

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**ESTUDIO FENOTÍPICO Y FUNCIONAL DE
SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN PACIENTES
SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO**

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

Nallibe Lanio Amador

Bajo la dirección de los doctores

Javier Alberto Carbone Campoverde
Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I

Tesis Doctoral

**Estudio fenotípico y funcional de
subpoblaciones linfocitarias en pacientes
sometidos a trasplante cardiaco**

Nallibe Lanio Amador

2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



**Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I**

Tesis doctoral

**Estudio fenotípico y funcional de
subpoblaciones linfocitarias en pacientes
sometidos a trasplante cardiaco**

**Tesis presentada por Nallibe Lanio Amador
para optar al grado de Doctor**

**Directores: Dr. Javier A. Carbone Campoverde
Dra. Elizabeth A. Sarmiento Marchese**

**El presente trabajo ha sido
realizado con ayuda de los
proyectos FIS
PI05/0839 y PI08/1430.**

**Servicio de Inmunología y
Unidad de Trasplante Cardíaco,
HGU Gregorio Marañón.**

**Al final del viaje comienza un camino,
otro buen camino...**

Agradecimientos

Me gustaría

Agradecer, Reconocer, Corresponder, Gratificar, Premiar, Retribuir, Devolver, Dar las gracias.

A todos. Por sus molestias. Por su tiempo y esfuerzo. Por compartir mi empeño.

Al Dr. Javier Carbone por proyectar nuestro futuro con la máxima confianza, trabajando infatigablemente sin dar oportunidad al desaliento. Por devolverme al camino de la ciencia.

A los Dres. Elizabeth Sarmiento, Antonio Gallego y Joaquín Navarro. Mentores, compañeros y amigos. El mejor equipo.

Al Dr. Eduardo Fernández-Cruz por sus aportaciones críticas y enseñanzas.

Al Dr. Marco Antonio Fernández por el lujo de contar siempre con el mejor consejo.

Al Dr. Florian Kern por su contribución altruista y por enriquecer nuestro trabajo con sus comentarios y experiencia.

A todo el equipo del Gregorio Marañón; residentes, facultativos, investigadores y colegas. Porque por vosotros Madrid valió algo más que una misa.

Al Dr. Jaime Pons por mostrarme que no hay meta imposible ni sacrificio que no valga la pena. Que pase el tiempo y que de pronto sean años, pero ni siquiera entonces habré saldado mi deuda de gratitud.

A la Dra. Joana M^a Ferrer por ser la inspiración que todo aprendiz necesita, y por enseñarme que hay muchos caminos, aunque no haya tiempo de recorrerlos todos.

A la Dra. Nuria Matamoros por su apoyo e interés.

A mis sufridos compañeros de Son Espases por soportarme, que viene a ser como apoyarme, pero con doble dosis de paciencia. A Toni, Edu y Reyes, por improvisar cada día una frase de ánimo.

A las Dras. Marilyn Lanio y M^a Eugenia Alonso, las primeras luces que alumbraron mi interés por la Inmunología y la investigación.

A todos mis amigos, desde Groenlandia a Katmandú, por tenerme presente.

A mis seres queridos. A David, por *to be*, que aunque no es lo mismo *ser* que *estar*, tú *eres estando* y *estás siendo*. A mi dulce Nadine, el combustible inagotable de todas mis jornadas. A Josiane, por ocuparse de todo y de todos. A Luisito, por asumir el riesgo de tomarme como ejemplo. A mis padres, por enseñarme a disfrutar con el esfuerzo y premiarme con su orgullo. Este es mi obsequio a vuestros desvelos.

Índice

| | |
|---|----|
| Summary..... | 13 |
| Abreviaturas..... | 19 |
| <i>1. Introducción</i> | 23 |
| 1. Trasplante cardiaco: Consideraciones generales..... | 25 |
| 2. Fármacos inmunosupresores: Mecanismos moleculares..... | 28 |
| 2.1. Glucocorticoides: Prednisona..... | 31 |
| 2.2. Inhibidores de la calcineurina: Ciclosporina A y Tacrolimus..... | 34 |
| 2.3. Micofenolato mofetil..... | 37 |
| 2.4. Daclizumab..... | 38 |
| 3. Problemas asociados a la inmunosupresión..... | 40 |
| 3.1. Citomegalovirus en el trasplante cardiaco..... | 45 |
| 4. Monitorización inmunológica en pacientes trasplantados..... | 49 |
| 4.1. Perfiles inmunológicos asociados a infección..... | 51 |
| 4.1.1. Parámetros de la inmunidad humoral adquirida: Inmunoglobulinas séricas, subclases de IgG y anticuerpos específicos..... | 51 |
| 4.1.2. Parámetros de la inmunidad humoral innata: Factores del complemento y lectina unidora de manosa..... | 52 |
| 4.1.3. Parámetros de la inmunidad celular: Poblaciones linfocitarias, monocitos y neutrófilos..... | 53 |
| 4.1.4. Estudios funcionales: Respuestas CMV-específicas..... | 55 |
| 4.1.5. Nuevos marcadores predictivos de riesgo de infección..... | 58 |
| 4.2. Perfiles inmunológicos asociados a rechazo..... | 62 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.1. Factores solubles: Patrones de citocinas..... | 63 |
| 4.2.2. Parámetros de la inmunidad celular..... | 65 |
| <i>II. Hipótesis.....</i> | 67 |
| <i>III. Objetivos.....</i> | 71 |
| <i>IV. Material y métodos.....</i> | 75 |
| 1. Pacientes y controles..... | 77 |
| 2. Obtención de muestras sanguíneas..... | 79 |
| 3. Citometría de flujo..... | 80 |
| 3.1. Marcaje de superficie..... | 80 |
| 3.2. Marcaje intracelular..... | 82 |
| 3.3. Análisis de subpoblaciones..... | 82 |
| 3.4. Ensayo funcional de respuesta CMV-específica..... | 84 |
| 4. ELISA cuantitativo anti-CMV..... | 86 |
| 5. Otros parámetros inmunológicos..... | 88 |
| 6. Análisis estadístico..... | 88 |
| <i>V. Resultados.....</i> | 91 |
| 1. Evolución de subpoblaciones linfocitarias de los pacientes trasplantados cardiacos..... | 93 |
| 1.1. Evolución de la expresión de CD25 y CD122..... | 98 |
| 2. Características inmunofenotípicas de los pacientes trasplantados cardiacos | 101 |
| 2.1. Características inmunofenotípicas de los pacientes trasplantados cardiacos de larga evolución..... | 104 |
| 3. Alteraciones inmunofenotípicas asociadas con el desarrollo de rechazo celular agudo..... | 105 |

| | |
|--|-----|
| 4. Alteraciones inmunofenotípicas asociadas con el desarrollo de infecciones severas..... | 109 |
| 5. Evaluación de la respuesta específica anti-CMV en pacientes trasplantados cardiacos..... | 112 |
| 5.1. Evolución de la respuesta humoral y celular específica anti-CMV..... | 113 |
| 5.2. Comparación con controles quirúrgicos..... | 114 |
| 5.3. Correlación entre parámetros inmunológicos..... | 114 |
| 6. Asociación entre la respuesta CMV-específica y el desarrollo de infección por CMV..... | 116 |
| <i>VI. Discusión.....</i> | 123 |
| <i>VII. Conclusiones.....</i> | 139 |
| <i>VIII. Bibliografía.....</i> | 143 |
| <i>IX. Anexos.....</i> | 157 |
| <i>X. Publicaciones.....</i> | 163 |
| Otras publicaciones..... | 185 |

Summary

Introduction: Rejection and infection are relevant causes of morbidity and mortality in heart transplant recipients. Notably, human cytomegalovirus (CMV) active infection poses serious risks to CMV-seropositive patients. However, reliable markers to detect an increased risk for developing these complications are lacking. Given the complexity of the immune response in this setting, several components must be analyzed simultaneously.

Hypothesis: The hypothesis of the present study is that before and after heart transplantation several abnormalities occur in functionally distinct lymphocyte subsets and that assessing these alterations could enable us to identify patients at risk of rejection or infection.

Objectives: To define the kinetics of and alterations affecting different lymphocyte subsets in heart recipients, and the relationship between these parameters and transplant-related complications.

Material and Methods: Several prospective and cross-sectional studies were designed. We assessed the maturation, activation, and regulatory profiles of T-cells and of the maturation status of B lymphocytes in a prospective follow-up study of 42 heart recipients (28 male; mean age 55=years), before and up to 1 year after transplantation. Induction therapy included 2 doses of humanized anti-CD25 monoclonal antibodies, whereas maintenance consisted of a calcineurin inhibitor (cyclosporine or tacrolimus), mofetil mycophenolate and prednisone. To assess the changes in the different lymphocyte subsets late after heart transplantation (1-3 years), a separate cross-sectional study was performed in other 31 heart recipients. To assess the effect of heart surgery, a control

group comprised of 32 age-matched patients who had undergone open-heart surgery without immunosuppression (surgical controls) was included. Due to the lack of normal values of the studied subsets, 36 healthy adults were also evaluated. Measurements were made before transplantation and at 7, 30, 90, 180 and 365 days after. Four-color flow cytometry of peripheral blood lymphocytes was performed. The monoclonal antibodies used were directly conjugated with fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, peridinin chlorophyll protein, or allophycocyanin. T-cell subsets were investigated using CD45RA/CCR7/CD4/CD8 (maturation status), HLADR/CD38/CD4/CD8 and HLA-DR/CD25/CD4/CD8 (activation status), CD127/CD25/CD4/FoxP3 (regulatory CD4+ T cells), and CD25/CD122/CD4/CD8 (assessment of IL2-R β). B-cell subsets were studied with the combination of CD27/IgD/CD19/IgM. Lymphocyte staining was carried out using a whole-blood lysis technique, according to the recommended methodology. We also evaluated prospectively CMV-specific immune responses in 38 seropositive heart recipients. For this purpose we measured anti-CMV IgG antibodies (by a CE trademark commercial ELISA test) and performed an *ex vivo* interferon gamma induction assay in T-cells stimulated with IE-1 and pp65 peptides by four color flow cytometry. Acute cellular rejection episodes were defined according to the 2005 revised ISHLT grading system. Severe infections were those requiring intravenous drug therapy during the first year after transplantation, while CMV infection was defined as positive antigenemia confirmed by significant viral load in peripheral blood or tissue cultures. Statistical analyses were performed using SPSS 16.0 statistical software for Windows.

Results: Pre-transplantation percentages of the functionally distinct lymphocyte subsets in heart recipients were compared with those of the healthy controls and used to define

peripheral blood baseline immunophenotypic status, which was characterized as follows: lower naïve CD8⁺ T-cell percentage (CD45RA⁺CCR7⁺), higher CD8⁺ terminally differentiated effector memory (TEM) percentage (CD45RA⁺CCR7⁻), and higher activated CD4⁺ and CD8⁺ T-cell percentages (CD38⁺HLADR⁺).

We assessed the kinetic changes that occurred in the lymphocyte subsets by comparing the percentages observed at each post-transplant study point with the pre-transplant values. The greatest impact was on day 7, when CD3⁺ and CD8⁺ T-cell percentages, but not CD4⁺ T cell, decreased significantly. Discordance was observed in the activation status of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. A significant decrease in CD4-activated cells was documented from day 7 to 1 year after transplantation while CD8-activated cells remained stable during follow-up. As compared with baseline values, a decrease in regulatory CD4 T-cell percentages (CD4⁺CD127_{low}CD25_{high}FoxP3⁺) was observed from day 7 to 12 months after transplantation. Interestingly, T cells expressing the beta chain of IL2-R (CD122) remained stable during the first 3 months. Changes in the homeostasis of T cells were characterized by a CD8-naïve expansion in the early post-transplant period (7 days to 90 days), followed by an increase in central memory CD4⁺ cells (180 days to 1 year). On day-7 after transplantation, a significant increase in total CD19⁺ B-cell percentages was observed. Expression of CD27 on CD19⁺ B cells remained stable throughout follow-up. Compared with values of healthy controls, higher CD8-TEM percentages were observed from baseline up to more than 1 year after transplantation. CD8 T-cell abnormalities were predominant in the long term after transplantation. Compared with healthy controls, long-term transplant recipients disclosed higher frequencies of total CD8⁺

T cells, higher CD8-activated cell percentages, higher CD8-TEM cell levels, and lower percentages of CD8-naïve and of CD8-central memory cells. Regulatory CD4 T-cell percentages were similar to those of healthy controls.

Acute cellular rejection was associated with higher levels of CD8-TEM cells during the first 6 months after transplant. The CD8-naïve/CD8-TEM ratio was significantly lower in patients with rejection at 3 and 6 months (0.58 ± 0.48 vs 1.33 ± 1.51 [$p=0.023$] and 0.45 ± 0.36 vs 1.25 ± 1.37 [$p=0.006$]). Interestingly, CD4-Treg cell percentages tended to be lower in the baseline study ($6 \pm 1.7\%$ vs $9 \pm 6.33\%$, $p=0.1$). Patients with rejection showed sustained lower percentages of naïve B cells from day 7 up to 6 months than patients who did not experience rejection. When we stratified patients using the median value of the distinct B-cell subsets, patients with higher percentages of naïve B cells (CD19+CD27-IgM+IgD+) at day 7 (>58%) had a 91% decrease in the risk of developing acute cellular rejection.

Patients who were free of severe infectious complications tended to have higher percentages of pre-transplant class-switched memory B cells than recipients who developed infections. When we stratified patients according to the median value of baseline class-switched memory B-cell percentages (CD19+CD27+IgM-IgD-), patients with higher levels (>14%) had a 74% decrease in the risk of developing severe infection after transplantation.

In the study to evaluate CMV-specific immune responses, when we compared baseline with 30-day post-transplant values, patients with CMV infection disclosed a significant decrease in the percentage of CD8/IFN γ + IE1 cells (0.40 ± 0.29 vs. 0.17 ± 0.15 , $p=0.035$) while this drop was not observed in non-CMV-infected patients neither in surgical controls.

At baseline, the anti-CMV IgG titer was significantly lower in patients who later developed CMV infection and this difference remained at 30 days after transplantation. One-month after transplantation, mean percentages of CD8/IFN γ + IE1 T cells were lower in CMV-infected patients. Taking into account the differences observed in the comparison of means analysis, ROC analysis was performed to set levels at which a response above or below indicated a decreased or increased risk of CMV infection, respectively. Patients were split into 2 groups according to the 30-day post-transplant values of CMV IgG titer (16,100 AU) and CD8/IFN γ + IE1 percentages (0,40%). A survival analysis was performed. Lower CD8/IFN γ + IE1 percentages and anti-CMV titers were associated with development of CMV infection (Log Rank, 4.17 [p=0.04] and 5.21 [p=0.02], respectively). We then evaluated if the combination of both markers was more suitable for detecting patients at risk of CMV infection. Cox regression analysis revealed an association between the risk of developing CMV infection and the combined parameters (relative hazard [RH] 6.07; 95% confidence interval, 1.34-27.48, p=0.019).

Conclusions: In the present studies, we have characterized T and B lymphocyte subset abnormalities in peripheral blood of heart recipients during the first year and beyond. Our results provide a quantitative assessment of the kinetics of different lymphocyte subsets in the post-transplant period. Some of the immunophenotypic abnormalities are associated with a higher risk of clinical complications such as overall severe infection, CMV infection or acute cellular rejection. These can be further assessed as potential biomarkers of risk for development of these complications in future studies.

A

AICD: Muerte celular inducida por activación (Activation-induced cellular death)

AMF: Acido micofenólico

C

CaN: Calcineurina

CfA: Ciclofilina A

CFC: Citometría de flujo

CML: Coriomeningitis linfocítica

CMV: Citomegalovirus

CPH: Complejo principal de histocompatibilidad

CsA: Ciclosporina A

D

DCZ: Daclizumab

DMSO: Dimetil sulfóxido

E

EBV: Virus Epstein-Barr

EFVR: *Enterococcus faecalis* vancomycin-resistente

ERGC: Elementos de respuesta a glucocorticoides

F

FK506: Tacrolimus

FKBP12: Proteína unidora de FK506-12

G

GC: Glucocorticoides

GCR: Receptor de glucocorticoides

GGIV: Gammaglobulina intravenosa

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

GMP: Guanina monofosfato

H

HBV: Virus de la hepatitis B

HCV: Virus de la hepatitis C

HGPRTasa: Hipoxantina-guanina fosforiltransferasa

HPG: Hipogammaglobulinemia

HSP: Proteína de estrés térmico (Heat Shock Protein)

HSV: Virus Herpes simplex

I

IFN γ : Interferón gamma

I κ B: Inhibidor del factor nuclear kB

IL: Interleucina

IMP: Inosina monofosfato

IMPDH: Inosinmonofosfato-deshidrogenasa

ISHLT: Sociedad Internacional de Trasplante de Pulmón y Corazón (International Society of Lung and Heart Transplantation)

L

LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva

M

MAP: Proteína activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein)

MASP: Serin-proteasa asociada a manosa (Mannose-binding protein-Associated Serine Protease)

MBL: Lectina unidora de manosa (Mannose binding lectin)

MFM: Micofenolato mofetil

N

NF-AT: Factor nuclear de las células T activadas

NF κ B: Factor nuclear kB

NPC: Neumonía por *Pneumocystis carinii*

O

ONT: Organización Nacional de Trasplantes

P

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PHA: Fitohemaglutinina

PRPP: 5-fosforibosil-1-fosfato

PTLD: Desorden linfoproliferativo post-trasplante (Post-transplant lymphoproliferative disorder)

S

SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente

T

TC: Trasplante cardiaco

TCR: Receptor de células T (T-cell receptor)

TLR: Receptor Toll-like (Toll-like receptor)

V

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial (Vascular endothelial growth factor)

VZV: Virus Varicela-Zoster

INTRODUCCIÓN

1. Trasplante cardiaco: Consideraciones generales

El trasplante cardiaco (TC) se ha convertido en una opción terapéutica para el manejo de los pacientes afectados por cardiopatías irreversibles en fase terminal (insuficiencia cardiaca grave o enfermedad de las arterias coronarias) que no presenten contraindicaciones. Los avances en el campo de la inmunosupresión, el control de las complicaciones infecciosas y la adecuada selección de donantes y receptores, han permitido mejorar la eficacia de este tratamiento. En la actualidad, y según datos recogidos en el Registro Mundial de Trasplantes que gestiona la ONT, cada año se efectúan en todo el mundo entre 5.500 y 6.000 intervenciones de este tipo.

Los resultados que se recogen en el XXVII Registro de la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón, que contabiliza cerca de 89.000 trasplantes cardiacos en el mundo, reflejan que en 2009 la sobrevida global del trasplante cardiaco fue de un 84% al primer año, con una tasa de incremento de mortalidad anual del 3.5% [1].

El mismo informe (Enero 1992-Junio 2009) destaca que entre las causas de muerte durante los primeros 30 días posteriores al trasplante, el fallo agudo del injerto representa el 41%, seguido por infecciones (13%) y fallos multiorgánicos (13%). En cambio, en el período posterior (entre 31 y 365 días) las infecciones pasan a ser la primera causa de fallecimiento (30%), mientras que el fallo agudo del injerto (18%) y el rechazo agudo (12%) tienen una menor incidencia en la mortalidad.

El primer trasplante cardiaco llevado a cabo en España lo efectuó el equipo dirigido por Cristóbal Martínez Bordiú en el Hospital La Paz de Madrid. La intervención se llevó a cabo el 18 de septiembre de 1968 y el enfermo tan solo sobrevivió unas horas a la

intervención. Pasarían 16 años hasta que el 8 de mayo de 1984, en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona se realizara el siguiente trasplante de corazón, a cargo del equipo dirigido por Josep María Caralps y Josep Oriol Bonín. En este caso el paciente sobrevivió nueve meses y falleció aparentemente como consecuencia de una crisis de rechazo [2]. En julio del mismo año, sería el equipo de Ramón Arcas, en la Clínica Universitaria de Navarra, y en septiembre, Diego Figuera, en el Hospital Puerta de Hierro, quienes se unirían a los centros con capacidad técnica de efectuar estas intervenciones. Hoy se realiza en 19 hospitales de todo el país y desde hace años el número de enfermos que recibe un injerto cardiaco cada año oscila entre 240 y 290.

En España, hasta Diciembre de 2010, un total de 6291 personas se habrían beneficiado de esta técnica, con un máximo de 353 intervenciones practicadas en el año 2000. A partir de este año, se ha producido un descenso progresivo en el número de intervenciones similar al de otros países, por una disminución de las indicaciones como consecuencia de un mejor manejo de las enfermedades susceptibles de tratarse con un trasplante (Figura 1). Por comunidades, Asturias (11.9), Navarra (9.5) y Galicia (7.5) son las que presentan una mayor distribución por millón de habitantes. La media nacional se sitúa en 5.9 trasplantados p.m.h. (Datos actualizados en <http://www.ont.es>)

El perfil clínico medio del paciente que se trasplanta en España es el de un varón de 53 años de edad, diagnosticado de cardiopatía isquémica no revascularizable con depresión grave de la función ventricular y situación funcional avanzada al que, tras un tiempo en lista de espera de 106 días, se implanta un corazón procedente de un donante fallecido por hemorragia cerebral con una media de edad de 37 años [3].

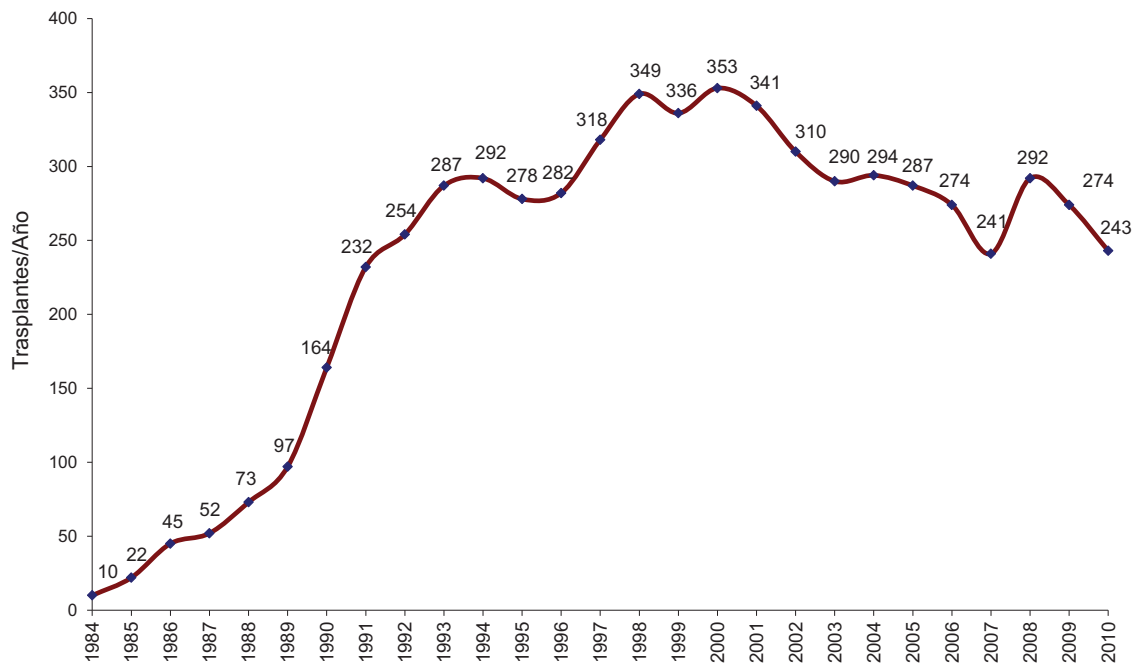


Figura 1. Número de trasplantes por año.

Registro Español de Trasplante Cardíaco 1984-2010.

La probabilidad de supervivencia total ha experimentado de forma progresiva una notable mejoría en los últimos años. La mortalidad precoz (primeros 30 días tras el trasplante) en 2009 fue del 18%, mientras que la supervivencia a 1 y 5 años fue del 85% y el 73%, respectivamente.

Entre las causas del fallecimiento la más frecuente es el fallo agudo del injerto (17%), seguido de infección (16%), un combinado de enfermedad vascular del injerto y muerte súbita (14%), tumores (12%) y rechazo agudo (8%) (Figura 2).

No obstante, la causa de la muerte suele estar en relación con el tiempo transcurrido desde el TC. De tal forma que, durante el primer mes la causa más frecuente es el fallo del injerto; del primer mes hasta el primer año, la infección, y tras el primer año el combinado de muerte súbita más rechazo crónico e infecciones [3].

De esta forma se comprueba que la infección parece estar alcanzando en los últimos años un alto protagonismo como causa de mortalidad, mientras que el rechazo agudo

se presenta en menor grado. Este desequilibrio podría deberse a una sobredosis de los fármacos inmunosupresores que previenen el rechazo, comprometiendo el estado de inmunocompetencia de los pacientes y favoreciendo el desarrollo de infecciones oportunistas.

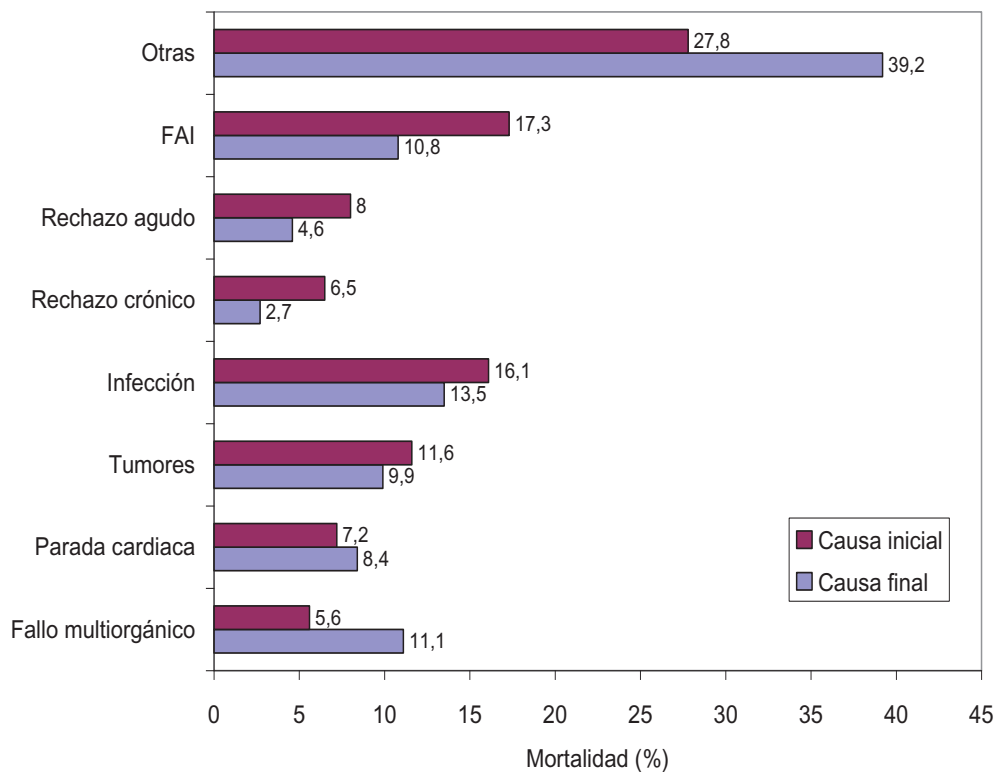


Figura 2. Causas de mortalidad general.

Causas de mortalidad total, causa inicial que desencadena el fallecimiento y causa final. FAI: fallo agudo del injerto. Registro Español de Trasplante Cardíaco 1984-2009.

2. Fármacos inmunosupresores: Mecanismos moleculares

La capacidad que tienen los organismos vivos de distinguir lo propio de lo extraño constituye la base inmunológica del rechazo. La posibilidad de suprimir la respuesta inmunitaria que se desencadena tras el reconocimiento alógeno, constituye el principio fundamental en el desarrollo de los fármacos inmunosupresores en la actualidad. El objetivo final de la terapia inmunosupresora es conseguir la máxima supervivencia del injerto y la mejor calidad de vida para el paciente con los mínimos

efectos secundarios. Para ello es imprescindible individualizar el tratamiento y valorar factores relacionados con el donante, el receptor y la evolución post-trasplante [4]. En el contexto del TC, la inmunosupresión ideal sería aquella que redujera al máximo la tasa de rechazo agudo, no originara patología infecciosa ni neoplásica, y no aumentara el riesgo cardiovascular.

Los linfocitos T tienen un papel fundamental en los eventos inmunes precoces que ocurren después de la exposición al injerto. Por ello, los fármacos inmunosupresores en general, actúan inhibiendo los mecanismos de activación de las células T, ejerciendo su acción a diferentes niveles [5]. La activación y proliferación de la célula T requiere de al menos tres señales mediadas por la interacción con los aloantígenos [6] (Figura 3).

