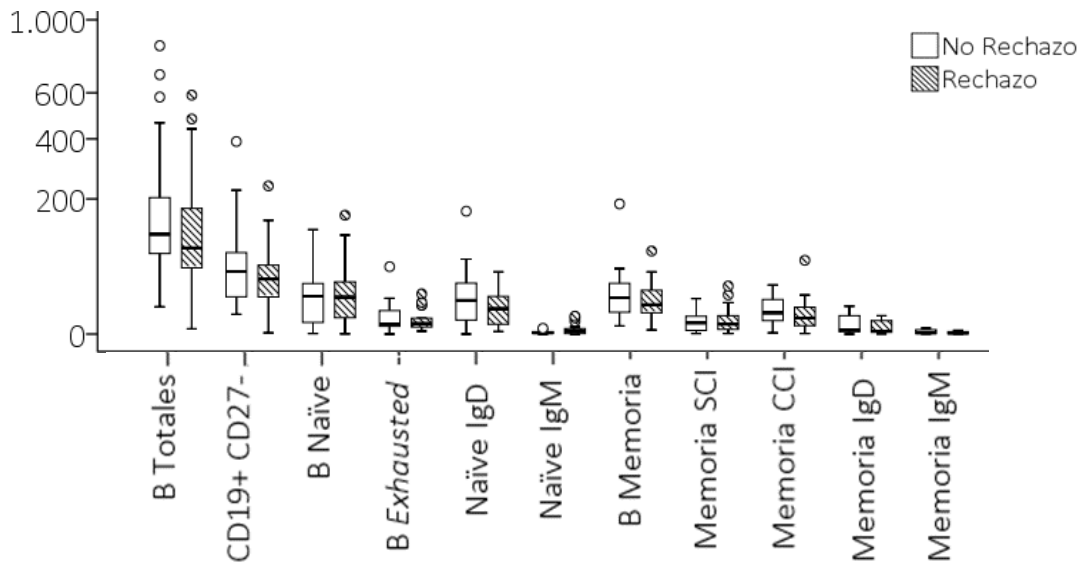


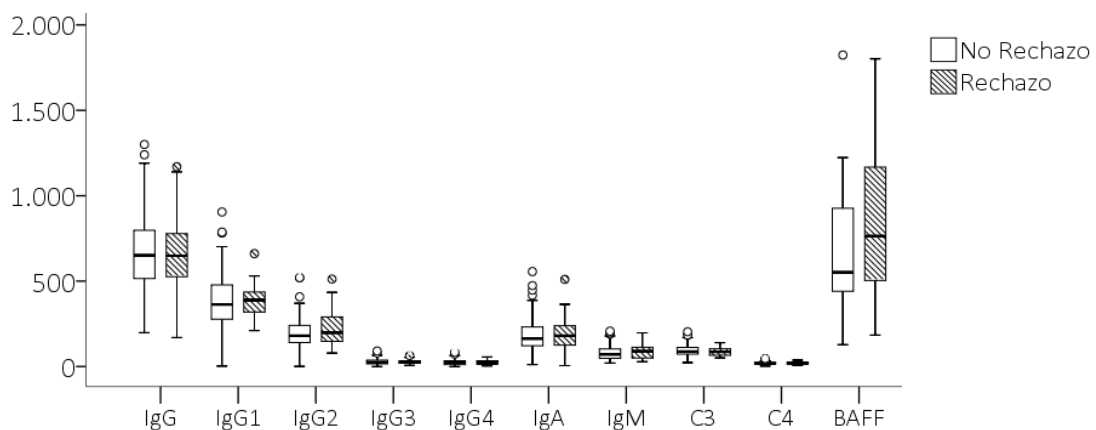
Figura 81. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B pretrasplante cardíaco entre pacientes con rechazo y sin rechazo. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)



• **Estudio del paciente a la semana postrasplante cardíaco**

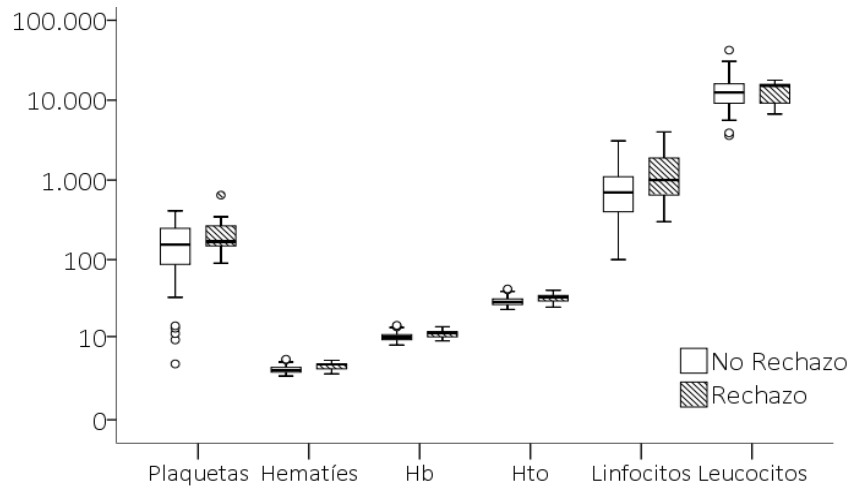
39 pacientes tuvieron episodios de rechazo pasada la semana postrasplante. Éstos tuvieron porcentajes significativamente inferiores de células B naïve IgM respecto a los pacientes sin episodios de rechazo (R: $0,72 \pm 0,55\%$ vs. NR: $1,51 \pm 1,07\%$; $p=0,03$), (figura 84). El resto de variables no muestran variaciones significativas.

Figura 82. Media de las variables inmunológicas a la semana postrasplante cardíaco en pacientes con rechazo versus no rechazadores



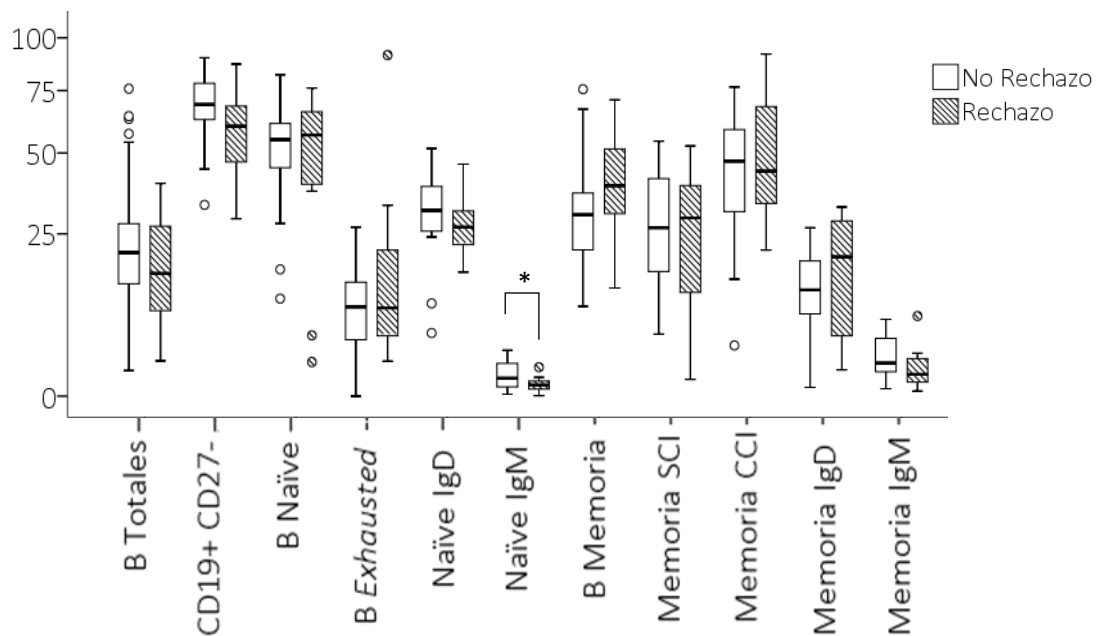
Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (g/L); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 83. Media de las variables hematológicas a la semana postrasplante cardíaco en pacientes con rechazo pasado este tiempo versus no rechazadores



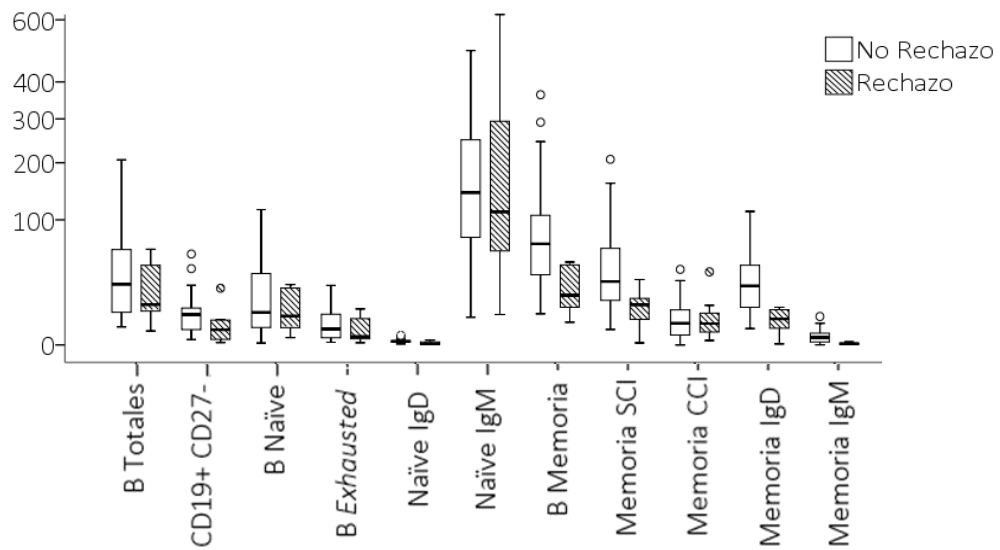
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$); Hb: Hemoglobina (g/dL); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 84. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B a la semana postrasplante cardíaco entre pacientes con rechazos pasado este tiempo versus no rechazadores. Valores en porcentajes



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Figura 85. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B a la semana postrasplante cardíaco entre pacientes con rechazos pasado este tiempo versus no rechazadores. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)

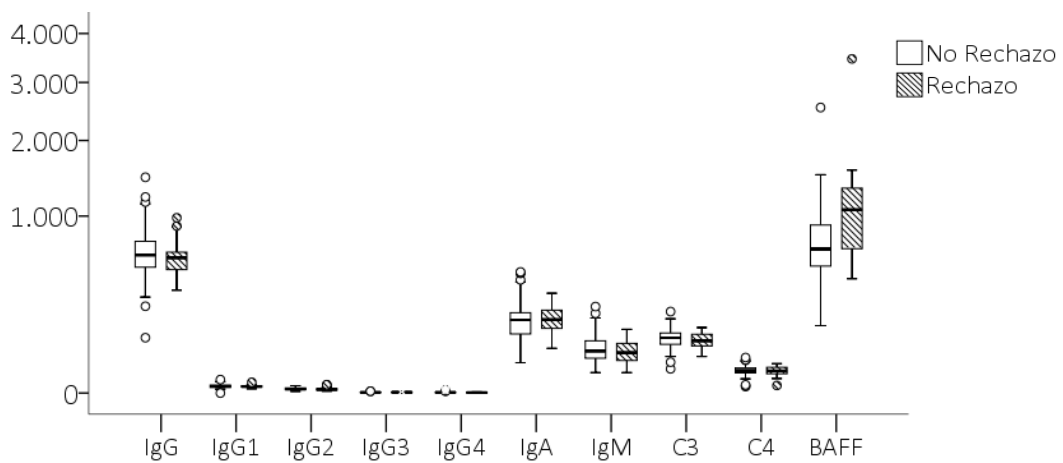


* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

• **Estudio del paciente al mes postrasplante cardíaco**

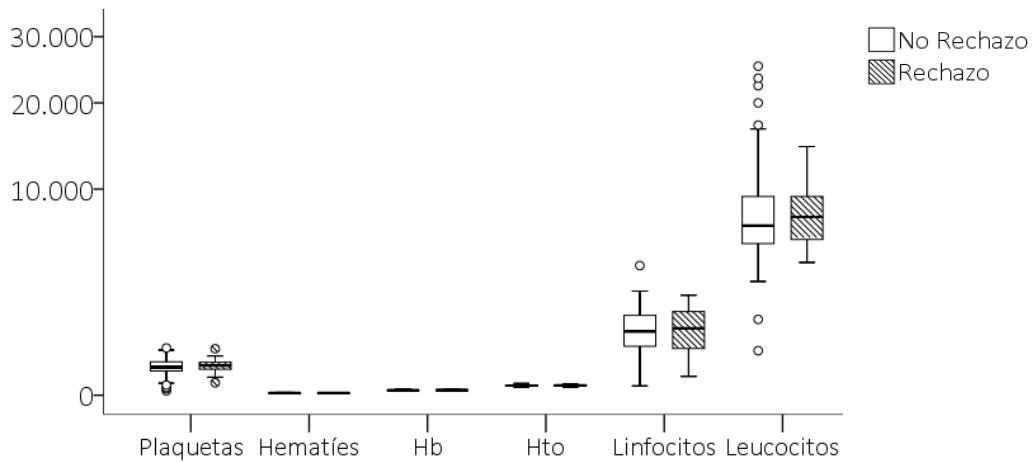
Los pacientes trasplantados cardíacos que tuvieron episodios de rechazo (N=33) pasado el mes postrasplante se compararon con aquellos que no (N=177) no encontrándose diferencias significativas.

Figura 86. Media de las variables inmunológicas al mes postrasplante cardíaco en pacientes con rechazo versus no rechazadores



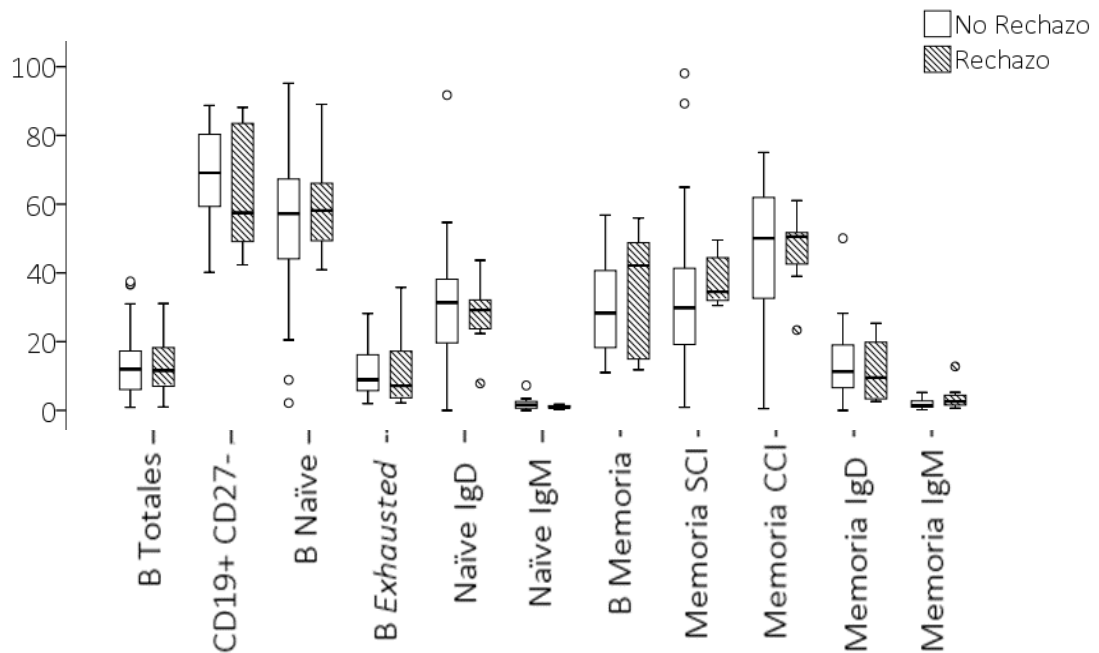
Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (g/L); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 87. Media de las variables hematológicas al mes postrasplante cardíaco en pacientes con rechazo pasado este tiempo versus no rechazadores



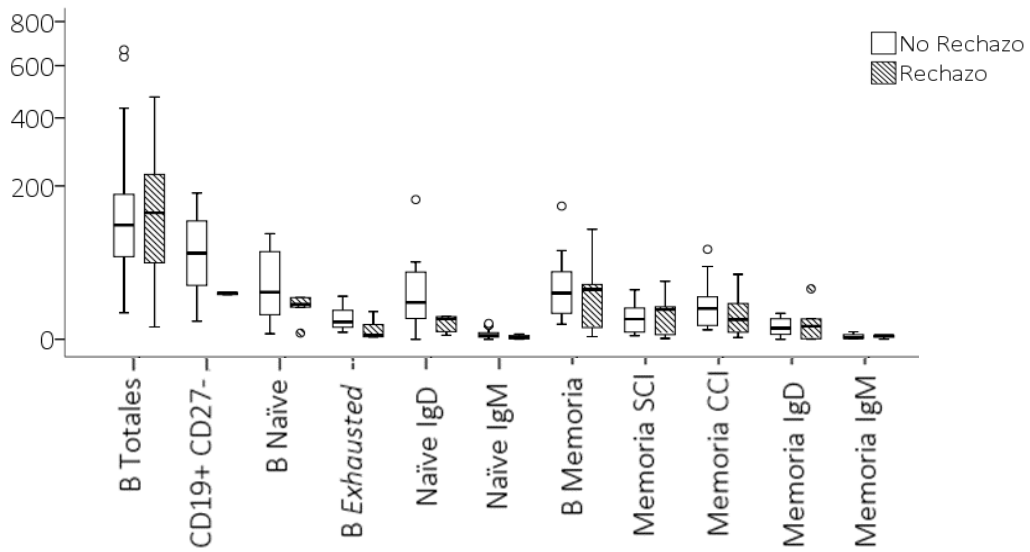
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$); Hb: Hemoglobina (g/dL); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 88. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B al mes postrasplante cardíaco entre pacientes con rechazos pasado este tiempo versus no rechazadores. Valores en porcentajes



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

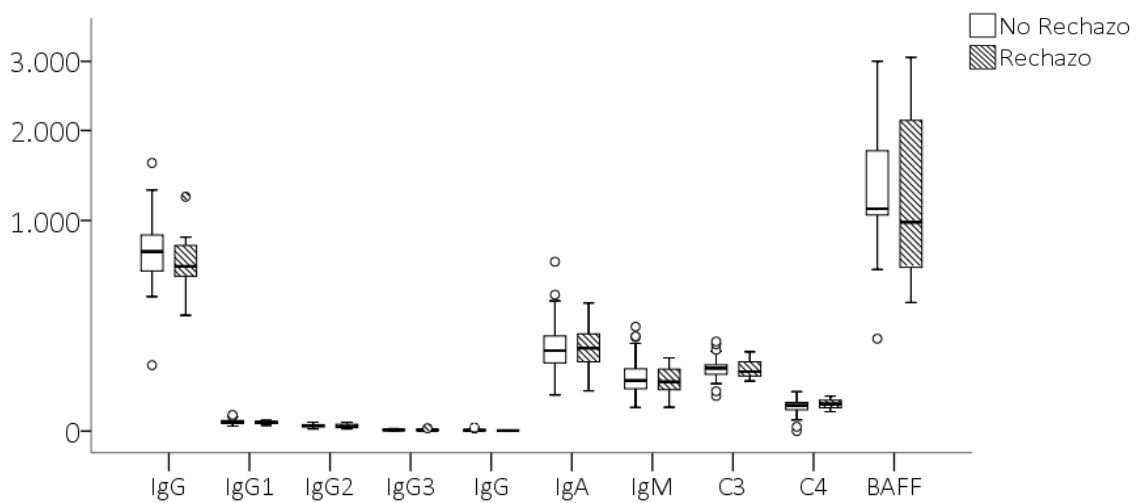
Figura 89. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B al mes postrasplante cardíaco entre pacientes con rechazos pasado este tiempo versus no rechazadores. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)



• **Estudio del paciente a los tres meses postrasplante cardíaco**

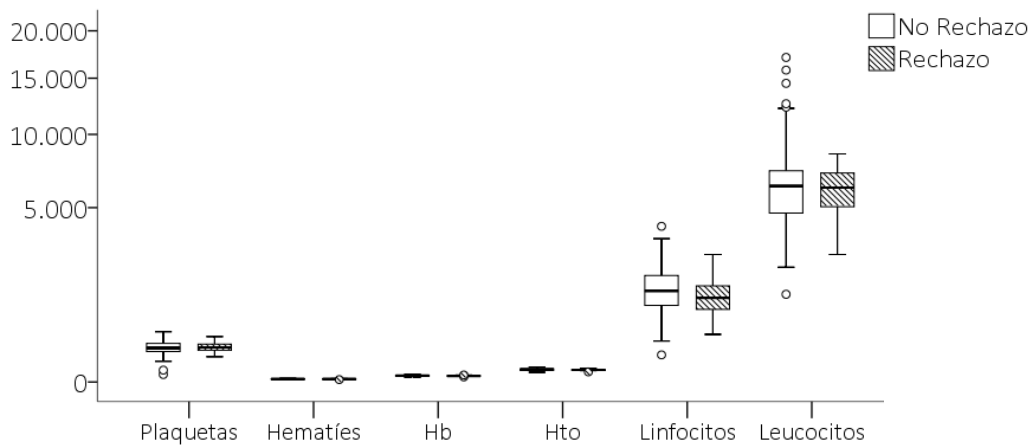
Del total de trasplantados cardíacos, 20 tuvieron episodios de rechazo pasados los tres meses del trasplante frente a los 182 que no. Al comparar las variables de estudio y las subpoblaciones linfocitarias no se encontraron diferencias significativas en ninguna de ellas.