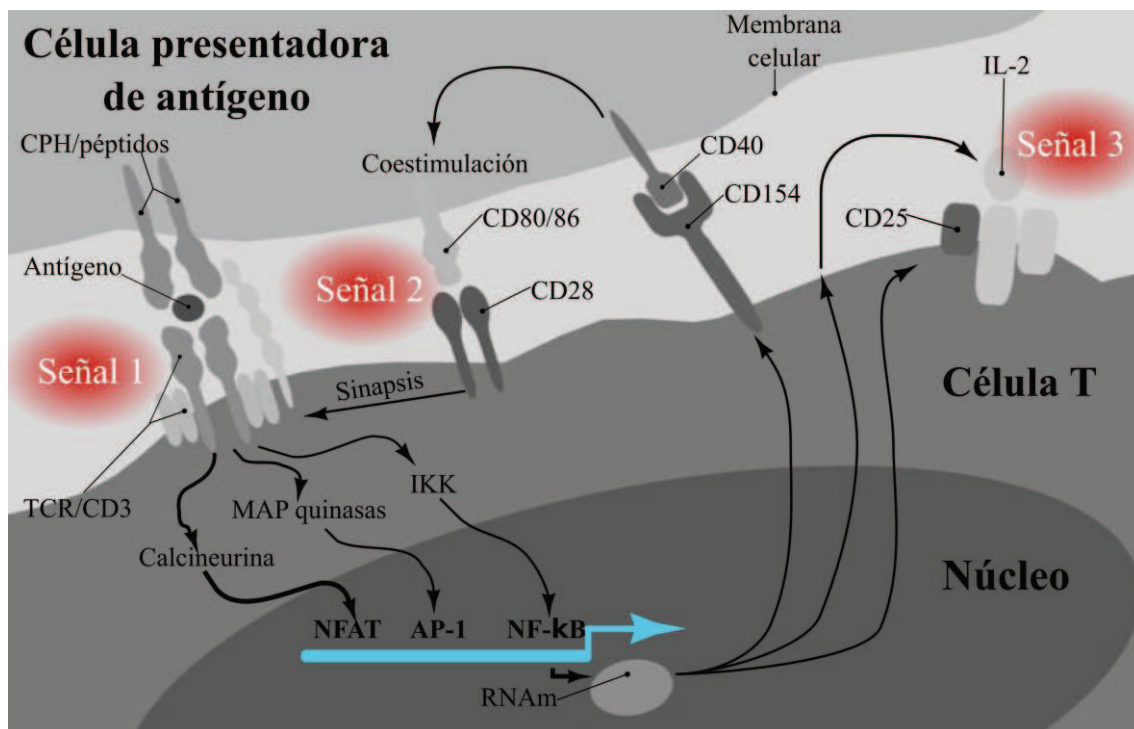


Figura 3. Modelo de activación de células T a través de 3 señales (Adaptado de Halloran P.F. *et al.* 2004).

Según este modelo, la señal 1 consiste en el reconocimiento del antígeno por el complejo TCR/CD3 durante la sinapsis inmunológica, mientras que la señal 2 está

mediada por moléculas complementarias que inducen la activación celular (CD80-86/CD28). Ambas señales desencadenan 3 vías de activación intracelular: la vía Ca^{2+} -Calcineurina, la vía de las MAPs quinasas, y la vía de quinasa C-factor nuclear κB ($NF\kappa B$). Estas vías activan la transcripción de factores que inducen la expresión de genes de citocinas, entre las que se encuentran la IL-2 y otras moléculas como CD154 (CD40L) y CD25 (IL-2R). El aumento de la IL-2 desencadena la señal 3 mediada por la interacción IL-2/IL-2R que finalmente induce la proliferación celular [7].

Según las características principales de su mecanismo de acción, los inmunosupresores se pueden clasificar en tres grandes grupos [8]:

- A. **Fármacos que bloquean la producción de citocinas:** Los anticalcineurínicos como la ciclosporina A y el tacrolimus y, de forma indirecta, los glucocorticoides (GC).
- B. **Fármacos que inhiben la síntesis de nucleótidos:** Los inhibidores de la síntesis de purinas como el ácido micofenólico, o metabolitos bloqueantes como la azatioprina. La ausencia de bases nitrogenadas impide la síntesis *de novo* del DNA, por lo que se inhibe la proliferación linfocitaria posterior a la activación.
- C. **Anticuerpos mono y policlonales:** Los anticuerpos policlonales se obtienen de suero de conejo o caballo, y van dirigidos contra las cadenas α y β de los TCR (timocitos, linfoblastos y células T periféricas). Si el inmunógeno usado son linfoblastos se denomina globulina antilinfocítica (ALG) y si son timocitos será globulina antitimocítica (ATG). Los anticuerpos monoclonales van dirigidos contra moléculas específicas como el anti-CD3 (OKT3) y anti-CD25 (basiliximab: murino y daclizumab: humanizado). Aunque el mecanismo de

acción difiere según cada tipo de anticuerpo, en general actúan impidiendo la acción de los linfocitos ya sea por bloqueo de sus receptores o por destrucción directa de los mismos.

Los regímenes de inmunosupresión utilizados en el trasplante de órganos pueden ser clasificados como de inducción, mantenimiento o rescate. La inmunosupresión de inducción es una profilaxis del rechazo relativamente intensa que se utiliza en el momento del trasplante para prevenir el rechazo agudo inicial. Es una pauta potente que no se puede mantener en el tiempo por sus efectos tóxicos. Las pautas de mantenimiento son de menor potencia pero permiten su uso más prolongado (menores efectos secundarios). Los tratamientos de rescate son similares a los de inducción en cuanto a su intensidad y potencia pero difieren en que son aplicados en respuesta a un episodio de rechazo [9]. Las dosis de fármacos normalmente se ajustan sobre la base de protocolos de tratamiento empírico que tienen en cuenta parámetros como el peso del paciente, las fluctuaciones de los niveles de fármacos en sangre, etc.

2.1. Glucocorticoides: Prednisona

Los GC fueron los primeros fármacos empleados como inmunosupresores ya que poseen una potente acción antiinflamatoria y efectos inmunomoduladores específicos. Entre ellos, la prednisona es uno de los más utilizados en la clínica. Se trata de un fármaco inactivo que se metaboliza en el hígado a prednisolona, la forma activa.

Aunque su eficacia terapéutica se debe fundamentalmente a la inhibición de la síntesis de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF α , IL-2, IL-8), sus efectos varían entre los diferentes tipos celulares. Aumenta el número de neutrófilos circulantes mientras que disminuyen linfocitos y monocitos, disminuye la expresión de moléculas del complejo

principal de histocompatibilidad (CPH) de clase II en monocitos y macrófagos, inhibe la respuesta de los mastocitos a la IgE, y disminuye la permeabilidad, la expresión de moléculas de adhesión y la síntesis de prostaglandinas en el endotelio vascular, entre otros [10].

Sus efectos terapéuticos están mediados por dos tipos de mecanismos diferentes: genómicos y no genómicos [11] (Figura 4). La vía genómica clásica implica la unión de los GC con receptores citoplasmáticos específicos (cGCR) ya que por su naturaleza lipofílica atraviesan la membrana celular. En su estado inactivo el receptor forma un complejo con proteínas chaperonas, incluyendo las denominadas proteínas de estrés térmico (HSP70, HSP90), inmunofilinas, cochaperonas (p23, Src) y algunas quinasas de la familia MAP [12]. Una vez que los GC difunden pasivamente la membrana celular y se unen al cGCR, cambios en la estructura de éste último determinan la disociación de las chaperonas y el complejo GC-cGCR se transloca al núcleo donde interacciona con el ADN en sitios conocidos como *elementos de respuesta a glucocorticoides* (ERGC), regulando la expresión de ciertos genes [13]. La activación de estos receptores induce dos mecanismos de acción genómica diferenciados: efecto inductor de genes anti-inflamatorios (transactivación) y efecto represor de genes proinflamatorios (transrepresión). En el primer caso el complejo forma un homodímero que se une a ERGC+ y activa la transcripción y síntesis de proteínas antiinflamatorias como anexina-1 (lipocortina-1), I κ B, IL-10 y numerosas enzimas y proteínas reguladoras. Las lipocortinas actúan inhibiendo la síntesis de la fosfolipasa A2, enzima necesaria para la síntesis del ácido araquidónico. Como consecuencia disminuye la síntesis de mediadores químicos de la inflamación, entre los que se encuentran prostaglandinas y leucotrienos, afectando la capacidad de infiltración leucocitaria. A su

vez, se han descrito dos mecanismos diferentes para el efecto represor. Uno de ellos es similar al inductor, pero la interacción directa del complejo monomérico GC-cGCR con el ADN reprime la expresión de genes proinflamatorios, y el sitio de interacción con el ADN se denomina ERGC- [14]. Por otra parte, los glucocorticoides también pueden reprimir la expresión de dichos genes de forma indirecta, mediante interacciones proteicas con factores de transcripción nuclear (NF κ B, NF-AT, STAT5, AP1) o compitiendo con ellos mediante el secuestro de coactivadores necesarios para su función [15].

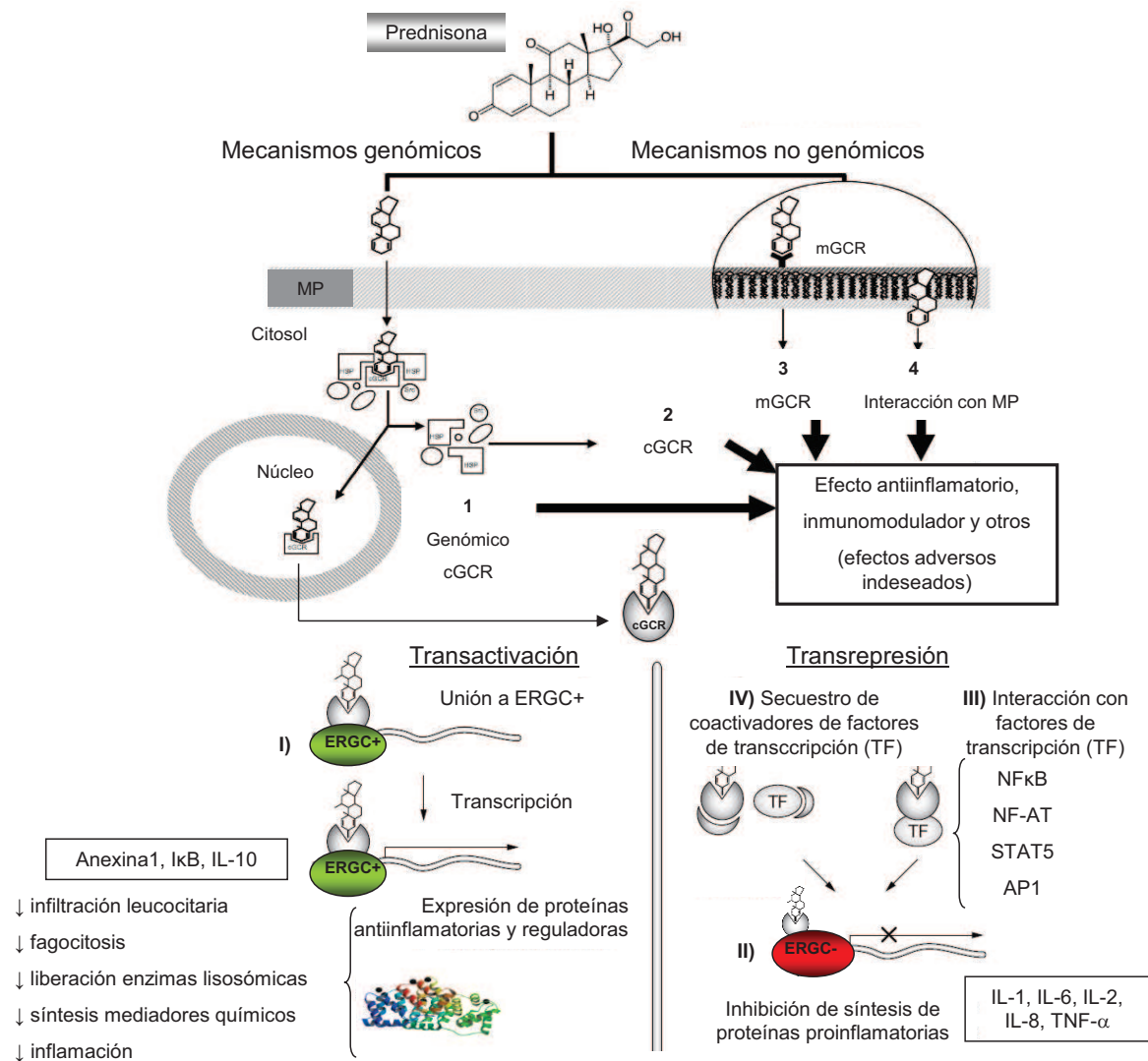


Figura 4. Mecanismos de acción de los glucocorticoides (Adaptado de Stahn C. *et al.* 2007 y 2008).

Por su parte los efectos no genómicos inmediatos de los GC se subclasifican en tres grupos: mediados por receptores citosólicos (cGCR) [16], por receptores de membrana (mGCR) [17], y por interacciones inespecíficas con la membrana plasmática que modifican sus propiedades físico-químicas [18]. En su conjunto, estas interacciones podrían interferir con numerosos procesos celulares tales como cascadas de señalización intracelular inducidas por el complejo TCR, movilización de Ca^{2+} y fosforilación de segundos mensajeros [19].

El tratamiento prolongado tiene importantes efectos secundarios adversos entre los que se encuentran: aumento en la incidencia de las infecciones, diabetogénesis, redistribución de los tejidos grasos, aterosclerosis, hipertensión, osteoporosis, miopatías, alteraciones de la cicatrización, edemas y producción de reacciones psicóticas [20].

2.2. Inhibidores de la calcineurina: Ciclosporina A y Tacrolimus

El mecanismo de acción de los inhibidores de la calcineurina consiste en bloquear a nivel intracelular las señales responsables de la producción de citocinas y moléculas de superficie implicadas en la diferenciación, proliferación y activación de los linfocitos T. No inhiben por completo su producción, sino que reducen la expresión de los genes que codifican para ellas [21].

La ciclosporina A (CsA) es un péptido cíclico lipofílico compuesto por 11 aminoácidos, producido por el hongo *Hypocladium inflatum gams*. Su mecanismo de acción inhibe la primera fase de la activación de las células T. En esta primera fase, se activa la transcripción de ciertos factores como la IL-2, IL-3, IL-4, interferón gamma (IFN- γ), CD154 (CD40L) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-

CSF) que, en su conjunto, permiten que las células T progresen desde la fase G0 a la G1 del ciclo celular. Por su naturaleza hidrofóbica puede difundir pasivamente la membrana y, una vez en el interior celular, la ciclosporina se une a una inmunofilina llamada ciclofilina A (CfA). Seguidamente, el complejo CsA-CfA inhibe a la fosfatasa calcineurina (CaN), una enzima que es activada por calmodulina y calcio. La calcineurina cataliza las reacciones de desfosforilación del factor nuclear de las células T activadas (NF-AT) permitiendo que éste se transloque al interior nuclear, donde al unirse al ADN, induce la expresión de los genes de las citocinas necesarios para la proliferación linfocitaria (Figura 5). Por lo tanto, la CsA inhibe la proliferación celular por su efecto anticalcineurínico [22].

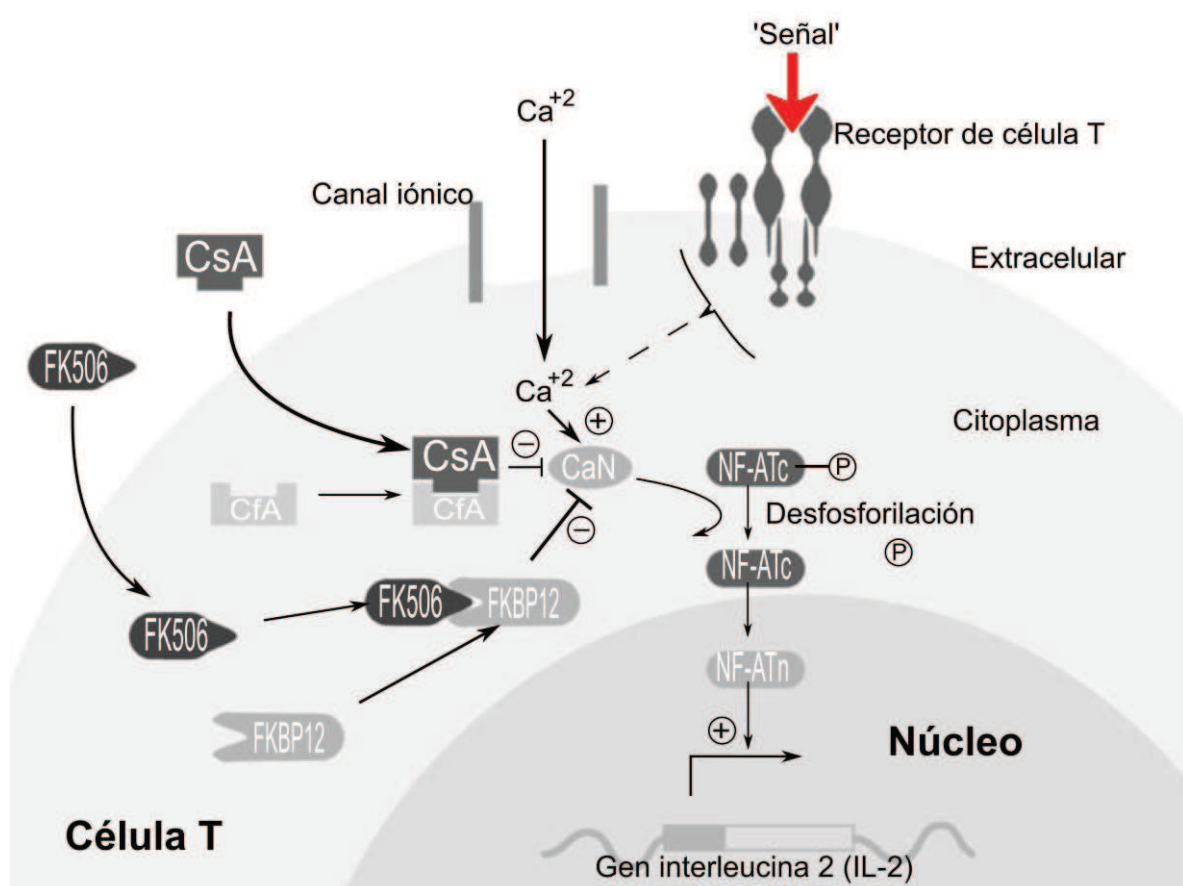


Figura 5. Mecanismo de acción de los inhibidores de la calcineurina: Ciclosporina A y Tacrolimus (FK506) (Adaptado de Stepkowski S.M. *et al.* 2000).

Entre sus efectos adversos destaca la nefrotoxicidad, con una disminución del aclaramiento de creatinina y un desproporcionado incremento de nitrógeno ureico en sangre. También puede producir toxicidad hepática, caracterizada por elevaciones de las transaminasas séricas. Otros efectos adversos son la hipertensión arterial, aparición de diabetes mellitus post-trasplante, hiperlipidemia, hirsutismo y toxicidad neurológica, caracterizada por temblores, parestesia y debilidad muscular [23].

El tacrolimus (FK506) es un agente macrólido inmunosupresor obtenido por fermentación del *Streptomyces tsukubaensis*, descubierto en 1984 en Japón. Es efectivo en la prevención del rechazo resistente a corticoides y ciclosporina, siendo de 10 a 100 veces más potente que la CsA [24]. Su mecanismo de acción es similar al de la CsA, pero forma un complejo con una inmunofilina diferente, la FKBP12 (Figura 5). El FK506 se une también a los receptores de membrana de hormonas esteroideas, inhibiendo la liberación de mediadores de los mastocitos, regulando el número de los receptores a IL-8 y disminuyendo la capacidad de adhesión y la expresión de E-selectina en los vasos sanguíneos. Todas estas acciones resultan en una disminución del reconocimiento de los antígenos y en una regulación negativa de la cascada inflamatoria [25]. Se ha demostrado también su capacidad para inhibir la proliferación de células NK y su actividad citotóxica en respuesta a la IL-2 [26].

Los efectos adversos son similares a los descritos para la ciclosporina, pero con menor incidencia de hipertensión, hiperlipidemia e hirsutismo. En cambio, en comparación con la CsA, FK506 aumenta la incidencia de diabetes post-trasplante y los efectos nefrotóxicos, neurológicos y gastrointestinales.

2.3. Micofenolato mofetil

El micofenolato mofetil (MFM) es un éster del ácido micofenólico (AMF) producido por algunas especies de hongos del género *Penicillium*. A nivel hepático el MFM es hidrolizado y convertido en AMF, su forma metabólicamente activa. El metabolito activo es un inhibidor potente, selectivo, no competitivo y reversible de las inosinmonofosfato-deshidrogenasas I y II (IMPDH) [5]. La IMPDH tipo I predomina en células en reposo, mientras que la tipo II es inducida y expresada en células activadas. Se trata de una enzima clave que interviene en la síntesis de purinas durante la fase S del ciclo celular, por lo que su inhibición bloquea la síntesis *de novo* de ADN. Tal como se esquematiza en la Figura 6, la síntesis de guanosina monofosfato (GMP) corresponde al punto donde confluyen las dos vías implicadas en la síntesis de purinas; en la síntesis *de novo* la IMPDH cataliza la conversión de la inosina monofosfato (IMP) en GMP, mientras que en la vía de rescate una guanina es convertida en GMP por acción de la hipoxantina guanina fosforiltransferasa (HGPRTasa).

Dado que los linfocitos T y B carecen de mecanismos de reutilización de purinas, dependen de manera decisiva para su proliferación de la actividad de la IMPDH. Por ello el AMF tiene un efecto citostático más potente en los linfocitos que en otros tipos celulares, afectando principalmente a la proliferación inducida por activación, ya que inhibe preferentemente a la IMPDH II [27]. También se han descrito otros efectos inmunosupresores del AMF entre los que se encuentran disminución de la síntesis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, INF- γ , TNF- α), inhibición de la secreción de anticuerpos en respuestas humorales primarias, inducción de apoptosis en linfocitos T, inhibición de la maduración de células dendríticas, inhibición de la expresión y

posterior glicosilación de moléculas de adhesión, disminución de la producción de óxido nítrico por macrófagos activados, etc. [28, 29]. Los efectos adversos están relacionados principalmente con síntomas gastrointestinales (diarrea y dispepsia), mielosupresión (principalmente neutropenia y anemia leve) y aumento de las infecciones virales y por *Candida albicans* [8].

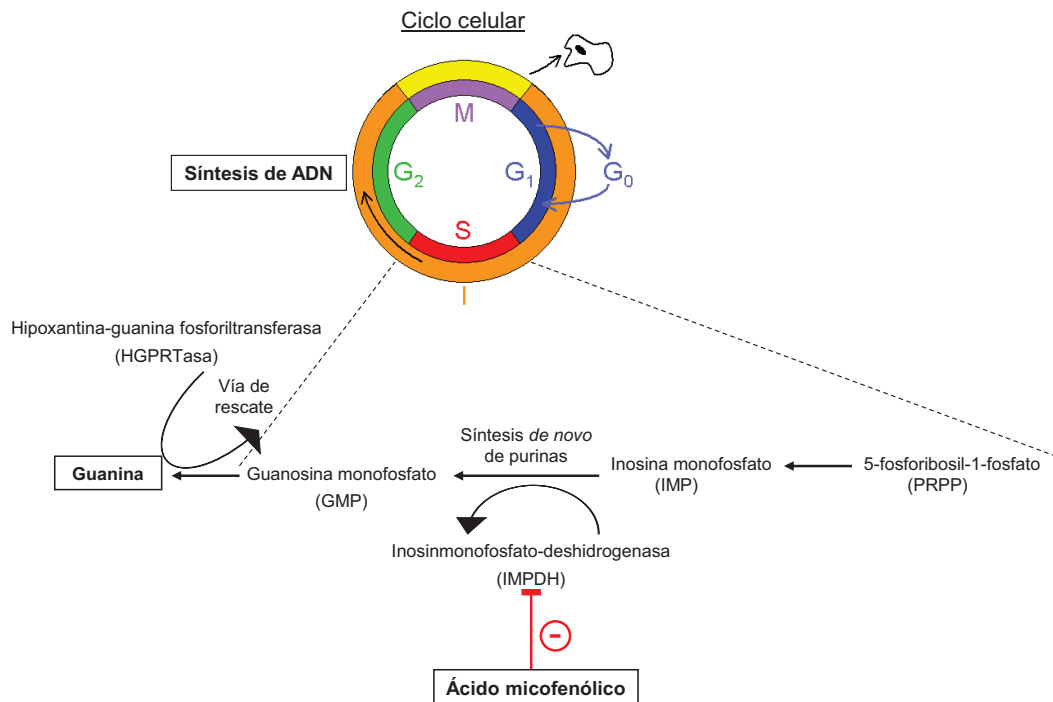


Figura 6. Mecanismo de acción del micofenolato mofetil (Adaptado de Stepkowski S.M. *et al.* 2000)

2.4. Daclizumab

El receptor de alta afinidad de la IL2 está compuesto por las subunidades α (CD25), β (CD122) y γ (CD132). CD25 es específico para IL2, CD122 forma parte, además, del receptor de IL15 y CD132 es una cadena compartida por muchos receptores de citocinas [30]. En situación basal el heterodímero $\beta\gamma$ actúa como IL2-R de afinidad intermedia ($k_d=10^{-9}$), aumentando su afinidad tras la unión de la subunidad α al activarse el linfocito ($k_d=10^{-11}$) [31].

El daclizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que bloquea específica y antagónicamente CD25. Su utilización como tratamiento inductor en el trasplante de órganos sólidos se basa en su capacidad transitoria de inhibir la expansión clonal de los linfocitos T aloreactivos que median el rechazo agudo del órgano [32]. Sin embargo, el mecanismo de acción exacto del daclizumab *in vivo* no ha sido completamente esclarecido [33].

La acción bloqueadora del daclizumab inhibe la vía Jak/Stat, por lo que previene los eventos de señalización intracelular desencadenados por la IL-2 (señal 3). Sin embargo, su acción antagonista puede ser revertida en presencia de altas dosis de ésta citocina. En este sentido se ha sugerido que la expresión del IL-2R de afinidad intermedia ($\beta\gamma$) podría actuar como vía alternativa en un intento del sistema por restaurar la homeostasis [34].

Así mismo, estudios previos indican que el efecto inmunomodulador del daclizumab se debe no sólo a su capacidad para bloquear CD25, sino que podría actuar además mediante varios mecanismos: i) endocitosis del complejo IL-2R/daclizumab [34], ii) interferencia con la vía de señalización IL-15 [35], iii) inhibición de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40L) y la producción de IFN- γ [36].

A pesar de la ventaja clínica que ha supuesto su introducción como tratamiento inductor, algunas evidencias apuntan a que un uso prolongado del mismo podría tener consecuencias negativas en la inducción de tolerancia. Por una parte la expresión de CD25 de alta intensidad caracteriza a una subpoblación de linfocitos T CD4 con capacidad supresora (Treg), cuya función es primordial en el mantenimiento de la tolerancia [37, 38]. Por otra parte, uno de los mecanismos mediante el cual el sistema inmune elimina células autoreactivas, es la muerte celular inducida por activación

(AICD), que está mediado por el sistema IL-2/IL-2R [35]. En ambos casos cabría esperarse que una acción bloqueadora prolongada sobre CD25 fuera perjudicial para el establecimiento de la tolerancia a medio y largo plazo. Sin embargo, varios estudios indican que la incidencia de rechazos en los pacientes tratados con daclizumab es menor en relación a otros inmunosupresores [39].

Al tratarse de un anticuerpo monoclonal humanizado diseñado por ingeniería genética (el 90% de las secuencias que lo componen son humanas), posee poca inmunogenicidad y una vida media en la circulación similar a la IgG endógena (aproximadamente 20 días). Se ha demostrado que es bien tolerado cuando se administra a una dosis de 1 mg/kg cada dos semanas en pacientes sometidos a TC. Su administración no induce la síntesis de anticuerpos clínicamente relevantes, ni se observa un aumento en la incidencia de infecciones ni tumores en estos pacientes [40]. Se ha demostrado que utilizado en combinación con anticalcineurínicos, corticosteroides y micofenolato mofetil, tiene un perfil de tolerancia y seguridad favorable.

3. Problemas asociados a la inmunosupresión

En el contexto del trasplante de órganos, el objetivo de la inmunosupresión es inhibir la respuesta del sistema inmunitario frente al aloinjerto para evitar el rechazo. Como consecuencia del uso prolongado de dichos fármacos se afecta el estado de inmunocompetencia de los pacientes, lo que propicia la aparición de infecciones oportunistas, trastornos autoinmunes y reacciones de hipersensibilidad, así como diversas formas de cáncer y desórdenes linfoproliferativos. A todo ello hay que añadir la toxicidad directa de los inmunosupresores (que constituye uno de los mayores

problemas que afectan a la supervivencia y calidad de vida del paciente) que pueden provocar daño crónico renal, hipertensión arterial, diabetes, hiperlipidemias, osteoporosis, etc. [41]. Dentro de los desórdenes linfoproliferativos tienen especial interés un grupo heterogéneo (PTLD), que pueden variar desde una expansión policlonal benigna de células B, hasta linfomas malignos con patrón monoclonal. Entre los factores de riesgo que se asocian a los PTLD se encuentra la infección primaria con virus Epstein–Barr (EBV), episodios de rechazo, tipo de trasplante, intensidad de la inmunosupresión, edad y la coinfección con citomegalovirus [42].

Para alcanzar el equilibrio adecuado entre profilaxis del rechazo y respuestas inmunitarias necesarias, se suele determinar el estado neto de inmunosupresión mediante la cuantificación de los niveles de fármacos en sangre. Sin embargo, esta medida no refleja en ningún caso los efectos fisiológicos reales de la terapia sobre los diferentes parámetros inmunológicos. Por ello, es necesario optimizar técnicas más precisas que permitan la individualización del tratamiento. En este sentido, se están desarrollando sistemas basados en la genómica y proteómica, que identificarían patrones de expresión de genes y proteínas asociados a infecciones específicas y/o rechazo del órgano [43]. Otras estrategias de monitorización inmunológica para la prevención de infecciones y el rechazo serán descritas en el Capítulo 4.

La incidencia global de infección en el TC oscila entre el 30% y el 60%, con una mortalidad relacionada del 4-15%. Las infecciones más frecuentes son las bacterianas (43-60%), seguidas de las víricas (40-45%) y, en menor proporción, las fúngicas y las causadas por protozoos (8-14%). La mayoría de las infecciones se manifiestan durante los 3 primeros meses y se localizan principalmente en el pulmón y la cavidad torácica [44].

Entre los factores que predisponen a infección se encuentran aquellos del huésped: edad, enfermedad de base, colonización previa por patógenos nosocomiales, infección latente, tratamientos antibióticos, ausencia de inmunidad específica (CMV, toxoplasma, EBV, VZV), diabetes, insuficiencia renal, desnutrición; y factores del trasplante: tipo y trauma quirúrgico, duración de la cirugía, lesión del injerto (preservación, tiempo de isquemia), infección latente del injerto, tipo de inmunosupresión, así como la utilización de profilaxis antiinfecciosa [45].