Figura 90. Media de las variables inmunológicas a los tres mes postrasplante cardíaco en pacientes con rechazo versus no rechazadores



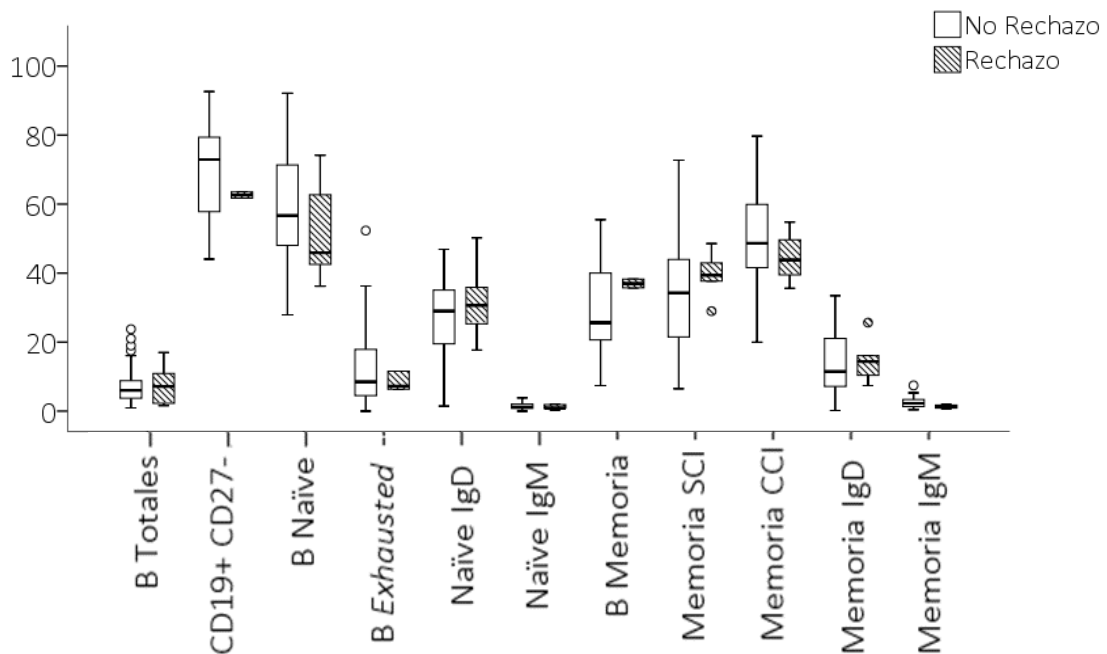
Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (g/L); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 91. Media de las variables hematológicas a los tres mes postrasplante cardíaco en pacientes con rechazo pasado este tiempo versus no rechazadores



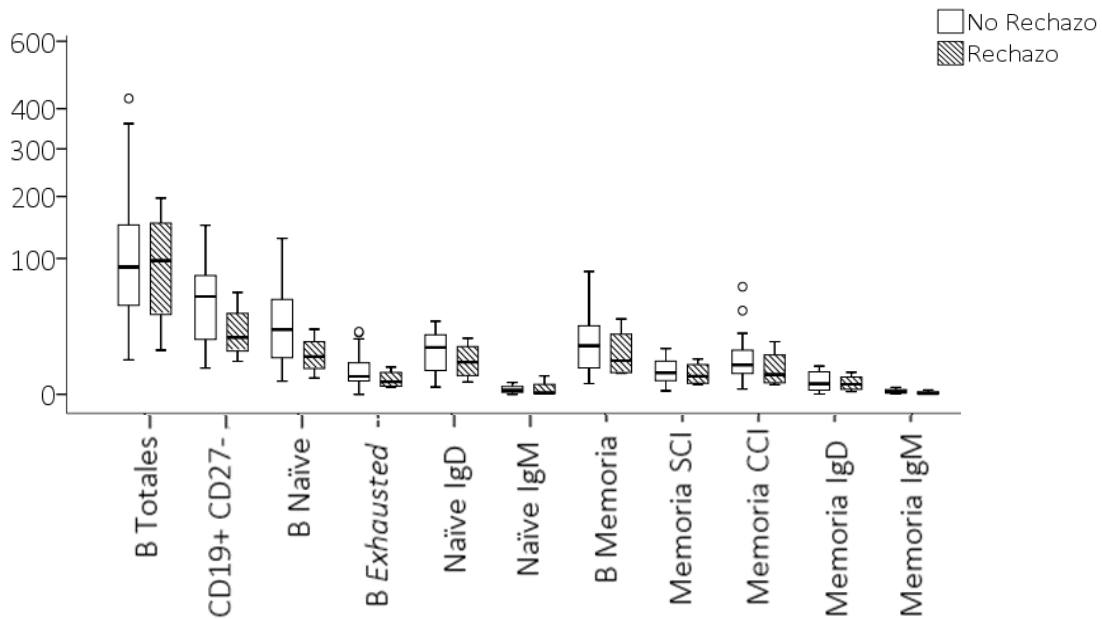
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$); Hb: Hemoglobina (g/dL); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 92. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B al mes postrasplante cardíaco entre pacientes con rechazo pasado este tiempo versus no rechazadores. Valores en porcentajes



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

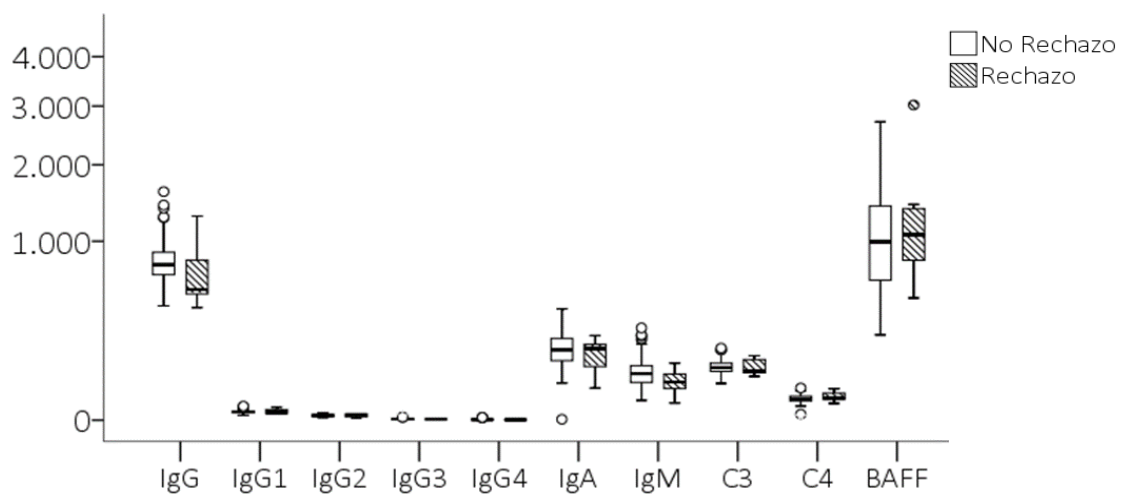
Figura 93. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B al mes postrasplante cardíaco entre pacientes con rechazos pasado este tiempo versus no rechazadores. Valores absolutos ($10^3 / \mu\text{l}$)



• **Estudio del paciente a los seis meses postrasplante cardíaco**

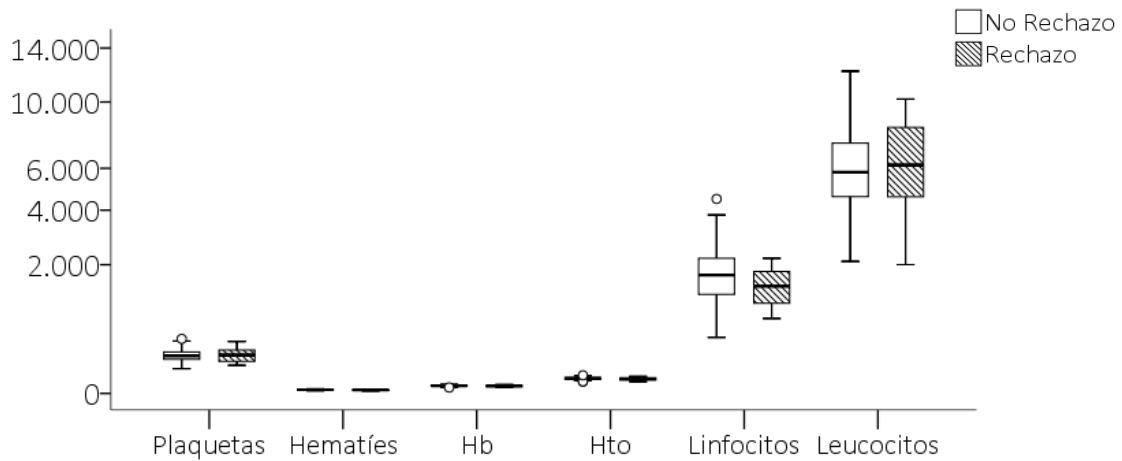
En el periodo entre los seis meses postrasplante y el año tuvieron episodios de rechazo 12 pacientes, frente a los 185 que no.

Figura 94. Media de las variables inmunológicas a los seis meses postrasplante cardíaco en pacientes con rechazo versus no rechazadores



Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (g/L); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

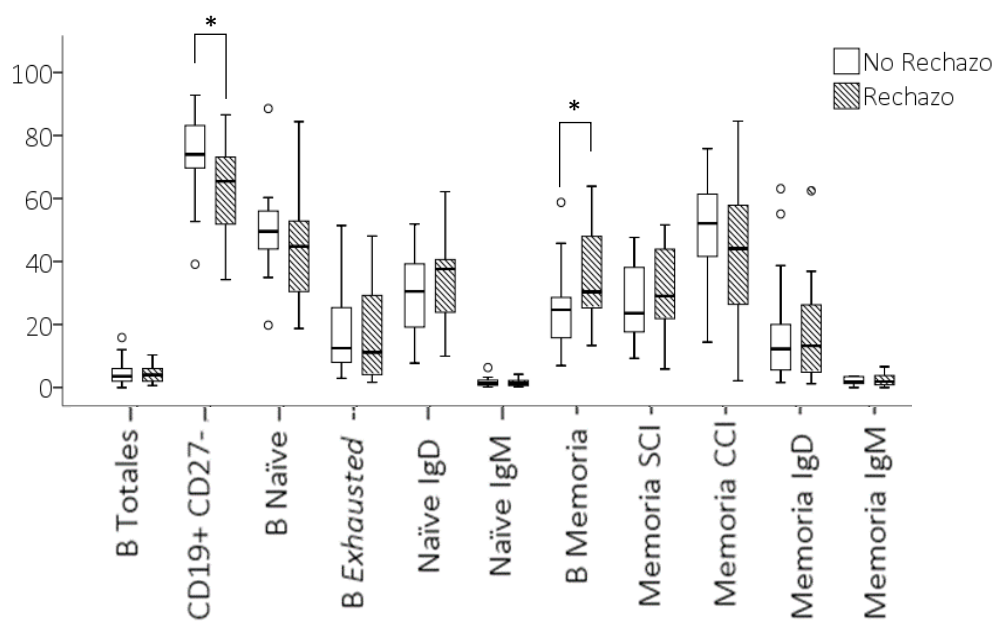
Figura 95. Media de las variables hematológicas a los seis meses postrasplante cardíaco en pacientes con rechazo pasado este tiempo versus no rechazadores



Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); Hematíes ($10^6/\mu\text{L}$); Hb: Hemoglobina (g/dL); Hto: Hematocrito (%); Linfocitos ($10^3/\mu\text{L}$); Leucocitos ($10^3/\mu\text{L}$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

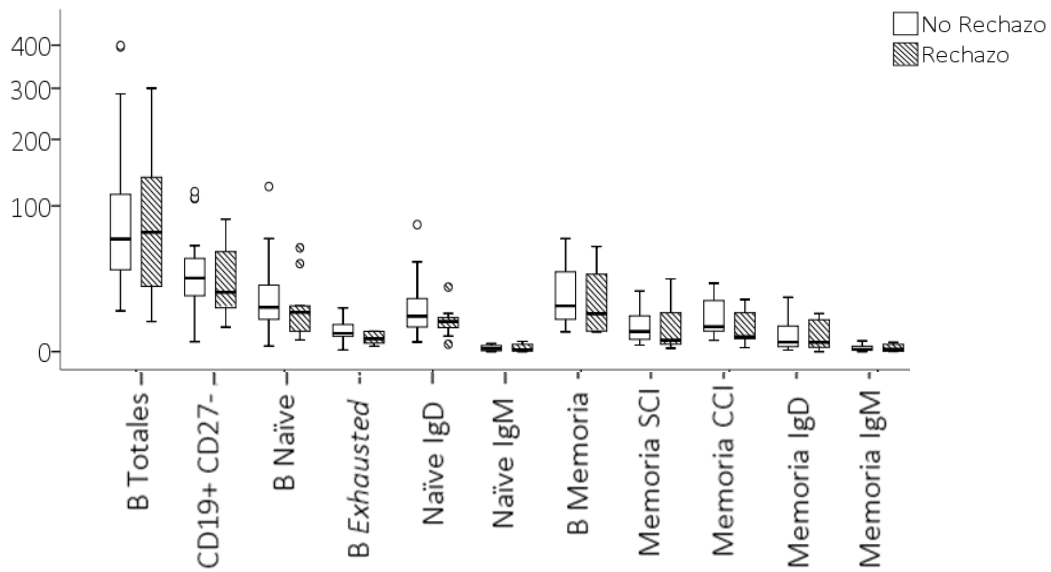
Los pacientes con rechazo tuvieron niveles significativamente inferiores de linfocitos CD19+CD27- (R: $61,58 \pm 16,46\%$ vs. NR: $74,03 \pm 12,80\%$; $p = 0,02$) y superiores de B memoria (R: $36,49 \pm 16,16\%$ vs. NR: $24,73 \pm 12,28\%$; $p = 0,02$) frente a los no rechazadores (figura 96). No se observan diferencias en valores absolutos.

Figura 96. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B a los seis meses postrasplante cardíaco entre pacientes con rechazos pasado este tiempo versus no rechazadores. Valores en porcentajes



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 97. Medias de las subpoblaciones linfocitarias B a los seis postrasplante cardíaco entre pacientes con rechazos pasado este tiempo versus no rechazadores. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)



6.1.1. Poblaciones B reguladoras en pacientes con episodios de rechazo

Del grupo incluido en el estudio de fenotipo B regulador, 16 tuvieron algún episodio de rechazo, frente a 12 pacientes de largo seguimiento que no. Al comparar sus medias mediante prueba T el grupo rechazador mostró menores valores absolutos de B10 ($R: 15,76 \pm 23,00 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs $NR: 31,77 \pm 27,46 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; $p=0,01$) y B transicionales ($R: 3,75 \pm 10,25 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs $NR: 15,13 \pm 18,51 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; $p=0,01$) (figura 100), de estas últimas también expresaron menores frecuencias ($R: 7,09 \pm 6,11\%$ vs $NR: 14,76 \pm 14,22\%$; $p=0,01$), (figura 99).

Figura 98. Dot plot del fenotipo B transicional en pacientes trasplantados cardíacos con rechazos versus tolerantes. Valores en porcentajes

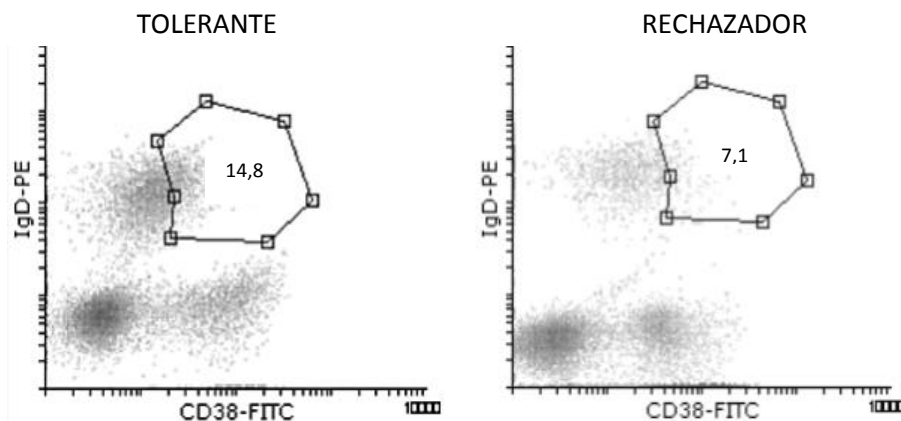
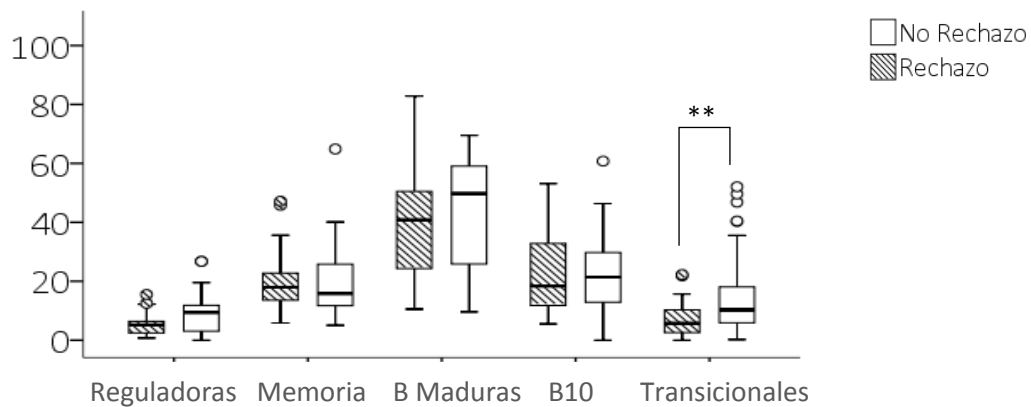
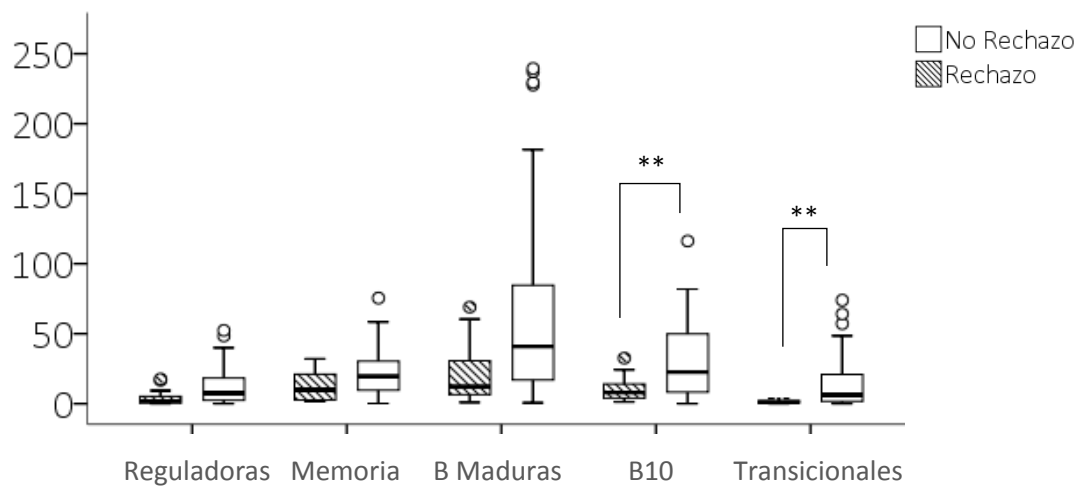


Figura 99. Diferencias del fenotipo B regulador en pacientes trasplantados cardíacos con rechazos versus no rechazadores. Valores en porcentajes



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Figura 100. Diferencias del fenotipo B regulador en pacientes trasplantados cardíacos con rechazos versus no rechazadores. Valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

6.1.2 Poblaciones B reguladoras en enfermedad vascular del injerto

Se analizaron las poblaciones B reguladoras de los 12 pacientes trasplantados cardíacos con EVI y se realizó un análisis descriptivo de su distribución tanto en frecuencias relativas como en valores absolutos (tablas 50 y 51). Posteriormente se compararon mediante ANOVA con corrección de Bonferroni con otros pacientes trasplantados cardíacos en seguimiento (<1 año postrasplante) y con los controles sanos.

Tabla 50. Descriptivos en porcentaje de las poblaciones linfocitarias con fenotipo B regulador en de pacientes con diagnóstico de enfermedad vascular del injerto (EVI)

	Media	ET	Mediana	DT	Mínimo	Máximo	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	8,49	2,29	6,31	7,23	1,18	24,73	1,18	.
B memoria reguladora	24,35	5,19	18,26	16,41	9,01	56,12	9,01	.
B maduras	36,28	5,79	37,19	18,32	12,46	61,11	12,46	.
B10	32,87	5,06	34,02	15,99	11,76	60,76	11,76	.
B transicionales	11,26	2,28	10,08	7,21	0,00	22,26	0,00	.

Tabla 51. Descriptivos de las poblaciones linfocitarias con fenotipo B regulador en de pacientes con diagnóstico de enfermedad vascular del injerto (EVI) en valores absolutos ($10^3/\mu\text{l}$)

	Media	ET	Mediana	DT	Mín.	Máx.	Percentiles	
							5	95
B reguladoras	11,82	7,92	1,32	25,03	0,12	81,26	0,12	.
B memoria reguladora	17,59	9,37	5,31	29,63	1,38	98,08	1,38	.
B maduras	38,28	25,91	6,57	81,93	0,99	264,43	0,99	.
B10	20,60	10,16	13,39	32,14	1,24	109,24	1,24	.
B transicionales	7,35	5,16	1,14	16,33	0,00	53,17	0,00	.

Los pacientes con EVI exhibieron valores significativamente superiores en frecuencias relativas de la población B10 respecto al resto de trasplantados cardíacos sin rechazo y al punto pretrasplante (EVI: $32,87 \pm 15,99\%$ vs. Pre_TC: $16,26 \pm 9,87\%$; $p=0,03$; TC: $20,82 \pm 14,25\%$; $p=0,05$). La población B transicional se mostró significativamente elevada en EVI respecto a los trasplantados cardíacos sin EVI (EVI: $11,26 \pm 7,21\%$ vs. TC: $5,74 \pm 4,00\%$; $p=0,01$), (figura 101).

Figura 101. Diferencia de medias en pacientes trasplantados cardíacos del fenotipo B regulador en porcentaje en el estudio pre, TC, EVI y CS.

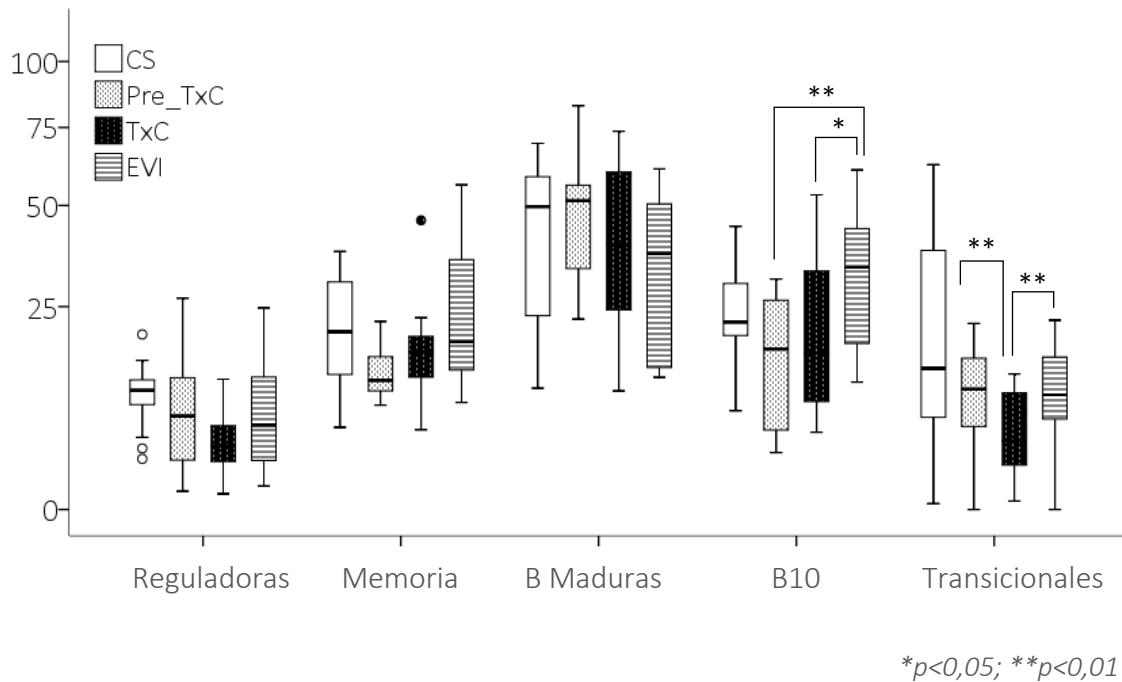
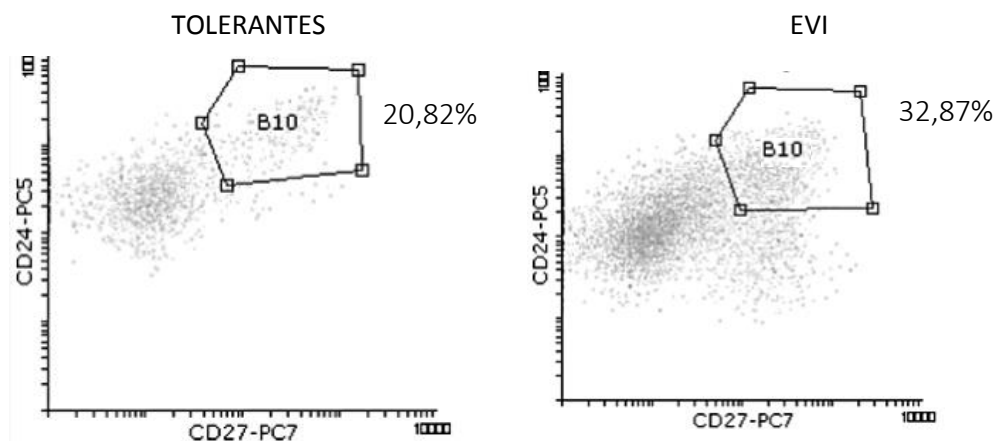
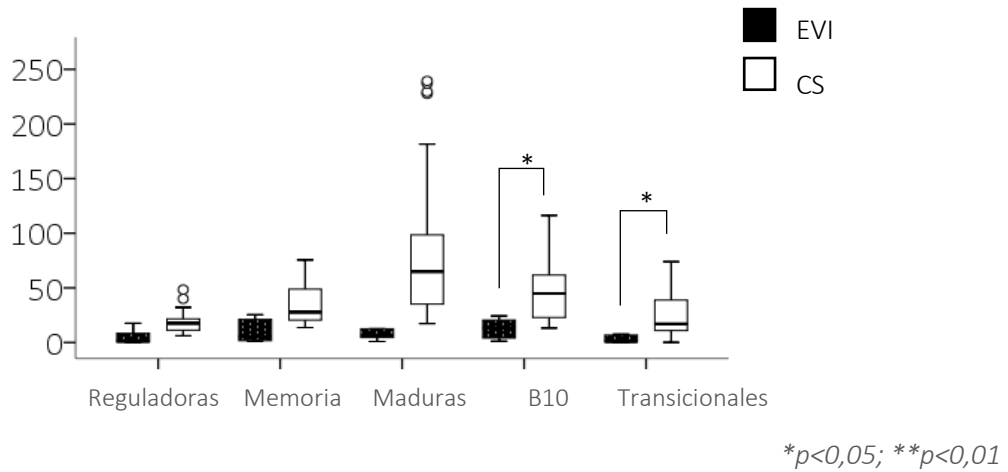


Figura 102. Dot plot del fenotipo B10 en pacientes trasplantados cardíacos con enfermedad vascular del injerto versus no rechazadores. Valores en porcentajes



Los análisis en valores absolutos sólo mostraron diferencias significativas entre los pacientes con EVI y el grupo control sano, con el resto de grupos de no se apreciaron diferencias significativas en ninguna de las poblaciones. Los pacientes con EVI poseen valores absolutos inferiores en todas las poblaciones, siendo estas diferencias significativas para B10 (EVI: $20,60 \pm 32,14 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. CS: $46,89 \pm 27,61 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; $p=0,02$) y transicionales (EVI: $7,35 \pm 16,33 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. CS: $24,80 \pm 21,14 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; $p=0,03$), (figura 103).