El riesgo de infección posterior al trasplante es una variable que cambia con el tiempo, y sus variaciones se observan fundamentalmente en los momentos en los que se modifica la pauta de la terapia inmunosupresora. Al no existir en la actualidad ninguna herramienta específica que nos permita medir el riesgo individual de infección, las estrategias profilácticas se basan en los resultados de pruebas serológicas y la historia previa epidemiológica del paciente. Dichos factores epidemiológicos de exposición se dividen en cuatro categorías: i) infecciones derivadas del donante, ii) infecciones derivadas del receptor, iii) infecciones nosocomiales e iv) infecciones comunitarias. Todas ellas en conjunto, conforman el patrón de infecciones post-trasplantes en un esquema bastante predecible (Figura 7).

Los agentes infecciosos derivados del donante generalmente se encuentran latentes en los tejidos de los órganos trasplantados y, al entrar en un medio propicio, se reactivan e invaden tejidos del receptor. De forma general se suele considerar que frente a un donante seropositivo para un patógeno dado, existe un alto riesgo de infección en un receptor seronegativo, mientras que el riesgo disminuye si el receptor es seropositivo.

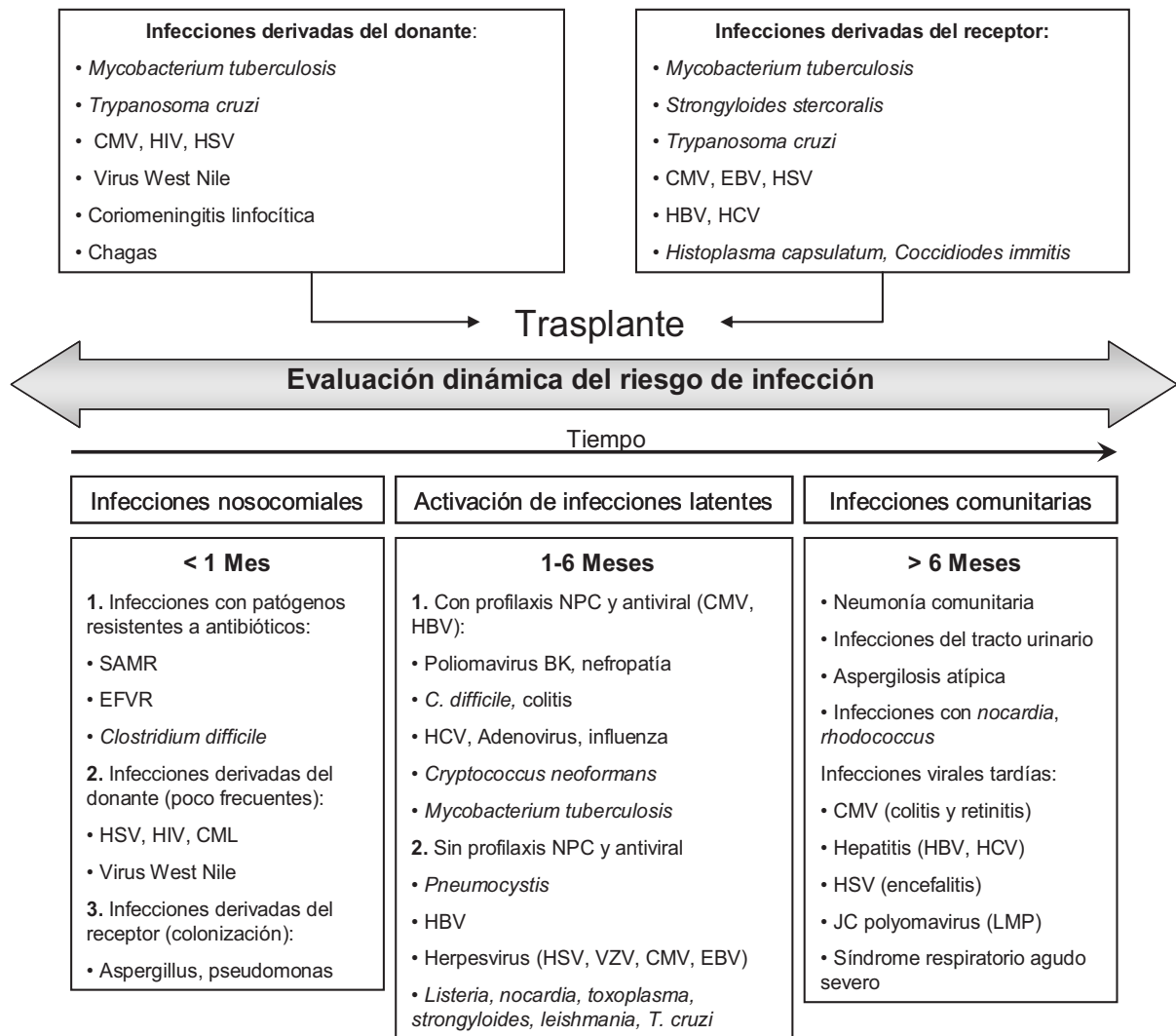


Figura 7. Evolución de los procesos infecciosos en el período post-trasplante.

CMV: Citomegalovirus, EBV: Virus Epstein-Barr, HSV: Virus Herpes simples, VZV: Virus Varicela-Zoster, HBV: Virus de la hepatitis B, HCV: Virus de la hepatitis C, SAMR: Staphylococcus aureus metiliclin-resistente, EFVR: Enterococcus faecalis vancomycin-resistente, CML: Coriomeningitis linfocítica, NPC: Neumonía por *Pneumocystis carinii*, LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva.

La evaluación dinámica del riesgo de infección se ha hecho necesaria dado que el patrón clásico ha ido cambiando a medida que se han introducido nuevos agentes inmunosupresores, y se han modificado los protocolos profilácticos de rutina. La introducción de los fármacos antivirales y la profilaxis anti-*Pneumocystis carinii* han hecho que disminuya la incidencia de las infecciones por herpes y las neumonías. En los últimos años se ha observado la aparición de infecciones tardías, debido probablemente a que los efectos de la terapia inmunosupresora suelen persistir por un

período de tiempo que supera el margen protector de la profilaxis antimicrobiana. En el período post-trasplante temprano (< 1 mes) las infecciones oportunistas son poco comunes, dado que el efecto de la inmunosupresión no es completo aún. En éste período, la mayoría de infecciones son de origen bacteriano, se localizan en la cavidad torácica y se relacionan con la cirugía, el post-operatorio y la instrumentación quirúrgica.

Sin embargo, en el período intermedio (entre 1-6 meses) predominan las infecciones virales y fúngicas, disminuyendo el riesgo global en el período tardío (> 6 meses) por la atenuación del régimen inmunosupresor. No obstante, en éste momento el riesgo de infección persiste debido a las fuentes de patógenos comunitarios, que pueden derivar en infecciones crónicas, potencialmente dañinas para el órgano trasplantado [46].

En general las estrategias de prevención de infecciones se pueden desglosar en: vacunación pre-trasplante, profilaxis universal y terapia preventiva. En el primer caso, previo al trasplante se debe valorar la necesidad de inmunización para prevenir varias infecciones comunes, entre las que se encuentra: sarampión, rubéola, paperas, difteria, tétanos, hepatitis B, poliomielitis, varicela, influenza y neumonía neumocócica [47]. En la profilaxis universal los fármacos se administran a todos los pacientes en riesgo por un período determinado de tiempo, mientras que el enfoque de la terapia preventiva consiste en administrar dichos fármacos sólo si se detecta, mediante técnicas moleculares o determinaciones antigénicas sensibles, una infección emergente antes de que aparezcan los síntomas.

3.1. Citomegalovirus en el trasplante cardiaco

En la actualidad, y a pesar de las intervenciones profilácticas, el citomegalovirus humano (CMV) continúa siendo una de las principales complicaciones clínicas en el TC, afectando al 7-35% del total de pacientes [44]. El CMV es un herpes virus, también conocido como herpes virus humano 5 (HHV-5). Pertenece a la subfamilia *Betaherpesvirinae* de la familia *Herpesviridae*. Su nombre alude al aumento de tamaño que se observa en las células infectadas producto del debilitamiento del citoesqueleto. Al igual que el resto de herpes tiene la capacidad de permanecer latente en los tejidos del organismo por largos períodos de tiempo, y se reactiva cuando la inmunocompetencia se ve comprometida. Demográficamente se encuentra de manera universal en todas las localizaciones geográficas y en todos los grupos socioeconómicos.

La infección por CMV puede causar de forma directa enfermedad invasiva, pero también puede provocar varios efectos secundarios de forma indirecta. La presentación clínica más común y menos grave es el síndrome mononucleósico, que consiste en la aparición de fiebre, mialgias, artralgias, odinofagia y mal estado general, junto con leucopenia, trombocitopenia y elevación ocasional de las enzimas hepáticas. El síndrome CMV invasivo se caracteriza generalmente por fiebre y neutropenia, que pueden ir acompañadas de linfadenopatías, y se desarrolla fundamentalmente a lo largo del primer año post-trasplante. En algunos casos la infección puede progresar de manera órgano-específica ocasionando diferentes síntomas dependiendo del órgano afectado: nefritis, hepatitis, carditis, colitis, neumonitis, retinitis, etc. En los trasplantados cardiacos, las enfermedades focales más frecuentes son la neumonía y la afección gastrointestinal, que comporta especial gravedad. Sus manifestaciones

clínicas consisten en dolor abdominal, diarrea, hemorragia digestiva, perforación y reactivación ulcerosa, aunque puede ser asintomática [44]. Por su parte los efectos secundarios se asocian a un incremento global del riesgo de adquirir infecciones oportunistas con posibles efectos patogénicos a largo plazo (i.e. PTLD asociada a EBV), un aumento en el riesgo de rechazo y fallo del órgano (esclerosis coronaria acelerada, disfunción endotelial, enfermedad vascular del injerto), desarrollo de tumores, diabetes mellitus, síndrome de Guillain-Barré, entre otros [48].

Desde el punto de vista epidemiológico en los pacientes trasplantados se pueden dar 3 posibles escenarios para el CMV: infección primaria por discordancia serológica donante-receptor (D+/R-), reactivación viral de una infección latente (D-/R+) o superinfección (D+/R+) [49]. La infección primaria es la forma más severa de la enfermedad, aunque se presenta en raras ocasiones dada la baja frecuencia de individuos CMV-seronegativos. No obstante, una estrategia de prevención adecuada debería incluir la monitorización del riesgo de infección por CMV en todos los pacientes inmunosuprimidos, independientemente del estatus serológico [50].

En el manejo clínico de los pacientes trasplantados la profilaxis universal ha demostrado ser una opción efectiva para prevenir infecciones, no sólo por CMV, sino también por otros herpes virus, así como algunos hongos y bacterias [51]. A esto hay que añadir el beneficio de reducir episodios de rechazo, vasculopatías y disminuir el desarrollo de desórdenes linfoproliferativos post-trasplantes [52]. Sin embargo ésta estrategia presenta algunas desventajas tales como el alto coste de tratar a un elevado número de pacientes durante largos períodos de tiempo, mielotoxicidad [53], infección oculta [54], la aparición de enfermedad CMV tardía tras la interrupción de la profilaxis (media=152 días post-trasplante) con manifestaciones atípicas y una alta

morbilidad [55] y la resistencia a ganciclovir [56]. Generalmente la profilaxis anti-CMV se administra durante los 3-6 primeros meses post-trasplante y consiste en altas dosis de acyclovir, ganciclovir o valganciclovir y, eventualmente, gammaglobulinas hiperinmunes (preparado de sueros humanos que contienen altos títulos de anticuerpos anti-CMV). El diagnóstico de certeza de enfermedad por CMV se basa en la demostración de cuerpos de inclusión citomegálicos en muestras tisulares.

En los últimos años los avances en las técnicas de diagnóstico, han hecho posible la introducción de la terapia antiviral preventiva. Entre dichos ensayos cabe destacar la evaluación de la presencia de virus con capacidad infectiva en sangre (viremia), la cuantificación de leucocitos pp65 positivos (antigenemia) y la cuantificación de la carga viral mediante PCR (DNAemia) [57]. Aunque esta propuesta terapéutica tiene la ventaja de ser menos costosa, menos tóxica y no generar resistencias, el tiempo que transcurre entre la aparición de las primeras señales de activación viral y el desarrollo de síntomas clínicos, puede no ser suficiente para que el tratamiento sea efectivo.

En resumen, siendo ambas estrategias igualmente efectivas para la prevención de la infección por CMV, actualmente es motivo de debate entre los clínicos cuál resulta más apropiada. Algunos autores proponen que la profilaxis universal se reserve sólo para aquellos pacientes con alto riesgo (D+/R-), mientras que la terapia preventiva sea la pauta que se aplique cuando existe un riesgo moderado-bajo [58]. Por su parte, la utilización de los sueros hiperinmunes se recomienda como profilaxis combinada con antivirales, en aquellos pacientes sometidos a TC de alto riesgo, para disminuir el riesgo de vasculopatías y enfermedades coronarias [59].

En cualquier caso, ninguno de los dos enfoques confiere protección contra el desarrollo de enfermedad tardía y la viremia persistente. Por éste motivo, el impacto a

medio y largo plazo de los efectos inmunomoduladores del CMV sobre el estado clínico general del paciente, requiere una evaluación detallada. El mantenimiento de la inmunocompetencia frente al CMV depende de la activación y proliferación de linfocitos T (CD4 cooperadores y CD8 citotóxicos) específicos. Los péptidos virales IE1 y pp65 estimulan la producción de IFN- γ y promueven la activación de las respuestas citotóxicas antígeno-específicas [60, 61]. Sin embargo, la administración de fármacos inmunosupresores limita la capacidad de respuesta en éstos pacientes, tanto si se trata de una infección primaria, como secundaria. A este efecto supresor se suman los mecanismos inmunomoduladores del propio virus que se dividen en 3 categorías [62]:

- A. **Afectación de la replicación celular:** La leucopenia característica que se observa durante una infección activa por CMV está provocada por la supresión viral de las fases G1 y S del ciclo celular en éstas poblaciones.

- B. **Señalización celular deficiente:** Los mecanismos de señalización intra/extracelular se pueden afectar interfiriendo en las transformaciones post-traduccionales de los péptidos mensajeros (i.e. glicosilación, plegamiento tridimensional, etc.)

- C. **Escape inmunológico** (resistencia de la célula infectada a ser atacada por las defensas del huésped): El CMV interrumpe el desarrollo normal del TCR, disminuye la expresión del CPH, entre otros factores implicados en el reconocimiento antigénico. Además se ha observado que el virus codifica algunas proteínas de membrana que modifican los eventos de reclutamiento y tráfico celular que se producen durante una respuesta inmunitaria, de tal forma que se incrementa la quimiotaxis de neutrófilos hacia las áreas de infección, facilitando la expansión patogénica del virus por el organismo.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, resulta obvio que la mejor estrategia en relación al CMV, es la prevención. No obstante, se mantiene el debate sobre si se debe administrar profilaxis universal o terapia preventiva, la duración del tratamiento, o qué fármacos son más efectivos, menos costosos y menos tóxicos [63]. Las estrategias terapéuticas futuras van encaminadas hacia el desarrollo de una vacuna segura y efectiva. Se han ensayado sin éxito algunas variantes con virus atenuados y actualmente se encuentran en diferentes fases de monitorización preclínica varias propuestas basadas en antígenos recombinantes [64].

4. Monitorización inmunológica en pacientes trasplantados

Para evitar episodios de rechazo del injerto y complicaciones derivadas del tratamiento inmunosupresor, es necesario establecer una oportuna monitorización inmunológica. Pocos trabajos han investigado el posible poder predictivo de marcadores de la inmunidad humoral o celular que puedan ser útiles para identificar el riesgo de desarrollar infecciones en pacientes inmunosuprimidos [65], a diferencia de los muchos esfuerzos focalizados en el estudio de marcadores inmunológicos de predicción del rechazo [66]. La monitorización de las alteraciones de la inmunidad humoral y celular es utilizada frecuentemente en otros modelos humanos de inmunodeficiencia primaria o secundaria, así como también en la evaluación de la reconstitución inmunológica tras el trasplante de médula ósea, pero no suele utilizarse en el contexto del trasplante de órganos sólidos. Por tanto, resulta paradójico que, reconociéndose el problema que significa la presencia de infecciones post-TC, existan muy pocos trabajos que estudien el estado de inmunocompetencia de éstos pacientes a lo largo del tiempo. Actualmente la modificación de los protocolos de

inmunosupresión y la introducción de profilaxis antimicrobiana en ausencia de infección, suele establecerse principalmente, sobre la base de 3 determinaciones:

1. Alteraciones en parámetros hematológicos (recuento de leucocitos y neutrófilos)
2. Reacción de hipersensibilidad retardada de células T contra antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*
3. Evaluación serológica de la presencia de anticuerpos IgG anti-CMV en donante y receptor

La falta de marcadores inmunológicos de predicción de infección se debe en parte a que los estudios evaluando la inmunocompetencia antes y después del trasplante son escasos [67-70]. A esto hay que añadir la dificultad que supone la identificación de grupos de control apropiados para comparar las variables analizadas. Se asume el estado de inmunocompetencia en el pre-TC y de inmunosupresión post-TC, pero en la actualidad no se realiza una evaluación objetiva, cuantitativa y funcional, de los parámetros inmunológicos. Por todo ello sería de mucha utilidad, no sólo la identificación de marcadores humorales y celulares, tanto de la inmunidad innata como de la específica, sino también la validación del valor predictivo de dichos marcadores en el contexto clínico del trasplante. Esto permitiría el diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de cualquiera de las patologías asociadas.

4.1. Perfiles inmunológicos asociados a infección

4.1.1. Parámetros de la inmunidad humoral adquirida: Inmunoglobulinas séricas, subclases de IgG y anticuerpos específicos

La disminución en los niveles de IgG puede estar causada por factores que afecten directamente la síntesis de inmunoglobulinas, por pérdida excesiva en orina o tracto gastrointestinal o bien por trastornos que aumenten el catabolismo de las mismas. La hipogammaglobulinemia (HPG) se clasifica según los valores de IgG como leve (500-700 mg/dl) moderada (350-500 mg/dl) o severa (<350 mg/dl) [71]. Estudios previos en TC describen la HPG severa como un factor de riesgo de infección, incluida la enfermedad por CMV [72, 73]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo en el Hospital Gregorio Marañón en un estudio retrospectivo de 41 pacientes trasplantados entre 1998 y 2002. Las variables que se asociaron con un mayor riesgo de desarrollar infecciones fueron los niveles de IgG e IgG1 pre-trasplante (<1055mg/dl y <695mg/dl respectivamente), así como valores de IgG post-trasplante menores de 589 mg/dl [74]. Posteriormente al analizar prospectivamente mediante regresión de Cox una cohorte de 38 pacientes trasplantados en el mismo centro entre 2002 y 2004, los valores de IgG pre (<1140mg/dl) y post-trasplante (<679mg/dl) se asociaron con un mayor riesgo de infección [69]. Cabe destacar de estos estudios el valor predictivo de la IgG basal (anterior al trasplante) lo que amplía el margen de tiempo para una posible intervención clínica. También en el contexto del TC, la hipogammaglobulinemia severa post-trasplante ha sido descrita como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de episodios de diarrea por *Clostridium difficile* [75].

Así mismo, en trasplante de pulmón se ha estudiado el posible papel de la HPG moderada en el desarrollo de neumonías, bacteriemias, y enfermedad invasiva por CMV [76-78]. En trasplante renal se ha descrito una mayor incidencia de infecciones recurrentes del tracto respiratorio con posterior desarrollo de bronquiectasias en pacientes con HPG [79] o bajos niveles de IgG₁ [80]. Otro estudio prospectivo de 92 pacientes relaciona la HPG pre-trasplante con el desarrollo de infecciones, confirmando el posible valor predictivo de las determinaciones basales [81]. Sin embargo, en trasplante hepático no se observa la misma tendencia. Curiosamente en éste caso, varios autores han reportado que aquellos pacientes que desarrollaron infecciones post-trasplante tenían niveles elevados de IgG basal [67, 82].

La determinación de los niveles de anticuerpos específicos ofrece información acerca de la capacidad de respuesta en relación a un patógeno determinado, por lo que también se ha valorado como posible marcador de riesgo. Tal es el caso de los anticuerpos anti-neumococo (anti-PPS) cuyos niveles disminuyen de forma progresiva durante el primer año post-trasplante, a pesar de que los pacientes son vacunados de forma profiláctica antes de recibir inmunosupresión [83]. En un estudio retrospectivo de una cohorte de 126 pacientes pediátricos sometidos a TC, se pudo demostrar la asociación entre ausencia de respuesta anti-PPS (definida como niveles de IgG anti-PPS <20mg/dl) y el desarrollo de complicaciones por infecciones respiratorias crónicas [84].

4.1.2. Parámetros de la inmunidad humoral innata: Factores del complemento y lectina unidora de manosa

Los componentes humorales de la inmunidad innata juegan un importante papel en la defensa temprana contra agentes infecciosos. A pesar de ello, pocos estudios reportan

la relación de éstos factores con la aparición de eventos infecciosos post-trasplantes. En TC se ha observado que los niveles de C3 y C4 disminuyen tras el trasplante [85]. En la cohorte descrita por Sarmiento *et al.* [69] se observó que aquellos pacientes con valores de C3 bajos al mes post-trasplante, presentaban más complicaciones infecciosas. Esta misma tendencia se demostró en trasplante hepático [67].

La lectina unidora de manosa (MBL) es un miembro de la familia de colectinas, que son proteínas séricas que reconocen patrones de carbohidratos frecuentes en la superficie de microorganismos patógenos. En trasplante renal se describió la asociación que existe entre niveles bajos de MBL al año post-trasplante, con una mayor incidencia de sepsis e infecciones virales [81]. En el mismo contexto, la deficiencia de MBL (definida como niveles <500ng/ml) se asoció al desarrollo de enfermedad CMV tardía en pacientes tratados con valganciclovir profiláctico [86].

4.1.3. Parámetros de la inmunidad celular: Poblaciones linfocitarias, monocitos y neutrófilos

El nivel más simple de investigación de la inmunidad celular es la determinación del número de linfocitos, un parámetro hoy en día totalmente asequible en la práctica clínica rutinaria. A pesar de ello, cuando buscamos trabajos relacionando linfopenia con infecciones en el TC, la única referencia bibliográfica encontrada es un estudio de Khalaf *et al.* que describe las alteraciones de las subpoblaciones de células T y B en 10 pacientes sometidos a TC y tratados con gammaglobulina antitimocítica y azatioprina [87]. En un seguimiento de 3 a 60 meses, se observó una persistente linfopenia T (media de 467 células/ml) y B (media de 95 células/ml). Sin embargo, el número de pacientes es muy bajo, no se analizó la asociación con eventos infecciosos y el tipo de inmunosupresión utilizado fue muy diferente al actual. Un trabajo mucho

más reciente en trasplante renal ha sugerido que la monitorización de linfocitos T CD4 y CD8 podría servir para detectar el riesgo de desarrollar enfermedad por CMV. En éste estudio la linfopenia T CD4 se correlacionó con un riesgo incrementado de sufrir infecciones, cáncer y aterosclerosis [88].

Pero no sólo la cuantificación linfocitaria resulta útil a la hora de monitorizar la capacidad de defensa, también la identificación de los diferentes perfiles funcionales y el análisis del estado de maduración/activación en estas poblaciones podrían añadir información. En relación a los marcadores de activación celular en linfocitos T, se ha descrito el incremento de la expresión de la molécula HLA-DR tras infección por CMV en trasplante renal [89], mientras que en el mismo contexto, altos valores de la subpoblación CD8/CD38⁺ se asoció a enfermedad CMV con un valor predictivo positivo del 90% en caso de infección primaria [90]. Recientemente, la alta expresión de CD38 en células citotóxicas (CD3⁺CD8⁺/CD38^{high}) se ha asociado a DNAemias positivas con posterior desarrollo de infección. En éste último caso se reportó un valor predictivo negativo del 100% para frecuencias superiores al 20% de la subpoblación identificada como marcador diagnóstico, recomendándose su utilización especialmente en casos donde las DNAemias son indetectables en sangre periférica porque existe enfermedad invasiva tisular [91]. En trasplante hepático se realizó un estudio similar, pero en éste caso los autores sugieren la monitorización de los niveles de expresión de CD38 en la superficie de células CD3⁺CD8⁺ como marcador de activación viral e infección temprana, aunque no establecen un valor de corte para la discriminación [92]. Por su parte, en monocitos, bajos niveles de HLA-DR se han asociado al desarrollo de sepsis en trasplante hepático [93]. Además, se han descrito alteraciones

inmunofenotípicas y funcionales de las células dendríticas en pacientes con infección CMV post-TC [94].

De forma general, en el contexto de trasplante de órganos sólidos, la neutropenia se considera un factor de riesgo asociado al desarrollo de infecciones. Sin embargo, al contrario de lo que parece ser un indicador de sobre-inmunosupresión en sangre periférica, la neutrofilia se ha relacionado con la aparición de infecciones bacterianas o fúngicas del espacio pleural en trasplante pulmonar. Las efusiones pleurales de los pacientes infectados presentan un elevado número de neutrófilos con porcentajes superiores a 21%, por lo que éste parámetro ha sido empleado como marcador de infección oculta con un 70% de sensibilidad y 79% de especificidad [95].

4.1.4. Estudios funcionales: Respuestas CMV-específicas

Al ser la infección por CMV una de las complicaciones más frecuentes en pacientes trasplantados, varios investigadores han analizado la relación entre la capacidad de respuesta celular frente al CMV y la prevalencia de infección activa en varios tipos de trasplantes [60, 61, 68, 70, 96-105]. Los métodos para evaluar la inmunidad CMV-específica son muy variables, así como también los resultados derivados de los mismos.

En un estudio preliminar Boland *et al.* analizaron la relación entre la proliferación celular de linfocitos estimulados con fibroblastos infectados con CMV y la prevalencia de infección activa por CMV en 105 pacientes seropositivos de varios tipos de trasplantes. Los resultados mostraron que la presencia de respuesta celular, detectable por incorporación de ^3H -timidina, se asociaba con menor riesgo de infección activa [98]. Un resultado análogo se obtuvo en 20 pacientes trasplantados de riñón, al

observarse una correlación inversa entre el desarrollo de infección y la capacidad citotóxica de los linfocitos CD8 CMV-específicos, generados por estimulación frente a fibroblastos autólogos infectados y medida mediante liberación de ^{51}Cr [99].

Actualmente las respuestas CMV-específicas se pueden medir cuantitativa y cualitativamente, analizando por separado células T CD4 cooperadoras y CD8+ citotóxicas. Los linfocitos aislados de sangre periférica son estimulados con péptidos antigénicos del virus (IE1, pp65), células infectadas o lisados celulares. Las células estimuladas responden produciendo diferentes citosinas (INF- γ , TNF- α), cuya presencia se valora por citometría de flujo (CFC). De ésta forma se puede analizar el tipo y número de linfocitos específicos que responden al estímulo, y por otra parte, la calidad de la respuesta en términos de citocina producida. Otras técnicas empleadas para medir la presencia de citocinas incluyen la utilización de tetrámeros de HLA y el inmunospot ligado a enzima (ELISPOT), aunque en éste último caso no es posible discriminar las subpoblaciones linfocitarias [106].

Mediante CFC Bunde *et al.* estudiaron 27 pacientes trasplantados de corazón y pulmón y observaron que las frecuencias de células T CD8 IE1-específicas por encima de 0.2% (día cero) y 0.4% (día 14) discriminaban entre pacientes que no desarrollaban enfermedad CMV y aquellos con mayor riesgo [60]. Una estrategia similar fue empleada por Gerna *et al.* en la monitorización de las respuestas específicas en 38 pacientes trasplantados (20 corazón; 9 pulmón; 9 riñón). En éste caso los linfocitos T fueron estimulados con células dendríticas autólogas infectadas con CMV al mes post-trasplante. La mayoría de los pacientes que recuperaron los niveles basales de respuesta específica, fueron capaces de resolver los eventos infecciosos, mientras que aquellos que tuvieron una recuperación tardía (posterior al mes post-trasplante)

desarrollaron enfermedad CMV que requirió tratamiento antiviral [100]. Este mismo grupo evaluó posteriormente una cohorte de 20 pacientes trasplantados que desarrollaron infección primaria (n=4) o reactivación viral (n=16) durante el primer año post-trasplante. Los resultados mostraron que la protección contra el virus se asociaba a la presencia de respuesta T específica para varios péptidos virales, sin que ninguno de ellos en particular reflejara de forma consistente un efecto protector [101]. Utilizando una metodología más completa para el estudio de la respuesta pp65-específica de linfocitos T CD8 en trasplante hepático, se encontró que la activación de dichas células (definidas por alta expresión de CD38) correlacionaba con un incremento en las transaminasas y la presencia de anomalías histológicas, incluso con DNAemia negativa para CMV [102].

En relación a los linfocitos CD4, se ha descrito que existe una correlación inversa entre el número de células CMV-específicas y la frecuencia de eventos infecciosos en trasplante de pulmón [61]. En un estudio piloto reciente se monitorizó la respuesta anti-CMV mediante el uso de tetrámeros en 17 pacientes de trasplante renal, y se encontró que, en relación a los niveles basales, la proporción de células CD4+IFN γ + a los 2 meses post-trasplante, tiene una correlación inversa con los niveles de DNAemia CMV. Cuanto más acentuada es la reducción relativa de la respuesta CD4, mayor es el número de copias de ADN viral en sangre [103].

El estudio de las respuestas específicas adquiere especial relevancia en los pacientes considerados de alto riesgo por serología discordante (D+/R-). En trasplante de pulmón se ha visto que en éstos pacientes seronegativos existe una correlación directa entre la capacidad de desarrollar una respuesta CMV-específica *de novo* y la ausencia de enfermedad [104]. En el caso de trasplante renal se ha visto que las

frecuencias de células CD4 pp65-específicas mayores de 0.03% confieren protección frente a la infección por CMV en los primeros 2 meses post-trasplante [105]. Sin embargo, en trasplante hepático no se pudo demostrar la correlación entre los diferentes patrones de respuesta utilizando varios estímulos antigénicos y el desarrollo de enfermedad CMV tardía tras la interrupción de profilaxis antiviral [68].