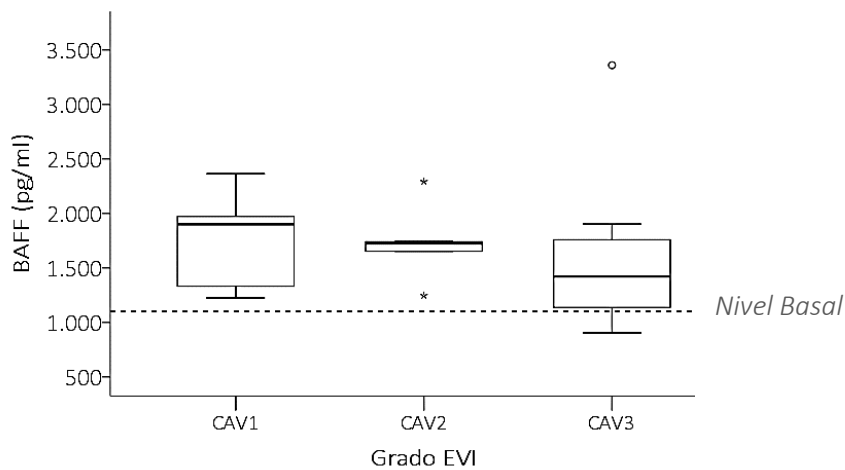
Figura 103. Diferencia de medias valores absolutos de pacientes con diagnóstico de EVI frente al grupo control sano



- Factor activador de célula B en enfermedad vascular del injerto**

Al cuantificar los niveles de BAFF en pacientes trasplantados de larga duración con EVI, se observaron niveles significativamente superiores en todos los grados de la enfermedad si los comparamos con los basales en CS (CAV1: 1757,57 ± 474,18 pg/ml; CAV2: 1729,89 ± 373,05 pg/ml; CAV3: 1638,40 ± 829,84 pg/ml; vs CS: 1161,99 ± 403,14 pg/ml; p=0,03) y no observándose diferencias significativas entre grados (figura 104).

Figura 104. Representación de los niveles de BAFF en pacientes con diagnóstico de EVI en diferentes grados de la enfermedad



6.2. ALTERACIONES EN TRASPLANTE PULMONAR ASOCIADAS A RECHAZO

Durante el periodo de seguimiento, 24 pacientes (29,2%) desarrollaron episodios de rechazo agudo que requirió el uso de tratamiento con corticoides durante el periodo de seguimiento. Las características clínicas y demográficas se muestran en la tabla 52.

Tabla 52. Datos demográficos y clínicos de pacientes trasplantados pulmonar con o sin rechazo durante los primeros seis meses postrasplante

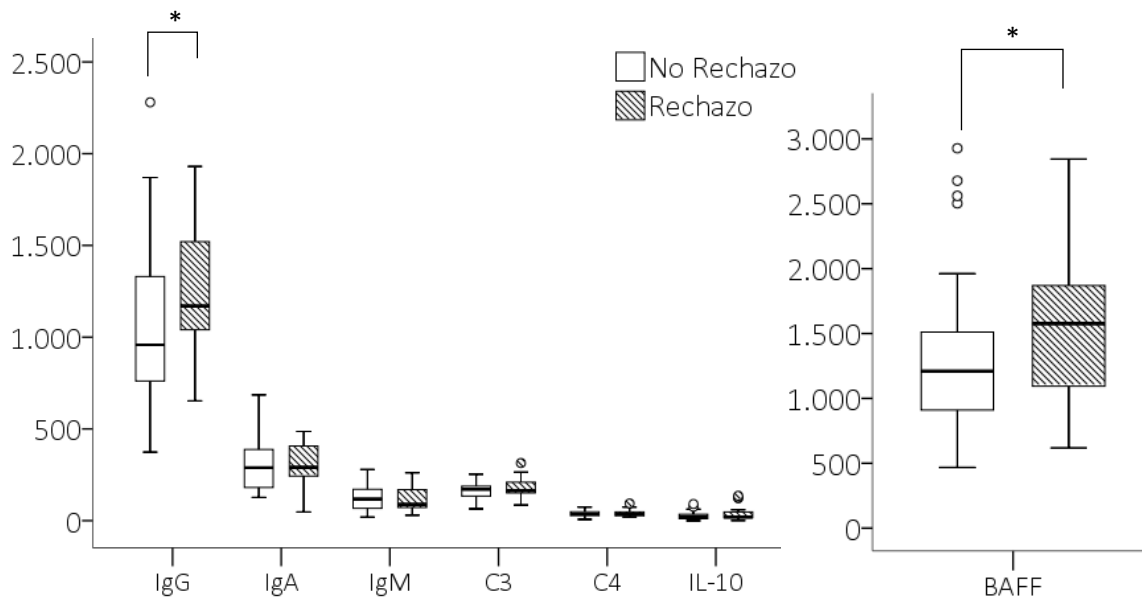
Variable	Rechazo (N=24)	No rechazo (N=58)	P
Edad, media (rango)	53,03 (20-67)	53,40 (16-69)	0,96
Sexo (Hombre/ mujer) (%)	58/42	80/20	0,07
Tx Urgente (%)	15,7	6,8	0,35
Tipo Tx (Uni/Bilateral) (%)	47/53	27/73	0,15
Duración del Tx (h)	6,6	8,9	0,65
Ventilación mecánica (%)	5	10,6	0,71
T CEC (min)	9297	11498	0,26
Tiempo en UCI (Días)	63	22	0,01
Tiempo Intubado (Días)	15,17	13,67	0,77
EPOC (N)	10	28	0,32
Fibrosis (N)	16	31	0,08
Déficit α - tripsina (N)	1	4	0,02
Sarcoidosis (N)	2	2	0,96
HT Pulmonar (N)	1	2	0,42
Exitus (%)	10	21,5	0,85

Tx: Trasplante; CEC: Circulación extracorpórea; UCI: Unidad de cuidados intensivos; HT: Hipertensión

- **Estudio del paciente en el pretrasplante pulmonar**

Los pacientes que experimentaron rechazos agudos tratados con corticoides dentro del periodo de seguimiento (N=24) de seis meses mostraron niveles superiores de IgG (R: $1397,75 \pm 732,51$ mg/dl vs. NR: $1099,71 \pm 456,81$ mg/dl; $p=0,04$) y BAFF pretrasplante (R: $1818,3 \pm 622,58$ pg/ml vs. NR: $1313,36 \pm 526,34$ pg/ml; $p= 0,02$) respecto a los que no presentaron esta complicación (figura 105).

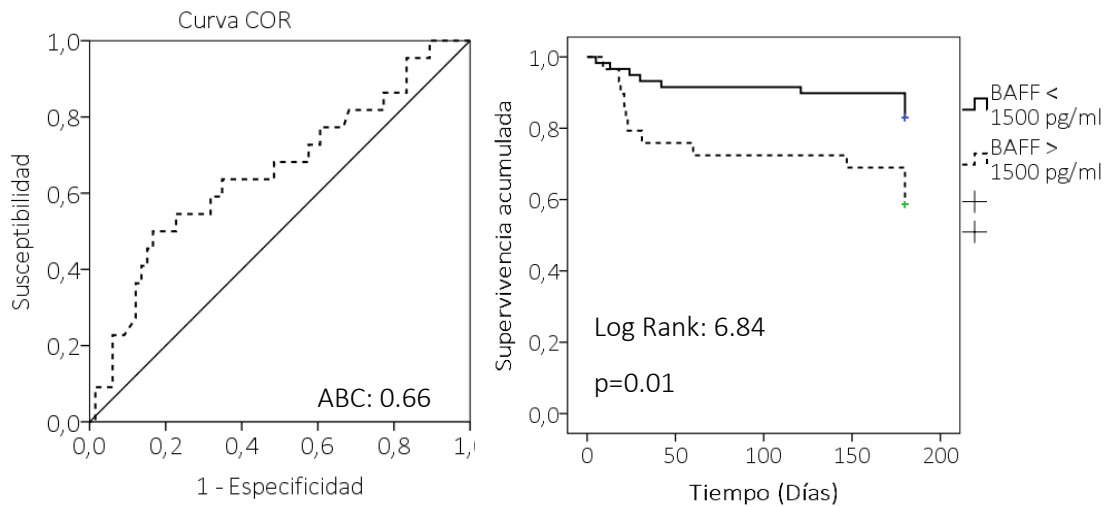
Figura 105. Variación de las medias inmunológicas pretrasplante pulmonar en pacientes con evento de rechazo frente a no rechazadores



Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl)); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Interleucina 10 (IL-10; pg/ml); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Mediante curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80%, de asociación entre los niveles de BAFF pretrasplante y la variable rechazo en 1500 pg/ml. Los pacientes con niveles de BAFF > 1500 pg/ml tuvieron un riesgo 9,52 ($p= 0,005$; IC 95%: 1,98 - 45,75) veces mayor de sufrir episodios de rechazo (Figura 106).

Figura 106. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para el cálculo de riesgo de desarrollo de rechazo según niveles de factor activador de célula B en pretrasplante pulmonar



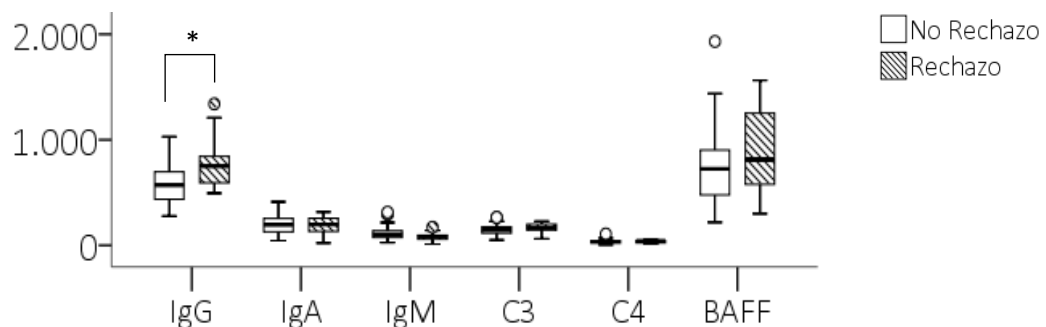
ABC: Área bajo la curva. Especificidad del 80%. Punto de corte: 1500 pg/ml

- **Estudio del paciente a la semana postrasplante pulmonar**

Los pacientes que sufrieron episodios de rechazo pasada la semana postrasplante (N=17) se compararon con aquellos que no (N=65).

Los que presentaron episodios de rechazo mostraron niveles superiores de IgG (R: $767,73 \pm 252,44$ mg/dl vs. NR: $580,78 \pm 190,33$ mg/dl; $p=0,00$) frente a los no rechazadores (figura 107).

Figura 107. Variación de las medias inmunológicas a la semana postrasplante pulmonar en pacientes con evento de rechazo frente a no rechazadores



Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl)); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Interleucina 10 (IL-10; pg/ml); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

- **Estudio del paciente al mes postrasplante pulmonar**

A partir del mes postrasplante sólo sufrieron episodios de rechazo agudo tratado con corticoides 6 pacientes, con este tamaño muestral se ha desestimado hacer análisis estadístico por ser insuficiente.

6.3. ALTERACIONES EN TRASPLANTE RENAL ASOCIADAS A RECHAZO

Durante el periodo de seguimiento de seis meses, 19 pacientes (19,6%) desarrollaron algún episodio de rechazo agudo que requirió el uso de tratamiento o fase de rescate. Las características clínicas y demográficas se muestran en la tabla 53.

Tabla 53. Datos demográficos y clínicos de pacientes trasplantados renales con o sin rechazo durante los seis primeros meses postrasplante

Variable	Rechazo (N=24)	No rechazo (N=73)	P
Edad, media (rango)	55,92 (32-81)	54,30 (20-81)	0,70
Sexo (Hombre/ mujer) (%)	14/5	51/27	0,50
Pretrasplante previo (%)	15,8	14,1	0,63
Inmunoterapia pre_TR (%)			
Basiliximab	57,9	67,9	0,08
ATG	35,3	14,9	0,06
Terapia Pretrasplante (%)			
Hemodiálisis	84,2	89,6	0,51
Diálisis peritoneal	21,1	19,7	0,90
Infección pretrasplante (%)	15,8	14,5	0,87
Tiempo isquemia (h)	10,69	10,66	0,95
Glomerulonefritis (N)	3	12	0,62
Nefropatía diabética (N)	3	16	0,29
Hipertensión (N)	4	7	0,26
Policistosis (N)	4	8	0,57
Nefropatía crónica intersticial(N)	1	8	0,44
Otros (N)	7	22	0,74

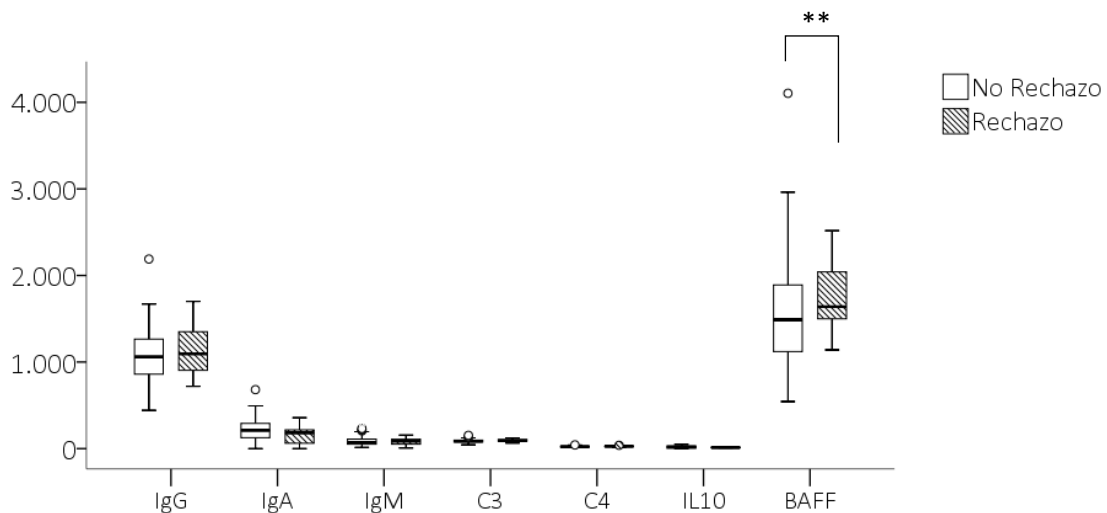
Pre_TR: Pretrasplante renal; ATG: Antitimoglobulina

- **Estudio del paciente en el pretrasplante renal**

Durante el periodo de seguimiento de seis meses 19 pacientes trasplantados experimentaron algún episodio de rechazo.

Los niveles de BAFF en el pretrasplante de los pacientes con rechazo fueron significativamente superiores a los no rechazadores (R: $2076,72 \pm 1202,38$ pg/ml vs. NR: $1243,84 \pm 404,63$ pg/ml; $p= 0,00$), (figura 108).

Figura 108. Variación de las medias inmunológicas pretrasplante renal en pacientes con evento de rechazo frente a no rechazadores

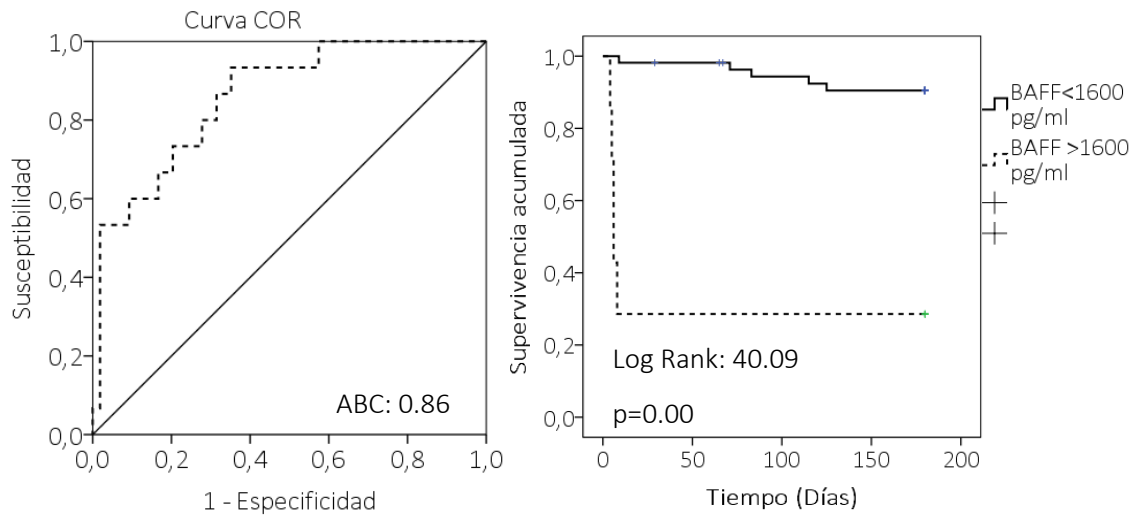


Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl)); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Interleucina 10 (IL-10; pg/ml); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Mediante curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80%, de asociación entre los niveles de BAFF pretrasplante renal y la variable rechazo en 1600 pg/ml.

Los pacientes con niveles de BAFF > 1600 pg/ml tuvieron un riesgo 25,00 ($p= 0,00$; IC 95%: 5,69 - 109,80) veces mayor de sufrir episodios de rechazo durante los seis meses posteriores al trasplante (Figura 109).

Figura 109. Curva ROC y análisis de supervivencia Kaplan- Meier para el cálculo de riesgo de desarrollo de rechazo según niveles de factor activador de célula B en pretrasplante renal

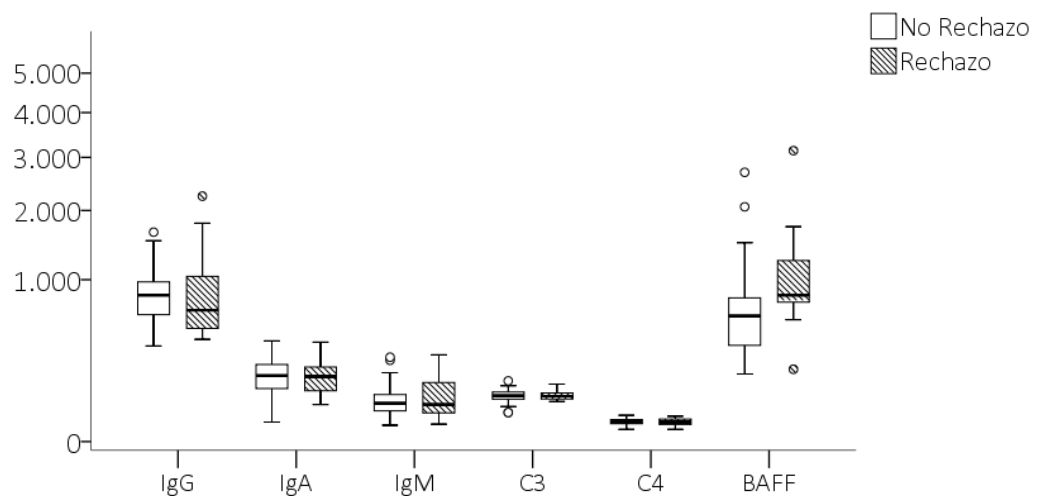


ABC: Área bajo la curva. Especificidad del 80%. Punto de corte: 1600 pg/ml

• **Estudio del paciente a la semana postrasplante renal**

De los pacientes trasplantados, 21 sufrieron episodios de rechazo pasada la semana postrasplante. Al compararlos con los que no mostraron episodios de rechazo durante el periodo de seguimiento postrasplante no se observaron diferencias significativas.

Figura 110. Variación de las medias inmunológicas a la semana postrasplante renal en pacientes con evento de rechazo frente a no rechazadores

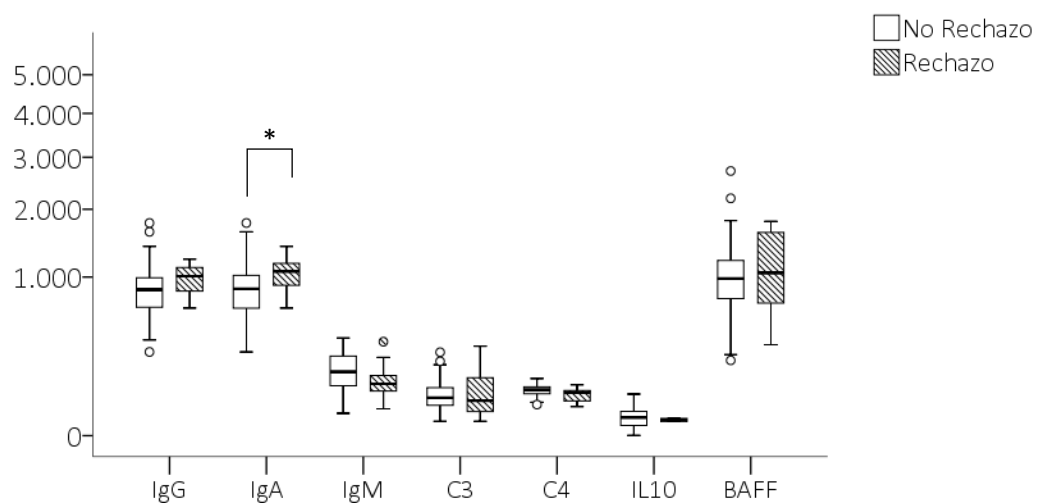


Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl)); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

- **Estudio del paciente al mes postrasplante renal**

Pasado el mes desde el trasplante, 14 pacientes sufrieron rechazo. Estos pacientes tuvieron niveles significativamente elevados de IgA (R: $1029,00 \pm 226,50$ vs. NR: $858,22 \pm 280,00$; $p=0,049$) respecto a los trasplantados que no experimentaron rechazos (figura 111).

Figura 111. Variación de las medias inmunológicas al mes postrasplante renal en pacientes con evento de rechazo frente a no rechazadores



Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM (mg/dl)); factores del complemento (C3, C4) (mg/dL); Interleucina 10 (IL-10; pg/ml); Factor activador de célula B (BAFF, pg/mL); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

- **Estudio del paciente a los tres meses postrasplante renal**

A partir de los tres meses postrasplante sólo sufrieron episodios de rechazo agudo 8 pacientes, con este tamaño muestral se ha desestimado hacer análisis estadístico.

7. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ATP INTRACELULAR EN LINFOCITOS T CD4+

7.1. NIVELES DE ATP EN ENFERMEDAD VASCULAR DEL INJERTO

Decidimos estudiar los niveles de ATP intracelular en pacientes diagnosticados con EVI (N=25) para comprobar como era su estado de inmunocompetencia respecto a pacientes trasplantados de larga duración que no han desarrollado esta complicación, lo que denominamos controles quirúrgicos (CQ, N=10). Las características demográficas del grupo de estudio se muestran en la tabla 54.

A los pacientes con diagnóstico de EVI se les agrupó teniendo en cuenta el grado de rechazo determinado por biopsias según la ISHLT.

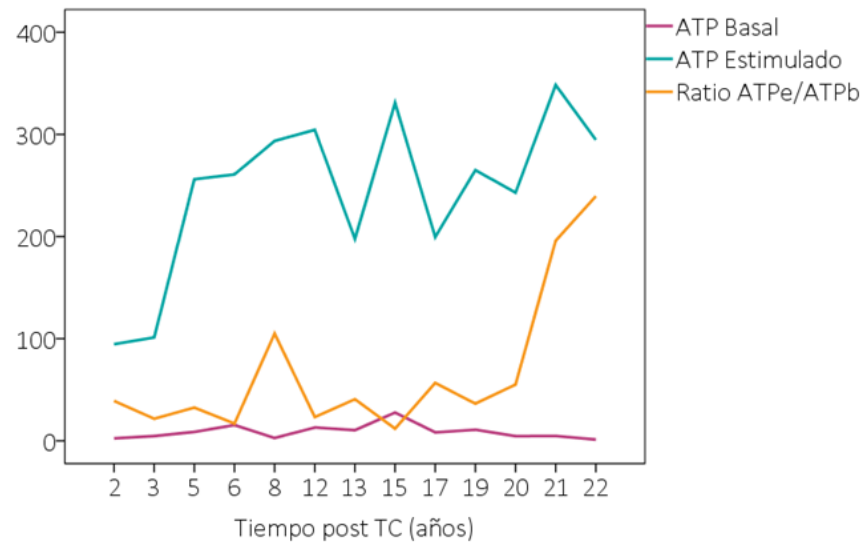
Tabla 54. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio de ATP intracelular

	CAV1	CAV2	CAV3	CQ
N	8	8	9	10
Edad	61	66	65	61
Sexo (H/M)	7/1	8/0	8/1	8/2
Tiempo Post TC (días)	5420	4258	5628	4538
Causa del Trasplante (%)				
MIIS/Coronariopatía	25,0	37,5	55,6	80,0
MIDI	37,5	25,0	33,3	10,0
Valvulopatía	25,0	12,5	11,1	10,0
MITH	12,5	–	–	–
Re-TC	–	25,0	–	–

CQ. Control quirúrgico; MIDI: Miocardiopatía dilatada; MIHT: Miocardiopatía hipertrófica. Re-TC: Retrasplante.

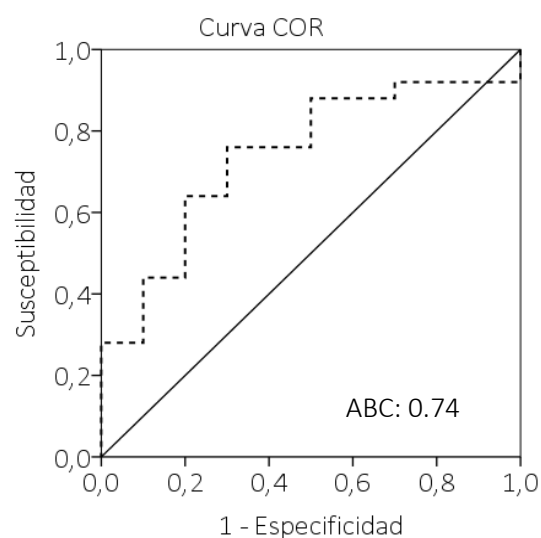
Al analizar la evolución de los niveles de ATP intracelular en pacientes con EVI en función del tiempo postrasplante, se pudo apreciar un crecimiento progresivo de los niveles de ATP estimulado y de la ratio de ATP estimulado/ ATP basal. En cambio, los niveles de ATP basal se mantenían más o menos constantes y en valores mínimos (figura 112).

Figura 112. Evolución de los valores de ATP en función de los años postrasplante cardíaco en pacientes con enfermedad vascular del injerto



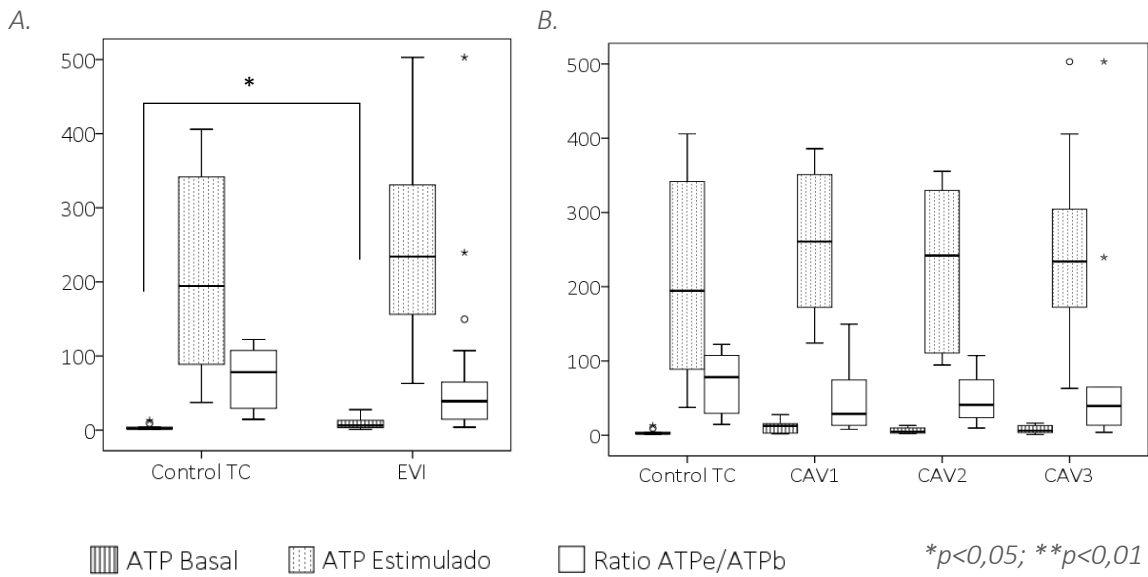
Al comparar cómo se encontraban los pacientes con EVI frente a los CQ, los primeros tuvieron niveles significativamente superiores de ATP basal (EVI: $8,59 \pm 6,72$ ng/ml vs. CQ: $4,02 \pm 3,99$ ng/ml; $p=0,02$), (figura 114). Mediante curva ROC se estableció como punto de corte, con una especificidad del 80%, de asociación entre los niveles de ATPb y EVI en 4.22 ng/ml. Los pacientes con niveles de ATPb > 4.22 ng/ml tuvieron un riesgo 7,11 ($p= 0,03$; IC 95%: 1,23 - 40,98) veces mayor de asociación con EVI (Figura 113).

Figura 113. Curva ROC para establecer punto de corte niveles de ATP basal en pacientes con EVI



ABC: Área bajo la curva. Especificidad del 80%. Punto de corte: 4,22 pg/ml

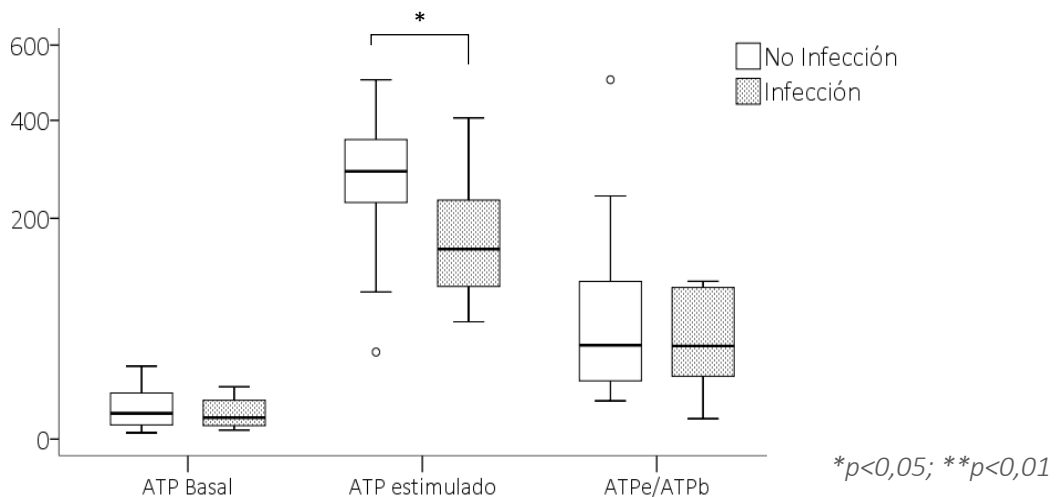
Figura 114. A. Medias de ATP basal, estimulado y ratio ATPe/ATPb en pacientes con EVI versus controles quirúrgicos. B. Medias de ATP por grado en el diagnóstico de EVI versus pacientes control.



7.2. NIVELES DE ATP EN TRASPLANTADOS CARDÍACOS CON INFECCIÓN

De los pacientes trasplantados cardíacos, un total de 15 experimentaron episodios de infección durante el periodo de seguimiento frente a 21 que no presentaron complicación infecciosa. El grupo con infecciones mostró valores significativamente inferiores de ATP estimulado respecto a los que no tuvieron complicación (I: $180,89 \pm 109,86$ ng/ml vs. NI: $272,96 \pm 111,52$ ng/ml; $p=0,02$), (figura 115).

Figura 115. Representación de las medias de los diferentes ATP estudiados en pacientes trasplantados cardíacos con eventos infecciosos versus pacientes sin infección

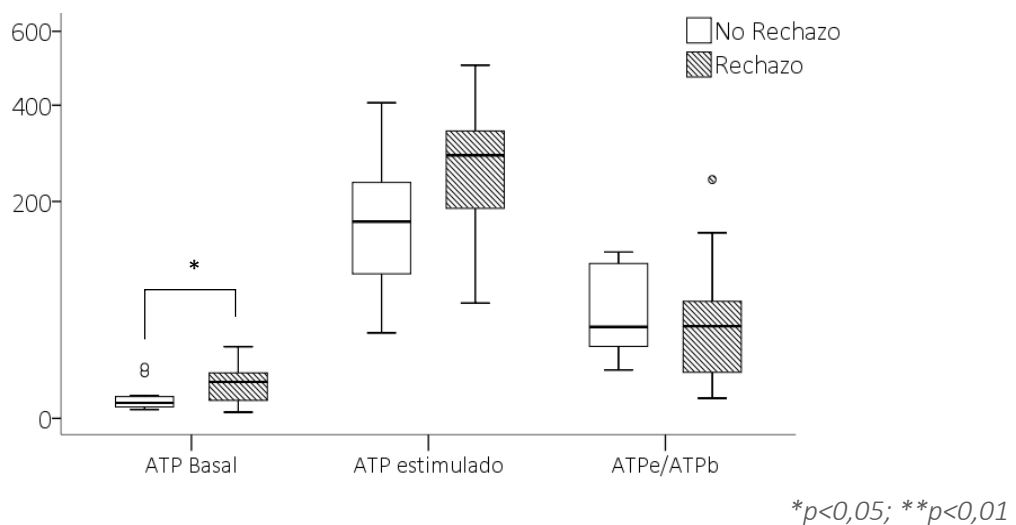


7.3. NIVELES DE ATP EN TRASPLANTADOS CARDÍACOS CON RECHAZO

Decidimos analizar los niveles de ATP en aquellos pacientes trasplantados cardíacos que habían tenido episodios de rechazo (N= 21), pero no EVI, y en pacientes que no mostraron episodios de rechazo durante el periodo de seguimiento (N=14).

Los datos reflejaron valores significativamente superiores en los niveles de ATP basal en aquellos pacientes con episodios de rechazo (R: $9,22 \pm 6,80$ ng/ml vs. NR: $4,40 \pm 4,44$ ng/ml; $p=0,03$) respecto a los que no (figura 116). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de ATP estimulado, pero sí una tendencia a tener valores superiores en los rechazadores (R: $265,77 \pm 112,36$ ng/ml vs. NR: $191,66 \pm 117,10$ ng/ml; $p= 0,07$)

Figura 116. Representación de las medias de los diferentes ATP estudiados en pacientes trasplantados cardíacos con episodios de rechazo versus pacientes sin rechazo (ng/ml)

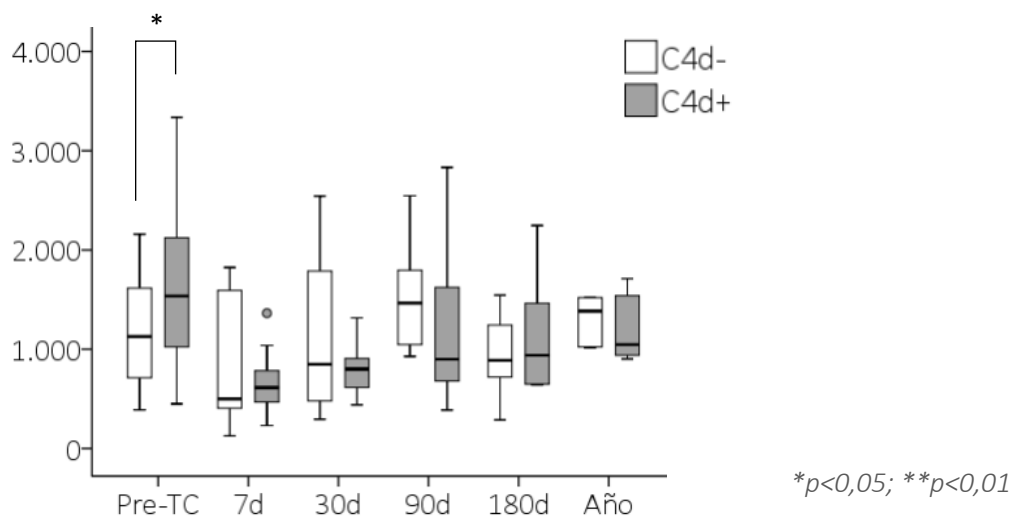


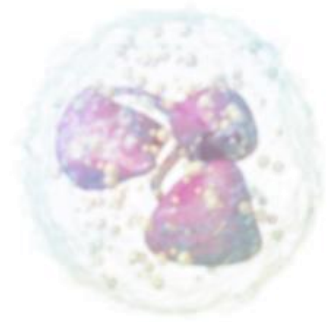
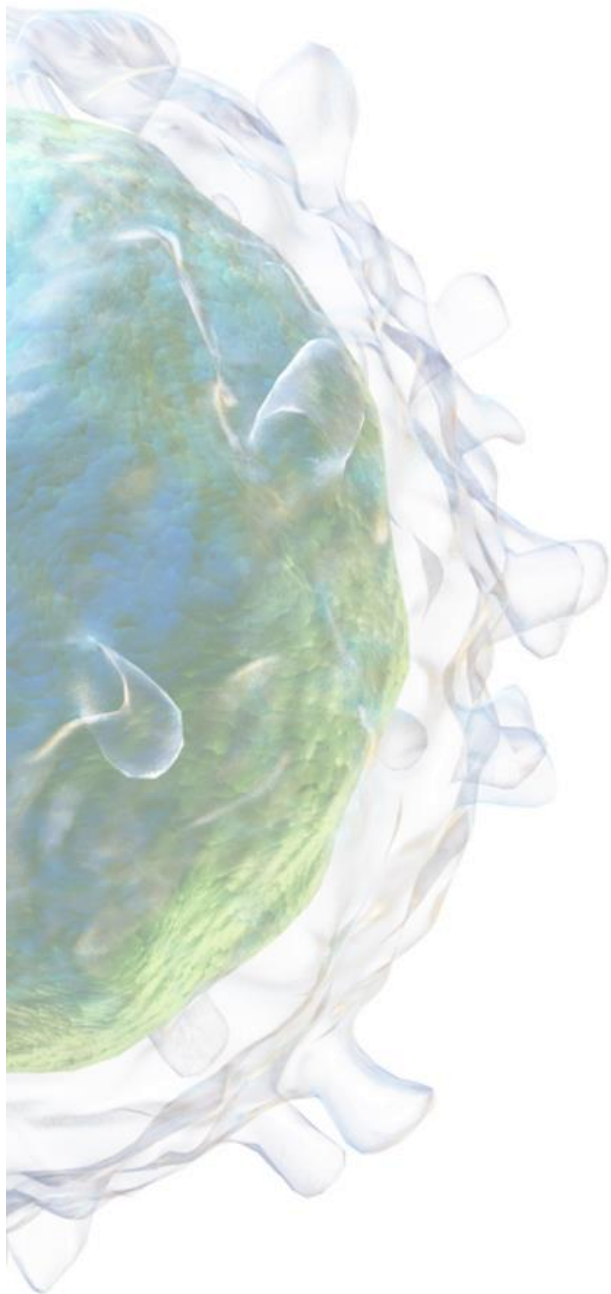
8. DETECCIÓN DE C3d y C4d EN BIOPSIAS CARDÍACAS

De los trasplantados con rechazo de grado 1 (N=13), un 25% presentó depósitos de C3d y un 57% de C4d. Ninguno de ellos mostró depósitos de ambos marcadores a la vez. De los trasplantados con grado 2 (N=22), un 14% presentó positividad para C3d y un 62,5% para C4d, no mostrándose en ningún caso expresión de los dos marcadores al mismo tiempo. Los rechazadores de grado 3 (N=24) tuvieron depósitos de C3d un 19% y un 77% de C4d. Un 14,3% expresó ambos marcadores al mismo tiempo.

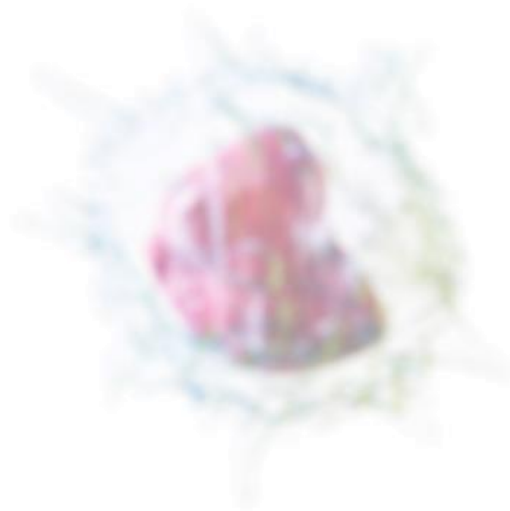
Si asociamos esa fijación de complemento al estado de las células B en el pre-TC, sí se observaron diferencias significativas. Los pacientes con depósito de C4d, la comparativa de C3d no pudo realizarse ya que la N=3, tuvieron un número menor de linfocitos CD19, tanto en porcentajes relativos ($7,37 \pm 6,13\%$ vs. $11,08 \pm 6,86\%$; $p=0,04$) como en valores absolutos ($98,93 \pm 85,66 *10^3/\mu\text{l}$ vs. $170,60 \pm 115,87*10^3/\mu\text{l}$; $p=0,01$). Además, al fijarnos en su fenotipo de maduración, los pacientes con biopsias C4d positivas presentaron porcentajes significativamente superiores de B Memoria CCI ($53,69 \pm 24,20\%$ vs. $35,22 \pm 18,47\%$; $p=0,04$) e inferiores de B Memoria SCI ($22,09 \pm 15,28\%$ vs. $39,41 \pm 27,66\%$; $p=0,03$). Los valores de BAFF pretrasplante en pacientes con positividad para C4d fueron significativamente superiores respecto a las biopsias negativas (C4d+: $1707,32 \pm 923,22$ pg/ml; C4d-: $1169,94 \pm 547,90$ pg/ml; $p= 0,046$).

Figura 117. Representación de las medias de BAFF (pg/ml) en pacientes trasplantados cardíacos con biopsias con positividad o negatividad para C4d





V. DISCUSIÓN



Cuando se realiza un trasplante de órganos se espera lo mejor, pero hay que estar preparado para lo peor. A pesar de ser una técnica muy consolidada y con buenos resultados, la alta tasa de morbimortalidad nos hace seguir trabajando en la búsqueda de marcadores precoces de las dos principales barreras para la supervivencia, como son las infecciones y el rechazo, importantes causas de pérdida del injerto a corto y largo plazo. Además, el tratamiento convencional puede estar limitado debido a la intolerancia o ineficacia en determinados pacientes.

Actualmente se trabaja en inducir tolerancia en el receptor tratando de modular la respuesta del SI y buscando una terapia individualizada, uno de los retos de la inmunoterapia del trasplante. Las estrategias se centran en i) el desarrollo de nuevos fármacos menos tóxicos, ii) la búsqueda de protocolos de minimización e individualización, y/o iii) la inducción de tolerancia por parte del receptor. En modelos preclínicos de monitorización se trabaja retirando la inmunosupresión en pacientes tolerantes o transfiriendo células reguladoras, pero estas aproximaciones no funcionan en todos los pacientes. Estudios en pacientes tolerantes han demostrado que no tienen un mayor riesgo de desarrollo de infecciones o cáncer, y su respuesta a las vacunas es similar a la de la población sana. El estudio de estos pacientes puede ayudar a entender los mecanismos detrás del desarrollo de tolerancia¹⁷⁸.

Por otro lado la monitorización inmunológica puede servir para detectar pacientes en riesgo individual de desarrollo de complicaciones postrasplante, lo que puede ser útil para la individualización de las terapias inmunosupresoras.