Recientemente se han publicado los resultados del primer estudio prospectivo longitudinal de las respuestas CMV-específicas en 44 trasplantados renales. En un período de seguimiento de 1 año, se realizaron al menos 5 determinaciones de las respuestas CD4 y CD8 específicas para pp65, IE1 y lisado viral, sin que pudieran encontrar relación alguna entre la capacidad de producción de IFN- γ y la presencia de DNAemia detectable [70].

En resumen se puede concluir que, a pesar de que en el contexto de la inmunidad celular existen trabajos que evalúan transversalmente la capacidad funcional de linfocitos CD4 y CD8 frente a CMV, aún son escasos los estudios longitudinales y continúan sin establecerse las variaciones fenotípicas y funcionales que caracterizan el estado post-trasplante y su posible relación con la capacidad de defensa de los pacientes [49]. Por otra parte, la discordancia de resultados publicados pone en evidencia la necesidad de desarrollar nuevas estrategias, que permitan discriminar aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar infecciones, independientemente de su estatus serológico [107].

4.1.5. Nuevos marcadores predictivos de riesgo de infección

El diseño de sistemas de puntuación (*scores*) que vinculan varios parámetros inmunológicos se ha utilizado como medida de la inmunocompetencia global en

trasplante renal. Este enfoque multiparamétrico se empleó en el estudio de una cohorte de 138 pacientes en el que se analizaron: subpoblaciones linfocitarias, respuestas linfoproliferativas de células T a mitógenos, capacidad fagocítica de neutrófilos y la producción de especies reactivas del oxígeno. Adjudicando 1 punto a cada marcador cuyos valores estuviesen por debajo del percentil 10 se obtuvo el valor del *score* de inmunocompetencia. Los pacientes con *scores* más altos presentaban una mayor incidencia de infecciones que requirieron ingreso hospitalario [108]. Estos resultados fueron confirmados poco después utilizando un sistema similar al que añadieron nuevos marcadores. En éste caso los parámetros analizados fueron: niveles de inmunoglobulinas séricas, número absoluto de linfocitos CD4, respuestas linfoproliferativas, capacidad fagocítica de neutrófilos y la producción de especies reactivas del oxígeno. En un período de seguimiento de 5 años los pacientes con peor *score* tuvieron más episodios de ingreso hospitalario debido a infecciones [109].

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica (QuantiFERON®-CMV; Cellestis Ltd, Melbourne, Victoria, Australia) que mide la capacidad de respuesta celular frente al virus mediante la cuantificación del IFN- γ producido por los linfocitos CD8 tras estimulación *ex vivo* con una mezcla de 22 epítomos de diferentes proteínas virales (IE-1, IE-2, pp65, pp50, pp28). La diferencia con respecto a los ensayos funcionales descritos en el apartado 4.1.4 radica en la forma de medir la citocina, que en éste caso se realiza mediante un ELISA, lo que facilita su estandarización y aplicación en la práctica clínica [110]. En un estudio preliminar de una cohorte de 108 pacientes trasplantados de pulmón (D+/R-) se demostró que los pacientes con un resultado positivo para éste ensayo al retirar el tratamiento profiláctico, presentaban menor incidencia de enfermedad CMV tardía [111].

Otra opción disponible es el ensayo de funcionalidad inmunológica Cylex® ImmuKnow® Assay (Columbia, MD USA), que detecta la activación celular midiendo la concentración de ATP producido por los linfocitos T CD4 tras estimulación con PHA. Su novedad radica en que es capaz de discriminar entre pacientes con alto riesgo de sufrir infecciones por sobre-inmunosupresión y los que podrían presentar rechazo por falta de inmunosupresión. El riesgo de desarrollar infecciones se incrementa 12 veces en los pacientes con niveles de producción de ATP por debajo de 25ng/ml, mientras que las respuestas celulares con más de 700ng/ml de ATP incrementan 30 veces el riesgo de rechazo celular [112]. Esta metodología ha sido empleada en el contexto de TC, reportándose una buena correlación entre respuestas bajas y la incidencia de episodios infecciosos, pero no se pudo demostrar la contraparte con el riesgo incrementado de rechazo [113].

Tabla 1. Polimorfismos en genes que codifican para proteínas de la inmunidad innata y específica y su asociación con el desarrollo de infecciones post-trasplante.

| Autor | Gen estudiado | Tipo de trasplante | Nº | Asociación con clínica |
|-----------------------------|----------------------|--------------------|-----|--|
| Ducloux <i>et al.</i> | TLR4 | Renal | 238 | Infecciones oportunistas y bacterianas severas |
| Cervera <i>et al.</i> | TLR4, MBL, MASP-2 | Renal | 245 | Enfermedad CMV |
| Hoffmann <i>et al.</i> | PD-1, IL-12p40 | Renal | 469 | Infección CMV |
| Rodrigo <i>et al.</i> | IL-1 β , IL-12 | Renal | 255 | Desarrollo de infecciones |
| Kijpittayarit <i>et al.</i> | TLR2 | Hepático | 92 | Enfermedad CMV |
| Worthley <i>et al.</i> | MBL2 | Hepático | 102 | Infecciones relevantes |
| Mitsani <i>et al.</i> | IFN- γ | Pulmón | 170 | Enfermedad CMV |

TLR: Receptor Toll-like, MBL: Lectina unidora de manosa, MASP: Serin-proteasa asociada a manosa, PD: muerte programada, IL: Interleucina, IFN: Interferon.

Actualmente se encuentra en estudio la posible relación entre la presencia de determinados polimorfismos y mutaciones en genes vinculados con la inmunidad, con

el aumento en el riesgo de infección. Entre ellos se encuentran genes que codifican para varias citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-12, IL-10, IL-6), receptores de la inmunidad innata, receptores *toll-like*, receptores Fc γ , etc. Algunos de estos estudios se resumen en la Tabla 1 [114-121].

Utilizando la tecnología de análisis de perfiles moleculares con microchips de ADN (*microarrays*), se han podido identificar patrones de expresión génica en biopsias cardíacas de pacientes trasplantados, con diferentes afecciones. De 76 muestras se pudieron clasificar 22 rechazos, 4 rechazos incipientes, 8 infecciones y 5 infecciones tempranas [122]. También en trasplante hepático se han podido establecer los perfiles de expresión génica asociados a infección aguda por CMV y rechazo agudo. En el primer caso se observó un incremento en la expresión de IFN- γ , caspasas 1 y 3, granzimas A y B, TGF- β , VCAM-1, IL-4, TNF- α , IL-10, IL-1 β e ICAM-1 [123].

Los estudios de farmacodinámica molecular permiten monitorizar los efectos de los inmunosupresores sobre las células del sistema inmunitario y, por tanto, su posible relación con la susceptibilidad para desarrollar infecciones. En este sentido se ha estudiado la expresión residual de genes regulados por el factor de activación nuclear NFAT, dos horas después de la administración de ciclosporina en trasplantados renales. Los resultados mostraron que los pacientes que tenían una mayor incidencia de eventos infecciosos tenían la expresión de dichos genes fuertemente suprimida [124]. En el caso de pacientes pediátricos se encontró la misma relación y ha sido propuesto como una herramienta para identificar pacientes sobre-inmunosuprimidos [125].

4.2. Perfiles inmunológicos asociados a rechazo

En los receptores de trasplantes las reacciones inmunitarias contra antígenos celulares del donante son la causa de los episodios de rechazo agudo o crónico y posterior pérdida del injerto. A fin de minimizar el efecto de rechazo, en los trasplantes se tiene en cuenta la compatibilidad entre donante y receptor, considerando grupo sanguíneo y la tipificación genética de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (sistema HLA). Además se consideran otros factores como la presencia en el suero del receptor, de anticuerpos preformados contra antígenos tisulares del donante. Para descartar este extremo se realiza una prueba llamada *cross-match* donde se enfrentan células del donante con suero del receptor. Estos anticuerpos anti-donante pueden formarse tras recibir transfusiones sanguíneas, por embarazos o trasplantes previos [66].

Se pueden producir tres tipos de rechazo:

- A. **Rechazo Hiperagudo:** Se produce en el plazo de minutos a horas después del restablecimiento de la circulación sanguínea en el injerto y está causado por anticuerpos preexistentes. Actualmente es raro, debido a la selección de tejidos y a las pruebas sanguíneas cruzadas que se realizan para valorar la compatibilidad de un órgano.

- B. **Rechazo Agudo:** Se produce habitualmente durante los primeros meses después del trasplante. Se puede sospechar este tipo de rechazo cuando existe un deterioro agudo de la función del órgano trasplantado. La confirmación del diagnóstico se realiza mediante biopsia del órgano afectado. Puede estar asociado con una inmunosupresión muy baja o con enfermedades

que provocan inflamación del órgano. El rechazo agudo es uno de los factores primarios de riesgo de rechazo crónico

- C. **Rechazo Crónico:** Es la fase en que la función de un órgano trasplantado está crónicamente deteriorada y finalmente puede producirse la pérdida del injerto. Evoluciona gradualmente durante meses o años. Entre las muchas causas posibles, está la lesión producida durante episodios previos "reversibles" de rechazo agudo. Se caracteriza por una remodelación de los tejidos (cicatriz del órgano y pérdida de su función).

Para prevenir el rechazo agudo tras el trasplante los pacientes reciben altas dosis de fármacos inmunosupresores, que gradualmente se van ajustando hasta alcanzar valores de mantenimiento mucho más bajos que los iniciales. La tendencia actual es eliminar dichos tratamientos si con el tiempo el sistema inmunitario del receptor se adapta al injerto. Esto es posible gracias a los mecanismos de inducción de tolerancia entre los que se encuentran la delección clonal de linfocitos reactivos anti-donante, la inducción de células T reguladoras, la generación de anticuerpos anti-idiotipo y el establecimiento de microquimerismos. Estos mecanismos suprimen de manera específica las respuestas contra el aloinjerto, sin afectar la capacidad de defensa contra antígenos no relacionados (virales, bacterianos, etc.) [126-128].

4.2.1. Factores solubles: Patrones de citocinas

Para el diagnóstico precoz de los episodios de rechazo resulta de especial utilidad el estudio de las citocinas. Por ejemplo, los niveles plasmáticos de IL-10 e IFN- γ son indicadores del grado de tolerancia al injerto en trasplante hepático. En relación a los niveles basales, los pacientes con buen pronóstico muestran un incremento

pronunciado de IL-10, y un descenso en los valores de IFN- γ , a las 2 horas post-trasplante, a diferencia de los que presentan rechazo agudo [129]. Por su parte, el estudio de la expresión residual de los genes de citocinas regulados por el factor nuclear NFAT (IL-2, IFN- γ , GM-CSF) mediante PCR en tiempo real, ha sido propuesto para el ajuste en las dosis de ciclosporina y tacrolimus. Se ha demostrado que los pacientes cursan sin rechazo si los niveles de expresión génica se mantienen inferiores al 30% a las 2 horas de administrar el fármaco [130]. También se ha descrito que la cuantificación en tejido de biopsias cardiacas de los niveles de RNAm de algunas citocinas, puede servir como marcador precoz de rechazo en trasplante de corazón. Específicamente, se encontró una fuerte asociación entre los niveles de RNAm de VEGF, con el desarrollo de episodios de rechazo agudo severo [131]. La presencia de ciertos polimorfismos en los genes que codifican para citocinas determina el grado de expresión de las mismas modificando, por tanto, su capacidad reguladora. En el caso de una citocina proinflamatoria como la IL-18, un aumento en su expresión debido al polimorfismo G137C, se ha relacionado con el desarrollo de rechazo agudo en trasplante renal [132]. En otros casos, la combinación de un perfil polimórfico de alta expresión de citocinas proinflamatorias (VEGF/IL-6) y baja expresión de citocinas reguladoras (IL-10), se ha asociado con un riesgo incrementado de rechazo crónico tardío en pacientes pediátricos de trasplante cardiaco [133].

Otro factor soluble con valor pronóstico en trasplante renal es sCD30, cuyos niveles aumentan en las respuestas de tipo Th2. Valores altos de sCD30 en el pre y post-trasplante se asocian a riesgo incrementado de rechazo agudo y nefropatía crónica del injerto, incluso en ausencia de aloanticuerpos linfocitotóxicos [134].

4.2.2. Parámetros de la inmunidad celular

Los linfocitos CD4 juegan un papel crucial en la patogénesis del rechazo, no sólo mediante la diferenciación/activación de células CD8 citotóxicas aloreactivas, sino también provocando la lisis directa de las células del injerto a través de mecanismos proinflamatorios y activación del complemento [135]. Diferentes estudios han relacionado la incidencia de episodios de rechazo con varios parámetros celulares entre los que se encuentran: la frecuencia de precursores aloreactivos de células CD4 y CD8, la capacidad funcional de células reguladoras y la distribución de las diferentes subpoblaciones celulares (perfiles de maduración y activación) [66].

En trasplante renal la identificación de diferentes perfiles celulares por citometría de flujo ha permitido distinguir entre pacientes con y sin rechazo. El cociente entre las frecuencias de células T CD8 y CD4 de memoria (central+efectora), y células reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+), por una parte, y los cambios post-trasplantes en los perfiles de maduración de células CD4, por otra, han identificado de forma muy específica a los pacientes con rechazo agudo. De tal forma que: (i) cocientes maduración/reguladoras superiores a 20, y (ii) un incremento en las frecuencias de células CD4 inmaduras, con una disminución recíproca de células de memoria y reguladoras, son los marcadores inmunológicos que caracterizan, en este estudio, a los pacientes con rechazo [136].

El estudio de las diferentes subpoblaciones de células reguladoras ha despertado especial interés dado que juegan un papel crucial en la generación de tolerancia hacia el injerto. En este sentido se ha descrito que la presencia de linfocitos CD4+CD25+FoxP3+ en infiltrados intersticiales de riñones trasplantados se asocia a una baja reactividad específica contra el injerto y, por tanto, con una mejor función

renal y menos daño crónico [137]. Otro parámetro que ha servido para evaluar la evolución de los pacientes es la cuantificación de RNAm de FoxP3 en orina. En pacientes con rechazo agudo se encontró un valor aumentado del cociente RNAm FoxP3/RNA ribosomal 18S, indicando una expresión incrementada de FoxP3 coincidiendo con el evento de rechazo. En estos pacientes se pudo identificar aquellos con mejor pronóstico de aceptación del injerto tras el rechazo con un 90% de sensibilidad y 73% de especificidad [138]. Otras células con capacidad supresora son los linfocitos CD8+CD28-. La monitorización de esta subpoblación ha servido para evaluar el estado de inmunosupresión y personalizar el tratamiento sin incrementar el riesgo de rechazo en trasplante renal [139].

También los marcadores de activación celular han resultado útiles en la monitorización del rechazo. La expresión aumentada de moléculas HLA-DR en la superficie de linfocitos de sangre periférica se ha asociado a una mayor incidencia de rechazo agudo en trasplante cardíaco [140], mientras que en trasplante renal la presencia de células CD3+HLA-DR+ en orina mostró una fuerte asociación con la presencia e intensidad de episodios de rechazo agudo [141].

Los estudios retrospectivos descritos de monitorización inmunológica han demostrado la asociación entre numerosos parámetros humorales y celulares, con el desarrollo de eventos de rechazo. Sin embargo, aún son necesarios estudios prospectivos que avalen la toma de decisiones clínicas en base a dichos parámetros. El objetivo a largo plazo de una estrategia de monitorización post-trasplante debe estar enfocado hacia la individualización, disminución y, a ser posible, retirada, del tratamiento inmunosupresor.

HIPÓTESIS

Se asume que la terapia inmunosupresora y otras intervenciones que se realizan en el TC alteran el estado de inmunocompetencia del paciente. Por otro lado se supone que el paciente es normal, desde el punto de vista inmunológico, antes del TC. Sin embargo tal supuesto estado de inmunocompetencia o de inmunosupresión, que motiva la introducción de medidas profilácticas y terapéuticas, no es monitorizado con parámetros inmunológicos. Nuestra experiencia en la valoración clínica inmunológica de pacientes trasplantados, nos ha permitido considerar que el estado de inmunocompetencia es evaluable y puede identificar rasgos individuales de susceptibilidad a complicaciones clínicas post-trasplante. La infección que requiere tratamiento intravenoso y el rechazo, se consideran factores de riesgo independientes de mortalidad en TC. La identificación de factores inmunológicos de riesgo permitiría realizar una intervención oportuna para disminuir la morbimortalidad en éstos pacientes. En base a estas consideraciones planteamos las siguientes hipótesis:

1. En el trasplante cardiaco, el procedimiento quirúrgico y la terapia inmunosupresora generan alteraciones cuantitativas y funcionales de la inmunidad celular que producen un estado de inmunodeficiencia secundaria.
2. Evaluar el estado de inmunocompetencia antes del TC puede ser útil para la identificación de los pacientes con mayor riesgo de desarrollar complicaciones clínicas (infecciones y/o rechazo) en el período post-TC.
3. Medir las alteraciones funcionales de la inmunidad celular que se producen en distintos tiempos después del trasplante, puede ser útil para la identificación de los pacientes en riesgo de desarrollar complicaciones clínicas (infecciones y/o rechazo) en el período post-TC.

OBJETIVOS

1. Objetivos Generales

- 1.1. La evaluación del estado de inmunocompetencia celular mediante estudio de subpoblaciones linfocitarias de los pacientes antes y después del TC.
- 1.2. La identificación de alteraciones en subpoblaciones linfocitarias T y B antes y después del TC como factores de riesgo de desarrollo de infecciones y/o rechazo celular en el periodo post-TC.

2. Objetivos Específicos

- 2.1. Descripción de la cinética longitudinal de distintas subpoblaciones linfocitarias T y B en base a parámetros fenotípicos (maduración, activación, células reguladoras, entre otros) durante el primer año tras el trasplante.
- 2.2. Comparación de los niveles de determinados parámetros de la inmunidad celular en distintos tiempos de observación antes y después del TC, con el nivel observado en controles sanos y pacientes sometidos a cirugía cardíaca que no requieren tratamiento inmunosupresor.
- 2.3. Determinar las alteraciones en las distintas subpoblaciones linfocitarias que se producen a largo plazo (entre 1 y 3 años post-TC).
- 2.4. Establecer la asociación existente entre las distintas alteraciones de la inmunidad celular y el desarrollo de eventos infecciosos y/o rechazo en el periodo post-TC.
- 2.5. Cuantificar los cambios que se producen en la inmunidad celular específica anti-CMV, así como su posible relación con el mantenimiento de niveles de anticuerpos anti-CMV antes y después del TC.
- 2.6. Establecer la asociación existente entre la respuesta CMV-específica (humoral y celular) y el desarrollo de infección por CMV en pacientes seropositivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes y controles

Los aspectos ético-legales planteados por el presente trabajo fueron sometidos a la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), que aprobó su realización. Así mismo, a todos los pacientes y controles se les solicitó un consentimiento informado para participar en el estudio y para que los datos obtenidos puedan ser publicados, siempre y cuando se garantice la confidencialidad de los mismos.

El proyecto se plantea como un estudio prospectivo para la caracterización de las alteraciones de la inmunidad celular relacionadas con inmunodeficiencia, y su asociación con el desarrollo de infecciones en el TC.

Para ello se registra una serie de 42 pacientes con cardiopatía grave que entran en lista de espera para TC, y que son sometidos a trasplante entre Marzo de 2006 y Octubre de 2008. Se excluyen del estudio los pacientes con inmunodeficiencia primaria conocida, aquellos que recibieron terapia inmunosupresora durante los 6 meses previos al trasplante, o con infecciones activas, nefropatías o enteropatía con pérdida de proteínas. Las características clínicas y demográficas de los pacientes se resumen en la Tabla 2.

Para el análisis transversal de comparación con controles se incluyeron 36 sujetos sanos (29 hombres-7 mujeres; edad media=50 años [27-62]) y 32 pacientes sometidos a cirugía cardiaca con circulación extracorpórea sin inmunosupresión en el período post-operatorio (controles quirúrgicos; 19 hombres-14 mujeres; edad media=53 años [26-75]) para establecer valores de corte y como referencia de normalidad, con una distribución de sexo y edad similar al grupo de estudio. Para determinar las

afectaciones que produce el tratamiento inmunosupresor a largo plazo se analizó una serie de 31 pacientes trasplantados de larga evolución (media de meses transcurridos tras el TC [rango]= 30.4 [13-75]).

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de 42 pacientes de trasplante cardiaco (Estudio prospectivo).

| Parámetro | N |
|--|--------------|
| Sexo masculino | 28 (67) |
| Edad (rango) | 54.7 (23-68) |
| CMV | |
| Serología receptor positiva | 38 (91) |
| Serología donante positiva | 34 (81) |
| Antigenemia positiva ⁽¹⁾ | 19 (45) |
| Nº de células positivas (rango) | 23 (1-90) |
| Infección CMV ⁽²⁾ | 17 (40) |
| Otras infecciones | |
| Infecciones virales | 29 (69) |
| Infecciones bacterianas aisladas | 29 (69) |
| Infecciones bacterianas recurrentes ⁽³⁾ | 17 (40) |
| Infecciones fúngicas | 15 (36) |
| Infecciones parasitarias | 3 (7) |
| Nº agentes patógenos aislados (rango) ⁽⁴⁾ | 3.2 (0-17) |
| Infección tratada por vía IV | 22 (52) |
| Infecciones antes de TC | 10 (24) |
| Rechazo | |
| Presencia de episodios de rechazo ⁽⁵⁾ | 11 (26) |

⁽¹⁾Confirmadas por PCR (viremia). ⁽²⁾Al menos 2 antigenemias positivas. ⁽³⁾Al menos 2 episodios confirmados por cultivos positivos. ⁽⁴⁾Todos requirieron tratamiento IV antimicrobiano específico. ⁽⁵⁾Biopsias endomiocárdicas VD de grado 2 o mayor (ISHLT). CMV: Citomegalovirus. TC: Trasplante cardiaco. Media (rango). Datos categóricos en números absolutos (%).

Las muestras del punto basal fueron obtenidas cuando el paciente entró en lista de espera de TC, o en el período inmediato anterior al trasplante (urgencia 0). Los estudios de seguimiento se realizaron a los 7 días (punto 1), 30 días (punto 2), 90 días (punto 3), 180 días (punto 4) y 365 días (punto 5). En el caso de controles sanos y trasplantados de larga evolución se realizó una única determinación, y los controles quirúrgicos se estudiaron en el pre-operatorio y a los 7 días post-cirugía.

Todos los pacientes recibieron como terapia de inducción inmunosupresora micofenolato mofetil (1000mg IV), metilprednisolona (500mg IV) y dos dosis de daclizumab (anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD25 o IL-2R α) 1mg/kg a día 0 y 14. A las 48 horas del trasplante se introdujo la terapia triple de mantenimiento que incluía un fármaco inhibidor de la calcineurina, tacrolimus (n=39) o ciclosporina (n=3), micofenolato mofetil y prednisona. Como tratamiento profiláctico se administró cefazolina 2g IV c/8hrs el primer día post-trasplante, trimetoprim-sulfametoxazol 160/800 mg VO c/12hrs 2 veces por semana durante el primer año, nistatina 500,000 U VO c/8hrs y norfloxacin 400 mg VO c/12hrs durante el primer mes post-trasplante. Se indicó profilaxis con itraconazol en aquellos pacientes con riesgo de aspergilosis invasiva. En el período post-trasplante inmediato se administró profilaxis universal con ganciclovir IV 5mg/kg c/12hrs durante 14 días. En el caso de pacientes de alto riesgo (serología CMV R-/D+ [n=4]) se administró además como tratamiento profiláctico inmunoglobulinas CMV hiperinmunes (CMVIG; Cytotec, Biotest).

En el caso de pacientes CMV-seropositivos, se consideró la presencia de niveles detectables de antigenemia positiva en sangre periférica en 2 o más determinaciones con más de una célula infectada, como indicador de reactivación o reinfección por CMV durante el seguimiento.

2. Obtención de muestras sanguíneas

De cada paciente se recogieron en total 30 mL de sangre periférica por punto de estudio: 5 mL en tubos Z serum sep Clot Activator (Greiner bio-one; Frickenhausen, Alemania), 5 mL en tubos tratados con ácido etilen diamino-tetraacético (EDTA) (Greiner bio-one) y 20 mL en tubos con heparina sódica (Greiner bio-one). A partir de

la sangre almacenada en tubo Z serum sep Clot Activator se extrajo el suero mediante centrifugación a 1750g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y las muestras así obtenidas se congelaron a -70°C hasta su posterior utilización.

Con la sangre extraída en tubo con heparina sódica se realizó una purificación de células mononucleadas (PBMCs) mediante la técnica de separación celular por gradiente de densidad (Ficoll-Paque; Amersham Biosciences), centrifugando durante 30 minutos a 600g a temperatura ambiente. Se recogió la población de leucocitos y se procedió a un primer lavado con tampón salino fosfato estéril (PBS) (Lonza; Verviers, Bélgica), centrifugando a 450g durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de un segundo paso de lavado a 300g en iguales condiciones. Una vez terminada la centrifugación se decantó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 10 mL de medio RPMI 1640 (Biochrome) suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal inactivado (FCS) (Biochrome), 2 mM de L-glutamina (Biochrome), y 1% de antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomycin 10 µg/mL). La suspensión celular se incubó en tubos de fondo cónico Falcon 50 mL (BD Biosciences) durante toda la noche (16horas) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. A la mañana siguiente se realizaron los ensayos de inducción de producción de citocinas *ex-vivo* con estímulos antigénicos específicos (ver apartado 3.4).

3. Citometría de flujo

3.1. Marcaje de superficie

Para la caracterización fenotípica de las subpoblaciones linfocitarias se realizó el marcaje de las moléculas de superficie en sangre total (tubos EDTA), con los diferentes anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos conjugados a fluorocromo. En

la Tabla 3 se detallan los paneles de anticuerpos empleados en el ensayo para la identificación de cada subpoblación.

Tabla 3. Panel de anticuerpos monoclonales utilizado para el estudio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias.

| Tubo | Fluorocromos | | | | Subpoblación de estudio (Perfil) |
|------|--------------|--------|-------|-------|----------------------------------|
| | FITC | PE | PerCP | APC | |
| 1 | IgG1κ | IgG2ακ | IgG1κ | IgG1κ | Control isotipo |
| 2 | CD27 | IgD | CD19 | IgM | Linfocitos B (Maduración) |
| 3 | CD45RA | CCR7 | CD4 | CD8 | Linfocitos T (Maduración) |
| 4 | HLADR | CD38 | CD4 | CD8 | Linfocitos T (Activación 1) |
| 5 | HLADR | CD25 | CD4 | CD8 | Linfocitos T (Activación 2) |
| 6 | CD56 | CD16 | CD3 | CD19 | TBNK |
| 7 | CD127 | CD25 | CD4 | FoxP3 | Linfocitos T (Reguladoras) |
| 8 | CD25 | CD122 | CD4 | CD8 | Linfocitos T (IL-2R) |
| 9 | IFNγ | CD38 | CD3 | CD8 | Linfocitos T (Estudio funcional) |

FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: Proteína Clorofila Peridina; APC: Alofocianina. Todos los anticuerpos de BD (Becton Dickinson, San José, CA), excepto CCR7-PE (R&D System Minneapolis, MN) y FoxP3-APC (eBioscience, San Diego, CA).

Para la caracterización de los linfocitos B (Tubo 2), previo a la tinción, se realizó un lavado de la sangre con PBS (5 minutos a 550g) para eliminar la IgM sérica, ya que podría interferir en el marcaje de la IgM de membrana por inhibición competitiva del AcMo anti-IgM. Brevemente, 100 µL de sangre se incubaron con 20 µL de las distintas mezclas de AcMo conjugados, en concentración saturante durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se añadieron 2 mL de solución de lisis (Facslysing solution, Becton Dickinson, San José, CA) para eliminar las células no nucleadas de la sangre, y se incubaron las muestras en las mismas condiciones por 15 minutos más. Transcurrido el período de incubación se añadieron 2 mL de PBS a cada tubo para lavar el exceso de AcMo sin fijar y se centrifugaron a 500g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Este paso de lavado se repitió una vez más en iguales condiciones y se resuspendió el precipitado celular en un volumen de 250 µL de PBS antes de adquirir las células en el citómetro de flujo.

3.2. Marcaje intracelular

Se utilizó la estrategia descrita por Liu *et al.* [142] para la identificación de linfocitos T CD4 con actividad reguladora, definidos por el fenotipo CD4+CD25_{high}CD127_{low}FoxP3+. La combinación de los marcadores de superficie CD25 y CD127 aumenta considerablemente la eficiencia del análisis, ya que más del 80% de estas células (CD25_{high}CD127_{low}) expresan el factor de transcripción nuclear FoxP3 y tienen actividad supresora [143].

Una vez concluida la incubación con los anticuerpos de superficie (CD4, CD25, CD127), se realizó un lavado con 2 mL de PBS, centrifugando los tubos a 500g durante 8 minutos a 4°C. Posteriormente se añadió 1 mL de paraformaldehído (PFA) 4% y se incubaron las muestras 10 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron con 2 mL de PBS al 0.5% de albúmina de suero bovino (tampón de lavado) en iguales condiciones y el precipitado se resuspendió en 500 µL de FACS-Perm Solution (BD Biosciences) para permeabilizar la membrana celular, incubándose durante 20 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Se repitió el lavado en iguales condiciones y se procedió a la tinción con el AcMo anti-human-FoxP3-APC durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en 200 µL de PFA 1% para su adquisición en el citómetro de flujo.

3.3. Análisis de subpoblaciones

Tanto la adquisición como el análisis se desarrollaron en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA) utilizando el programa CellQuest Pro. Para un análisis óptimo se adquirieron como mínimo 50 000 eventos en la región de linfocitos,

determinada por tamaño y complejidad (FSC vs SSC). Las diferentes subpoblaciones están expresadas como porcentajes del total de linfocitos B, T CD4 o T CD8, según se indica. En la Figura 8 se representa de forma resumida la estrategia de análisis seguida para la caracterización de cada subpoblación.

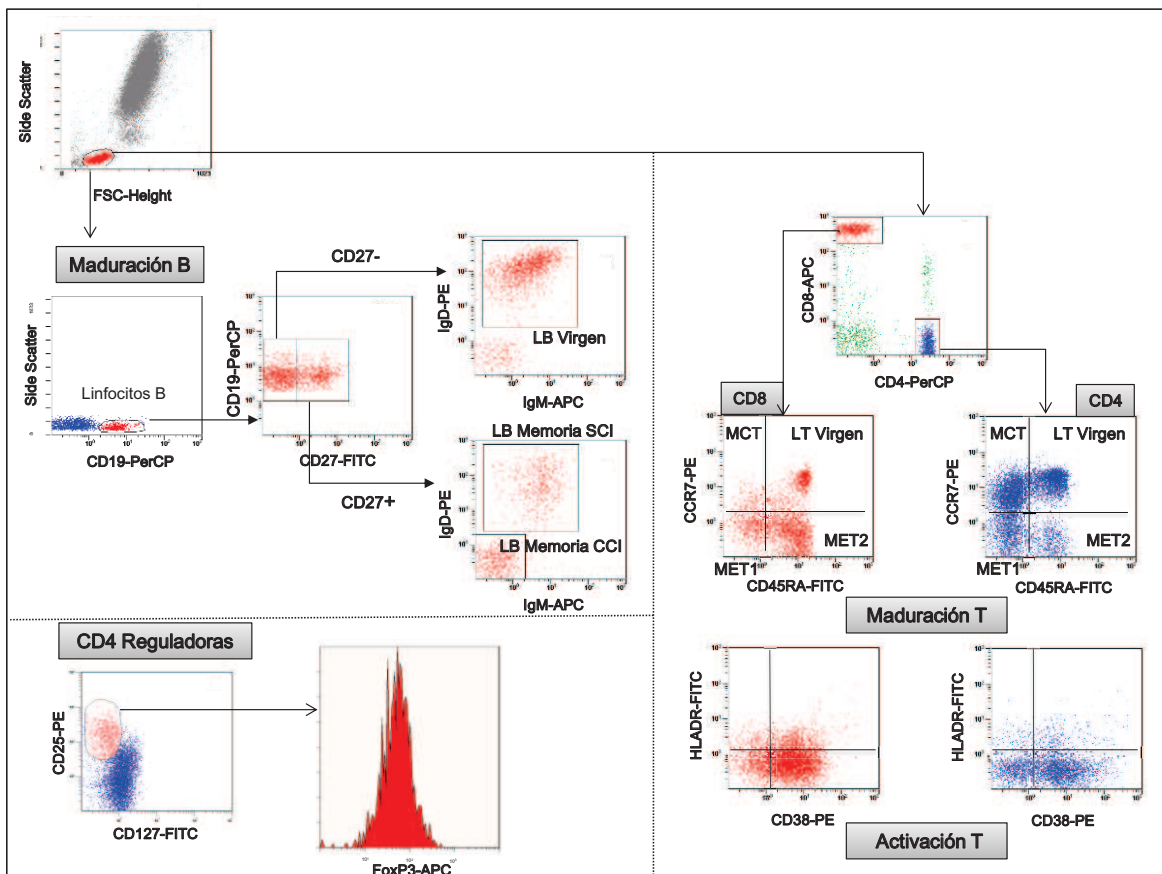


Figura 8. Estrategia de análisis de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Tinción con anticuerpos monoclonales de células de sangre periférica para la identificación y caracterización de linfocitos B, T CD4, T CD8 y células reguladoras. Selección secuencial de subpoblaciones para el estudio de los diferentes perfiles de maduración/activación. Fenotipos definidos en apartado 3.3.

El análisis del fenotipo madurativo de las células B se estableció según lo descrito en estudios anteriores; B virgen CD19+/CD27-IgM+IgD+, memoria sin cambio de isotipo (non-switched) CD19+/CD27+IgM+IgD+, memoria con cambio de isotipo (class-switched) CD19+/CD27+IgM-IgD- [144]. Por su parte los linfocitos T fueron estudiados en base a la expresión de los marcadores CD45RA y CCR7 para determinar las diferentes subpoblaciones: el fenotipo CD45RA+CCR7+ caracteriza a las células T

virgen, CD45RA-CCR7+ memoria central (MCT), CD45RA-CCR7- memoria efectora 1 (MET1) y CD45RA+CCR7- identifica a las células efectoras finales (MET2) [145]. Los niveles de expresión de las moléculas HLA-DR, CD38 y CD25 se estudiaron para medir activación celular en los linfocitos T. Para la evaluación prospectiva del efecto del daclizumab (anti-CD25) sobre el sistema IL-2/IL-2R, se monitorizaron los niveles de expresión de CD25 (IL-2R α) y CD122 (IL-2R β) sobre la superficie de los linfocitos T (Tabla 3: Tubo 8). Los porcentajes de células reguladoras (Treg) se estudiaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.

3.4. Ensayo funcional de respuesta CMV-específica

A partir de las células mononucleadas (PBMCs) purificadas mediante gradiente de densidad en Ficoll, se realizó un ensayo de inducción de citocinas *ex vivo* para medir la capacidad de respuesta CMV específica, estimulando con péptidos antigénicos del virus. Para ello se utilizó el procedimiento descrito por Bunde *et al.* [60] empleando péptidos de 15 aminoácidos correspondientes a las proteínas víricas IE-1 y pp65 (Jerini Ag PepmixTM, Nr 301002 y 200902, respectivamente) cedidos por el Dr. Florian Kern del Institut für Medizinische Immunologie der Charité, Berlin, Alemania. Las soluciones stock de los péptidos fueron almacenadas a -80°C (8 u 80 mg/mL en dimetil sulfóxido [DMSO]) en alícuotas de 10 μ L.

Se incubaron 400 μ L de suspensión celular ajustada a una concentración de 2.5×10^6 cel/mL en tubos de polipropileno de fondo cónico Falcon 15 mL (BD Biosciences) con 4 μ L de péptido antigénico (IE-1 o pp65) diluido en 96 μ L de medio RPMI/FCS (500 μ L volumen total) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Como control se montaron muestras en paralelo estimuladas sólo con DMSO, empleado como

diluyente de los péptidos. A las 2 horas se añadieron 500 μ L de medio RPMI/FCS con 20 μ g/mL de brefeldina A (BFA; Sigma-Aldrich) diluida a partir de 1 μ L de solución stock (10 mg/mL), y se incubaron las muestras 4 horas más en iguales condiciones. Las concentraciones finales de cada péptido y BFA fueron 1 μ g/ml y 10 μ g/mL, respectivamente.

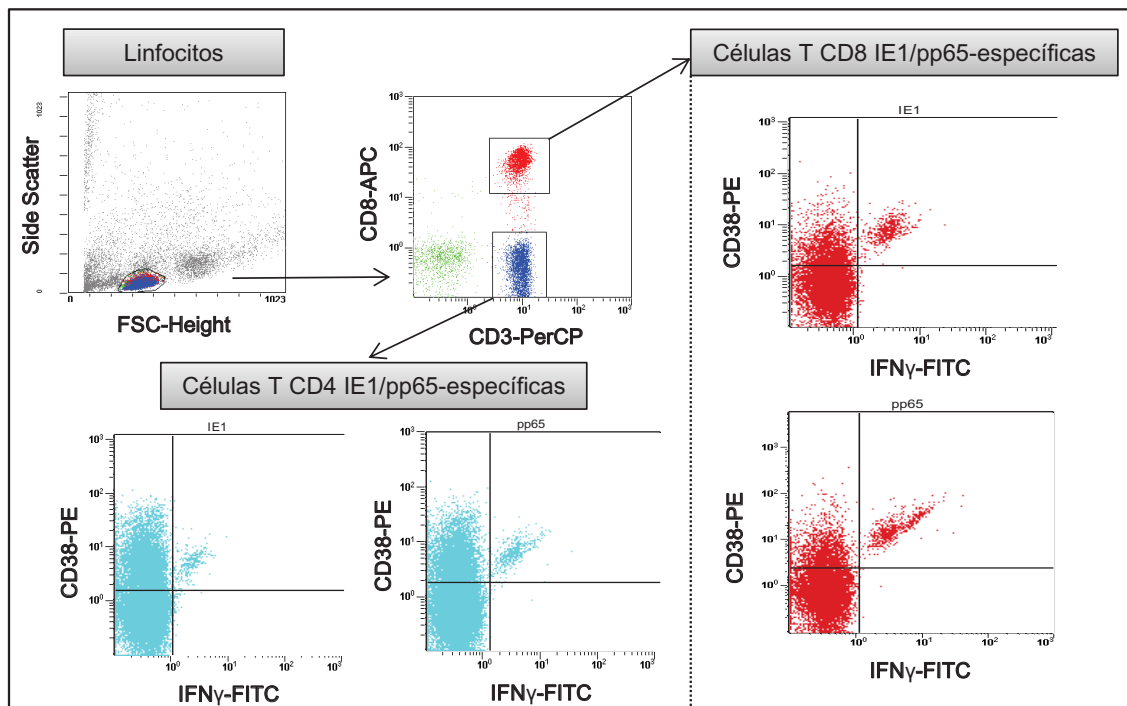


Figura 9. Estrategia de análisis para el estudio de la respuesta funcional CMV-específica.

Las células mononucleadas purificadas fueron estimuladas con los péptidos antigénicos (IE-1 y pp65) o DMSO y se cuantificó la producción de IFN- γ *ex vivo* mediante citometría de flujo. Las células respondedoras fueron identificadas mediante selección secuencial de linfocitos (tamaño vs. complejidad), células T CD8 (CD3+CD8+) y células T CD4 (CD3+CD8-). Finalmente, se cuantificó el porcentaje de linfocitos respondedores representando en un gráfico de puntos la intensidad de fluorescencia de CD38 vs. IFN- γ , y seleccionando las células IFN- γ positivas. La frecuencia de células respondedoras inespecíficas (DMSO) se sustrajo al porcentaje de células IE-1/pp65-específicas.

Después de un total de 6 horas de estimulación antigénica, las células fueron lavadas con 3 mL de PBS frío centrifugando a 430g durante 8 minutos a 4°C. Posteriormente se añadió 1 mL de PFA 4% y se incubaron las muestras 10 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron con 2 mL de PBS al 0.5% de albúmina de suero bovino en iguales condiciones y el precipitado se resuspendió en

500 μ L de FACS-Perm Solution (BD Biosciences), incubándose durante 20 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Se repitió el lavado en iguales condiciones y se procedió a la tinción con 20 μ L de cada uno de los anticuerpos monoclonales (Tabla 3: Tubo 9) durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en 200 μ L de PFA 1% para su adquisición en el citómetro de flujo. En la Figura 9 se representa de forma resumida la estrategia de análisis seguida para el estudio de las respuestas funcionales CMV-específicas. El porcentaje de células CMV-específicas se obtuvo al restar la frecuencia de células respondedoras inespecíficas (estimuladas sólo con DMSO) a la frecuencia de células IE-1/pp65-específicas productoras de IFN- γ .

4. ELISA cuantitativo anti-CMV

Se realizó un ensayo inmunoenzimático indirecto para el reconocimiento cualitativo y la determinación cuantitativa de los anticuerpos IgG contra el citomegalovirus en suero de pacientes y controles (Enzygnost-CMV-IgG; Dade Behring, Marburg, Alemania).

Para ello se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con antígenos inactivados derivados de fibroblastos humanos infectados con CMV. Las muestras de suero, así como la solución de referencia anti-CMV P/N, fueron prediluidas en proporción 1+20 con tampón para muestras coloreado (Tris/HCL 0.3 M, 0.1% Tween 20). En cada uno de los pocillos se añadieron 200 μ L de tampón para muestras sin colorear y 20 μ L de muestra prediluida, para una dilución final del suero de 1+200. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C. Concluida la incubación se realizaron 4 lavados con solución de lavado y se añadió 100 μ L de conjugado anti- IgG humana-peroxidasa, prediluido 1+50 en tampón microbiológico para conjugado,

incubando en iguales condiciones. Antes de la adición del sustrato las placas fueron lavadas 4 veces y finalmente se agregó a cada pocillo 100 μL de cromógeno TMB diluido 1+10 en tampón sustrato (kit de reactivos). Inmediatamente después de finalizar la distribución del sustrato, se incubó 30 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 μL de solución de parada (H_2SO_4 2.5 N) y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro SEAC Sirio S (RADIM) a una longitud de onda de 450 nm.

Se utilizó como control positivo la solución de referencia anti-CMV P/N y como control negativo pocillos que no fueron recubiertos con antígenos CMV. Para la valoración cualitativa se utilizaron los siguientes criterios:

Anti-CMV/IgG negativo: $\Delta E < 0.100$

Anti-CMV/IgG positivo: $\Delta E > 0.200$;

donde ΔE es la diferencia de señal antígeno CMV positivo menos la señal obtenida de la misma muestra con el control negativo. Las muestras que presentaron una actividad de anticuerpo IgG positiva se valoraron cuantitativamente con ayuda del método α (hoja Excel proporcionada por el fabricante) siguiendo la fórmula:

$\text{Log}_{10} \text{Título} = \alpha \Delta E^\beta$ (las constantes α y β dependen del lote de reactivos)

Al no existir valores normales como datos de referencia, los títulos de anticuerpos se analizaron en la cinética longitudinal de cada paciente y en comparación con controles en análisis transversal.

5. Otros parámetros inmunológicos

Para comprobar la especificidad del valor predictivo de los marcadores estudiados se analizaron conjuntamente otros parámetros de la inmunidad humoral y celular, y su posible relación con las variables CMV-específicas. Se incluyeron para el estudio determinaciones de rutina realizadas en el laboratorio de Inmunología tales como: concentración de IgG total y sus subclases (nefelometría), así como también concentración de IgG específica para otros virus (anti-varicella zoster [ELISA, Binding Site, Birmingham, United Kingdom] y anti-antígeno de superficie de hepatitis B [ELISA, Ortho-Clinical Diagnostics, United Kingdom]), y concentración de IFN- γ sérico (Human high sensitivity IFN γ ELISA Kit Diaclone SAS, France). En relación a la inmunidad celular se evaluó por citometría de flujo la respuesta proliferativa frente a un agente mitógeno inespecífico (fitohemaglutinina, PHA) de linfocitos T totales, CD4+, y CD8+ mediante marcaje con carboxifluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE) en un subgrupo de 12 pacientes trasplantados.

6. Análisis estadístico

Para comprobar la bondad de ajuste a la normalidad de cada una de las variables analizadas se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre los valores basales y los obtenidos en cada visita del estudio se analizaron con la prueba *t* de Student para muestras relacionadas (datos pareados). Para la comparación de medias entre 2 grupos se utilizó la prueba *t* de Student para muestras independientes. La comparación de medias entre más de 2 grupos se realizó mediante la prueba ANOVA (análisis de la varianza, con corrección de Bonferroni para establecer diferencias entre grupos). La comparación de variables categóricas se realizó mediante el test χ^2 . Los

coeficientes de correlación de Pearson o Spearman se utilizaron para calcular la correlación entre variables numéricas. La estimación de la asociación entre marcadores inmunológicos y la aparición de episodios infecciosos o de rechazo se realizó mediante comparación de medias utilizando el test U de Mann-Whitney. Aquellos parámetros que se asociaron significativamente a los eventos clínicos analizados se incluyeron en el análisis de supervivencia que se realizó mediante el método de regresión de Cox o Kaplan-Meier, según se indique. Para estratificar a los pacientes en 2 grupos se estableció como punto de corte la mediana de las variables analizadas, o el resultado derivado de las curvas de operación característica del receptor (Receiver-Operating Characteristic [ROC]). Para comparar la igualdad de las curvas de progresión se empleó el test Log-rank. Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el programa informático SPSS versión 19.0 para Windows (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, Illinois, USA).

RESULTADOS

1. Evolución de subpoblaciones linfocitarias de los pacientes trasplantados cardiacos

Se realizó un análisis prospectivo longitudinal de los porcentajes (frecuencias relativas al número absoluto de linfocitos) de diferentes subpoblaciones linfocitarias en 42 pacientes (Tabla 2 Material y Métodos) sometidos a trasplante cardiaco entre Marzo de 2006 y Mayo de 2009, previo al trasplante y en 5 puntos de estudio consecutivos: 7, 30, 90, 180 y 365 días post-TC. Para ello se caracterizaron fenotípicamente las subpoblaciones mediante citometría de flujo. Las variaciones en la evolución de los diferentes parámetros analizados se compararon con los valores iniciales (punto basal previo al trasplante) de cada uno de los pacientes.

En relación a las principales poblaciones celulares el mayor impacto se observó a los 7 días post-trasplante. Se objetivó un descenso del porcentaje de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+, y un incremento de células B CD19+, aunque sólo se observó significación estadística en el descenso de los linfocitos CD8 y en el incremento de la población B. Progresivamente comenzaron a recuperarse los niveles basales de las diferentes poblaciones de forma que al año post-TC dichas diferencias desaparecieron, con la única excepción de los linfocitos T CD8+ que se mantuvieron significativamente aumentados. Las frecuencias de células NK (CD3-CD56+CD16+) disminuyeron de forma significativa a los 90d post-TC, alcanzando los valores iniciales en los meses sucesivos. Los monocitos describieron una cinética similar a los linfocitos T, con una caída significativa a los 7 días seguida de aumentos sostenidos entre los 3 y 6 meses (Figura 10).

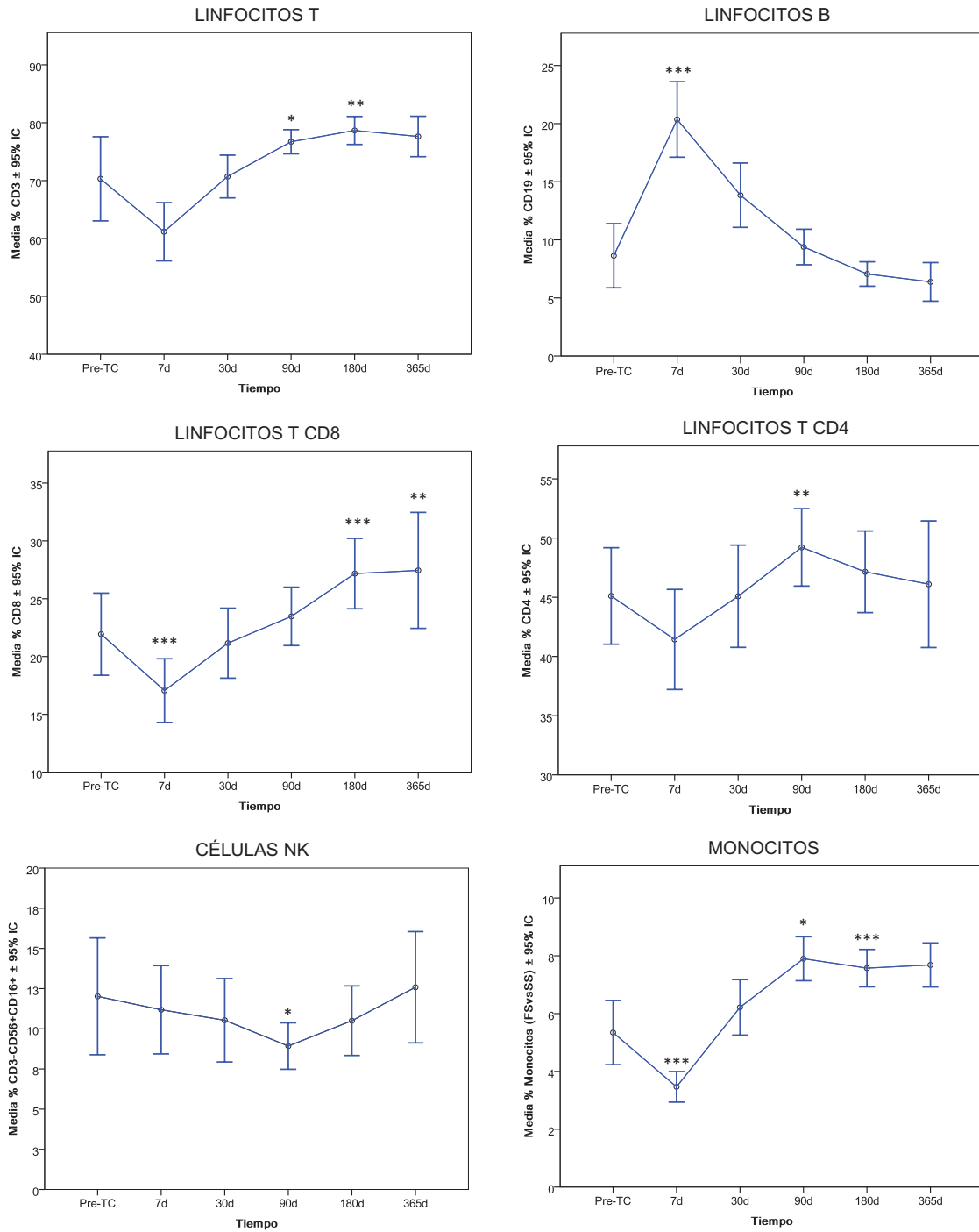


Figura 10. Evolución de subpoblaciones linfocitarias en pacientes trasplantados cardiacos (TC). Análisis longitudinal de los porcentajes de diferentes subpoblaciones linfocitarias en 42 pacientes TC. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias en los diferentes puntos de estudio en relación al valor basal, utilizando prueba t para muestras relacionadas: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) y ***($p \leq 0.001$). En el resto de puntos no se observan diferencias significativas.

Para analizar los posibles cambios en la homeostasis celular asociados a la inmunosupresión, se estudiaron los perfiles de maduración de cada una de las subpoblaciones en relación al punto basal. Las células B vírgenes se mantuvieron sin variaciones significativas a lo largo de todo el tiempo de estudio, mientras que las B memoria sin cambio de isotipo (SCI) sólo mostraron un incremento significativo en el punto 180d y las B memoria con cambio de isotipo (CCI) disminuyeron significativamente al año post-TC (Figura 11A).

En el caso de las células T, de forma general se puede reseñar que en el período post-TC temprano (7d-90d) se produce una expansión de células T CD8+ vírgenes, mientras que en el post-TC tardío (180d-365d) predominan las células de memoria, principalmente MCT en LT CD4+ (Figura 11 B y C).

Los perfiles de activación se estudiaron en base a la coexpresión de los marcadores HLA-DR y CD38 en linfocitos T CD4+ y CD8+. Al tratarse de marcadores de infección crónica (DR) y aguda (CD38) en células T CD8+ se evaluó también la expresión individual de ambos marcadores (perfiles CD8 activados 2 y 3). Tras el trasplante se observó un significativo descenso en los niveles de CD4 activados, manteniéndose ésta tendencia decreciente durante todo el período de estudio. Al analizar el perfil de los linfocitos T CD8 en base a la coexpresión de los marcadores de activación, no se aprecian diferencias significativas en ningún punto. No obstante, al desglosar las frecuencias de células HLA-DR y CD38 positivas, se observó un descenso significativo a los 7d y 180d, respectivamente. En resumen, en éstos pacientes el tratamiento inmunosupresor disminuye el estado de activación de las células T, fundamentalmente CD4+ (Figura 12).

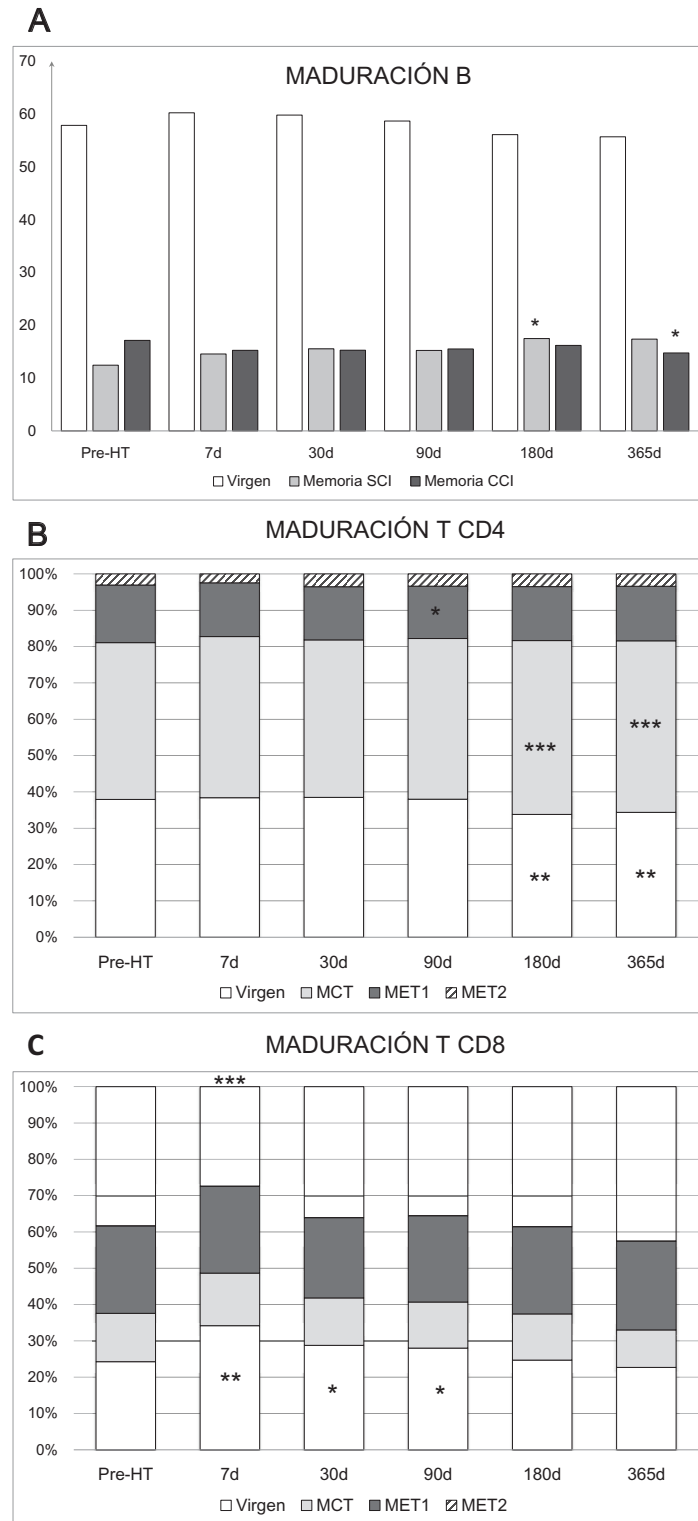


Figura 11. Evolución de perfiles de maduración de subpoblaciones B y T. Análisis longitudinal de los cambios en los porcentajes de subpoblaciones vírgenes y memoria en linfocitos B, T CD4 y T CD8. **A)** Media de los porcentajes de subpoblaciones de células B; vírgenes, memoria sin cambio de isotipo (SCI), memoria con cambio de isotipo (CCI). **B)** y **C)** Media de los porcentajes de subpoblaciones de células T CD4 y CD8; vírgenes, memoria central (MCT), memoria efectora 1 (MET1) y memoria efectora 2 (MET2). Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias en los diferentes puntos de estudio en relación al valor basal, utilizando prueba t para muestras relacionadas: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) y ***($p \leq 0.001$). En el resto de puntos no se observan diferencias significativas.

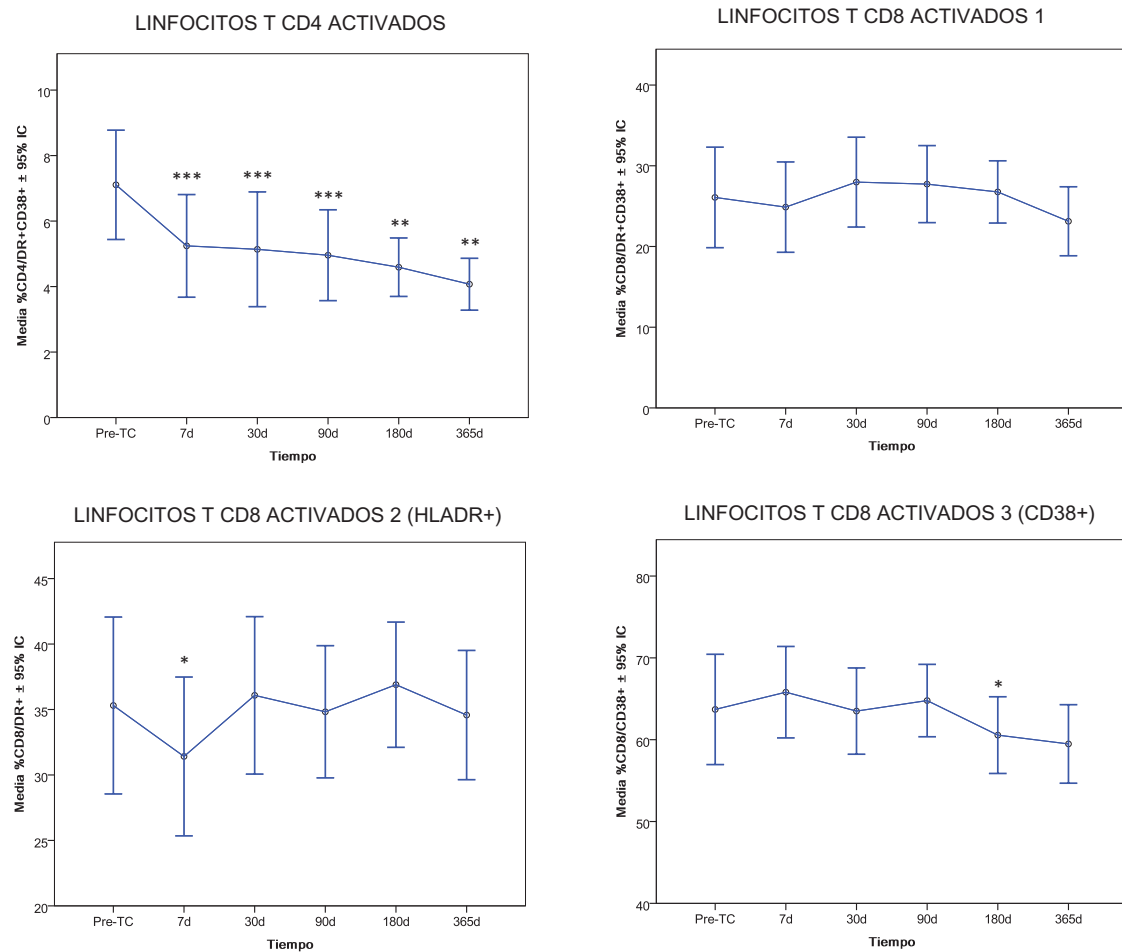


Figura 12. Evolución de perfiles de activación de células T. Análisis longitudinal de los cambios en los porcentajes de subpoblaciones T CD4 y CD8 activadas. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias en los diferentes puntos de estudio en relación al valor basal, utilizando prueba t para muestras relacionadas: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) y ***($p \leq 0.001$). En el resto de puntos no se observan diferencias significativas.