La mayoría de trabajos se han centrado en monitorizar los niveles de fármacos en sangre⁷⁹, pero en los últimos años han emergido nuevos ensayos basados en la cuantificación de subpoblaciones de linfocitos¹⁷⁹, niveles de citoquinas e Igs, anticuerpos citotóxicos específicos de donante altamente sensibles y depósitos de complemento C3d o C4d en tejidos, entre otros. Más allá de los componentes de inmunocompetencia que se vigilan de rutina (hemograma, prueba de tuberculina y serologías virales) hay mucho margen de mejora en el campo de la monitorización en inmunología del trasplante.

Dentro de los biomarcadores inmunológicos está la caracterización de subpoblaciones linfocitarias, muy usadas en otros modelos de enfermedad. Llama la atención el

reducido número de trabajos en el campo de la cuantificación, incluso de subpoblaciones linfocitarias T CD3, CD4 o CD8, a priori la principal diana de la inmunosupresión. Pero si la monitorización de la respuesta celular T está en fase preliminar, el estudio de los linfocitos B todavía es más experimental y se centra en su papel como célula de anticuerpos¹⁸⁰. Recientemente se ha renovado el interés por investigar el rol del linfocito B como mecanismo patogénico y como biomarcador en trasplante.

En relación con la cuantificación de componentes solubles producidos por el linfocito B relacionados con su capacidad de producir anticuerpos, se han mostrado interesantes progresos en la caracterización de asociaciones entre los niveles de anticuerpos anti-HLA previos, o que surgen de novo, con un mayor riesgo de rechazo o complicaciones crónicas como la EVI en trasplante de corazón o de rechazo crónico en trasplante renal. Sin embargo, muy poco se han investigado a las células que producen estos anticuerpos desde un punto de vista inmunofenotípico y funcional.

En términos generales, los biomarcadores inmunológicos que están fuera del área de la aloinmunidad se encuentran en fase de experimentación o validación¹⁸¹, por lo que no existe evidencia suficiente que apoye su utilización actualmente en la práctica clínica y de hecho, no se utilizan en protocolos consensuados. Es tiempo de reexaminar los roles de estos biomarcadores habiendo por ello focalizado en esta tesis doctoral en el posible papel como biomarcador de la célula B en trasplante en relación con sus potenciales funciones de protección, regulatorias e inflamatorias.

Cuando un paciente entra en lista de espera su estado de salud, en muchos casos, es crítico, ya sea porque está en la etapa terminal de su enfermedad de base, por tratamiento farmacológico intensivo o por el uso de terapias invasivas. De ahí que una parte de la tesis, la inicial, se centre en describir alteraciones inmunológicas en el paciente durante su periodo en lista activa de espera.

Lamentablemente, y a pesar de las altas tasas de trasplante, las donaciones no son suficientes y el tiempo en la lista de espera se alarga, teniendo que usar dispositivos de asistencia circulatoria. Ello nos ha llevado a aprovechar la oportunidad y evaluar componentes inmunológicos en estos pacientes.

Cuando estudiamos el estado inmunológico de los pacientes portadores de ACM observamos que poseen menores niveles de todas las Igs, C3 y C4, plaquetas, hematíes, Hb, Hto, y linfocitos, siendo esta diferencia mayor en los portadores de DAV respecto a los portadores de otros dispositivos, como balón. Por el contrario, poseen valores elevados de BAFF, leucocitos y linfocitos B. Esto podría deberse a que el DAV es una técnica invasiva que favorece la aparición de infecciones (40-50% de los casos) y causa hemorragias hasta en el 35% de los pacientes, ya que la mayoría de portadores debe usar anticoagulantes para evitar el bloqueo del sistema por coagulación¹⁸². En los pacientes portadores de ACM es conocido el déficit de inmunidad celular e hipogammaglobulinemia¹⁸³. Estos resultados pueden deberse a la inflamación producida por los dispositivos que aumentan la respuesta innata del SI, elevando los valores de leucocitos y células innatas que a su vez elevan los niveles de BAFF, lo que explicaría los niveles más altos de esta citoquina en pacientes con ACM invasiva.

Estos resultados preliminares, realizados en un número reducido de pacientes, sientan las bases para explorar en futuros estudios el rol de la inmunodeficiencia humoral secundaria al uso de estos dispositivos, sobre todo desde la perspectiva de biomarcador de riesgo de infección. Al mismo tiempo se destaca por primera vez el papel de BAFF como biomarcador de inflamación. A lo largo de la tesis se verá que niveles altos de esta citocina, asociados al estado de maduración de célula B, se correlacionan significativamente con eventos clínicos de tipo inflamatorio o aloinmune (rechazo).

Como se ha indicado más arriba, la patología de base que hace de un paciente candidato a trasplante podría influir en el estado de inmunocompetencia en el que el paciente llega a la lista de espera. Distintos factores lo pueden justificar, desde el propio uso de dispositivos de ACM en TC, pasando por el uso de ECMO en TP o de diálisis periódica en TR. La propia patología terminal cardíaca, pulmonar y renal puede asociarse a estas alteraciones. Esto fue lo que nos preguntamos y los resultados observados es que ya en el periodo pre-TC los pacientes con patología isquémica poseen niveles inferiores de IgG, IgG2 e IgG3 y mayores de C3 y C4 respecto a los enfermos con cardiopatía dilatada. Con estos resultados puede decirse que los pacientes con MIIS se encuentran en peor estado que los MIDI. La isquemia desencadena una serie de eventos asociados con la rama innata del SI. Se produce una activación de factores del endotelio, liberación de óxido

nitroso (NO) que provoca dilatación y un aumento en la permeabilidad vascular. Esta dilatación favorece el reclutamiento de células inflamatorias y la activación del complemento, pudiendo explicar el aumento de estas moléculas en sangre. El posible rol de este perfil inmunológico con eventos clínicos post trasplante deberá evaluarse en futuros estudios. Aunque no es objetivo de esta tesis, se ofrece información preliminar sobre el posible rol del sistema de complemento en pacientes con cardiopatía isquémica.

Que los pacientes con MIDI posean niveles significativamente superiores de IgG podría deberse a la activación celular y mediada por anticuerpos, que se relaciona con un aumento de la reactividad humoral contra el propio tejido cardíaco¹⁸⁴.

En TP encontramos que los pacientes con FQ y FPI poseen niveles de IgG superiores a los pacientes con EPOC. La FQ se caracteriza por la presencia de moco espeso que facilita la colonización de bacterias. Estos pacientes tienen infecciones recurrentes que provocan el deterioro progresivo de la función pulmonar. Estas infecciones recurrentes y severas podrían explicar una hiperactivación de inmunidad humoral y conducir a niveles más altos de IgG como un mecanismo compensatorio de respuesta a la infección. En varios modelos de patología humana se describen niveles mayores de IgG relacionados con mal pronóstico, un ejemplo es la hipergammaglobulinemia en pacientes con cirrosis o en la infección VIH¹⁸⁵.

Por otro lado, es conocida la susceptibilidad a infecciones de los pacientes con EPOC, que en muchos casos usan corticoides inhalados o sistémicos de forma crónica, que puede que conduzcan al menor nivel de IgG observado en este subgrupo de pacientes. En futuros estudios será interesante ver si la presencia de niveles más bajos de IgG desde el momento previo al trasplante predispone a este subgrupo de pacientes a mayores tasas de infección pre y postrasplante.

Estudios han asociado cifras elevadas de Igs, paradójicamente, a una evolución desfavorable en FQ, como se comenta más arriba para otras enfermedades. Entre las características de la FQ se encuentra el excesivo acumulo de neutrófilos en las vías aéreas y la hiperglobulinemia, que podría ser el reflejo de la producción de citoquinas como IL-1, IL-6 e IL-8, o TNF- α ¹⁸⁶. Los pacientes con FQ muestran valores significativamente superiores de IL-10 respecto a los EPOC. Estos resultados coinciden

con los de otros estudios donde los niveles de IL-10 e IL-8 en FQ están aumentados debido al deterioro progresivo de la función pulmonar por la masiva infiltración de neutrófilos y linfocitos T que producen una desregulación en las vías inflamatorias locales¹⁸⁷. Estos datos confirman la hipótesis de que cuando un paciente entra en lista de espera su estado de salud está inmunocomprometido y abre las puertas para identificar perfiles inmunológicos pretrasplante de riesgo en estos pacientes.

Del análisis de las cinéticas de las subpoblaciones B se refleja que tras el TC se producen diferencias cualitativas y cuantitativas en la distribución, siendo éstas más frecuentes en cifras absolutas que en porcentajes. En el punto pre-TC, los pacientes poseen mayores frecuencias de linfocitos B respecto a los CS, pero no es así en valores absolutos, donde las cifras son inferiores. Observamos que en ese punto el valor de linfocitos es muy inferior al de CS (TC: $1486,81 \pm 714,96 * 10^3/\mu\text{l}$ vs. CS: $2378,61 \pm 631,71 * 10^3/\mu\text{l}$; $p=0.00$) explicando así la disparidad, ya que a pesar de que los valores en porcentaje son mayores, el recuento absoluto es menor.

A la semana post-TC la población de linfocitos B experimenta un máximo valor, en recuento absoluto y en porcentaje, disminuyendo de manera progresiva hasta el año y situándose en valores inferiores, tanto del punto pre-TC como del CS.

En el resto de subpoblaciones apenas se observa variación porcentual en su distribución. Sí se observan en la población B *exhausted*, donde los porcentajes son siempre superiores a los CS, haciéndose significativos al año. Estudios evidencian que esta población triple negativa se incrementa en número y frecuencia con el envejecimiento y con la activación crónica del SI¹⁸⁸. Se ha encontrado elevada en autoinmunidad, como LES¹⁸⁹ donde los valores son superiores a población sana y en artritis reumatoide en pacientes con peor respuesta¹⁹⁰. De forma reciente se ha encontrado también expandida en pacientes con cáncer de pulmón¹⁹¹. No está claro cómo surgen estas células. Se entiende que pasan por varios procesos de activación e hipermutación, teniendo como resultado la pérdida de marcadores de superficie. Aunque otras teorías se basan en falta de maduración hacia CD27 o una reacción defectuosa en el centro germinal. En futuros estudios se deberá analizar cuál podría ser el rol fisiopatológico de estos niveles más altos de células B *exhausted* en trasplante.

Los porcentajes de B de memoria SCI se mantienen por debajo de los CS en el estudio pre-TC, siendo significativos si los comparamos con el máximo valor a los tres meses post-TC. La población B memoria que sólo expresa IgD experimenta un aumento en su porcentaje a lo largo del tiempo, logrando un valor máximo al año de estudio. Esta cifra es significativamente superior respecto a CS en pre-TC, 6 meses y año post-TC.

En cuanto a cifras absolutas, todas las poblaciones de estudio muestran la misma cinética, experimentando un máximo a la semana y un mínimo que siempre se sitúa entre los 6 meses y el año post-TC. Además, los valores de los linfocitos B en CS son superiores a todas ellas, exceptuando la población B memoria IgD, donde los TC cifras superiores pero no significativas. Si aceptamos la premisa que hemos comentado en la introducción acerca del olvido del marcador IgM para la identificación de memoria, podemos decir que en general se experimentaría un aumento de memoria SCI durante el seguimiento, siendo la única población donde los valores absolutos son superiores a los mostrados por los CS.

Estos datos reflejan el estado de inmunosupresión en el periodo postrasplante, evidenciando la falta de reconstitución celular y asociando los mayores niveles de célula B a las máximas dosis de inmunosupresores, que se administran en torno a la semana y 14 días postrasplante. Estudios muestran que existe un balance entre la rama T y B, y el tratamiento inmunosupresor post-TC afecta directamente a la población CD3⁺⁶⁹. El efecto deletéreo de esta población provocaría un aumento en el fenotipo B, responsable de ese máximo a la semana postrasplante. La no reconstitución celular al año post-TC puede explicarse como resultado de la generación reducida de linfocitos T y las citocinas producidas por éstos, provocando defectos intrínsecos en la activación y cambio de isotipo de los linfocitos B. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que tras el trasplante el compartimento celular sufre alteraciones, tanto en frecuencia como en recuento absoluto, y difieren de los valores basales observados en población sana.

El estudio en recuento absoluto nos lleva a resultados menos sesgados, aunque las frecuencias relativas evidencian que se produce una alteración en la homeostasis y distribución del linfocito B postrasplante cardíaco.

Las células B son capaces de producir respuestas inflamatorias mediante la producción de citoquinas como TNF- α , IL-6 o la linfoxina- α , o desencadenar una respuesta

reguladora a través de la producción de IL-10 e IL-35. De forma general, cualquier subpoblación B con capacidad reguladora puede ser llamada B reguladora ya que todavía no hay consenso sobre su definición ni clasificación^{192,193}. En la última década han sido descritas en enfermedades autoinmunes, infección y cáncer¹⁹⁴, pero por lo que suscitaron interés en nuestro trabajo, es porque se han definido como las responsables de proporcionar tolerancia en TOS⁵⁷. En este estudio decidimos establecer los niveles basales mediante la cuantificación en CS para poder establecer una comparativa.

Hemos observado que los receptores en el estudio pre-TC poseen frecuencias inferiores en la población B10, y menores valores absolutos de B10, B reguladoras y transicionales respecto a los CS. Como hemos comentado previamente, los pacientes cuando entran en lista de espera para trasplante presentan alteraciones en su estado inmunológico y activación crónica. Además, como hemos observado en la cinética, la población B naïve pre-TC presenta niveles significativamente inferiores respecto a los CS, coherente con lo observado en las poblaciones transicionales. Lo mismo se observa en TR, donde además poseen menores valores de B reguladoras y B de memoria reguladora. Por el contrario, no se aprecian variaciones entre tipo de intervención, mostrando un perfil similar entre TC y TR.

¿Estas alteraciones en la distribución linfocitaria están asociadas a una clínica determinada? Al analizar los 104 pacientes TC que desarrollaron infecciones durante el periodo de seguimiento, observamos que en el pre-TC poseen porcentajes inferiores de linfocitos B memoria CCI respecto a los no infectados. El incremento basal de células de memoria CCI se asocia a un efecto protector antiinfeccioso en los pacientes. Las células B memoria CCI han experimentado procesos de maduración y de cambio de isotipo para la producción de anticuerpos específicos. Sarmiento et al. en trabajos previos han demostrado que niveles más altos de IgG pre-TC se asocian con un menor riesgo de desarrollo de infecciones¹⁹⁵. Ambos hallazgos se relacionan de forma coherente. El hecho de que en el pretrasplante la frecuencia de esta población sea menor podría estar condicionando el estado de inmunocompetencia del receptor. Que el porcentaje de células B memoria CCI actúe como posible biomarcador de riesgo de infección es un hallazgo muy interesante ya que podría ser parte de una firma inmunofenotípica de riesgo de infección desde antes del trasplante, con las posibles consiguientes medidas

protectoras que se podrían evaluar en futuros estudios, si este biomarcador se valida adecuadamente en estudios multicéntricos. Otro marcador elevado en el punto pre-TC fueron las plaquetas. Las enfermedades contagiosas causadas por virus o bacterias suelen la causa más común de una cantidad de plaquetas altas en la sangre

Los linfocitos aparecen disminuidos en el punto 7d y elevados los leucocitos, también a los tres meses post-TC. No hay que olvidar que la respuesta adaptativa CD3+ está inhibida mediante fármacos, mientras que la innata permanece activa, provocando un desequilibrio hacia la rama mieloide. Cuando estudiamos el punto 30d, los pacientes que desarrollan evento infeccioso pasada esa fecha presentan frecuencias mayores de CD19+CD27- y menores de B memoria. En general, los pacientes con infecciones parecen tener menos memoria y más células B naïve o inmaduras, encargadas de desviar la respuesta hacia un fenotipo regulador y no activador. Una vez más se destaca el posible rol de biomarcador que podría tener el inmunofenotipo de célula B, en este caso tras el trasplante. Habrá que analizar si un paciente con células B memoria CCI que tiene niveles bajos en el estudio pre-TC y que en el postrasplante inmediato exhibe niveles más bajos de células B de memoria está en mayor riesgo de desarrollar infecciones.

En cuanto a la asociación con la variable clínica de rechazo agudo celular en TC, el porcentaje de células B naïve IgM a la semana y CD19+CD27- a los 6 meses están significativamente disminuidos, pero con las células B memoria ocurre lo contrario. Es lo opuesto a lo observado cuando se analiza la aparición de evento infeccioso. Podemos decir que los pacientes con rechazo estarían desplazados hacia una respuesta más activada y madura. Un estudio realizado en trasplante de riñón asoció mayores porcentajes de B memoria CCI pretrasplante a mayor riesgo de rechazo¹⁹⁶ y también se han visto aumentadas en pacientes con LES¹⁸⁹. Estos resultados sientan las bases para iniciar una validación en estudio multicéntrico del estado de maduración de célula B como biomarcador de rechazo agudo celular en TC. Resulta interesante encontrar un posible rol de linfocito B en la patogenia de un evento que clásicamente es más asociado con alteraciones aloinmunes mediadas por célula T. Tratando de explorar más en profundidad esta “atípica” asociación, en cuanto al depósito de factores de complemento C3d y C4d, los pacientes con rechazo celular y fijación de C4d tienen un fenotipo basal asociado diferente a los que no presentan depósitos. Los mayores niveles

de linfocitos B de memoria CCI y menores de SCI se asocian a un perfil inmunológico más potente e incluso mayor posibilidad de daño crónico del injerto.

Respecto al fenotipo B regulador, los pacientes con TC que sufrieron algún episodio de rechazo durante el periodo de seguimiento mostraron valores significativamente inferiores de la población B10, principal productora de IL-10. Esto implica que aquellos pacientes que no mostraron signos de rechazo poseen un mayor de células B10 con capacidad antiinflamatoria que intervendría en los mecanismos inmunomoduladores de tolerancia. Esto puede resultar otro atractivo foco de interés para ampliar nuestras observaciones del rol del linfocito B en procesos de inducción de tolerancia o de predisposición a rechazo.

Además, los pacientes con rechazo también mostraron menores cifras de células B transicionales, también en frecuencias. Actualmente no se sabe si el fenotipo regulador pertenece a un linaje en concreto o es el ambiente y la epigenética la que hace que se desarrollen de ese modo. Sí parece haber una relación entre las células B transicionales y las naïve, pues las segundas serían la evolución de las primeras.

La enfermedad vascular del injerto (EVI o CAV) es un tipo de rechazo crónico que se produce a largo plazo y para el cual todavía se desconocen los mecanismos desencadenantes. Al estudiar el fenotipo B regulador en pacientes trasplantados de larga duración con diagnóstico de EVI nos encontramos con que éstos poseen valores en porcentaje significativamente superiores de B10 y Transicionales respecto a los pacientes trasplantados control. En valores absolutos los niveles de ambas poblaciones sólo son significativamente inferiores respecto a los CS. Que los pacientes con EVI tengan altos niveles de esta población podría implicar un estado de activación constante que trataría de compensarse mediante la población B10. En modelos de inflamación crónica las poblaciones B reguladoras se han encontrado elevadas¹⁹⁷. Eso nos hace pensar en un mecanismo compensatorio. El estado inmunológico de los pacientes con EVI es complicado, pues llevan años con terapia inmunosupresora que debilita al paciente y enmascara los síntomas clínicos. Los mecanismos que se ponen en marcha en el desarrollo de rechazo crónico todavía no están claros. Al igual que los CD4+, las células B pueden producir un amplio espectro de citoquinas bajo condiciones de inflamación. Otra citocina involucrada en el mecanismo B regulador es el TGF- beta,

factor que se ha encontrado elevado en casos de fibrosis y que podría estar implicado en el mecanismo de desarrollo de EVI.

Lo complejo de las células B es que regulan tanto la rama innata como la adaptativa del SI. En general el perfil mostrado en los pacientes TC con rechazo muestra una desregulación en las proporciones, debido a la disminución de B naïve y un aumento de células B maduras. En un estudio en pacientes tolerantes trasplantados de riñón se ha observado una dominancia de linfocitos B en sangre, con más células B naïve y transicionales y menos memoria. Esta firma parece que podría marcar la diferencia entre tolerancia y rechazo en modelos preclínicos de trasplante¹⁹⁸ y sigue observándose en pacientes estables sin rechazo doce meses después de la intervención¹⁹⁹. Además, estos pacientes tolerantes también muestran una mayor presencia de células B reguladoras. Podría deberse a una estimulación previa por BAFF que contribuiría a una respuesta aloinmunitaria más intensa, tanto desde el punto de vista del reconocimiento antigénico por parte de las CPA como para la producción de DSA por parte de las células B memoria o plasmáticas. Las células B que escapan al proceso de selección negativa generan aloanticuerpos de alta afinidad caracterizados por ser particularmente dañinos para el injerto.

Uno de los mecanismos más importantes de control del compartimento B es BAFF. Se ha establecido que BAFF es capaz de mantener el equilibrio entre las respuestas proinflamatorias y reguladoras llevadas a cabo por los linfocitos B.

También hemos observado una correlación negativa entre los niveles de BAFF y las poblaciones B reguladoras. Las células B reguladoras en pacientes TR tolerantes quienes han interrumpido la inmunosupresión, el fenotipo tolerante está caracterizado por un incremento en el ratio de transicionales a maduras¹⁷⁸.

En esta tesis se evalúa por primera vez el posible papel de BAFF como biomarcador de riesgo de rechazo e infección postrasplante en los tres tipos de trasplante estudiados, TC, TP y TR. Los niveles de BAFF deben estar bien regulados porque concentraciones anormales de esta citoquina afectan directamente a las funciones de la célula B y han sido observados en diferentes enfermedades inflamatorias e infecciones²⁰⁰. En el marco del proyecto GAMA realizado en Mozambique, estudiaron una cohorte de 85 pacientes con infección primaria por VIH que comprende a pacientes en la fase aguda (pre-

seroconversión) y la fase reciente (post-seroconversión). A partir de 49 citocinas, encontraron dos, BAFF y MCP-1, positivamente asociadas al grupo pre-seroconversión. Es la primera vez que se describe un perfil de citocinas capaz de diferenciar estos dos estadios de la primoinfección²⁰¹. La implicación de BAFF en la infección VIH ha sido establecida como un equilibrio entre los linfocitos T efectores y T reguladores. Un exceso de BAFF desplazaría el equilibrio hacia un fenotipo T efector²⁰². En trabajos previos observamos que un exceso de BAFF favorecía la progresión a SIDA en pacientes con infección VIH y tenían peor pronóstico²⁰³. Por otra parte, también lo observamos elevado en pacientes con IDVC. El trasplante no deja de ser una inmunodeficiencia secundaria, así que decidimos trasladar la investigación a este campo. Los resultados en la cinética de BAFF reflejan semejanzas en los tres tipos de TOS, mostrando valores elevados en el punto pre-TOS y con un mínimo valor a los 7d. Estos resultados son opuestos a la cinética de célula B en TC, donde las cifras más elevadas de linfocitos B se encuentran a los 7d postrasplante. Trabajos recientes muestran resultados similares donde los niveles de BAFF son característicamente altos cuando los pacientes tienen linfopenia B y gradualmente decrecen mientras los niveles celulares retornan a valores normales^{204,205}. En nuestro estudio también hemos encontrado una correlación negativa entre los niveles de BAFF y los valores de célula B, tanto en absolutos como en frecuencias relativas.

La cinética de BAFF tiene el mismo comportamiento en los tres tipos de TOS, no observándose diferencias significativas entre ellos ni con los CS en el punto pre-TOS. Lo mismo ocurre con la cinética de IL-10, se comportan del mismo modo y no existen variaciones significativas entre TOS. Por el contrario, los niveles pre-TOS son significativamente muy superiores a los mostrados por los CS. En población sana los niveles de esta citoquina son prácticamente indetectables²⁰⁶. Los niveles altos de IL-10 en el pre-TOS podrían deberse a un mecanismo compensatorio para suprimir las respuestas dañinas por regulación del balance Th1/T17 y de forma directa disminuyendo la respuesta inflamatoria del SI innato, ya se encuentra elevada en situaciones de inflamación crónica²⁰⁶.