En relación a las células con función reguladora, el estudio se centró en la subpoblación Treg caracterizada por el fenotipo $CD4+CD25_{high}CD127_{low}FoxP3+$, por tratarse del tipo celular más implicado en la inmunología del trasplante. En los puntos 7d y 30d tras el tratamiento inductor con daclizumab (anticuerpo monoclonal anti-CD25), se utilizó la combinación $CD127_{low}FoxP3+$ para definir la población reguladora, dada la imposibilidad de medir la expresión de CD25. En los pacientes trasplantados se observó un descenso significativo de la población Treg $CD4+$ durante todo el tiempo de estudio, sin que la frecuencia de células reguladoras alcanzara los niveles pre-trasplante transcurrido un año de seguimiento (Figura 13).

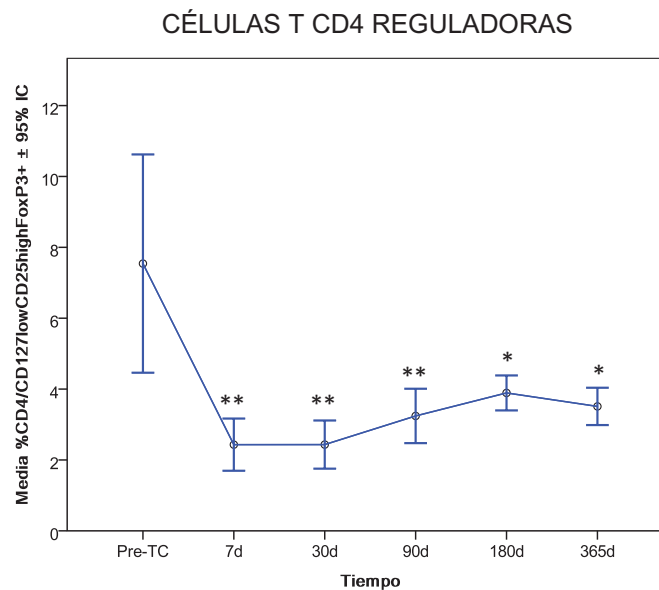


Figura 13. Cinética de células reguladoras. Análisis longitudinal de los cambios en los porcentajes de células reguladoras. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias en los diferentes puntos de estudio en relación al valor basal, utilizando prueba t para muestras relacionadas: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) y ***($p \leq 0.001$). En el resto de puntos no se observan diferencias significativas.

1.1. Evolución de la expresión de CD25 y CD122

Para evaluar de forma prospectiva el efecto del tratamiento inductor con daclizumab sobre el sistema IL-2/IL-2R, se monitorizaron los niveles de expresión de CD25 (IL-2R α) y CD122 (IL-2R β) sobre la superficie de los linfocitos T. En la Figura 14 se puede apreciar que, desde el punto basal, existe un perfil de expresión diferente de ambas cadenas del receptor de IL-2 en linfocitos T CD4+ y CD8+. De forma general en los pacientes trasplantados, los linfocitos T CD4+ se caracterizaron por altos niveles de expresión de CD25 (>60%) y bajos de CD122 (<20%), mientras que los CD8+ se caracterizaron por una baja expresión de CD25 (<15%) y alta de CD122 (>55%).

Se observó en ambos tipos celulares una disminución significativa en los niveles de CD25 durante los 3 primeros meses. Posteriormente, de forma gradual comienza a recuperarse la expresión que no se completa hasta los 6 meses post-TC. A diferencia

de CD25, no se observaron cambios significativos de la expresión de CD122 en ningún punto del estudio.

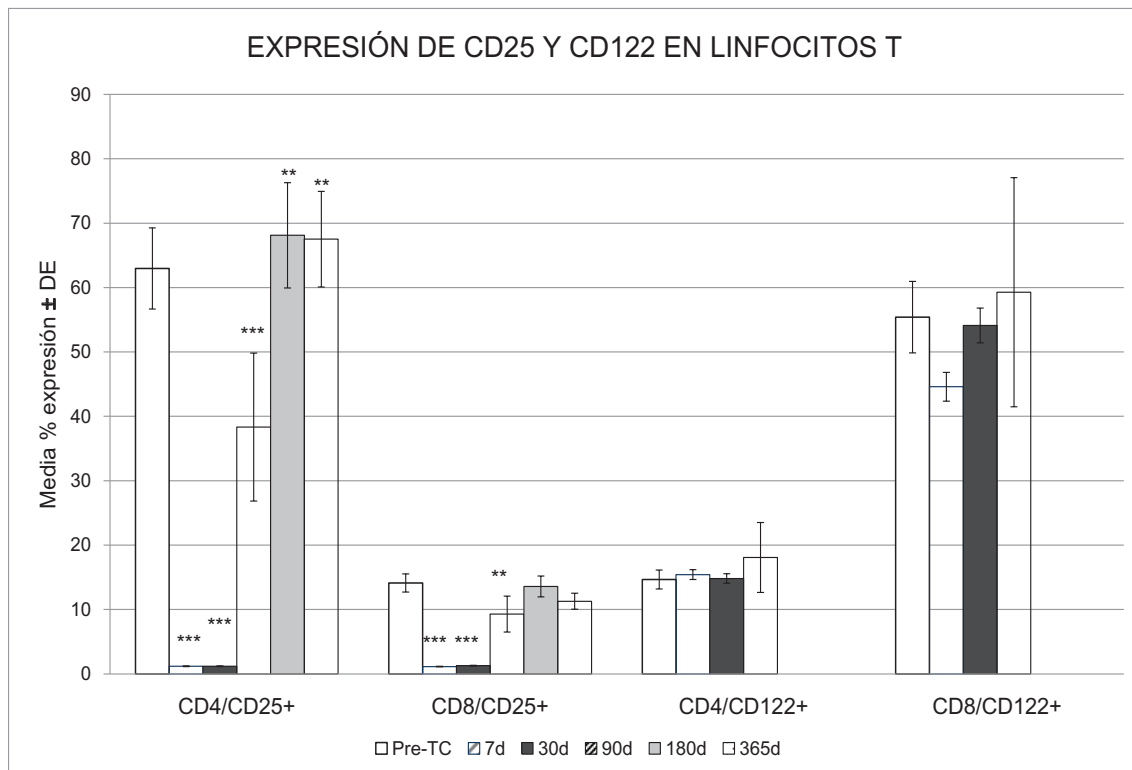


Figura 14. Evolución de la expresión de CD25 y CD122 en linfocitos T. Comparación de los niveles de expresión de CD25 y CD122 en linfocitos T CD4 y CD8. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias en los diferentes puntos de estudio en relación al valor basal, utilizando prueba t para muestras relacionadas: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) y ***($p \leq 0.001$). En el resto de puntos no se observan diferencias significativas.

En relación a la tasa gradual de recuperación en la expresión de CD25, a los 90d se observaron 3 patrones de reconstitución diferentes en el conjunto de pacientes estudiados. El grupo 1 se caracterizó por una recuperación lenta con bajos niveles de expresión de CD4/CD25+ ($\leq 43\%$), el grupo 2 lo constituyen pacientes con un patrón de recuperación medio ($43\% < \text{CD4/CD25+} \leq 65\%$), mientras que en el grupo 3 se encuentran los pacientes con un patrón de reconstitución rápido ($\text{CD4/CD25+} > 65\%$). Al analizar las medias de los porcentajes de CD25 y CD122 en ambos tipos celulares se pudo demostrar que las diferencias entre grupos eran significativas para CD25, no así para CD122 (Tabla 4).

Tabla 4. Diferencias en los niveles de expresión de CD25 y CD122 según tasa de recuperación de CD25 a los 90d post-TC.

| Parámetro (%) | Grupo 1: Baja (n=22) | Grupo 2: Media (n=10) | Grupo 3: Alta (n=10) | Valor <i>p</i> |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------|
| LT CD4 CD25+ | 11.7 ± 11.8 | 60.1 ± 5.2 | 75.1 ± 7.8 | <0.001* |
| LT CD8 CD25+ | 3.9 ± 3.9 | 15.3 ± 12.6 | 15.2 ± 5.4 | <0.001* |
| LT CD4 CD122+ | 14.8 ± 11.8 | 25.6 ± 16.9 | 14.3 ± 6.0 | 0.185 |
| LT CD8 CD122+ | 54.7 ± 18.2 | 66.1 ± 19.1 | 58.3 ± 18.2 | 0.482 |

Media ± desviación estándar. Estratificación de los pacientes TC en 3 grupos según la tasa de recuperación de la expresión de CD25 en LT CD4 a los 90d post-TC; Grupo 1: %CD25≤43; Grupo 2: 43<%CD25≤65; Grupo 3: %CD25>65. *Diferencia estadísticamente significativa utilizando prueba ANOVA.

Se puede resumir, por tanto, que el efecto bloqueante del daclizumab se mantiene durante los primeros 3 meses post-trasplante y se limita a la molécula diana específica; CD25, sin afectar la expresión del IL-2R de afinidad intermedia.

2. Características inmunofenotípicas de los pacientes trasplantados cardíacos

La comparación transversal de los niveles de las diferentes subpoblaciones linfocitarias entre pacientes y controles permitió definir las singularidades inmunofenotípicas de los trasplantados cardíacos en cada punto de estudio. A falta de valores normales estandarizados esta comparación es válida para describir la anomalía que se produce en cada subpoblación.

El análisis previo al trasplante mostró que, en relación a los controles sanos, los pacientes TC se caracterizaban por tener menores niveles de: i) linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo (CD19+CD27+IgM+IgD+) y de linfocitos T CD8+ vírgenes (CD8+CD45RA+CCR7+); y ii) mayores niveles de: linfocitos T CD8+ efectores finales MET2 (CD8+CD45RA+CCR7-) y de células T activadas (CD4+CD38+HLADR+ / CD8+CD38+HLADR+). Por su parte, la comparación con los controles quirúrgicos reveló que los pacientes que se incluyen en lista de espera por enfermedad cardíaca terminal presentan niveles significativamente mayores de células T activadas (Figura 15 A).

Así mismo, en el estudio basal se pudo comprobar que los pacientes con etiología isquémica del trasplante se caracterizaban por mayores porcentajes de las subpoblaciones T de memoria central CD45RA-CCR7+ ([CD4+: 48 ± 17 vs. 39 ± 8 ; $p=0.07$] [CD8+: 17 ± 10 vs. 9 ± 6 ; $p=0.015$]) y de linfocitos T CD4+ activados ([CD25+: 69 ± 7 vs. 56 ± 11 ; $p<0.001$] [CD25+HLADR+: 9 ± 5 vs. 5 ± 2 ; $p=0.05$]), en comparación con pacientes cuya patología de base era de origen no isquémico.

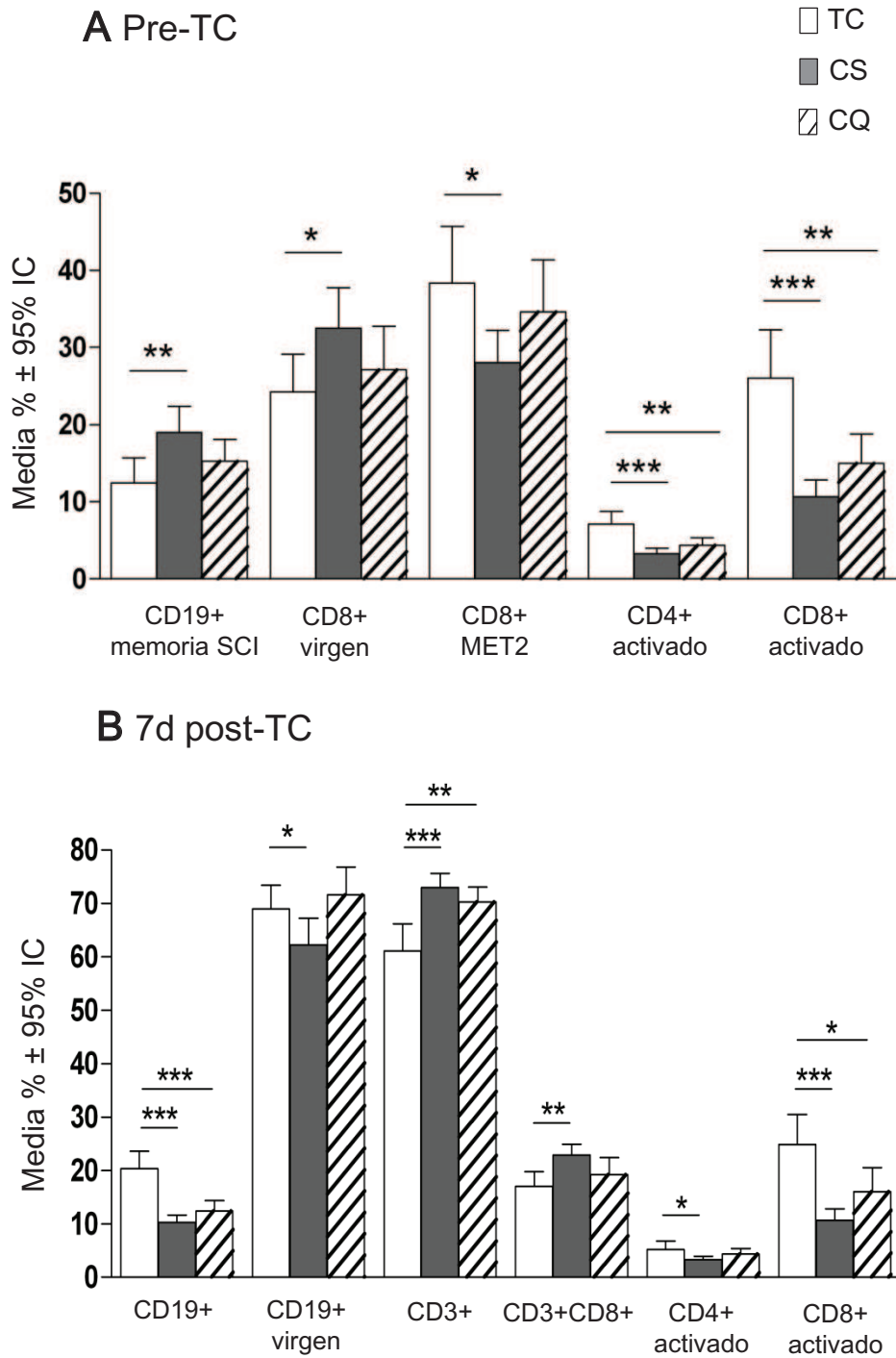


Figura 15. Estudio transversal: Diferencias entre pacientes y controles. A) Antes y **B)** después del tratamiento inmunosupresor. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias entre grupos utilizando prueba t para muestras independientes: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) y ***($p \leq 0.001$). TC: Trasplante cardiaco; CS: Control sano; CQ: Control quirúrgico. Definiciones fenotípicas en texto. En el resto de parámetros no se observan diferencias significativas para los puntos de estudio representados.

Al hacer el análisis extensivo al resto de puntos se pudo comprobar que, en relación a los controles sanos, el porcentaje de linfocitos B CD19+ de los pacientes se incrementa a los 7d y 30d, pero a partir de los 6 meses disminuye de forma significativa. El aumento de células B a la semana post-TC se debe fundamentalmente a una expansión de células B vírgenes (CD19+CD27-) (Figura 15 B) que se mantiene hasta los 3 meses post-TC.

La cinética de las alteraciones en los porcentajes de linfocitos T CD3+ refleja un comportamiento inverso al de los linfocitos B, con valores significativamente inferiores durante el primer mes y superiores a partir de los 3 meses post-TC, vinculadas fundamentalmente a las variaciones del total de linfocitos CD8+, ya que la frecuencia de linfocitos CD4+ fue similar a la de los controles en todos los puntos del estudio. A partir de los 30d se produce un incremento sostenido del porcentaje de la subpoblación T CD8+ MET2 que se mantiene de forma significativa durante el primer año post-TC. Así mismo, en todos los puntos analizados las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ activados fueron significativamente superiores a los niveles observados en controles. No obstante, debido al tratamiento inductor con daclizumab, los niveles de células CD25+ (también considerado un marcador de activación en células T) fueron inferiores hasta los 90d, punto a partir del cual aumenta significativamente la expresión de este marcador en linfocitos CD4+. Por su parte, los niveles de células T CD4 reguladoras se mantuvieron significativamente bajos desde los 7d hasta el año post-TC (Figura 15B y Tabla 1 Anexos).

2.1. Características inmunofenotípicas de los pacientes trasplantados cardiacos de larga evolución

El análisis inmunofenotípico de los pacientes de larga evolución (entre 1 y 3 años post-TC) reveló que algunas de las alteraciones encontradas durante el primer año post-trasplante se mantuvieron, a pesar de la atenuación del tratamiento inmunosupresor. En estos pacientes persistía la relativa linfopenia B compensada por un aumento de linfocitos T CD8+, cuyo perfil de maduración se caracterizaba por altos niveles de células efectoras finales (MET2) y que además expresan marcadores de activación. También persistía la disminución en la expresión de CD25, tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ (Figura 16).

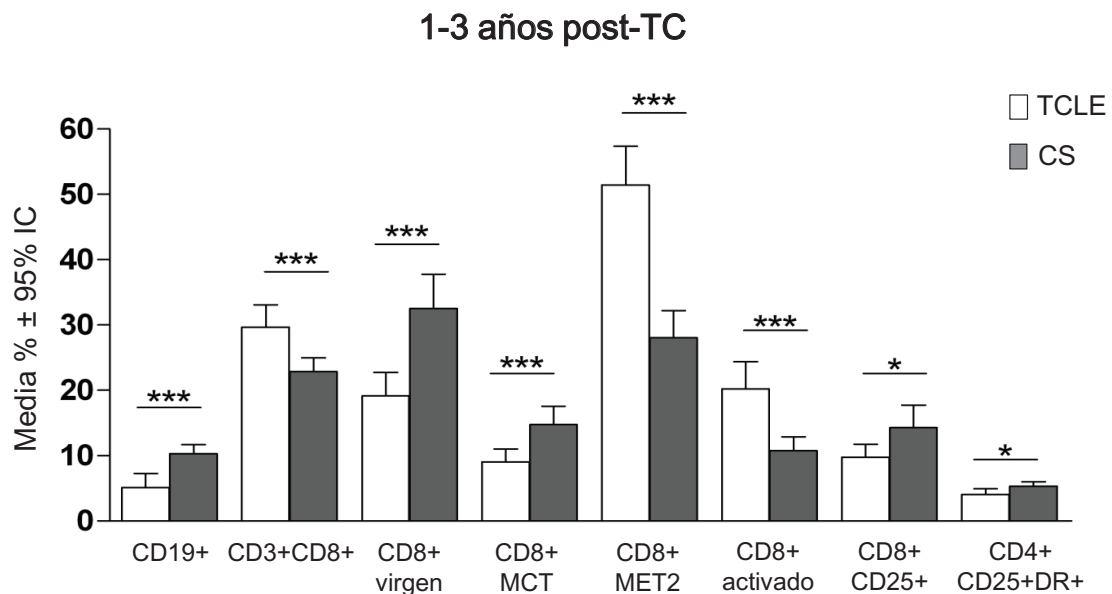


Figura 16. Estudio transversal: Diferencias entre pacientes de larga evolución post-TC y controles. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias entre grupos utilizando prueba t para muestras independientes: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) y ***($p \leq 0.001$). TC: Trasplante cardiaco; CS: Control sano; TCLE: Trasplante cardiaco de larga evolución. Definiciones fenotípicas en texto. En el resto de parámetros no se observan diferencias significativas para los puntos de estudio representados.

3. Alteraciones inmunofenotípicas asociadas con el desarrollo de rechazo celular agudo

Durante el período de seguimiento (primer año post-TC) un total de 11 pacientes (26%) desarrollaron al menos un episodio de rechazo celular agudo que requirió tratamiento (ISHLT grado 2 [n=6], 3 [n=3], y 4 [n=2]). El tiempo medio transcurrido hasta el evento de rechazo fue de 87 días (rango; 7-267 días).

Los pacientes con rechazo del órgano (R), mostraron menores niveles de células B vírgenes (CD19+CD27-IgM+IgD+) desde la primera semana hasta los 180d post-TC, en comparación con los pacientes que no tuvieron rechazo (NR) (Figura 17). En éstos pacientes (R) se encontraron niveles significativamente superiores de células B de memoria (CD19+CD27+) a los 3 y 6 meses post-TC (Figura 17). Dicho incremento se vinculó a una expansión de células de memoria con cambio de isotipo a los 3 meses (R:20.4±7.1 vs. NR:14.0±7.5; p=0.021) y de células de memoria sin cambio de isotipo a los 6 meses (R:25.3±8.7 vs. NR:15.1±9.3; p=0.004).

En los pacientes con episodios de rechazo se encontró una correlación positiva entre niveles disminuidos de células B vírgenes y disminución del cociente T CD4:CD8 antes del trasplante (R=0.77; p=0.016) y a los 7d (R=0.71; p=0.031), 30d (R=0.78; p=0.013), y 90d (R=0.74; p=0.014). Esta correlación no se observó en los pacientes que no tuvieron rechazo. Además, se observó una correlación inversa significativa entre los valores de células B vírgenes y los de linfocitos T CD8 con fenotipo de memoria efectora 1 (MET1) antes del trasplante (R=-0.7; p=0.037) y a los 30d (R=-0.73; p=0.025), así como con el grado del primer episodio de rechazo (LB vírgenes 30d; R=-0.60, p=0.045).

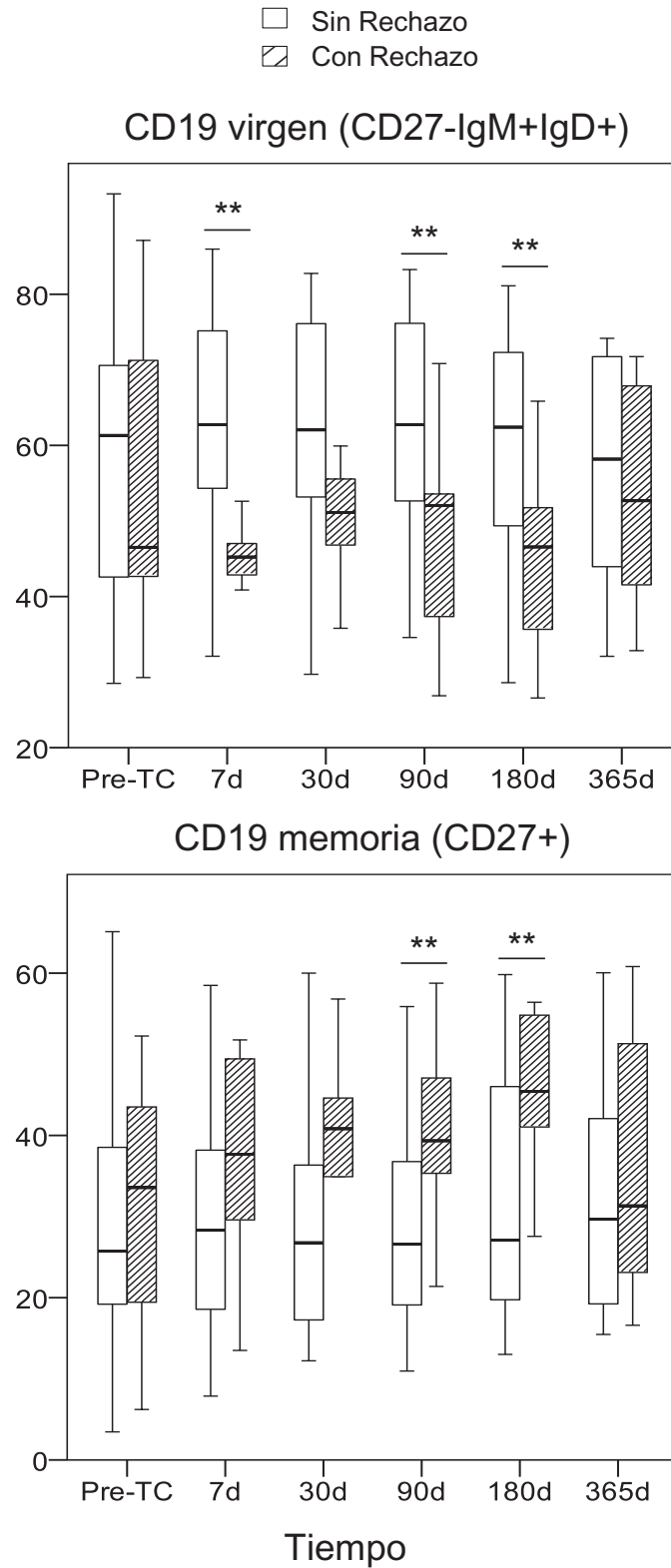


Figura 17. Diferencias en la distribución de la memoria B en pacientes TC con y sin rechazo celular agudo. Se consideraron biopsias endomiocárdicas de grado 2 o mayor (ISHLT). Los diagramas de caja representan; mediana, percentiles 25 y 75, y valores extremos. Se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias entre grupos utilizando test U de Mann-Whitney: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$) y ***($p \leq 0.001$). TC: Trasplante cardiaco.

Es decir, en el período post-TC temprano se observó que los pacientes con mayor grado de rechazo tenían menores porcentajes de células B vírgenes y más linfocitos T CD8 (menor cociente CD4:CD8) con fenotipo de memoria efectora.

Al estratificar los pacientes utilizando como valor de referencia la mediana de los niveles de células B vírgenes a los 7d, los pacientes con frecuencias superiores (>58%) tenían un 91% menos de riesgo de desarrollar un evento de rechazo celular agudo (Figura 18 y Tabla 5).

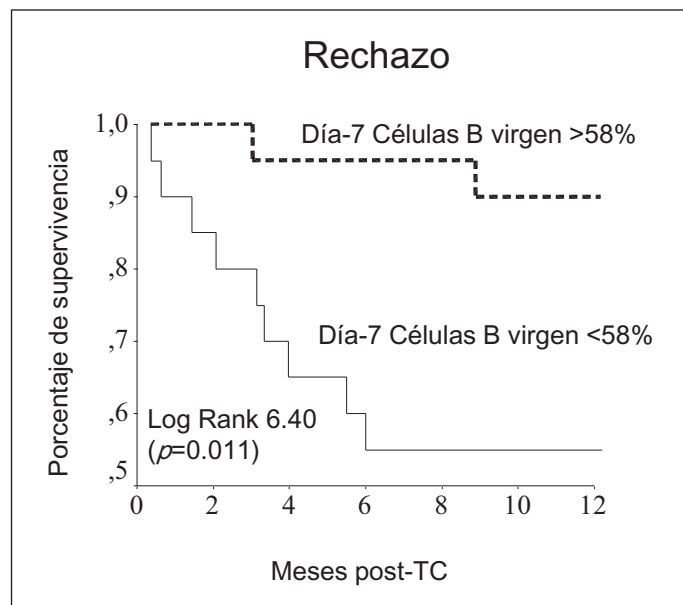


Figura 18. Curva Kaplan-Meier para el desarrollo de rechazo celular agudo en pacientes estratificados según niveles de células B vírgenes (7d). Se consideraron biopsias endomiocárdicas de grado 2 o mayor (ISHLT). TC: Trasplante cardiaco.

Tabla 5. Análisis de regresión de Cox de los factores asociados con rechazo celular agudo

| Factores | RR (95% IC) | Valor p |
|------------------------------|------------------|-----------|
| Univariado | | |
| 7d CD19+CD27-IgM+IgD+ (>58%) | 0.09 (0.01-0.80) | 0.02 |
| 30d IgG>630 mg/dL | 0.21 (0.04-0.99) | 0.04 |
| Bivariado | | |
| 7d CD19+CD27-IgM+IgD+ (>58%) | 0.10 (0.01-0.84) | 0.03 |
| 30d IgG>630 mg/dL | 0.51 (0.10-2.59) | 0.06 |

RR: Riesgo Relativo, IC: Intervalo de confianza

Esta asociación se mantuvo significativa incluso después de realizar el ajuste por la presencia de hipogammaglobulinemia IgG al mes post-TC, que fue la única variable significativamente asociada con el desarrollo de rechazo al realizar el análisis de regresión de Cox univariado (Tabla 2 Anexos y Tabla 5).

4. Alteraciones inmunofenotípicas asociadas con el desarrollo de infecciones severas

Durante el período de seguimiento (primer año post-TC) un total de 22 pacientes (52%) desarrollaron al menos una complicación infecciosa severa que requirió tratamiento endovenoso antimicrobiano específico. La distribución de los agentes infecciosos, aislados por cultivo o antigenemia, fue la siguiente: Citomegalovirus (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=5), *Corynebacterium sp* (n=2), *Aspergillus fumigatus* (n=2), *Enterococcus sp* (n=1), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1), *Aspergillus nidulans* (n=1), *Mucor circinelloides* (n=1) y *Candida tropicalis* (n=1). El 82% de los eventos primarios de infección severa ocurrió durante los primeros 3 meses post-TC.