La ausencia de BAFF o de BAFF-R resulta en linfopenia B y su exceso ha sido relacionado con linfocitos B autorreactivos o desórdenes autoinmunes²⁰⁷. La sobreexpresión de

BAFF induce una expansión dramática de células B activadas, particularmente de la zona marginal, provocando hipergammaglobulinemia, producción de anticuerpos y deposición de inmunocomplejos, además, estudios recientes han demostrado que BAFF puede promover la activación T, proliferación y diferenciación²⁰⁸. Bloom et al. han demostrado recientemente que los niveles de BAFF postrasplante en pacientes con rechazo renal son más altos que en los controles, dejando evidencia de que niveles elevados de BAFF generan una desregulación ambiental que promueve la expansión de células B alorreactivas²⁰⁹.

Un estudio en 143 TR ha asociado la producción de anticuerpos anti-HLA específicos de donante (DSA) con niveles altos de BAFF²¹⁰. Los niveles elevados de BAFF se han asociado a una reacción anómala por parte de los linfocitos, escapando a la señales de control y siendo capaces de producir anticuerpos DSA. Niveles elevados de DSA están implicados en mecanismos de rechazo en TOS, siendo una de las técnicas de titulación y monitorización postrasplante. Nuestro estudio evidencia que valores de BAFF elevados en el pre-TOS (tanto en TC, TR y TP) se asocian con un mayor riesgo de rechazo postrasplante. Además, cuando se estudian los niveles de BAFF en pacientes con EVI en diferentes grados y en pacientes con depósito de C4d en sus biopsias, los resultados también son significativamente elevados en comparación a sus respectivos controles. La sobreexpresión de BAFF induce una expansión de células B activadas, particularmente de la zona marginal, además de hipergammaglobulinemia, producción de autoanticuerpos y depósito de inmunocomplejos²⁰⁹. Estudios previos en biopsias de trasplantados renales con rechazo agudo han evidenciado esta correlación entre BAFF y el depósito de C4d²¹¹.

En conclusión, los niveles de BAFF están asociados a una sensibilización pre-TOS y son útiles como valor predictivo de la pérdida del injerto. Esta observación es una de las observaciones sistemáticas en los tres TOS evaluadas de mayor relevancia del trabajo y como otros resultados antes comentados abre las puertas a esta citocina para su evaluación multicéntrica como biomarcador de rechazo. En TC y TP estudios recientes del grupo que dirige esta tesis han demostrado esta asociación de niveles altos de BAFF con riesgo de rechazo agudo^{126,127}. El significado clínico de BAFF se ha demostrado en pacientes en los cuales se administra Belimumab, un anticuerpo bloqueante de BAFF

para el tratamiento de LES. La neutralización de los altos niveles de BAFF conlleva una reducción de los niveles de autoanticuerpos patogénicos y una mejora clínica de la enfermedad^{212,213}.

De manera independiente, los TC que desarrollan rechazo poseen en el pre-TC valores elevados de plaquetas, Hb y Hto. El rechazo humoral implica la activación de vías independientes de complemento, pudiéndose activar células endoteliales con expresión de moléculas de adhesión y la aparición de infiltrados celulares de leucocitos y plaquetas⁶².

Además, en pacientes TP se han encontrado valores superiores de IgG pre-TP en rechazadores, que se mantienen elevados también a los 7d postrasplante. En TR rechazadores se han encontrado niveles altos de IgA al mes. Estudios han evidenciado que niveles elevados de IgA en enfermos renales crónicos están asociados a un mayor riesgo y mayor morbilidad²¹⁴. Estos resultados podrían asociarse a que las células B de los pacientes con episodios de rechazo han sido activadas, mostrándose así niveles inferiores de B naïve y superiores de linfocitos B memoria que han sufrido proceso de hipermutación somática y cambio de isotipo, y con los niveles elevados de BAFF que favorece la aparición de todos estos cambios.

Es interesante observar que también hubo una asociación significativa entre niveles más altos de BAFF pre-TOS y el desarrollo de infecciones en el análisis bivalente. Múltiples estudios han evidenciado niveles elevados de BAFF en infecciones, pero éste es el primero en situarlo como marcador predictivo de riesgo de infección. BAFF se une a tres receptores expresados por células B, BAFFR, TACI y BCMA. Las mutaciones en TACI y BAFFR han sido descritas como causantes de cuadros asociados a deficiencias de anticuerpos²¹⁵. Numerosos estudios, entre los que figuran Carbone et al. han demostrado un mayor riesgo de desarrollo de infecciones en pacientes con hipogammaglobulinemia IgG.

Resulta curioso que en dos situaciones que parecen opuestas a primera vista, como es el desarrollo de infecciones y rechazo, se encuentren valores elevados de BAFF. En los estudios de BAFF aparecen muchas inconsistencias que hay que resolver. Valores altos de BAFF después de la administración de anti células B deben ser interpretados con precaución, puesto que, los niveles altos de BAFF pueden deberse a la falta de absorción,

ya sea por falta de células o por defectos en sus receptores, o con un retraso en la reconstitución celular del compartimento B^{216,204}. BAFF es característicamente alto cuando los pacientes tienen linfopenia y gradualmente decrecen conforme el número de linfocitos B circulantes vuelven a la normalidad^{200,217}. Además, la linfopenia B postrasplante generalmente se asocia con un incremento de los niveles de BAFF. Altos niveles de BAFF parecen predecir una reconstitución más rápida del compartimento B observada en pacientes con rechazo. Conocer mejor las vías de señalización para poder actuar como intervención inmunomoduladora sería clave para seguir con las investigaciones.

Monitorizar los niveles de BAFF postrasplante como marcador de rechazo mediado por anticuerpos podría ser una de las nuevas formas de identificación de riesgo de rechazo, y establecer puntos de corte pretrasplante para identificar aquellos pacientes con un mayor riesgo de desarrollo de rechazo e infección.

También hemos detectado mayores niveles de IL-10 pre-TP en pacientes con desarrollo de infecciones postrasplante. La IL-10 es secretada en grandes cantidades por tejidos mucosos como el intestino o los pulmones donde las respuestas inmunológicas indeseadas o incontroladas pueden causar daños graves. El exceso de esta citocina podría estar inhibiendo células dendríticas, T CD4+, neutrófilos, NK y macrófagos y favoreciendo la aparición de infecciones en estos pacientes²¹⁸. Aquellos pacientes que tuvieron evento infeccioso a partir de la semana mostraron menores valores de linfocitos. Por el contrario, poseen mayores valores de leucocitos. En este punto de estudio el paciente ya se encuentra con terapia inmunosupresora, este actúa sobre la rama adaptativa, lo que podría explicar el aumento de leucocitos y la disminución de linfocitos en pacientes con infecciones.

La respuesta del organismo ante eventos infecciosos es compleja e implica varios sistemas de control, por todo ello establecer un único marcador de riesgo de desarrollo de infecciones es complicado. La idea es monitorizar a los pacientes y la elaboración de un perfil de marcadores que identifiquen pacientes con riesgo alto.

Un ensayo comercial aprobado por la FDA para uso clínico en monitorización postrasplante es *IMMUKNOW*²¹⁹. En este ensayo, el ATP producido por los T CD4+ tras estimulación con un mitógeno policlonal es medido. Refleja la reactividad y además, la

competencia inmunológica del paciente. Los datos más consistentes se han observado como predictor del riesgo de infección en pacientes TR²²⁰, TC²²¹ y hepáticos²²². Pero este ensayo no es específico y los resultados de distintos ensayos clínicos para predecir la aparición de rechazo son contradictorios²²³.

Decidimos analizar tanto los niveles basales de ATP en las células como el ATP tras estimular. Para establecer el nivel de respuesta decidimos analizar la ratio ATP e/ATPb. Al analizar la cinética se observa que mientras los niveles de ATPb se mantienen más o menos estables conforme aumenta el tiempo postrasplante, mientras que las cifras de ATPe aumentan progresivamente, al igual que la ratio. Esto podría indicar que con el paso del tiempo las células CD4+ se vuelven más reactivas a medida que aumenta el tiempo postrasplante. Trabajos previos han mostrado niveles significativamente más bajos de ATP en pacientes con infección observándose, hasta en un 62% de los pacientes, una respuesta inmunitaria débil. En rechazo hay gran disparidad de resultados, llegándose a visualizar ligeramente elevados en pacientes con rechazo agudo, pero no se ha establecido ningún punto de corte.

Los niveles de ATPb en pacientes con EVI están significativamente elevados si se comparan con pacientes sin EVI, al igual que se ha observado en pacientes con rechazo no EVI, dato que refleja que estos pacientes estarían más activados o reaccionan de una forma más fuerte sin necesidad de estímulo. Esto debemos confirmarlo en estudios con mayor número de pacientes. De confirmarse, sería de mucho interés ya que aún no se conoce bien la patogenia que lleva al EVI, una importante barrera de supervivencia a largo plazo en TC.

Por el contrario, en pacientes que han desarrollado episodios infecciosos los niveles de ATPe son inferiores a los que no desarrollaron infecciones. Este hecho podría indicar que las células T CD4+ son menos reactivas, o que los niveles de inmunosupresión en estos pacientes es superior. Esto favorecería la aparición de eventos.

Actualmente el kit está indicado para cuantificar el estado de inmunosupresión (reflejaría los niveles de inmunosupresores) y ajustar la terapia de forma individual, pero, como se ha comentado previamente, los datos en cuanto a rechazo son confusos. Que los pacientes con rechazo, EVI o no EVI, tengan una mayor reactividad,

independientemente del uso de inmunosupresión, refleja una mayor activación celular o resistencia al tratamiento.

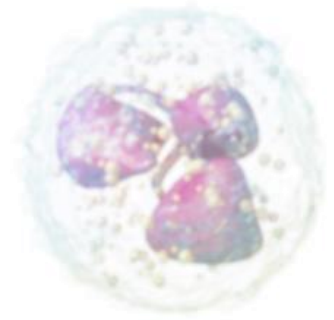
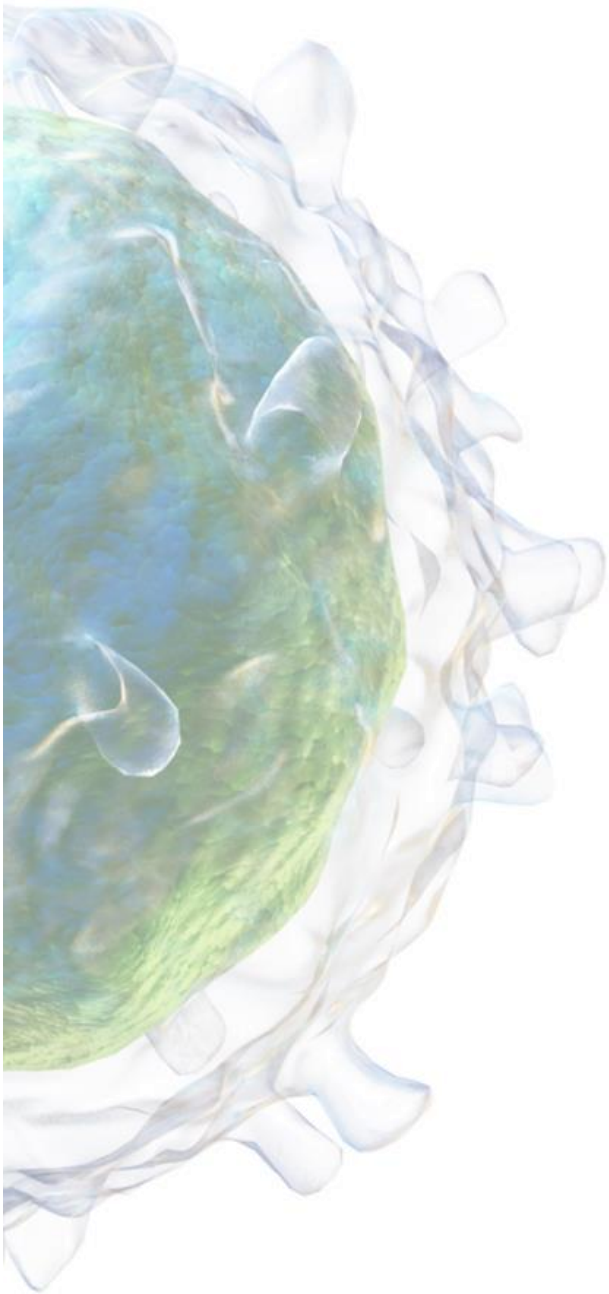
Un estudio retrospectivo monitorizó la producción de ATP antes y después del TR en 64 receptores y lo comparó con el tipo de inmunosupresión, dosis y efectos adversos con infecciones o rechazos, donde se observaron cifras elevadas de ATP pre-TR en pacientes con más episodios de rechazo, mientras que los pacientes con cifras bajas tenían un mayor riesgo de infecciones. Los pacientes que recibieron tratamiento para el rechazo mostraron un descenso en las cifras de ATP a los cinco días de inicio del tratamiento²²⁰.

Globalmente la tesis presenta una descripción panorámica original de la cinética de distintas subpoblaciones B y productos solubles en distintos TOS.

Se proponen posibles biomarcadores de riesgo de infección, como por ejemplo los niveles más bajos de células B de memoria CCI en el pre-TC.

Se describe el posible rol de BAFF como biomarcador de riesgo de rechazo e infección en tres TOS.

Cuántos más datos sobre monitorización inmunológica se consigan, más claro nos será entender el mecanismo involucrado durante la inducción y mantenimiento de la tolerancia y guiar mejor en la inmunosupresión logrando una terapia individualizada. Todo ello es un buen punto de partida para la validación de estos biomarcadores para un eventual uso clínico de los mismos. Quizás contribuyan en el futuro a uno de los sueños de la inmunología del trasplante.



VI. CONCLUSIONES

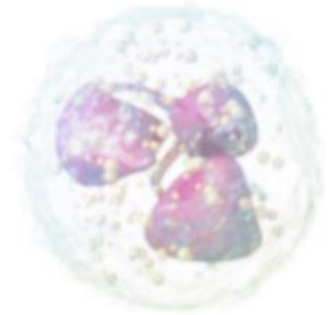
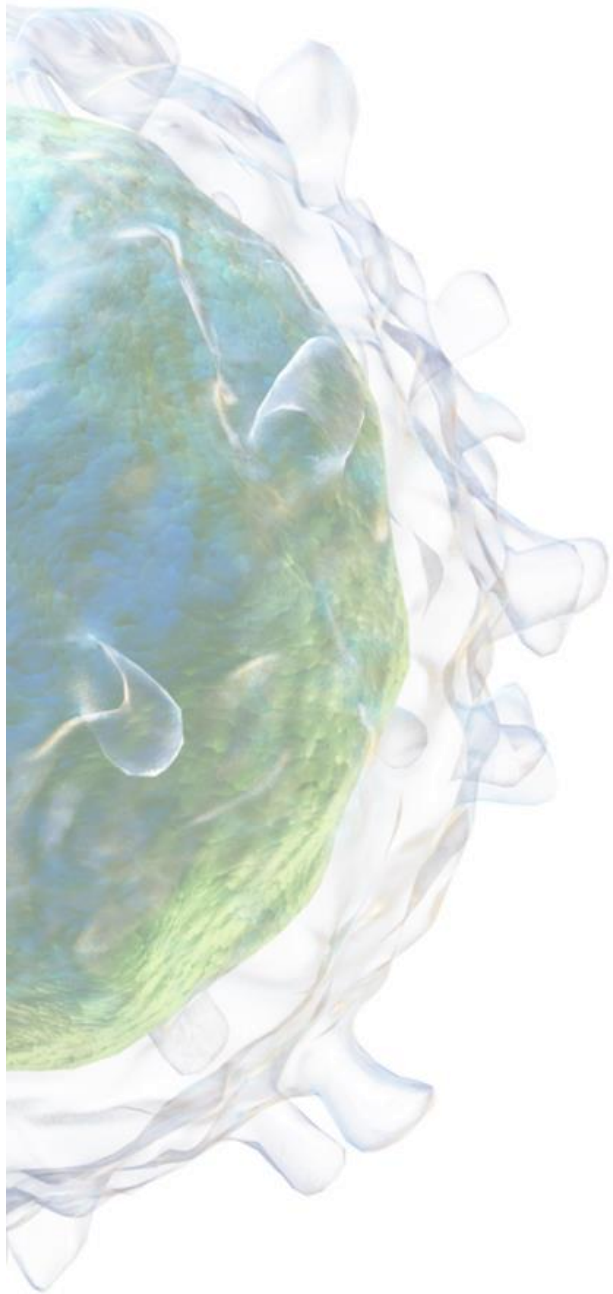


1. Se detectan alteraciones inmunofenotípicas de linfocitos B en pacientes con patología terminal cuando son evaluados al entrar en lista de espera para trasplante de cardíaco y renal, influyendo la etiología del trasplante o el uso de asistencia circulatoria mecánica en el caso de trasplante cardíaco.
2. En el estudio pretrasplante cardíaco se observan valores más bajos de distintas subpoblaciones de linfocitos B en comparación con las cifras en población sana.
3. A los 7 días postrasplante cardíaco se observa un aumento global de linfocitos B totales. Las cifras de linfocitos B no llegan a reconstituirse pasado el año postrasplante, quedando por debajo de las mostradas tanto en el pretrasplante como en los controles sanos.
4. Los pacientes trasplantados cardíacos en general, cardíacos con enfermedad vascular del injerto y trasplantados renales muestran menores valores de células B reguladoras pretrasplante comparados con los controles sanos.
5. Porcentajes pretrasplante cardíaco de células B de memoria con cambio de isotipo inferiores al 39%, así como porcentajes de linfocitos B naïve superiores al 70% y de células B de memoria inferiores al 25% al mes del trasplante cardíaco, son factores de riesgo de desarrollo de infecciones severas.
6. Los pacientes trasplantados cardíacos con rechazo muestran menores valores en las poblaciones B reguladoras y CD19+CD27- y mayores de B memoria.
7. Concentraciones séricas elevadas de BAFF pretrasplante son un factor de riesgo de desarrollo de infecciones severas post trasplante cardíaco y renal y de infecciones recurrentes en trasplante pulmonar, así como de rechazo agudo postrasplante en todos los trasplantes analizados.
8. Valores de IL-10 pretrasplante superiores a 29 pg/ml son un factor de riesgo de desarrollo de infecciones postrasplante pulmonar.

9. Los pacientes trasplantados cardíacos con EVI muestran valores elevados de BAFF y ATP basal. También poseen mayores cifras de células B reguladoras respecto al resto de trasplantados cardíacos.

10. En trasplantados cardíacos con rechazo y depósito de C4d en biopsia endomiocárdica se observa un mayor nivel de células B de memoria con cambio de isotipo y menor de memoria sin cambio de isotipo, además de mayores niveles de BAFF.

11. Se proponen varias alteraciones inmunofenotípicas de linfocito B y de factores solubles asociados como candidatas a ser evaluadas como biomarcador de infección y rechazo para uso clínico en distintos trasplantes de órgano sólido.



VII. BIBLIOGRAFIA



Bibliografía

1. Hardy, J.D., et al., Lung Homotransplantations in Man. *Journal of American Medical Association*, 1963. 186(12): p.1065-1074.
2. Lund, L.H., et al., The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report- 2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant*.2017 Oct; 36(10): 1037-1079.
3. Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. Datos del registro mundial de trasplantes, 2017.
4. Recommendations for nonheart beating organ donation: a position paper by the Ethics Committee, American College of Critical Care Medicine, Society of Critical Care Medicine. *Crit Care Med*. 2001; 29(9): p. 1826-31.
5. Memoria de actividad ONT. Donación en asistolia. Informe actividad. España 2016
6. Memoria de actividad. Corazón 2016. ONT.
7. Delgado, M., et al., Avances en asistencias circulatorias mecánicas. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61(Supl 2): p. 25-32.
8. Simon, D., et al., Left Ventricular Assist Device Related Infection: Treatment and Outcome. *Clinical Infectious Diseases*. 2005. 40(8): p. 1108-15.
9. Registro español de trasplante pulmonar. Memoria anual 2016. ONT. Resultados 2001-2016.
10. Hardy, K.A, et al., Obliterative bronchiolitis in children. *Chest* 1988; 93 (3):460-466.
11. Ussetti G. Introducción al trasplante Pulmonar. Monografía Trasplante Pulmonar. Neumomadrid. 2012.
12. Román, B. A., et al. Normativa para la selección de pacientes candidatos a trasplante pulmonar. Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica. *Archivos de Bronconeumología* 2011. 47(6): 303-309.
13. Monchaud, C., et al., Pharmacokinetic Optimization of Immunosuppressive Therapy in Thoracic Transplantation: Part I *Clin Pharmacokinetic* 2009; 48 (7): 419-462.
14. Chambers, D.C., et al., The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report.

15. 2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. International Society for Heart and Lung Transplantation.
16. Gómez-de-Antonio, D., et al., Clinical lung transplantation from uncontrolled non-heart-beating donors revisited. *J Heart Lung Transplant*. 2012; 31: 349-53.
17. Warnecke, G., et al. Normothermic perfusion of donor lungs for preservation and assessment with the Organ Care System Lung before bilateral transplantation: a pilot study of 12 patients. *Lancet*. 2012; 380: 1851-8.
18. Kennedy, V.E, et al. Bronchoalveolar lavage as a tool to predict, diagnose and understand bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant*. 2013; 13(3): 552-61.
19. Chia, E., et al. Imaging features of intrathoracic complications of lung transplantation: What the radiologists need to know. *World J Radiol*. 2017; 9(12): 438-447.
20. Kasiske, B.L, et al. The evaluation of renal transplant candidates: clinical practice guidelines. *Am J Transplant* 2001; 1(Supl 2): 1-95.
21. Guías trasplante renal ONT 2016.
<http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20Renal.pdf>
22. Real Academia Española y Asociación de Academias de la Lengua Española (2014). «trasplante». *Diccionario de la lengua española (23.ª edición)*. Madrid: Espasa. ISBN 978-84-670-4189-7.
23. Roitt, I.M, et al. *Encyclopaedia of immunology*. 3rd edition. San Diego: Editorial Academic Press, 1992.
24. Janeway, C.A., et al. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2ª edición. Barcelona: Editorial Masson, 2003
25. Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 4ª Edición. New York: Raven Press, 1998
26. Yusabai, A. et al., Risk Factors for Acute Rejection in Heart Transplanted Recipients. CA Meeting: 2013 American Transplant Congress. Abstract number: C1435.
27. Parham, P. *The Immune system*, fourth edition. Garland Science. 2014
28. Regueiro, J.R, et al. *Inmunología: biología y patología del sistema inmune*. 3ª Edición. Madrid: Editorial médica Panamericana, 2002.
29. Sherman, L.A, et al. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 385-402

30. Simpson, E, et al. Minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:655-61.
31. Griffiths, G.M. The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 343- 348.
32. Benichou, G., et al. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 1992; 175: 305-8.
33. Sayegh, M.H, et al. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338: 1813-21.
34. Pietra, B.A. Transplantation immunology 2003: simplified approach. *Pediatr Clin North Am.* 2003; 50:1233-59.
35. Gould, D.S, et al. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today.* 1999; 20:77-82.
36. Trenado, A. et al., Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favour immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukaemia. *The Journal of Clinical Investigation.* 2003. 112 (11): 1688-1696.
37. Lin, C.M, et al. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant* (2016) 21(1):40–44.
38. Kaneku, H., et al. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant* (2013) 13(6):1541–1548.
39. Crotty, S., et al. Immunological memory in humans. *Semin Immunol* 2004. 16(3):197–203.
40. Colvin, R.B., et al., Antibody- mediated organ- allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 2005. 5:807-817.
41. Lopes-Carvalho, T., et al., Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* 2004, 197, 192–205.
42. Palanichamy, A., et al., Novel human transitional b cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J. Immunol.* 2009, 182, 5982–5993.
43. Meyer-Bahlburg, A.; et al., Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to baff-mediated homeostatic proliferation. *J. Exp. Med.* 2008, 205, 155–168.