Los pacientes que durante el seguimiento se mantuvieron sin complicaciones infecciosas severas (NI) mostraron una tendencia hacia niveles más altos de células B de memoria CCI (CD19+CD27+IgM-IgD-) en el punto pre-TC, en comparación con los pacientes que posteriormente sí desarrollaron infecciones (I) (NI:19.8±10.2 vs. I:13.6±6.6; p=0.066). A los 90d los pacientes NI tuvieron mayores frecuencias de células T CD4 vírgenes (NI:42.9±17.1 vs. I:32.1±16.6; p=0.047) y menores niveles de células T CD8 memoria central (NI:9.5±5.9 vs. I:16.6±10.1; p=0.012).

Al estratificar los pacientes utilizando como valor de referencia la mediana de los niveles basales de células B de memoria CCI, los pacientes con frecuencias superiores (>14%) tenían un 74% menos de riesgo de desarrollar un proceso infeccioso severo tras el trasplante (Figura 19 y Tabla 6). En trabajos previos de nuestro grupo reportamos que la determinación de los niveles de IgG post-TC puede ser útil para identificar los pacientes en riesgo de desarrollar infecciones [69, 74], por ésta razón se realizó un análisis simultáneo de ambos parámetros. No se observó

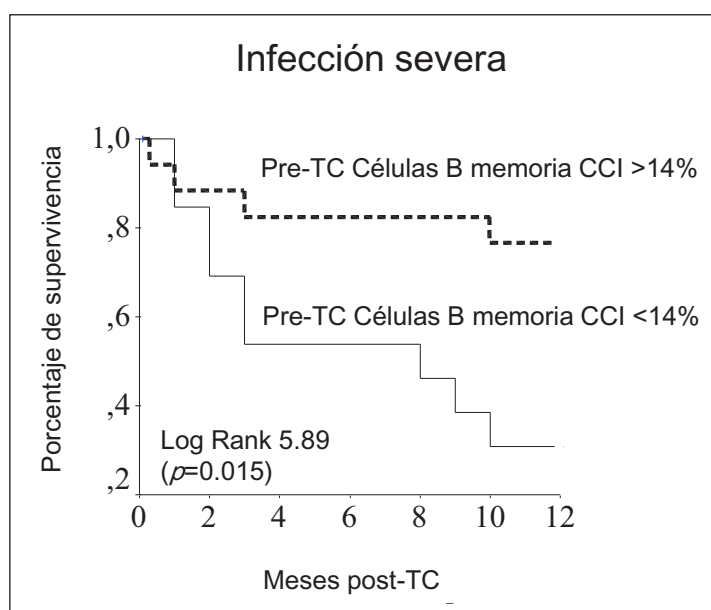


Figura 19. Curva Kaplan-Meier para el desarrollo de infecciones severas en pacientes estratificados según niveles basales de células B de memoria. TC: Trasplante cardiaco, CCI: Con Cambio de Isotipo.

Tabla 6. Análisis de regresión de Cox de los factores asociados con el desarrollo de infecciones severas

| Factores | RR (95% IC) | Valor <i>p</i> |
|----------------------------------|------------------|----------------|
| Univariado | | |
| Pre-TC CD19+CD27+IgM-IgD- (>14%) | 0.26 (0.07-0.86) | 0.027 |
| 30d IgG>630 mg/dL | 0.31 (0.12-0.81) | 0.01 |
| Trasplante urgente | 2.96 (1.26-6.95) | 0.01 |
| Peso donante | 1.04 (1.01-1.08) | 0.04 |
| Bivariado | | |
| Pre-TC CD19+CD27+IgM-IgD- (>14%) | 0.24 (0.07-0.79) | 0.02 |
| 30d IgG>630 mg/dL | 0.32 (0.09-1.05) | 0.06 |
| Pre-TC CD19+CD27+IgM-IgD- (>14%) | 0.29 (0.09-0.95) | 0.04 |
| Trasplante urgente | 0.27 (0.09-0.84) | 0.02 |
| Pre-TC CD19+CD27+IgM-IgD- (>14%) | 0.28 (0.08-0.94) | 0.04 |
| Peso donante | 1.02 (0.98-1.06) | 0.36 |

RR: Riesgo Relativo, IC: Intervalo de confianza

correlación significativa entre el porcentaje de células B de memoria CCI y los valores de IgG en el punto pre-TC ni a los 30d ($R=0.19$; $p=0.34$ y $R=0.304$; $p=0.1$, respectivamente). Sin embargo, la prevalencia de infecciones severas fue

significativamente menor (11.1%) en los pacientes con niveles basales de células B memoria CCI superiores al 14% ó valores de IgG por encima de 630mg/dL a los 30d, en comparación con los pacientes con niveles de éstos marcadores por debajo del valor de corte (64.8%; $p=0.008$).

Además, el análisis bivariado de regresión de Cox reveló que la determinación de los niveles basales de células B de memoria CCI (>14%) añade información a la determinación de la IgG al mes post-TC (>630mg/dL) como factor de protección frente a las infecciones severas. Para éste último análisis sólo se incluyeron los eventos infecciosos desarrollados después del primer mes post-TC. La asociación entre la frecuencia de células B de memoria CCI y el desarrollo de infecciones se mantuvo significativa después de realizar el ajuste por diferentes variables clínicas, que se asociaron con el desarrollo de infecciones en el análisis de regresión de Cox univariado (Tabla 6).

Por otra parte, los pacientes con infecciones bacterianas recurrentes ($n=17$; 40%) se caracterizaron por una disminución en los niveles basales de células B de memoria CCI (11.7 ± 6.9 vs. 19.7 ± 9.3 ; $p=0.0014$) y un incremento en la frecuencia de linfocitos activados CD4+CD38+DR+ (10.6 ± 4.3 vs. 5 ± 2.4 ; $p=0.002$).

Finalmente, los pacientes con antigenemia CMV positiva ($n=19$; 45%) mostraron menores porcentajes de: linfocitos T CD8 de memoria efectora 1 a los 7d (CMV+: 16 ± 9.3 vs. CMV-: 27.6 ± 16 ; $p=0.024$), linfocitos T CD4 de memoria efectora 2 a los 90d (CMV+: 1.6 ± 1.2 vs. CMV-: 4.1 ± 6.3 ; $p=0.045$); y mayor frecuencia de linfocitos activados CD8+CD38+DR+ a los 12 meses post-TC (CMV+: 33.4 ± 12.5 vs. CMV-: 19.7 ± 8.2 ; $p=0.002$).

5. Evaluación de la respuesta específica anti-CMV en pacientes trasplantados cardiacos

La infección por CMV es una de las que conlleva mayor morbimortalidad en los pacientes trasplantados, por lo que se realizó un análisis prospectivo longitudinal de la respuesta anti-CMV en un subgrupo de 38 pacientes seropositivos (CMV+) sometidos a trasplante cardiaco entre Marzo 2006 y Octubre 2008. Para ello se evaluaron de forma simultánea parámetros de la inmunidad humoral (anticuerpos) y celular (linfocitos T CD4+ y CD8+). Dada la mayor complejidad de este estudio, las variables se analizaron en 2 puntos: previo al TC y a los 30d. Posteriormente se realizó un seguimiento clínico de los pacientes durante un período de 6 meses. Ninguno de los pacientes recibió GGIV en el primer mes post-TC.

Durante el período de seguimiento 13 pacientes (34%) desarrollaron infección por CMV (2 ó más antigenemias positivas). Se detectaron de media 15 células positivas (1-90) confirmadas por una viremia de 14313 copias/mL (6180-16800). El tiempo medio transcurrido hasta el desarrollo de infección activa por CMV fue de 3.2 meses (1.6-5 meses). Se administró terapia antiviral preventiva a 5 pacientes que tuvieron más de 30 células positivas en las determinaciones de antigenemia (ganciclovir IV [n=3], valganciclovir oral [n=2]). Se diagnosticó enfermedad CMV en 3 pacientes (pulmonar [n=1], hematológica [n=1], gastrointestinal [n=1]). La información clínica de los pacientes se resume en la Tabla 3 Anexos.

En relación a la morbilidad asociada al virus, los pacientes que durante el seguimiento desarrollaron infección por CMV tuvieron una prevalencia significativamente mayor de infecciones bacterianas y/o fúngicas que requirieron tratamiento endovenoso antimicrobiano específico. Estas infecciones se documentaron antes y después de la

infección por CMV y fueron más virulentas en los pacientes con infección activa por el virus (co-infección) (8 de 10 casos de aspergillosis, 3 de 3 infecciones multiresistentes por *Acinetobacter baumannii*, 4 de 8 infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y 5 de 11 infecciones por *Candida*). Así mismo 1 de los 3 pacientes que desarrolló infección por Varicella zoster tenía infección activa por CMV.

5.1. Evolución de la respuesta humoral y celular específica anti-CMV

Para cuantificar los cambios que se producen en la inmunidad específica anti-CMV se compararon los valores iniciales (pre-TC) de anticuerpos IgG y células T productoras de IFN- γ , con los obtenidos a los 30d (post-inmunosupresión), analizando de forma independiente los pacientes con y sin infección por CMV.

Los pacientes que durante el seguimiento desarrollaron infección por CMV mostraron una disminución no significativa en el título de anticuerpos IgG anti-CMV (14462 ± 11048 vs. 8877 ± 8281 ; $p=0.17$) acompañada de una disminución significativa del porcentaje de células CD8/IFN γ + estimuladas con el péptido IE-1 (0.40 ± 0.29 vs. 0.17 ± 0.15 ; $p=0.035$). En cambio, los pacientes que no desarrollaron infección por CMV mantuvieron los niveles de células CD8/IFN γ + estimuladas con IE-1 sin variaciones significativas tras el trasplante (0.41 ± 0.45 vs. 0.53 ± 0.64 ; $p=0.50$), aunque en éstos pacientes también se observó una disminución no significativa del título de anticuerpos IgG anti-CMV (24926 ± 17013 vs. 18061 ± 15193 ; $p=0.16$). Por su parte, el grupo control de pacientes quirúrgicos mantuvo constantes tanto los títulos de anticuerpos anti-CMV como las respuestas celulares específicas analizadas.

5.2. Comparación con controles quirúrgicos

Previo al trasplante, los pacientes que posteriormente desarrollaron infección por CMV mostraron niveles de anticuerpos IgG y frecuencias de linfocitos específicos anti-CMV similares al grupo control quirúrgico. Los pacientes que no tuvieron infección por CMV mostraron niveles significativamente superiores de anticuerpos IgG anti-CMV en comparación con los controles (24926 ± 17013 vs. 10317 ± 10179 ; $p=0.001$).

Al mes post-TC, el porcentaje de células CD8/IFN γ + estimuladas con IE-1 fue significativamente menor en el grupo de pacientes infectados por CMV en relación a los controles quirúrgicos (0.17 ± 0.15 vs. 0.53 ± 0.71 ; $p=0.018$). Por el contrario, los pacientes que no sufrieron infección por CMV tuvieron títulos superiores de anticuerpos anti-CMV (18061 ± 15193 vs. 10558 ± 9379 ; $p=0.031$) y similares frecuencias de células CD8/IFN γ + estimuladas con IE-1 al grupo control.

5.3. Correlación entre parámetros inmunológicos

En los pacientes con infección por CMV no se encontró correlación entre ninguno de los parámetros de la inmunidad humoral y celular específica anti-CMV estudiados, ni en el punto basal ni al mes post-TC. Sólo en los pacientes sin infección por CMV, se pudo demostrar la existencia de una débil correlación positiva entre la frecuencia de células CD8/IFN γ + estimuladas con IE-1 y el título de anticuerpos IgG anti-CMV a los 30d ($r=0.43$; $p=0.038$).

En cuanto a los marcadores inmunológicos estudiados para comprobar la especificidad del valor predictivo de las variables analizadas, en ninguno de los grupos se encontró correlación entre las respuestas humoral y celular anti-CMV y las variables

inespecíficas (concentración sérica de IFN- γ , concentración de IgG total y sus subclases, frecuencias de células T CD4+ y CD8+, NK, B, así como de células T activadas). Tampoco se encontró correlación entre los parámetros de la inmunidad específica anti-CMV y los niveles de fármacos inmunosupresores al mes post-TC.

6. Asociación entre la respuesta CMV-específica y el desarrollo de infección por CMV

Para establecer la posible asociación entre la capacidad de respuesta anti-CMV y el riesgo de reinfección por el virus, se compararon parámetros de las respuestas humoral y celular entre pacientes con y sin infección tras el trasplante.

En el punto previo al trasplante el título de anticuerpos IgG anti-CMV fue significativamente menor en los pacientes que posteriormente desarrollaron infección por CMV, y ésta diferencia entre los dos grupos se mantuvo significativa al mes post-TC (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros de la respuesta humoral y celular anti-CMV según la presencia o no de infección CMV en pacientes TC seropositivos.

| Parámetros | Pre-TC | | | Post-TC (30d) | | |
|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------------|----------------------|--------------------------|----------------|
| | Infección CMV (n=13) | Sin Infección CMV (n=25) | Valor <i>p</i> | Infección CMV (n=13) | Sin Infección CMV (n=25) | Valor <i>p</i> |
| % CD4/IFN γ +IE1 | 0.05±0.06 | 0.08±0.02 | 0.74 | 0.08±0.18 | 0.15±0.46 | 0.63 |
| % CD8/IFN γ +IE1 | 0.40±0.29 | 0.41±0.45 | 0.97 | 0.17±0.15 | 0.53±0.64 | 0.013 |
| % CD4/IFN γ +pp65 | 0.13±0.08 | 0.13±0.10 | 0.72 | 0.19±0.23 | 0.13±0.14 | 0.31 |
| % CD8/IFN γ +pp65 | 1.01±1.01 | 0.80±0.86 | 0.94 | 1.05±1.03 | 0.75±0.76 | 0.32 |
| Título anti-CMV | 14462±11048 | 24926±17013 | 0.045 | 8877±8281 | 18061±15193 | 0.021 |

Media \pm desviación estándar. Diferencias estadísticas calculadas utilizando prueba *t* para muestras independientes o Mann-Whitney, según proceda. Porcentajes de linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de IFN- γ referidos al total de CD4 y CD8, respectivamente. TC: Trasplante cardiaco

En cuanto a las respuestas celulares específicas, en el punto basal no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en los porcentajes de células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN- γ estimuladas con los péptidos antigénicos IE-1 y pp65. Sin embargo, a los 30d la frecuencia de células T CD8+ IE1-específicas productoras de

IFN- γ (CD8/IFN γ + IE-1) fue significativamente menor en los pacientes que sufrieron infección por CMV (Tabla 7 y Figura 20).

El resto de marcadores inmunológicos analizados para comprobar la especificidad de las diferencias observadas en las variables CMV-específicas, mostraron valores muy similares en ambos grupos (Tabla 8).

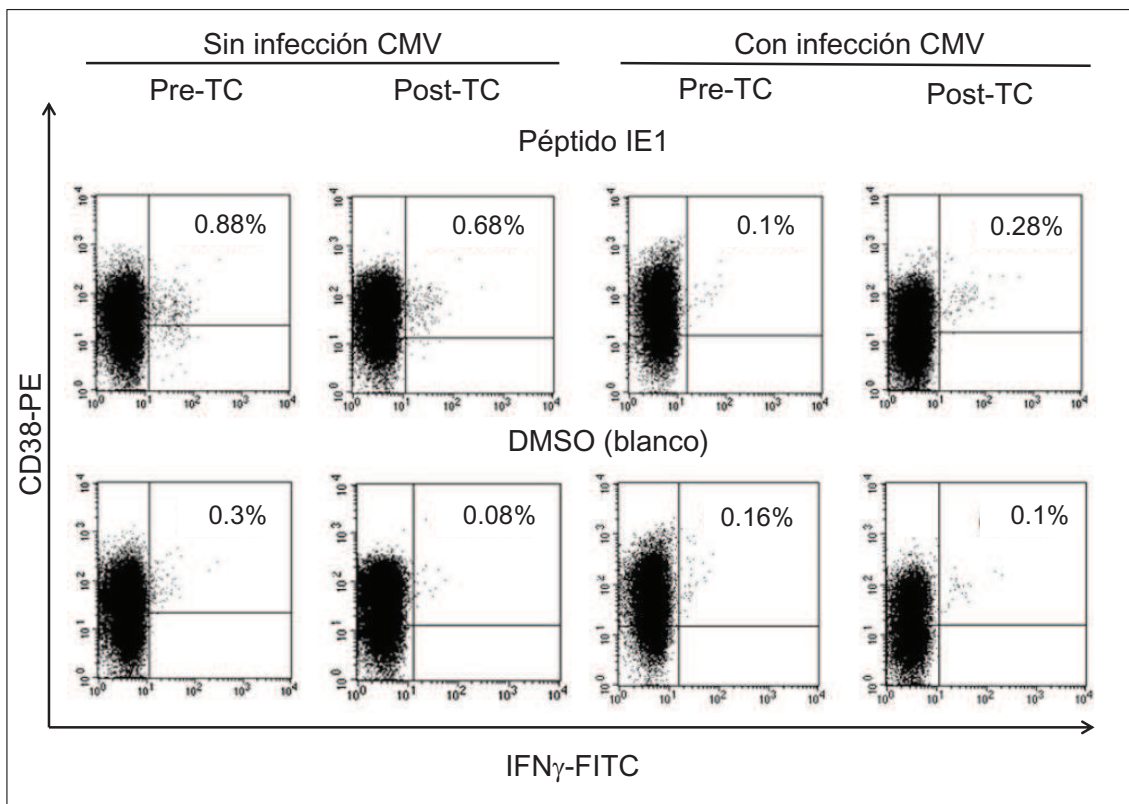


Figura 20. Respuesta celular CD8 frente a IE-1 en pacientes con y sin infección por CMV antes y después del trasplante. Imágenes representativas de 2 pacientes. A los 30d post-TC la frecuencia de células IE1-específicas es inferior en el paciente que desarrolla infección por CMV. Las células estimuladas con DMSO se estudiaron como control de respuesta inespecífica, restándose éste porcentaje al obtenido al estimular con IE-1 para obtener el valor de la respuesta específica. CMV: Citomegalovirus; TC: Trasplante cardiaco; DMSO: Dimetil sulfóxido.

Se evaluó además la respuesta linfoproliferativa frente a un agente mitógeno inespecífico (PHA) a los 30d en un subgrupo de pacientes sin infección CMV (n=6) y con infección CMV (n=6). Al comparar los porcentajes de células CFSE-positivas como medida del nivel de proliferación inducida, no se observaron diferencias significativas

en ninguna de las poblaciones estudiadas (CD3+, CD4+ y CD8+) entre pacientes con y sin infección por CMV (Figura 21).

Tabla 8. Otros parámetros inmunológicos según la presencia o no de infección CMV en pacientes TC seropositivos.

| Parámetros | Pre TC | | Valor <i>p</i> | Post-TC (30d) | | Valor <i>p</i> |
|------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------|----------------------|--------------------------|----------------|
| | Infección CMV (n=13) | Sin Infección CMV (n=25) | | Infección CMV (n=13) | Sin Infección CMV (n=25) | |
| IgG (mg/dL) | 1168±386 | 1137±444 | 0.86 | 673±194 | 707±333 | 0.69 |
| IgG1 (mg/dL) | 850±372 | 700±292 | 0.29 | 476±241 | 413±119 | 0.29 |
| IgG3 (mg/dL) | 51±27 | 59±40 | 0.80 | 31±19 | 29±14 | 0.80 |
| Anti-varicella (mUI/mL) | 643±237 | 730±131 | 0.29 | 652±213 | 615±269 | 0.69 |
| Anti-HBsAg (UI/mL) | 8.5±20.8 | 4.28±7.81 | 0.52 | 38±49 | 25±33 | 0.45 |
| IFN- γ sérico (pg/mL) | 5.2±9.8 | 3.4±6.5 | 0.64 | 1.4±2.6 | 2.3±3.7 | 0.25 |
| % LT | 71±6 | 75±7 | 0.12 | 71±9 | 75±9 | 0.29 |
| % LT CD4 | 47±8 | 51±11 | 0.30 | 48±10 | 51±14 | 0.49 |
| % LT CD4 activado | 6.6±4.7 | 7.1±4.6 | 0.81 | 5.4±4.7 | 4.9±5 | 0.77 |
| % LT CD8 | 23±11 | 24±8 | 0.91 | 22±5 | 24±10 | 0.69 |
| % LT CD8 activado | 25.3±19.3 | 24.7±11.3 | 0.92 | 21.9±19.6 | 23.7±13.9 | 0.76 |
| % LB | 15±7 | 17±7 | 0.71 | 19±7 | 15±7 | 0.18 |
| % NK | 12±8 | 10±7 | 0.31 | 9±5 | 7±5 | 0.44 |

Media \pm desviación estándar. Diferencias estadísticas calculadas utilizando prueba *t* para muestras independientes o Mann-Whitney, según proceda. HBsAg: Antígeno de superficie de Hepatitis B; LT=CD3+; LT CD4=CD3+CD4+; LT CD8=CD3+CD8+; LT activado=CD38+DR+; LB=CD19+; NK=CD3-CD56+CD16+. Porcentajes de linfocitos T activados referidos al total de CD4 y CD8. TC: Trasplante cardiaco

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en el análisis de comparación de medias, se realizó el análisis de la curva característica de operación del receptor (ROC) para establecer los valores de corte de las variables identificadas. De este modo se establecieron los niveles de respuesta por encima o por debajo de los cuales existía un riesgo inferior o superior, respectivamente, de desarrollar infección por CMV. Posteriormente los pacientes se estratificaron en dos grupos, según el título de anticuerpos IgG anti-CMV y el porcentaje de células CD8/IFN γ estimadas con IE-1 a los 30d post-TC. Los valores límite se establecieron en 16100 para el título de anticuerpos IgG anti-CMV (sensibilidad: 92%; especificidad: 48%) y en 0.40% para la

frecuencia de células CD8/IFN γ + estimuladas con IE-1 (sensibilidad: 92%; especificidad: 44%).

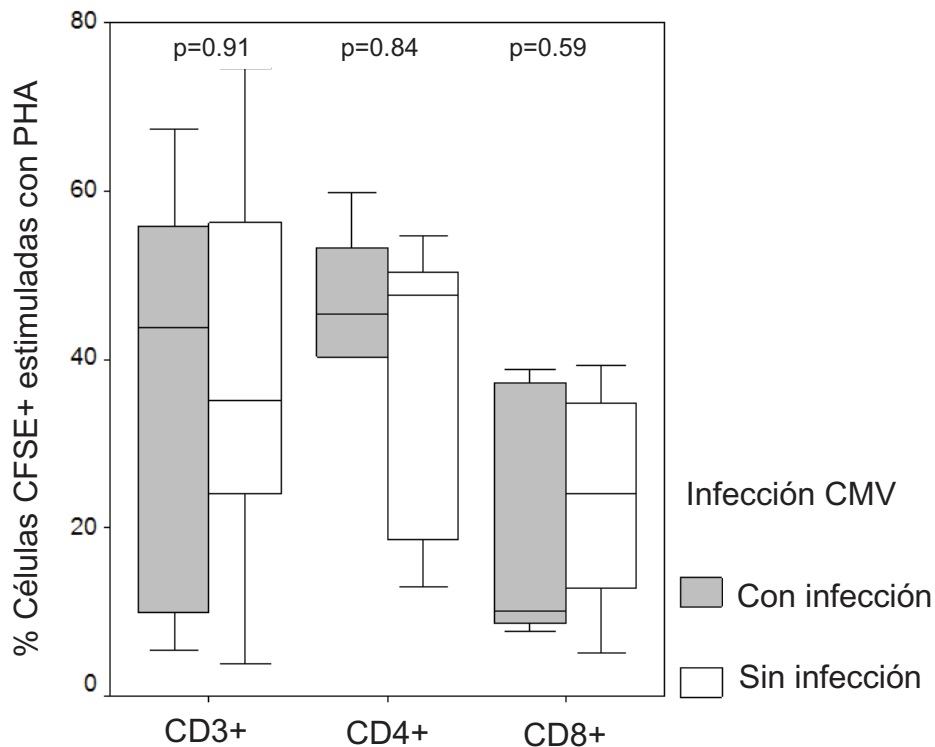


Figura 21. Respuesta proliferativa frente a PHA en pacientes con y sin infección por CMV al mes post-trasplante. Análisis secuencial del porcentaje de células CFSE-positivas en el total de linfocitos T (CD3+) y de las poblaciones CD4+ y CD8+ (referidas al total de CD3+). No se encontraron diferencias en la capacidad proliferativa de las poblaciones T entre pacientes infectados y no infectados.

El análisis de supervivencia demostró que valores por debajo de los límites establecidos para las variables estudiadas, se asociaban con desarrollo de infección por CMV (título de anticuerpos anti-CMV: Log Rank 5.21 [p=0.02]; % CD8/IFN γ + IE-1: Log Rank 4.17 [p=0.04]). Entre los 25 pacientes con niveles de anticuerpos anti-CMV inferiores a 16100 la tasa de desarrollo de infección por CMV a 1, 2 y 3 meses fue 8%, 24% y 28%, respectivamente; mientras que en los 13 pacientes restantes (>16100) fue de 0%, 8% y 8%, respectivamente (Figura 22).

Posteriormente se evaluó si la combinación de ambos marcadores incrementaba el valor predictivo de las variables, para seleccionar los pacientes con mayor riesgo de desarrollar infección por CMV. Los resultados derivados del análisis cruzado de los parámetros (tabla de contingencia) se resumen en la Tabla 9.

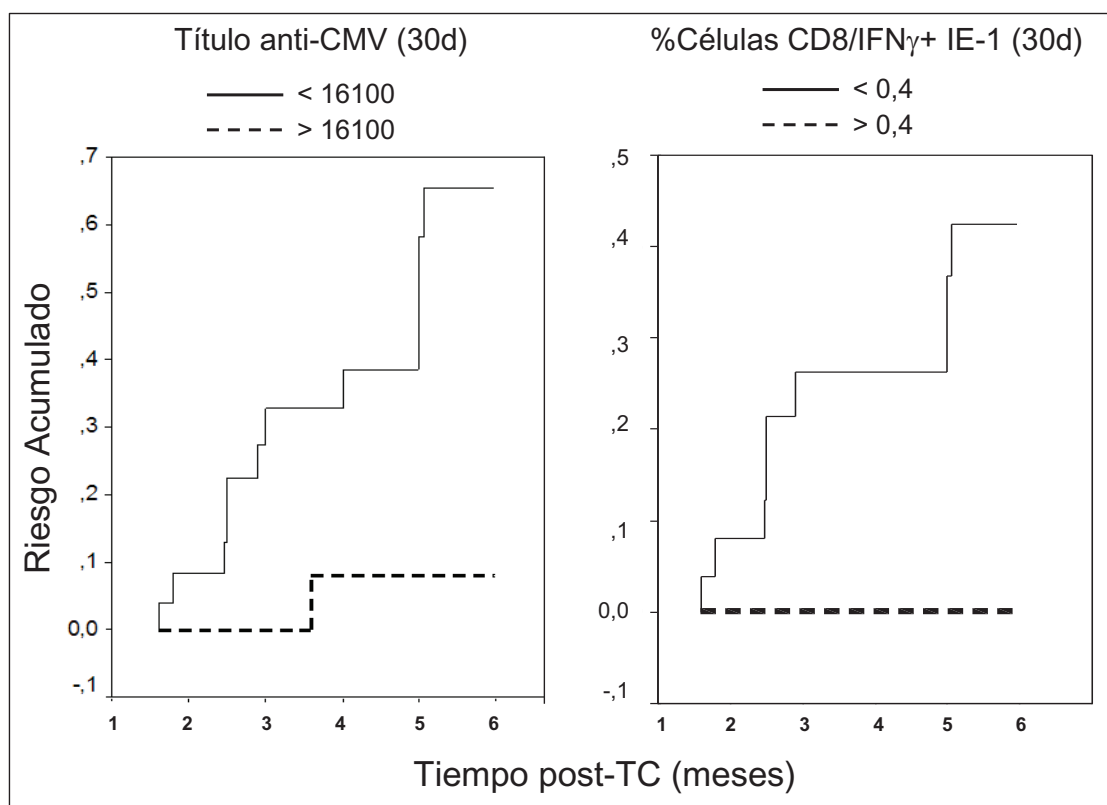


Figura 22. Curva Kaplan-Meier para el desarrollo de infección por CMV en pacientes TC estratificados según niveles de título de anticuerpos anti-CMV y células CD8 específicas para IE-1 a los 30d post-TC. TC: Trasplante cardiaco.

Tabla 9. Asociación entre marcadores inmunológicos y el desarrollo de infección por CMV al mes post-TC.

| Parámetros | Chi-cuadrada | Valor p | SEN | ESP | VPP | VPN | RPP |
|--|--------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | (χ^2) | | | | | | |
| CD8/IFN γ + IE-1<0.40% ¹ | 4.66 | 0.033 | 92 | 44 | 46 | 92 | 1.6 |
| Título IgG anti-CMV<16100 ¹ | 6.17 | 0.015 | 92 | 48 | 48 | 92 | 1.8 |
| Combinación de marcadores ² | 8.11 | 0.006 | 85 | 67 | 55 | 89 | 2.5 |

¹ Valor de corte obtenido mediante análisis de la curva característica de operación del receptor (ROC). ² CD8/IFN γ + IE-1<0.40% y título IgG anti-CMV<16100. TC: Trasplante cardiaco; SEN: Sensibilidad; ESP: Especificidad; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo; RPP: Razón de Probabilidad Positiva.

Tal como se aprecia, al combinar ambos marcadores se incrementa el grado de significación estadística obtenido con cada variable asociada de forma independiente. La combinación de los dos marcadores seleccionados (CD8/IFN γ + IE-1 < 0.40% y título IgG anti-CMV < 16100 al mes post-TC) se encontró en el 85% (11/13) de los pacientes infectados por CMV y sólo en el 36% (9/25) de los pacientes que no sufrieron infección (Figura 23).