44. Kamburova, E.G., et al. In vitro effects of rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am J Transplant* 2012; 12:341–350.
45. Griffin, D.O.; et al. A small cd11b (+) human b1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. *J. Exp. Med.* 2011, 208, 2591–2598.
46. Harris, D.P, et al. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *J Immunol* 2005; 174:6781–6790.
47. Wortel, C.M., et al. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. *Transpl Immunol.* 2017. 41: 1-9.
48. Yanaba, K.; et al., The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol.* 2009, 182, 7459–7472.
49. Wolf, SD., et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine.* 184 (6): 2271–2278.
50. Mizoguchi, A., et al., Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *The Journal of Experimental Medicine.* 186 (10): 1749–1756.
51. Coelho, V., et al., Rethinking the multiple roles of B cells in organ transplantation. *Organ Transpl* 2013, 18 (1): 13-21.
52. Firl, D.J., et al., A Paradigm Shift on the Question of B cells in Transplantation? Recent Insights on regulating the alloresponse. *Front Immunol.* 2017, 8:80.
53. Aybar, L.T., et al., Reduced CD5(+) CD24(hi) CD38(hi) and interleukin-10(+) regulatory B cells inactive anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis permit increased circulating autoantibodies. *Clin Exp Immunol.* 2015. 180 (2): 178-188.
54. Eibel H., et al., Defined Blocks in Terminal Plasma Cell Differentiation of Common Variable Immunodeficiency Patients. *J Immunol* October 15, 2005, 175 (8) 5498-5550.
55. Katz, S. I. et al., B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature.* 251 (5475): 550–551.
56. Chandrasekharan, D. et al., Achieving operational tolerance in transplantation: how can lessons from the clinic inform research directions? *Transpl Int.* 2013. 26(6): 576-589.

57. Nieto- Ríos, J.F., et al. Papel del linfocito B en el rechazo crónico del trasplante. *Med y laboratorio*. 2010. 16: 41-64.
58. Peng, B. et al., Regulatory B cells: the cutting edge of immune tolerance in kidney transplantation. 2018. *Cell Deth & Disease* 9 (109).
59. Lorenzo, V., et al., *Manual de nefrología clínica, diálisis y trasplante Renal*. 3ª Edición. Madrid: Editorial Harcourt Brace, 2002.
60. Kasiske, B., et al. The evaluation of renal transplant candidates: Clinical practice guidelines. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:1-34.
61. Arias, M., et al. *Manual de trasplante renal*. 1ª Edición. Madrid: Editorial Grupo 2 Comunicación Médica, SL, 2005.
62. Hammond, E.H., et al., Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. *J Heart Transplant* 1989. 8(6): 430-443.
63. Reed, E.F, et al. Acute antibody-mediated rejection of cardiac transplants. *J Heart Lung Transplant*. 2006; 25(2):153-159.
64. Tran, A., et al., Donor-specific HLA alloantibodies: impact on cardiac allograft vasculopathy, rejection, and survival after paediatric heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* (2016) 35(1):87–91.
65. Bando, K., et al., Obliterative Bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation: an analysis of risk factors and management. *Thorac Cardiovas Surg* 1995; 110:4-14.
66. Nankivell, B.J., et al., Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010. 363:1451-1462.
67. Almond, P.S., et al., Risk factor for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55:752-757.
68. Matas, A.J., et al., Chronic rejection. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4(8 suppl): 23-29.
69. Allison, A.C., Immunosuppressive drugs, the first 50 years and the glance forward. *Immunopharmacology*, 2000. 47 (2-3): 63-83.
70. Molnar, A.O., et al., Generic immunosuppression in solid organ transplantation: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2015. 22. 350:h3163
71. Taylor, A.L., et al., Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanism of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005. 56 (1): 23-46.

72. Biología de la inmunosupresión del trasplante de órganos. Ed. Novartis Farmacéutica. España. 2005.
73. Barnes, P.J., Glucocorticoids: pharmacology and mechanisms. 2011. Capítulo 2: 16-37. *Advances in Combination Therapy for Asthma and COPD*.
74. Barnes, P.J., Signal Transduction Pathways Involved in Glucocorticoid Actions. *Signal Transduction: Pathways, Mechanisms and Diseases*, 2010; p. 289-309.
75. Croxtal, J.D., et al., Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2000;130(2):289-298.
76. López, G., et al., Uso de medicamentos inmunosupresores en pacientes con trasplante renal, hepático y de médula ósea, en una clínica de nivel III de Bogotá. *Rev. Fac. Med*. 2009; 57(3): 227-235.
77. Oppenheimer, F., et al. Individualización de la inmunosupresión en el rechazo agudo. *Nefrología*. 2009; 29 (Sup Ext 2): 49.
78. First, M.R., Tacrolimus based immunosuppression. *J Nephrol*. 2004. 17 Suppl 8: S25-31.
79. Jasiak, N.M., et al., Immunosuppression in Solid-Organ Transplantation: Essentials and Practical Tips. *Crit Care Nurs Q*. 2016; 39(3):227-240.
80. Martín- Dávila, P., et al., Immunosuppression and infection in transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(2):143-154.
81. Haddad, E.M., et al., Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(4).
82. Schuurman, J. et al., *Modern Immunosuppressive - 2012 - Medical book*. Springer.
83. Lennard, L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 2002; 51:143-146.
84. Gisbert, J.P., et al., Common misconceptions about 5-aminosalicylates and thiopurines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(30):3467-3478.
85. Allison, A.C., et al., Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 2000. 47 (2-3):85-118.
86. Kim, S., et al., Expression of IMPDH mRNA after mycophenolate administration in male volunteers. *Biomed Res Int*. 2014: 870209.

87. De Clercq, E. Antivirals and antiviral strategies. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2(9): 704- 720.
88. Kaltenborn, A., et al., Mycophenolate mofetil in liver transplantation: a review. *Ann Transplant*. 2013; 18:685-696.
89. Dandel, M., et al., Maintenance immunosuppression with mycophenolate mofetil: long-term efficacy and safety after heart transplantation. *Transplant Proc*. 2009. 41(6):2585-2588.
90. Matthew, C., et al., Enteric-coated mycophenolate sodium immunosuppression in renal transplant patients: efficacy and dosing. *Transplantation Reviews*. 2012; 26(4): 233–240.
91. Ahsan, N., et al., Randomized trial of tacrolimus plus mycophenolate mofetil or azathioprine versus cyclosporine oral solution (modified) plus mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation: results at 2 years. *Transplantation*. 2001;72(2):245-250.
92. Nishikawa, K., et al., Annual trends and triple therapy, 1991-2000. *Clin Transpl*. 2001:247-269.
93. Carter, P.J. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6 (5): 343-357.
94. Reichert, J.M., et al., Monoclonal antibody successes in the clinic. *Rosensweig. Nature Biotechnol*. 2005; 23, 1073-1078.
95. Goebel, J. et al., Daclizumab (Zenapax) inhibits early interleukin-2 receptor signal transduction events. *Transpl Immunol*. 2000; 8(3): 153- 159.
96. Wiseman, L., et al., Daclizumab: A review of its use in the prevention of acute rejection in renal transplant recipients. *Drugs* 1999; 58(6): 1029-1042.
97. Daclizumab. Base de datos del consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos de España.
98. Kreijveld, E., et al., Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+ CD25+ regulatory T- cell pool is present in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2007; 7 (1): 249- 255.
99. Vlad, G., et al., Anti- CD25 treatment and FOXP3- positive regulatory T cells in heart transplantation. *Transpl Immunol*. 2007; 18 (1): 13-21.

100. Baan, C.C., et al., Anti- CD25 monoclonal antibody therapy affects the death signals of graft- infiltrating cells after clinical heart transplantation. *Transplantation*. 2003; 75(10): 1704- 1710.
101. Mehra, M.R., et al., A multicenter, prospective, randomized, double-blind trial of Basiliximab in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24:1297-1304.
102. Deeks, E.D., et al., Rabbit antithymocyte (Thymoglobulin). A review of its use in the prevention and treatment of acute renal allograft rejection. *Drugs* 2009, 69:11.1483.
103. Cravedi, P., et al., Cyclosporine prolongs delayed graft function in kidney transplantation are rabbit antihuman thymocyte globulins the answer? *Nephron Clin. Pract* 2005; 101: 65-71.
104. Niaudet, P., Immunosuppressive treatment. *Nephrol Ther.* 2011; 7 (7): 592-598.
105. Swinnen, L.J., et al., Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*, 1990; 323: 1723-1728.
106. Pérez, M.G., et al., *Rhodococcus equi* infection in transplant recipients: a case of mistaken identity and review of the literature. *Transpl Infect Dis.* 2002; 4: 52-56.
107. Allen, U., et al., Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2009; 9: 87-96.
108. Bernabeu-Wittel, M., et al., Infectious complications of heart transplantation. A prospective study for the first 6 years of a transplantation program. *Rev Clin Esp.* 1999;199(8):489-495.
109. Fishman, J.A. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 2007; 357: 2601-2614.
110. Montoya, J.G., et al., Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford University Medical Center. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 629-640.
111. El Oakley, R.M., et al. Postoperative mediastinitis: Classification and management. *Ann Thorac Surg.* 1996; 61:1030-1036.
112. Speich, R., et al., Epidemiology and management of infections after lung transplantation. *Clin Infect Dis.* 2001; 33 Suppl 1: S58-S65.

113. Dauber, J.H., et al., Infectious complications in pulmonary allograft recipients. *Clin Chest Med.* 1990; 11 (2): 291-308.
114. Hernández, D., et al., Has patient survival following renal transplantation improved in the era of modern immunosuppression? *Nefrología.* 2013; 33:171-180.
115. Ravaioli, M., et al., Immunosuppression modifications based on an immune response assay: results of a randomized, controlled trial. *Transplantation.* 2015; 99:1625-1632.
116. Fernández- Ruiz, Mario., et al., Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology.* 2014; 3(2): e12.
117. Mendez-Eirin, E., et al. Cumulative incidence of cytomegalovirus infection and disease after heart transplantation in the last decade: effect of preventive therapy. *Transplant Proc* 2012; 44: 2660-2662.
118. Rubin, R.H., Prevention and treatment of cytomegalovirus disease in heart transplant patients. *J Hear Lung Transpl.* 2000; 19: 731-735.
119. Hummel, M. Early postoperative therapy after heart transplantation: Prophylaxis, diagnosis and antibiotic, antimycotic and antiviral therapy of infections. *Appl Cardiopulm Pathophysiol.* 2011; 15: 245-255.
120. González, I.O., et al., Infecciones respiratorias en el paciente con trasplante pulmonar. Servicio de Neumología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. 2013.
121. Caillard, S., et al., Transplant patient monitoring. *Rev Prat.* 2007; 57(3): 299-308.
122. Lavee, J., et al. Influence of panel-reactive antibody and lymphocytotoxin crossmatch on survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1991; 10: 921-929.
123. Chang, D.H., et al., Immunosuppression following heart transplantation: prospects and challenges. *Immunotherapy.* 2014; 6: 181-194.
124. Florescu, D.F., et al., What is the impact of hypogammaglobulinemia on the rate of infections and survival in solid organ transplantation? A meta-analysis. *Am J Transplant* 2013; 13: 2601-2610.

125. Sarmiento, E., et al., Challenges associated with immunological scores for the prediction of the risk of infection after transplant. *Transpl Infect Dis.* 2015; 17(1): 156-157.
126. Mawhorter, S., et al., Hypogammaglobulinemia and infection risk in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008; 13:581-585.
127. Sarmiento, E., et al., Evaluation of humoral immunity profiles to identify heart recipients at risk for development of severe infections: A multicenter prospective study. *J Heart Lung Transplant.* 2017; 36(5): 529- 539.
128. Sarmiento, E., et al., Monitoring of early humoral immunity to identify lung recipients at risk for development of serious infections: A multicenter prospective study. *J Heart Lung Transplant.* 2018; S1053-2498(18)31428-1.
129. Fernández- Ruiz, M., et al., Monitoring of immunoglobulin levels identifies kidney transplant recipients at high risk of infection. *Am J Transplant.* 2012; 12: 2763-2773.
130. Fernández- Ruiz, M., et al., Hypocomplementemia in kidney transplant recipients: impact on the risk of infectious complications. *Am J Transplant.* 2013; 13: 685-694.
131. Sarmiento, E., et al., Decreased levels of serum complement C3 and natural killer cells add to the predictive value of total immuno-globulin G for severe infection in heart transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2012; 14: 526-39.
132. Carbone, J., et al., Humoral and cellular immune monitoring might be useful to identify liver transplant recipients at risk for development of infection. *Transpl Infect Dis.* 2008; 10: 396-402.
133. Prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: Updated Guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, and HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2014; 58: 1308-1311.
134. Stewart, S., et al., Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24(11): 1710-1720.
135. Terasaki, P.I. Antibody response to homograft. I. Preliminary studies of the time of appearance of lymphoagglutinins upon homografting. *Am Surg* 1959; 11: 896-899.

136. Terasaki, P.I., et al., Presensitization and kidney transplant failure. *Postgrad Med* 1970; 47: 89-100.
137. Solez, K., et al., 05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (CAN). *Am J Transplant* 2007; 7(3): 518-526.
138. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science. pp. Chapter 2. 2002.
139. Kalled, S.L., et al., BAFF: B cell survival factor and emerging therapeutic target for autoimmune disorders. *Expert Opin Ther Targets*. 2003; 7(1): 115-123.
140. Zhang, J., et al., Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2001;166(1): 6-10.
141. Cheema, G.S., et al., Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(6): 1313-1319.
142. Yasuyuki, G., et al., Elevation of Serum B-Cell Activating Factor Levels During Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 91(5): 912–914.
143. Mariette, X., et al., The level of BlyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 168–171.
144. Gavin, A.L., et al., DeltaBAFF, an Alternate Splice Isoform That Regulates Receptor Binding and Bio presentation of the B Cell Survival Cytokine, BAFF. *J Biol Chem*. 2003; 278(40): 38220- 38228.
145. Moore, P.A., et al., BlyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*. 1999; 285(5425):260-263.
146. Schneider, P., et al., BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*. 1999; 189(11): 1747-1756.
147. Nardelli, B., et al., Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*. 2001; 97(1): 198-204.
148. Scapini, P., et al., G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BlyS. *J Exp Med*. 2003; 197 (3): 297-302.
149. Gross, J.A., et al., TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*. 2000; 404(6781): 995-999.

150. Schiemann, B., et al., An Essential Role for BAFF in the Normal Development of B Cells through a BCMA-Independent Pathway. *ScottScienceNew Series*, 2001; 293(5537): 2111-2114.
151. Xing-Zhong, X., et al., Brief Definitive Report Taci Is a Traf-Interacting Receptor for Tall-1, a Tumor Necrosis Factor Family Member Involved in B Cell Regulation. *JEM Home* 2000; 192 (1): 137.
152. Marsters, S.A., et al., Interaction of the TNF homologues BLYS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol.* 2000; 10(13): 785-788.
153. Dörner, T., et al., B cells, BAFF/zTNF4, TACI, and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.* 2001; 3(4): 197–199.
154. Yu, G., et al., APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol.* 2000;1(3):252-256.
155. Thompson, J.S., et al., BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science.* 2001;293(5537): 2108-2111.
156. Gross, J.A., et al., TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLYS. *Immunity.* 2001;15(2):289-302.
157. Trescol-Biémont, M.C., et al., Regulation of A1/Bfl-1 expression in peripheral splenic B cells. *Biochimie.* 2004;86(4-5): 287-294.
158. Batten, M., et al., BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med.* 2000;192(10): 1453-1466.
159. Collins, C.E., et al., B lymphocyte stimulator (BLYS) isoforms in systemic lupus erythematosus: disease activity correlates better with blood leukocyte BLYS mRNA levels than with plasma BLYS protein levels. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(1): R6.
160. Knight, A.K., et al., High serum levels of BAFF, APRIL and TACI in Common Variable Immunodeficiency. *Clin Immunol.* 2007; 124(2): 182–189.
161. Schuster, A., et al., B-cell activating factor BAFF reflects patients' immunological risk profile after kidney transplantation. *Transpl Immunol.* 2017; 45: 35- 41.
162. Kobashigawa, J., et al. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 252-269.

163. Mosquera, J.M., et al., Criterios diagnósticos de rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante renal. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña. *Nefrología* 2011;31(4):382-391.
164. Bickerstaff, A., et al., An experimental model of acute humoral rejection of renal allografts associated with concomitant cellular rejection. *Am J Pathol.* 2008; 173(2):347-357.
165. Colvin, R.B. Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. *JASN* 2007; 18(4): 1046- 1056.
166. Moore, K. W., et al., Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr Virus gene BCRF1. *Science.* 1990; 248, 1230-1234.
167. Moore, K. W., et al., Interleukin-10. *Ann. Rev. Immunol.* 1993; 11, 165-190.
168. Mosier, D. E., et al., Retroviral induction of acute lymphoproliferative disease and profound immunosuppression in adult C57 Bl/6 mice. *J. Exp. Med.* 1985; 161, 766-784.
169. Shanafelt, A. B. et al., The amino -terminal helix of GM-CSF and IL-5 governs high-affinity binding to their receptors. *EMBO J.* 1991; 10, 4105-4112.
170. Sher A., et al., Role of T-cell derived cytokines in the down-regulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol. Rev.* 1992; 127, 183-204.
171. Silva, J. S., et al., Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 1992; 175, 169-174.
172. Spits H., et al., Functional characterization of human IL-10. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1992; 99, 8-15.
173. Vieira, P., et al., Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88, 1172-1176.
174. Kim J. M., et al., Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J. Immunol.* 1992; 148, 3618-3623.
175. Hara, M., et al., IL-10 Is Required for Regulatory T Cells to Mediate Tolerance to Alloantigen In Vivo. *J Immunol.* 2001; 166(6): 3789- 3796.
176. Kullberg, M. C., et al., Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J. Immunol.* 1992; 148, 3264-3270.

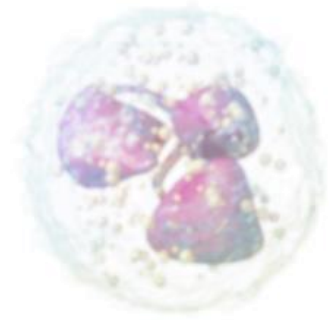
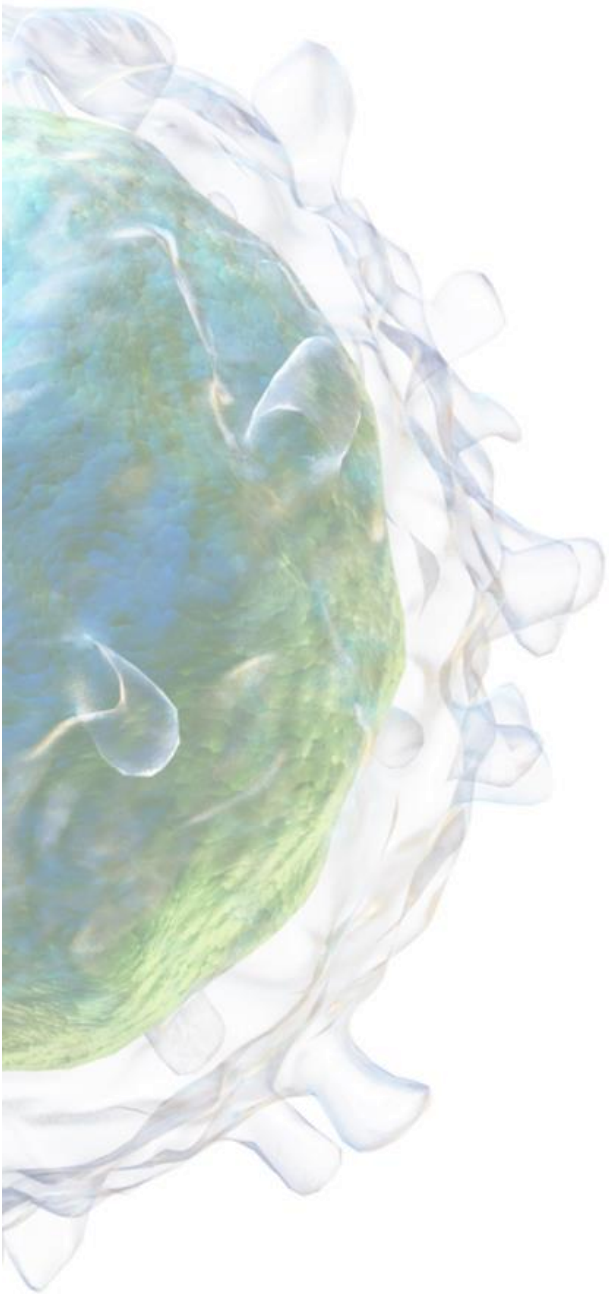
177. Heinzel, F. P., et al., Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4 positive lymphocytes in-vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 1991; 88, 7011-7015.
178. Ferry, BL., et al., Measurement of peripheral B cell subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID) using a whole blood method. *Clin Exp Immunol.* 2005. 140(3): 532-539.
179. Behnam, SK., et al. Immune monitoring as prerequisite for transplantation tolerance trials. *Clin Exp Immunol.* 2017. 189 (2): 158- 170.
180. Paz- Artal, E., et al. Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti- HLA sensitization in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2018. (print)
181. Ildstad, ST., et al. Regulatory B cells: the new “it” cell. *Transplant Proc.* 2014. 46 (1): 3- 8.
182. Bestard, O., et al. Preformed circulating HLA- specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int.* 2015. 88 (4): 874- 887.
183. Espinoza, C., et al. Asistencia circulatoria mecánica. *Sociedad chilena de medicina.* 2012.
184. Vázquez, A. Dispositivos de asistencia mecánica circulatoria (II). *Anestesia R.* 2018.
185. Roig, E. Miocardiopatía dilatada. *Medicine.* 2001. 8 (47): 2472- 2479.
186. Zorina, P. Hipergammaglobulinemia en pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV): diseño de caso- control. Tesis doctoral. Facultad de Medicina de Mérida. 1997.
187. Strandvik, B., et al. Antistaphylococcal antibodies in cystic fibrosis. *Infection.* 1990. 18 (3): 170- 172.
188. Shanshiashvili, LV., et al. mGluR1 interacts with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and modulates the secretion of IL-10 in cystic fibrosis peripheral lymphocytes. *Mol Immunol.* 2012. 51 (3-4): 310- 315.
189. Colonna-Romano, G., et al. A double negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Ageing Dev* 2009. 130:681- 690.

190. Zhu, L., et al. Altered frequencies of memory B cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol.* 2018. 37(1): 205-212.
191. Mahmood, Z., et al. CD27-IgD⁻ memory B cells are modulated by in vivo interleukin-6 receptor (IL-6R) blockade in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015. 17(1):61.
192. Centuori, S., et al. Double-negative (CD27⁻IgD⁻) B cells are expanded in NSCLC and inversely correlate with affinity-matured B cell populations. *J Transl Med.* 2018. 16: 30.
193. Iwata, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011. 117(2):530–541.
194. Fillatreau S. Regulatory plasma cells. *Curr Opin Pharmacol.* 2015. 23:1–5.
195. Mauri, C., et al. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest.* 2017. 127 (3): 772- 779.
196. Sarmiento, E., et al. Decreased levels of serum immunoglobulins as a risk factor for infection after heart transplantation. *Transplant Proc.* 2005. 37(9): 4046- 4049.
197. San Segundo, D., et al. Frequencies of circulating B- cell subpopulations before kidney transplantation identify patients at risk of acute rejection. *Transplant Proc.* 2015. 47 (1): 54- 56.
198. Siepert, A., et al. Mechanisms and rescue strategies of calcineurin inhibitor mediated tolerance abrogation induced by anti-CD4 mAb treatment. *Am J Transplant* 2013; 13:2308–2321.
199. Viklicky, O., et al. B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation* 2013. 95:148–154.
200. Mizoguchi, A., et al. A case for Regulatory B Cells. *J Immunol.* 2006. 176: 705-710. *J Heart Lung Transpl.* 2015. 34(4): 124.
201. Rodriguez, B., et al. Plasma levels of B-lymphocyte stimulator increase with HIV disease progression. *AIDS.* 2003;17: 1983-1985.
202. Pastor, L., et al. A Cytokine Pattern That Differentiates Pre-Seroconversion from Post seroconversion Phases of Primary HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2017. 74(4): 459- 466.

203. Poudrier, J., et al. Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clin Dev Immunol.* 2012: 592187.
204. Carbone, J., et al. Potential role of BAFF as a biomarker in HIV infection. *Infect Dis (Lond).* 2015. 47(4): 260- 262.
205. Khan, WN. B cell receptor and BAFF receptor signalling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol.* 2009; 183: 3561-3567.
206. Kreuzaler, M., et al. Soluble BAFF Levels Inversely Correlate with Peripheral B Cell Numbers and the Expression of BAFF Receptors. *J Immunol.* 2011. 188 (7): 2930-2931.
207. Gorelik, L., et al. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J Exp Med.* 2003; 198: 937-945.
208. Jacobson, CA., et al. Post-transplantation B cell activating factor and B cell recovery before onset of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014. 20(5): 668- 675.
209. Chen, M., et al. The function of BAFF on T helper cells in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014. 25(3): 301- 305.
210. Sarwal, MM., et al. BAFF may modulate the rate of B-cell repopulation after rituximab therapy for acute renal transplant rejection. *Transplantation* 2009; 88: 1229.
211. Thibault-Espitia, A., et al. BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2012; 12: 2754.
212. Banham, G., et al. Prezzi D, Harford S, Taylor CJ, Hamer R, Higgins R, Bradley JA, Clatworthy MR (August 2013). Elevated pretransplantation soluble BAFF is associated with an increased risk of acute antibody-mediated rejection. *Transplantation.* 2013. 96 (4): 413- 420.

213. Manzi, S. et al. Effects of belimumab, a B lymphocyte stimulator-specific inhibitor, on disease activity across multiple organ domains in patients with systemic lupus erythematosus: combined results from two phase III trials. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71: 1833–1838.
214. Hahn, B.H. Belimumab for systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2013; 368:1528–1535.
215. Martínez- Flores, JA., et al. Circulating Immune Complexes of IgA Bound to Beta 2 Glycoprotein are Strongly Associated with the Occurrence of Acute Thrombotic Events. *J Atheroscler Thromb.* 2016. 23(10): 1242- 1253.
216. Durandy, A., et al. Primary antibody deficiencies. *Nat Rev Immunol.* 2013. 13(7): 519- 533.
217. Pascual, J., et al. Alemtuzumab induction and antibody-mediated kidney rejection after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplantation* 2009; 87: 125.
218. Sarantopoulos, S., et al. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood,* 2011. 117: 2275-2283.
219. Gorosito, M., et al. The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Letters.* 2015. 589 (22): 3362-3369.
220. Kowalski, R., et al. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant.* 2003. 17(2): 77-88.
221. Serban, G., et al. Significance of immune cell function monitoring in renal transplantation after Thymoglobulin induction therapy. 2009. *Human Immunol.* 70 (11): 882- 890.
222. Kobashigawa, J, A., et al. Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes. *J Heart Lung Transplant.* 2010. 29(5): 504- 50

223. Rodrigo, E., et al. ImmuKnow as a diagnostic tool for predicting infection and acute rejection in adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Liver Transpl.* 2012. 18 (10): 1245- 1253.
224. Ling, X., et al. Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection? A meta-analysis. *Transplantation* 2012; 93:737–743.



VIII. ANEXOS



• CORRELACIONES DE FACTOR ACTIVADOR DE CÉLULA B

Mediante correlación bivariada quisimos comprobar la relación existente y la fuerza de ésta entre BAFF y los distintos subtipos de fenotipo B, así como con las variables inmunológicas de estudio.

Analizamos los valores en el punto pretrasplante cardíaco, contando con pacientes que poseen la cuantificación de BAFF y la determinación del fenotipo B Maduración y B reguladoras.

Tabla 1. Correlación entre los niveles de BAFF pretrasplante cardíaco y subpoblaciones B Maduras

%	B Totales	CD19+CD27-	Naïve	Exhausted	Naïve IgD	Naïve IgM	Memoria	Mem. SCI	Mem. CCI	Mem. IgD	Mem. IgM
Pearson	-0,19**	-0,13	-0,19	0,15	0,10	0,02	0,10	-0,03	0,27**	-0,16	-0,07
BAFF Sig. (bil.)	0,01	0,15	0,06	0,45	0,62	0,91	0,27	0,77	0,01	0,42	0,74
N	186	122	99	26	28	28	123	101	101	28	28

Valores Absolutos	B Totales	CD19+CD27-	Naïve	Exhausted	Naïve IgD	Naïve IgM	Memoria	Mem. SCI	Mem. CCI	Mem. IgD	Mem. IgM
Pearson	-0,28**	-0,25*	-0,26*	0,03	0,03	0,07	-0,11	-0,22	0,20	-0,35	0,05
BAFF Sig. (bil.)	0,00	0,02	0,03	0,88	0,89	0,75	0,28	0,07	0,11	0,08	0,82
N	153	89	65	25	26	26	90	67	67	26	26

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Correlación de Pearson; Significación bilateral

Tabla 2. Correlación entre los niveles de BAFF pretrasplante cardíaco y variables hematológicas e inmunológicas

	IgG	IgA	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Hematíes	Hb	Hto	Linfocitos
Pearson	-0,01	0,02	-0,19*	0,04	0,00	0,15	-0,02	-0,19*	-0,23**	-0,21**	-0,24
BAFF Sig. (bil.)	0,93	0,81	0,02	0,71	0,98	0,16	0,87	0,02	0,00	0,01	0,00
N	142	140	139	95	95	95	95	166	166	166	166

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Correlación de Pearson; Significación bilateral

Tabla 3. Correlación entre los niveles de BAFF pretrasplante cardíaco y subpoblaciones B Reguladoras

%		B Totales	Reguladoras	Memoria	Maduras	B10	Transicionales
Pearson		-0,34**	-0,08	0,01	0,09	-0,23*	0,10
BAFF	Sig. (bil.)	0,01	0,54	0,94	0,45	0,03	0,42
	N	69	69	69	69	69	69

Valores Absolutos		B Totales	Reguladoras	Memoria	Maduras	B10	Transicionales
Pearson		-0,25*	-0,14	-0,18	-0,19	-0,25*	-0,15
BAFF	Sig. (bil.)	0,04	0,24	0,15	0,12	0,02	0,22
	N	69	69	69	69	69	69

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Correlación de Pearson; Significación bilateral

Figura 1. Estrategia de análisis del fenotipo B regulador en paciente trasplantado cardíaco.

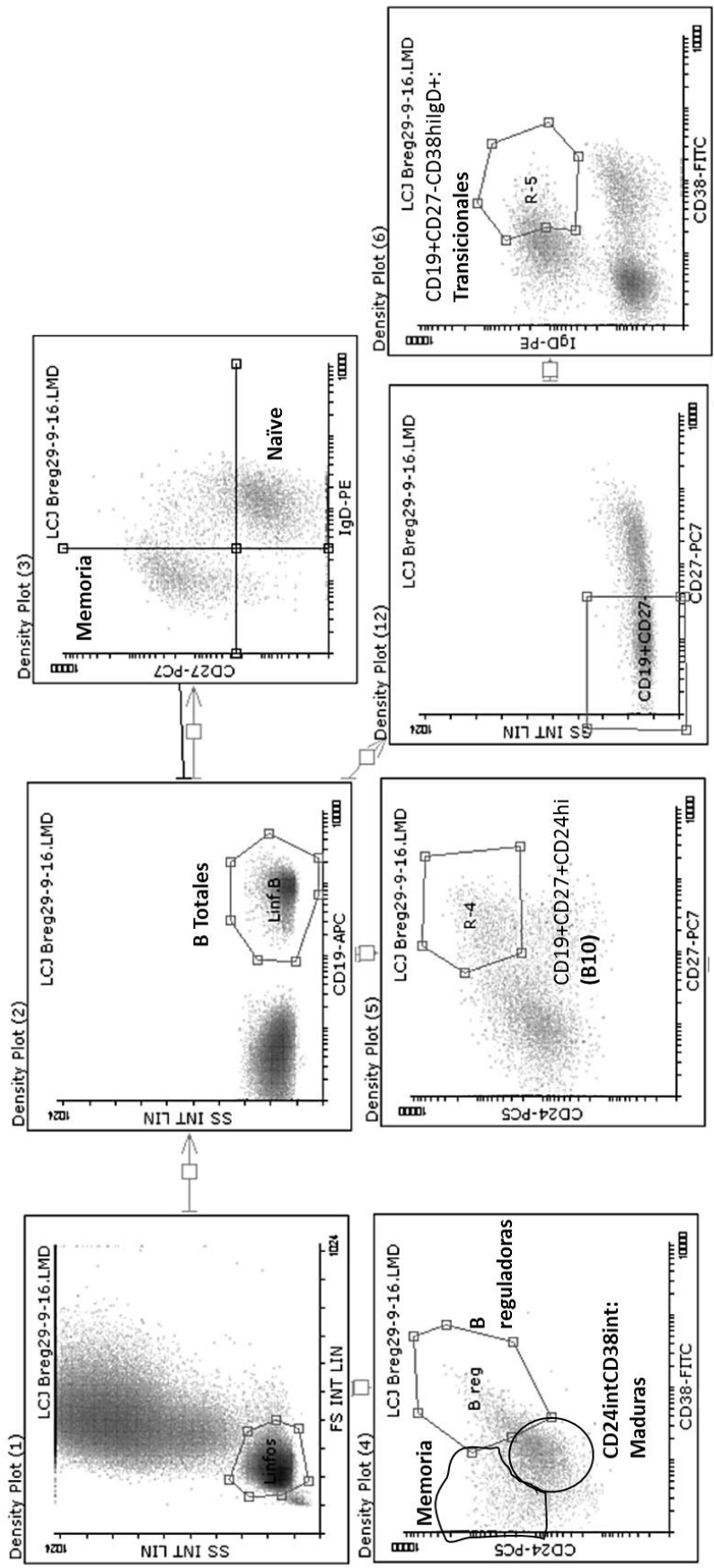
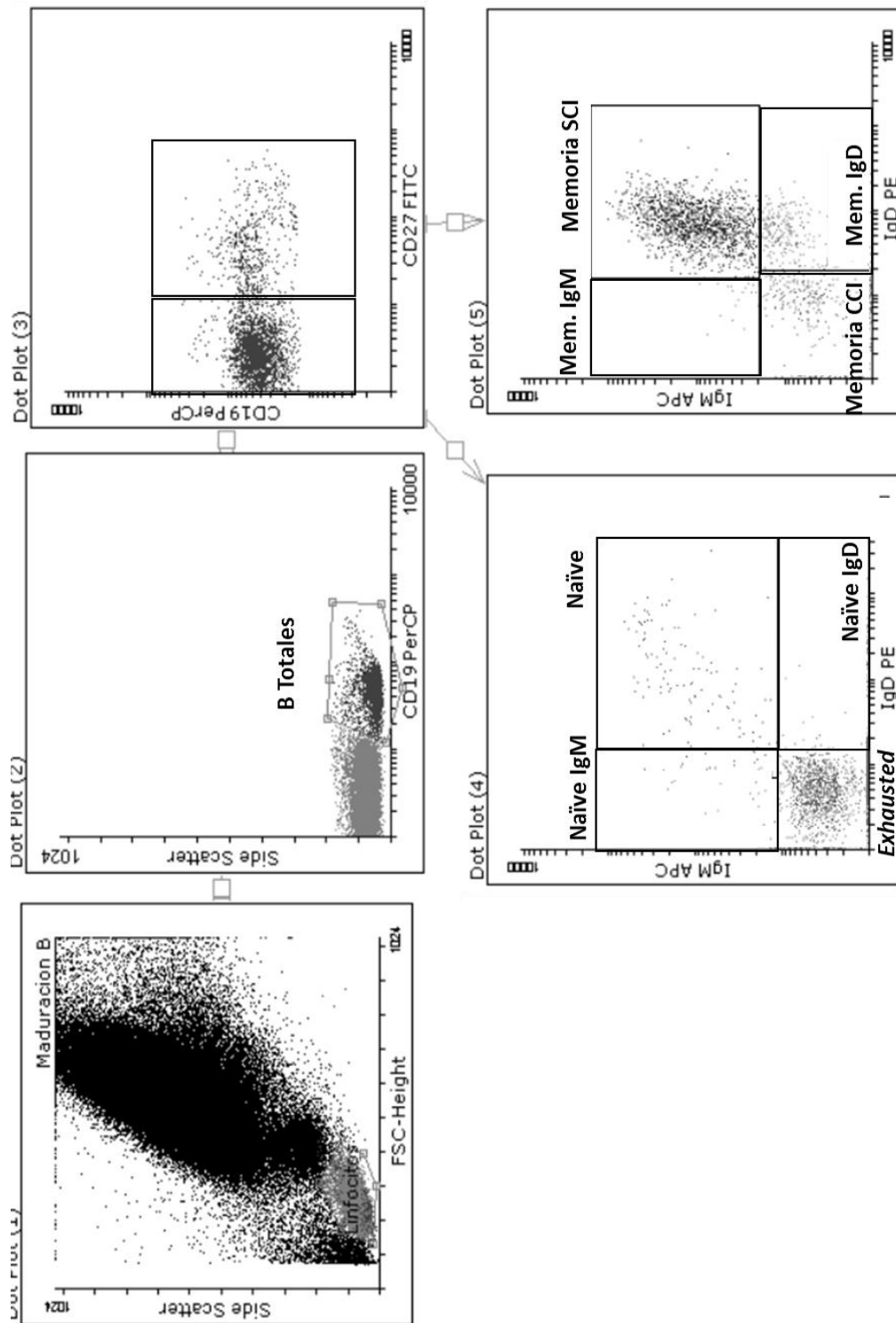
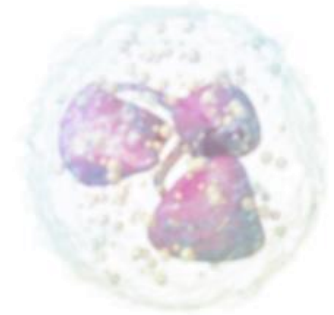
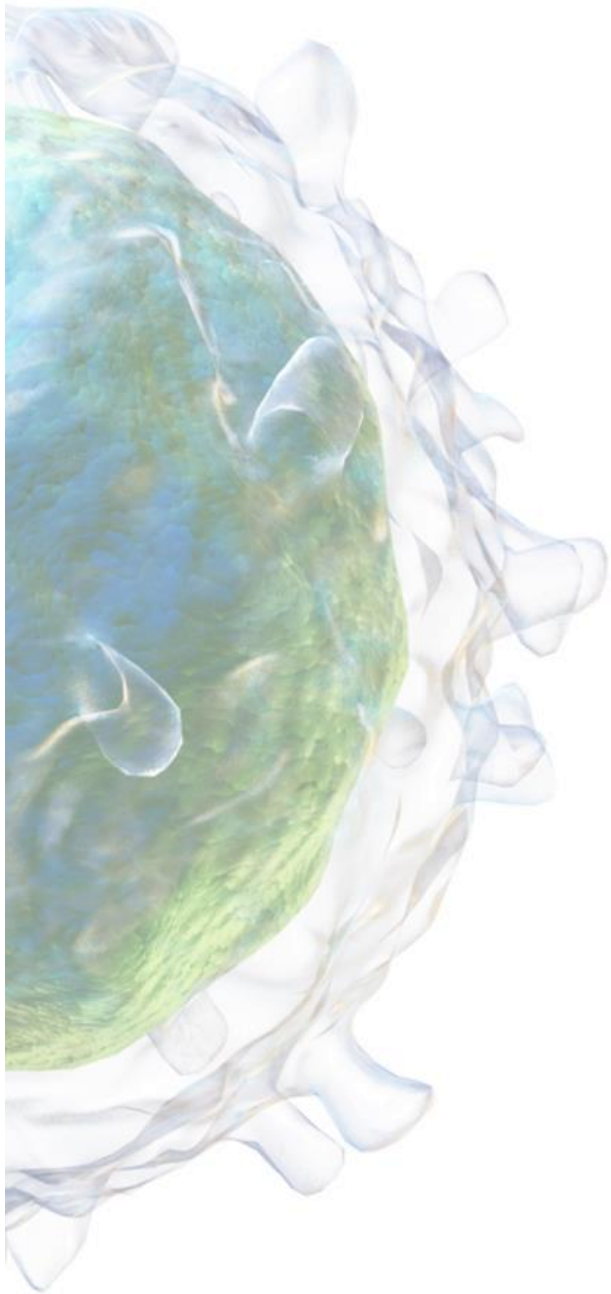


Figura 2. Estrategia de análisis del fenotipo maduración B en paciente trasplantado cardíaco.





IX. PUBLICACIONES



El trabajo presentado en esta tesis ha sido divulgado en estas publicaciones:

1. Sarmiento, E., Cifrian, J., **Calahorra, L.**, Bravo, C., Lopez, S., Laporta, R., Ussetti, P., Sole, A., Morales, C., de Pablos, A., Jaramillo, M., Ezzahouri, I., García, S., Navarro, J., Lopez-Hoyos, M., Carbone, J. **Monitoring of early humoral immunity to identify lung recipients at risk for development of serious infections: A multicenter prospective study.** *J Heart Lung Transplant.* 2018. 37(8):1001-1012.

Abstract

BACKGROUND:

Infection is still a leading cause of death during the first year after lung transplantation. We performed a multicenter study among teaching hospitals to assess monitoring of early humoral immunity as a means of identifying lung recipients at risk of serious infections.

METHODS:

We prospectively analysed 82 adult lung recipients at 5 centres in Spain. Data were collected before transplantation and at 7 and 30 days after transplantation. Biomarkers included IgG, IgM, IgA, complement factors C3 and C4, titers of antibodies to pneumococcal polysaccharide antigens (IgG, IgA, IgM) and antibodies to cytomegalovirus (IgG), and serum B-cell activating factor (BAFF) levels. The clinical follow-up period lasted 6 months. Clinical outcomes were bacterial infections requiring intravenous anti-microbial agents, cytomegalovirus (CMV) disease, and fungal infections requiring therapy.

RESULTS:

We found that 33 patients (40.2%) developed at least 1 serious bacterial infection, 8 patients (9.8%) had CMV disease, and 10 patients (12.2%) had fungal infections. Lower IgM antibody levels against pneumococcal polysaccharide antigens at Day 7 (defined as <5 mg/dl) were a risk factor for serious bacterial infection (adjusted odds ratio [OR] 3.96; 95% confidence interval [CI] 1.39 to 11.26; $p = 0.0099$). At Day 7 after transplantation, IgG hypogammaglobulinemia (defined as IgG <600 mg/dl) was associated with a higher risk of CMV disease (after adjustment for CMV mismatch: OR 8.15; 95% CI 1.27 to 52.55; $p = 0.028$) and fungal infection (adjusted OR 8.03, 95% CI 1.51 to 42.72; $p = 0.015$). Higher BAFF levels before transplantation were associated with a higher rate of development of serious bacterial infection and acute cellular rejection.

CONCLUSION:

Early monitoring of specific humoral immunity parameters proved useful for the identification of lung recipients who are at risk of serious infections.

2. Sarmiento, E., Jaramillo, M., **Calahorra, L.**, Fernandez-Yañez, J., Gomez-Sanchez, M., Crespo-Leiro, MG., Paniagua, M., Almenar, L., Cebrian, M., Rabago, G., Levy, B., Segovia, J., Gomez-Bueno, M., Lopez, J., Mirabet, S., Navarro, J., Rodriguez-Molina, JJ., Fernandez-Cruz, E., Carbone, J. **Evaluation of humoral immunity profiles to identify heart recipients at risk for development of severe infections: A multicenter prospective study.** J Heart Lung Transplant. 2017. 36(5):529-539.

Abstract

BACKGROUND:

New biomarkers are necessary to improve detection of the risk of infection in heart transplantation. We performed a multicenter study to evaluate humoral immunity profiles that could better enable us to identify heart recipients at risk of severe infections.

METHODS:

We prospectively analysed 170 adult heart recipients at 8 centres in Spain. Study points were before transplantation and 7 and 30 days after transplantation. Immune parameters included IgG, IgM, IgA and complement factors C3 and C4, and titers of specific antibody to pneumococcal polysaccharide antigens (anti-PPS) and to cytomegalovirus (CMV). To evaluate potential immunologic mechanisms leading to IgG hypogammaglobulinemia, before heart transplantation we assessed serum B-cell activating factor (BAFF) levels using enzyme-linked immunoassay. The clinical follow-up period lasted 6 months. Clinical outcome was need for intravenous antimicrobials for therapy of infection.

RESULTS:

During follow-up, 53 patients (31.2%) developed at least 1 severe infection. We confirmed that IgG hypogammaglobulinemia at Day 7 (defined as IgG <600 mg/dl) is a risk factor for infection in general, bacterial infections, and CMV disease. At Day 7 after transplantation, the combination of IgG <600 mg/dl + C3 <80

mg/dl was more strongly associated with the outcome (adjusted odds ratio 7.40; 95% confidence interval 1.48 to 37.03; $p = 0.014$). We found that quantification of anti-CMV antibody titers and lower anti-PPS antibody concentrations were independent predictors of CMV disease and bacterial infections, respectively. Higher pre-transplant BAFF levels were a risk factor of acute cellular rejection.

CONCLUSION:

Early immunologic monitoring of humoral immunity profiles proved useful for the identification of heart recipients who are at risk of severe infection.

OTRAS PUBLICACIONES

1. Sarmiento, E., Diez, P., Araya, M., Jaramillo, M., **Calahorra, L.**, Fernandez-Yañez, J., Palomo, J., Sousa, I., Hortal, J., Barrio, J., Alonso, R., Muñoz, P., Navarro, J., Vicario, J., Fernandez-Cruz, E., Carbone, J. **Early intravenous immunoglobulin replacement in hypogammaglobulinemic heart transplant recipients: results of a clinical trial.** *Transpl Infect Dis.* 2016. 18(6): 832-843.
2. Carbone, J., **Calahorra, L.**, Navarro, J., Sarmiento, E. **Potential role of serum BAFF as a biomarker in HIV infection.** *Infect Dis.* 2015. 47(4):260-262.