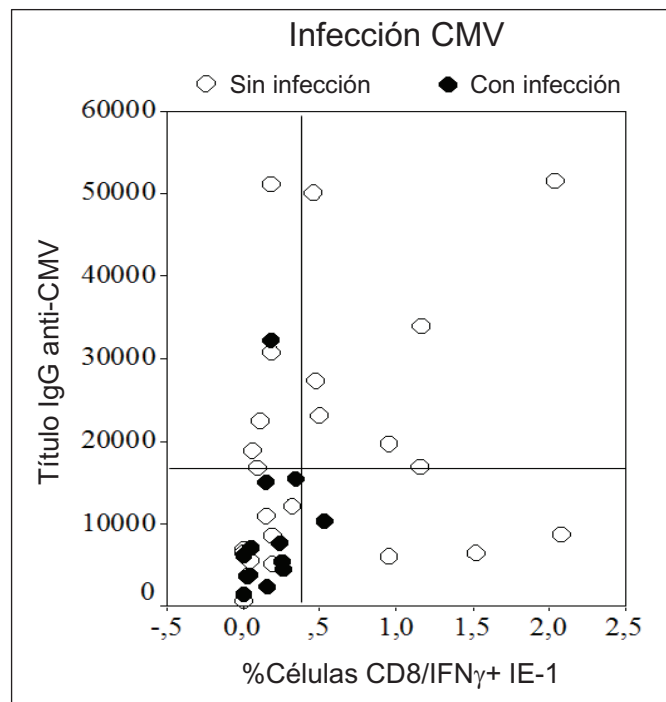


Figura 23. Monitorización simultánea de marcadores inmunológicos asociados a riesgo de infección por CMV. Línea horizontal: valor de corte del título de anticuerpos IgG anti-CMV (16100). Línea vertical: valor de corte del nivel de células CD8/IFN γ + IE1 (0.40%). Al mes post-trasplante la determinación simultánea de ambos parámetros incrementa el valor predictivo para estimar el riesgo de infección por CMV.

El análisis de regresión de Cox reveló la existencia de una asociación significativa entre la combinación de marcadores inmunológicos estudiados y el riesgo de desarrollar infección por CMV (Riesgo Relativo [RR]: 6.07; Intervalo de confianza 95%: 1.34-27.48; $p=0.019$). Esta asociación se mantuvo significativa en el análisis multivariado al realizar el ajuste por diferentes variables clínicas. Los parámetros estadísticos se mantuvieron sin cambios significativos tras ajustar por: sexo del

receptor del trasplante (RR: 6.07; p=0.019), serología CMV del donante (RR: 6.07; p=0.019), edad del donante (RR: 7.13; p=0.011), tiempo de intubación (RR: 11.7; p=0.02), tiempo en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (RR: 7.04; p=0.011) y tiempo de circulación extracorpórea (RR: 7.39; p=0.01).

DISCUSIÓN

En el trasplante cardiaco pocos estudios han investigado los cambios que se producen en las diferentes poblaciones linfocitarias y su potencial impacto en la evolución clínica de los pacientes [146-150]. La necesidad de encontrar nuevos biomarcadores que permitan monitorizar el estado inmunológico de cada paciente, es el principal reto pendiente para alcanzar un tratamiento post-TC personalizado.

En la búsqueda de estos marcadores, uno de los primeros pasos es la definición de patrones patogénicos y para ello es necesario conocer las alteraciones que se producen en las variables analizadas. En el presente estudio se describen las anomalías que se producen antes y después del TC en distintas subpoblaciones linfocitarias, así como su posible asociación con algunos eventos clínicos relevantes, como la infección y el rechazo. El análisis de los porcentajes de dichas subpoblaciones y sus variaciones a lo largo del tiempo, refleja los cambios homeostáticos que se producen independientemente de la linfopenia secundaria a los tratamientos inmunosupresores.

Del análisis de la cinética (comparación punto de estudio-punto basal) descrita para las células B y T en los pacientes trasplantados se desprende que: i) en el período post-TC temprano se produce una depleción linfocitaria que afecta fundamentalmente a los linfocitos T CD8 de memoria, y ii) un incremento porcentual de los linfocitos B secundario a la depleción T, sin que se evidencien cambios significativos en la distribución de las subpoblaciones B de memoria. Además, tampoco se observaron cambios en las subpoblaciones de memoria de las células T CD4. A pesar de ésta disminución inicial, la expansión de las células T CD8 de memoria en el período post-TC tardío, sugiere que el reconocimiento antigénico del aloinjerto podría estimular la

diferenciación y proliferación de células aloespecíficas. Se ha descrito que la exposición al injerto provoca una expansión de células T CD8 efectoras finales (MET2) donante-específicas que contienen altos niveles de granzima B y perforina, lo que podría explicar la presencia sostenida de células activadas con capacidad citotóxica en estos pacientes [151].

La caracterización del efecto del daclizumab (anti-CD25) sobre la expresión de las cadenas α (CD25) y β (CD122) del receptor de la IL-2 en los diferentes puntos del estudio arroja varias conclusiones. En primer lugar que las subpoblaciones T CD4 y CD8 tienen una constitución basal bien diferenciada del IL-2R, predominando la cadena α (IL-2R alta afinidad) en los linfocitos T CD4 y la cadena β (IL-2R afinidad intermedia) en los linfocitos T CD8. De ello se deduce que el efecto del daclizumab debe ser más pronunciado sobre los linfocitos CD4, bloqueando gran parte de los receptores de alta afinidad de la IL-2 durante los primeros 3 meses post-TC. Otro hallazgo relevante es que a pesar de estar formando parte de un complejo heterotrimérico ($\alpha/\beta/\gamma$) el bloqueo es selectivo para la cadena α (CD25) y no afecta al resto del receptor. Ello se desprende del mantenimiento de los niveles de expresión de la cadena β (CD122) en ambas subpoblaciones a lo largo de todo el estudio. Además, el nivel de CD122 no correlaciona con la cinética de re-expresión de CD25, indicando que la recuperación del receptor de alta afinidad es independiente del receptor de afinidad intermedia, sin que las diferencias en la tasa de reconstitución de CD25 (baja/media/alta) se asociara a ninguno de los eventos clínicos monitorizados.

Por otra parte, a pesar de que los niveles de las células Treg ($CD4+CD25_{high}CD127_{low}FoxP3+$) se mantienen significativamente disminuidos durante el primer año post-TC, los pacientes de larga evolución (1-3 años post-TC)

recuperaron los niveles basales de esta subpoblación, relevante por su papel en la inducción de tolerancia en el trasplante de órganos. Resulta llamativo por tanto, que la disminución de células reguladoras no se haya asociado al desarrollo de rechazo celular agudo en ninguno de los puntos evaluados. En una reciente revisión Newell *et al.* resumen la evidencia científica sobre el papel de las Treg en la inducción de tolerancia clínica en trasplante. Entre sus conclusiones señalan la posibilidad de que la expansión de las Treg se produzca como consecuencia de un episodio de rechazo que emerge *de novo*, en un intento por atenuar el daño al injerto, y no como un mecanismo protector necesario para el establecimiento previo de tolerancia [152]. Además, nuestros resultados concuerdan con otros estudios en los que se describe que el efecto del daclizumab sobre las Treg no parece afectar su capacidad supresora [37, 38], pero sí es capaz de atenuar el nivel de activación de los linfocitos T CD4. También se ha postulado que aunque disminuya la frecuencia de Treg periféricas, la inducción de alotolerancia se garantiza por un número suficiente de células donante-específicas con capacidad para infiltrar el injerto y ejercer su papel regulador *in situ* [137]. Además, debe tenerse en cuenta que los pacientes estudiados recibieron una pauta corta de inducción con daclizumab (2 dosis). Como se ha indicado, la disminución en el porcentaje de células reguladoras se acompaña de una reducción en los niveles de subpoblaciones T CD4 activadas entre la semana y el año post-TC, lo que explicaría también el hecho de que no se observe tendencia al rechazo con esta terapia de inducción.

Para establecer el grado de anormalidad que se produce en la distribución de las subpoblaciones, se hicieron comparaciones punto por punto con los porcentajes de los controles estudiados. En la evaluación pre-TC, el deterioro cardiaco avanzado de los

pacientes que entran en lista de espera se asoció con un patrón de activación linfocitaria diferente al observado en pacientes que fueron sometidos a cirugía cardíaca sin tratamiento inmunosupresor (controles quirúrgicos). El incremento en la expresión de marcadores de activación en las células T con predominio de citocinas pro-inflamatorias, se ha descrito en pacientes con fallo cardíaco crónico [153]. En nuestra cohorte encontramos niveles basalmente aumentados en la expresión de marcadores de activación en ambas subpoblaciones T, particularmente en los pacientes con etiología isquémica del trasplante. Además, se encontró una correlación directa significativa entre las frecuencias de células T activadas (CD38+DR+) y la concentración sérica de IFN- γ (datos no mostrados), lo que refuerza la existencia de un perfil pro-inflamatorio en el período pre-TC. Se ha sugerido que la activación linfocitaria podría tener un papel patogénico en el desarrollo de la cardiopatía [154-156] pero se necesitan estudios más profundos que permitan esclarecer este supuesto o, si por el contrario, se trata de un fenómeno secundario.

Cabe destacar además, el aumento significativo que se observó desde el primer mes y a lo largo de todo el seguimiento, en el porcentaje de células CD8 de memoria efectoras finales, tal como se argumenta previamente. Como era de esperar en pacientes que han recibido inducción con daclizumab, los porcentajes de células reguladoras fueron inferiores a los hallados en controles durante todo el seguimiento. Así mismo, resulta de interés el hecho de que, pese a que en la cinética descrita el nivel de células T CD4 disminuye a lo largo del tiempo, este nivel es significativamente más alto que el observado en controles sanos.

En los receptores de trasplantes la viabilidad del injerto está limitada por varias formas de rechazo [1]. Hasta el momento, se conoce poco sobre los mecanismos específicos

que desencadenan y controlan las respuestas inmunológicas que median este complejo proceso. Se ha descrito que los linfocitos T CD4 juegan un papel crucial en la patogénesis del rechazo celular, promoviendo la diferenciación y activación de los linfocitos T CD8 citotóxicos [157], pero también mediante lisis celular directa de las células del injerto a través de mecanismos pro-inflamatorios y activación del complemento [135,158]. En el caso del rechazo mediado por anticuerpos, su función cooperadora con las células B aloespecíficas resulta esencial para el establecimiento de la respuesta humoral dirigida contra el injerto.

Por el contrario, el papel de los linfocitos B en el rechazo celular no se ha definido con exactitud. La presencia de aloanticuerpos se ha correlacionado tanto con el desarrollo de rechazo celular agudo, como con el rechazo celular crónico, indicando que pueden ser procesos que están muy interrelacionados. En trasplante hepático se ha descrito incluso, la presencia simultánea de rechazo celular agudo y mediado por anticuerpos [159]. Recientemente varios autores han descrito la dualidad de las células B por su capacidad para aumentar o suprimir las respuestas aloinmunes [160, 161], ya que, aunque pueden inducir el rechazo del órgano actuando como presentadoras de antígenos o mediante la generación de anticuerpos donante-específicos [162], también podrían estar implicadas en la inducción de alotolerancia [163-166]. La capacidad supresora de las células B se describió simultáneamente por tres grupos independientes utilizando modelos experimentales de aloinmunidad. Estos primeros estudios demostraron el papel fundamental de los linfocitos B, tanto en la inducción como en el mantenimiento de la tolerancia [167-169]. Le Texier *et al.* analizaron las características de la respuesta B inducida en un modelo de rata tolerogénica para injertos cardíacos. Encontraron que la inducción de tolerancia se alcanzaba mediante

una respuesta humoral muy regulada, facilitada por la infiltración del injerto por células B con un perfil supresor/inhibitorio. Curiosamente, la inhibición de la respuesta B se caracterizaba por la acumulación progresiva de células B inmaduras IgM+, que no eran capaces de hacer el cambio de isotipo hacia IgG y por una disminución en la expresión de CD27. Según nuestros resultados, los pacientes que no desarrollaron eventos de rechazo celular (funcionalmente tolerantes) se caracterizaron por tener mayores niveles de células B virgen (CD19+CD27-IgM+IgD+) durante los primeros 6 meses post-TC, indicando que un mecanismo similar al descrito en modelos animales, podría mediar la inducción de tolerancia en humanos. Además, sólo en los pacientes no tolerantes se encontró una correlación inversa entre frecuencias de células B virgen y linfocitos T CD8 de memoria efectora, lo que sugiere que la expansión de subpoblaciones específicas podría desencadenar los eventos celulares que median el rechazo. Newell *et al.* describieron en 2010 una cohorte de 25 receptores de trasplante renal con tolerancia operacional establecida, en los que había un aumento en la expresión de genes relacionados con la activación y diferenciación de las células B, y dicho perfil genético correlacionaba con un incremento porcentual y absoluto de células CD19+ en periferia. El análisis fenotípico de dicha población indicó que el aumento se producía por expansión de células vírgenes y transicionales inmaduras [170]. En el mismo contexto y a partir de una hipótesis y diseño experimental similares, otros dos grupos han coincidido en asociar el estado tolerogénico con la presencia de linfocitos B con fenotipo inhibidor [171, 172]. Estos hallazgos en su conjunto sugieren la posibilidad de que estas células puedan contribuir en alguna medida al establecimiento del estado de tolerancia al injerto y ponen de manifiesto la relevancia de dicha población en el trasplante de órganos sólidos. No obstante, en trasplante

hepático la inducción de tolerancia se ha asociado con la expansión de células NK, lo que sugiere que los biomarcadores relacionados con el estado de tolerancia pueden variar en dependencia del tipo de órgano [173].

Con respecto al desarrollo de infecciones severas la variable de riesgo también se encontró en la distribución de memoria de las células B. En éste caso, el incremento basal de células de memoria con cambio de isotipo se asoció con un efecto protector anti-infeccioso en los pacientes. En trabajos previos de nuestro grupo se demostró que niveles más altos de IgG pre-TC se asocian con menor riesgo de desarrollar infecciones [69]. Ambos hallazgos sugieren que la protección frente a infecciones podría estar favorecida por la presencia de un mayor número de células maduras con capacidad para secretar anticuerpos protectores y mayores niveles de anticuerpos preformados previo al trasplante. La ausencia de correlación entre el porcentaje de células B de memoria CCI y los valores de IgG, apunta a que ambos componentes podrían tener un papel protector diferente. Nuestros resultados no demuestran si la expansión de células B de memoria es un reflejo de la capacidad funcional real de cada paciente para sintetizar anticuerpos protectores frente a un agente infeccioso. En cambio, sí demostramos que la monitorización del estado madurativo de los linfocitos B añade potencia al valor predictivo de la determinación post-TC (30d) de los niveles de IgG. Por la complejidad de las respuestas que median el equilibrio entre inducción de tolerancia y defensa frente a patógenos, es poco probable que un único marcador biológico sea capaz de predecir el riesgo de infección en el contexto del trasplante de órganos. Por ello, sería recomendable la evaluación simultánea de varios parámetros, tal como sugerimos en esta tesis. Recientemente se ha descrito asociación entre niveles disminuidos de células B de memoria, hipogammaglobulinemia IgG y riesgo

incrementado de infección en receptores de médula ósea [174, 175]. En nuestro estudio los pacientes con la combinación: bajos niveles pre-TC de células B de memoria CCI y bajos niveles post-TC de IgG, desarrollaron infecciones severas, bacterianas recurrentes y por CMV, con mayor prevalencia que los pacientes que no tenían dichos marcadores combinados. Por esta razón, la presencia de tal perfil podría indicar un estado de baja inmunocompetencia frente a agentes infecciosos, convirtiendo a estos pacientes en potenciales candidatos a recibir profilaxis antimicrobiana por un período de tiempo más prolongado (p. ej. profilaxis anti-CMV, que suele suspenderse a los 15 días tras el trasplante en los receptores seropositivos).

Estos resultados refuerzan la conveniencia de realizar nuevos estudios que incluyan la realización de análisis multivariados que permitan identificar los factores protectores contra las complicaciones clínicas descritas. El número de pacientes incluidos en nuestra cohorte, no nos permitió hacer este tipo de aproximación que requiere un tamaño muestral superior. No obstante, al evaluar el riesgo de rechazo celular no se encontró ningún parámetro clínico que añadiera información, con la única excepción de la hipogammaglobulinemia IgG al mes post-TC. En el caso de infección severa el análisis bivariado demostró que el incremento en el porcentaje de células B CCI se asociaba de forma independiente al riesgo de infección.

En relación a la evaluación de las respuestas inmunológicas frente a citomegalovirus, una de las complicaciones infecciosas más relevantes en TC, nuestros resultados mostraron que la disminución, tanto del nivel de anticuerpos IgG anti-CMV como de las células T CD8/IFN γ +IE-1-específicas, pueden ser un factor de predisposición para desarrollar infección por CMV. A pesar de su baja especificidad, la combinación de ambos marcadores puede ser útil para identificar a los pacientes seropositivos con

mayor riesgo de sufrir infección, ya que la reactivación del virus se produjo casi exclusivamente en los pacientes en los que ambos parámetros coincidían por debajo del valor de corte seleccionado. De confirmarse estos resultados, haciendo extensivo el estudio a un mayor número de pacientes, sería oportuno considerar estas determinaciones como herramientas preventivas en el manejo clínico post-TC.

En la actualidad, los receptores de TC selectivamente reciben profilaxis universal o terapia preventiva, en función únicamente de su estatus serológico (D+/R-: alto riesgo; D+/R+: bajo riesgo) y de la viremia CMV. Normalmente se considera que los receptores seronegativos son los que tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad CMV, a pesar de lo cual, la prevalencia de casos en términos absolutos es mayor en el grupo D+/R+. Manuel *et al.* demostraron que los receptores seropositivos son susceptibles a la transmisión de múltiples cepas de CMV del donante o a la reactivación de las propias. La coexistencia de diferentes variantes genéticas de CMV se asoció con mayor carga viral y un mayor retraso en la eliminación del virus, independientemente del estatus serológico basal [176]. Por consiguiente, la seropositividad en sí misma no confiere una ventaja o estado de protección frente al CMV tras la terapia inmunosupresora. La identificación y posterior validación del umbral de riesgo en las respuestas anti-CMV, haría posible ajustar la selección de los pacientes candidatos a recibir tratamiento profiláctico por un período de tiempo prolongado o, por el contrario, indicar la terapia, incluso con niveles indetectables de viremia. Por lo tanto, la realización de ensayos inmunológicos como los aquí descritos, permitiría individualizar el tratamiento según las necesidades específicas de cada paciente, disminuyendo por una parte, la toxicidad y otros riesgos relacionados con la exposición prolongada universal a los fármacos, y por otra, la incidencia de la

enfermedad CMV. Se necesitan más estudios para determinar si la protección frente al virus depende del estado inmunológico basal (p. ej. título de anticuerpos IgG anti-CMV) o si la monitorización de estos biomarcadores podría indicar cuándo retirar la profilaxis antiviral, una vez alcanzado cierto nivel de protección [177].

Varios grupos han explorado la utilidad de cuantificar las respuestas celulares T CMV-específicas, sin que hasta el momento exista un consenso en cuál es la mejor estrategia para predecir el riesgo de infección en pacientes trasplantados. Algunos investigadores han coincidido en asociar el aumento de la viremia y el desarrollo de enfermedad CMV, con un descenso en la magnitud de la respuesta de los linfocitos T CD8 [60, 96], T CD4 [61, 105], o de ambas subpoblaciones [178, 179] frente a lisados virales y/o a los péptidos IE-1 y pp65. Otros, por el contrario, no han encontrado asociación entre las respuestas celulares frente al virus y el incremento de la viremia [68, 70]. Al evaluar las respuestas celulares T frente a IE-1 y pp65 Kirchner *et al.* mostraron que la complejidad de las mismas está determinada por la existencia de una gran variabilidad entre individuos en cuanto a: i) amplitud o capacidad de respuesta, ii) subpoblación celular dominante y iii) epítomos antigénicos reconocidos [180]. En nuestra cohorte los pacientes que desarrollaron infección por CMV mostraron a los 30d post-TC menores niveles de respuesta T CD4 y CD8 frente a IE1, mientras que en el mismo punto las respuestas frente a pp65 fueron superiores. Recientemente se ha descrito que las respuestas T CD8 parecen ser más importantes en la infección primaria y durante el período post-TC temprano, mientras que las respuestas T CD4 serían necesarias para el control de la replicación viral a largo plazo [181].

Contrariamente, poco se ha investigado sobre la capacidad protectora de los anticuerpos anti-CMV y su relación con el aumento de la viremia. Hay estudios que

demuestran que individuos sanos seropositivos, a pesar de fracasar en el control celular del virus, son capaces de desarrollar anticuerpos anti-CMV, y viceversa [182]. Es decir, que las respuestas humorales y celulares pueden ser divergentes y no siempre complementarias. Este hecho podría explicar la ausencia de correlación entre las respuestas celulares específicas y el título de anticuerpos anti-CMV, observada en la cohorte de pacientes seropositivos evaluada en nuestro estudio.

Al igual que en el caso de las infecciones severas, la evaluación del riesgo global de infección por CMV debería basarse, por tanto, en la monitorización simultánea de parámetros humorales y celulares. La definición de patrones de anticuerpos específicos, ligado a la inducción de activación en células T CD4 de memoria, ha demostrado ser una estrategia útil en el estudio de infecciones causadas por otros microorganismos [183]. Además, nuestros resultados apoyan la hipótesis sugerida por otros grupos sobre la conveniencia de que los protocolos profilácticos, para aumentar su eficacia, deben ser capaces de inducir respuestas protectoras tanto humorales como celulares específicas [184, 185].

El análisis de la cinética de la respuesta CMV-específica también puede ser relevante en el seguimiento clínico de estos pacientes. Las determinaciones antes y después del trasplante permiten establecer y cuantificar, la pérdida de intensidad (o no) en las respuestas. En nuestro estudio, sólo los pacientes que desarrollaron infección por CMV mostraron una disminución significativa en la frecuencia de células T CD8/IFN γ + estimuladas con IE-1 al mes post-TC. Resulta llamativo el hecho de que la cirugía cardíaca *per se* no parece tener un efecto relevante en esta subpoblación, tal como se deduce de los resultados encontrados en los controles quirúrgicos.

Paralelamente se analizaron otros parámetros inespecíficos, ya que la falta de respuesta celular T CD8 frente a IE-1 y los bajos títulos de anticuerpos anti-CMV podrían simplemente reflejar un estado inmunológico comprometido por los tratamientos inmunosupresores. Las concentraciones séricas de IFN- γ , IgG total, y de las subclases IgG1 e IgG3, que están relacionadas con el control de las infecciones virales, fueron similares en ambos grupos (con y sin infección CMV). Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de anticuerpos específicos para otros virus (anti-varicella, anti-HBsAg), en la distribución de las principales poblaciones linfocitarias (T, B, NK), ni en las respuestas proliferativas evaluadas. Además, la ausencia de correlación entre las respuestas CMV-específicas y los marcadores inmunológicos inespecíficos, sugiere que los pacientes con infección CMV podrían tener una deficiencia funcional particular que los haga más susceptibles al virus. En resumen, nuestros resultados mostraron que las anomalías descritas se asociaban de forma específica con el riesgo de infección por CMV.

Los resultados presentados en este trabajo podrían ser el de punto de partida en la validación posterior de algunos de los marcadores estudiados para su utilización en la práctica clínica. Para ello se deben diseñar estudios multicéntricos que incluyan un mayor número de pacientes. La citometría de flujo es un recurso ampliamente disponible en hospitales con capacidad para realizar trasplantes que cuentan con Servicios o Unidades de Inmunología. En consecuencia, de confirmarse los resultados en futuros estudios, sería factible la traslación y aplicación de los mismos en el manejo de estos pacientes. La propuesta del uso combinado de marcadores como forma de evaluación inmunológica multifuncional (p. ej. inmunidad humoral y celular anti-CMV), es otra de las aportaciones de esta tesis. Los resultados mostrados pueden servir

también de base conceptual para la indicación de medidas profilácticas. El uso de gammaglobulinas intravenosas específicas anti-CMV no ha llegado a demostrar claramente su eficacia para prevenir la infección CMV. Debe tenerse en cuenta que los ensayos realizados no se han centrado en el paciente con riesgo inmunológico, en los que tal indicación está realmente justificada [186, 187]. Lo mismo ocurre con la indicación de terapia celular CD8 anti-CMV [188]. En ambos casos la indicación puede ser más eficaz si se concentra en los pacientes con riesgo inmunológico [189], que es lo que en la medicina actual se ha denominado profilaxis o terapia guiada inmunológicamente [177].

CONCLUSIONES

1. La principal afectación en la distribución de subpoblaciones linfocitarias se observó a los 7d post-trasplante cardiaco y se caracterizó por el incremento del porcentaje de células B y la disminución de las células T CD8 efectoras finales, linfocitos T CD4 activados y células reguladoras.
2. Al año post-trasplante se produjo un incremento de linfocitos T CD8 mientras que se mantuvieron significativamente bajos los porcentajes de linfocitos T CD4 activados y células reguladoras.
3. En pacientes tratados con daclizumab se observó una disminución en la expresión de CD25 en ambas subpoblaciones de linfocitos T, que se mantuvo durante los primeros 3 meses post-trasplante. El tratamiento con anti-CD25 no afectó la expresión de CD122.
4. Los pacientes incluidos en lista de espera para trasplante cardiaco presentaron mayores porcentajes de células T activadas que los controles sanos y quirúrgicos.
5. Después del primer año post-trasplante se observó una disminución porcentual de la población linfocitaria B, acompañada de un incremento en el porcentaje de células T CD8, fundamentalmente efectoras finales y activadas.
6. Los pacientes con porcentajes de células B vírgenes superiores al 58% a los 7d post-trasplante, tuvieron un 91% menos de riesgo de desarrollar un evento de rechazo celular agudo durante el primer año tras el trasplante.
7. Los pacientes con porcentajes basales de células B de memoria con cambio de isotipo superiores al 14% tuvieron un 74% menos de riesgo de desarrollar un proceso infeccioso severo durante el primer año tras el trasplante.

8. En los pacientes que desarrollaron infección por CMV se observó un descenso en el porcentaje de células CD8 productoras de IFN- γ tras estimulación con el péptido IE-1 a los 30d post-trasplante, mientras que dicha disminución no se apreció en pacientes sin infección por CMV ni en controles quirúrgicos.
9. No se observó correlación entre el porcentaje de linfocitos T productores de IFN- γ estimulados con IE-1 y pp65 y el título de anticuerpos IgG anti-CMV en ninguno de los puntos de estudio.
10. Los valores de IgG anti-CMV inferiores a 16100 y de células CD8/IFN γ + frente a IE-1 por debajo de 0.4% a los 30d post-trasplante, se asociaron a mayor probabilidad de desarrollar infección por CMV.
11. La combinación de bajos títulos de anticuerpos IgG anti-CMV y menores porcentajes de células T CD8 productoras de IFN- γ tras estimulación con IE-1, incrementó de forma significativa el riesgo de infección por CMV.
12. Nuestros datos sugieren que la monitorización de parámetros inmunitarios celulares y humorales podría ser útil para identificar pacientes con mayor riesgo de desarrollar infección o rechazo tras el trasplante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stehlik, J., et al., The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010. *J Heart Lung Transplant*, 2010. 29(10): p. 1089-103.
2. Figuera Aymerich, D., [The history of the heart transplant in Spain]. *Rev Esp Cardiol*, 1995. 48 Suppl 7: p. 7-10.
3. Almenar, L., et al., Spanish Heart Transplantation Registry. 21st Official Report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure and Heart Transplantation (1984-2009). *Rev Esp Cardiol*, 2010. 63(11): p. 1317-28.
4. Allison, A.C., Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology*, 2000. 47(2-3): p. 63-83.
5. Stepkowski, S.M., Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med*, 2000. 2(4): p. 1-23.
6. Halloran, P.F., Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*, 2004. 351(26): p. 2715-29.
7. Wang, D., et al., CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and I kappa B kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(1): p. 164-71.
8. Taylor, A.L., C.J. Watson, and J.A. Bradley, Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005. 56(1): p. 23-46.
9. Martin-Davila, P., M. Blanes, and J. Fortun, [Immunosuppression and infection in transplant recipients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2007. 25(2): p. 143-54.
10. Barnes, P.J., Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2005. 25(3): p. 451-68.
11. Stahn, C., et al., Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. 275(1-2): p. 71-8.
12. Wikstrom, A.C., Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. *J Endocrinol*, 2003. 178(3): p. 331-7.
13. Almawi, W.Y. and O.K. Melemedjian, Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol*, 2002. 71(1): p. 9-15.
14. Dostert, A. and T. Heinzel, Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des*, 2004. 10(23): p. 2807-16.
15. Stahn, C. and F. Buttgereit, Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008. 4(10): p. 525-33.
16. Croxtall, J.D., Q. Choudhury, and R.J. Flower, 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): p. 289-98.

17. Bartholome, B., et al., Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J*, 2004. 18(1): p. 70-80.
18. Buttgereit, F. and A. Scheffold, Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*, 2002. 67(6): p. 529-34.
19. Lowenberg, M., et al., Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med*, 2007. 13(4): p. 158-63.
20. Buttgereit, F., et al., The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 2005. 34(1): p. 14-21.
21. Matsuda, S. and S. Koyasu, Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 2000. 47(2-3): p. 119-25.
22. Martinez-Martinez, S. and J.M. Redondo, Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr Med Chem*, 2004. 11(8): p. 997-1007.
23. Shibasaki, F., U. Hallin, and H. Uchino, Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem*, 2002. 131(1): p. 1-15.
24. Collins, R.H., Tacrolimus (FK506) versus cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. *Lancet*, 1994. 344(8927): p. 949.
25. Dumont, F.J., FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem*, 2000. 7(7): p. 731-48.
26. Kim, T.J., et al., FK506 causes cellular and functional defects in human natural killer cells. *J Leukoc Biol*, 2010. 88(6): p. 1089-97.
27. Allison, A.C. and E.M. Eugui, Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 2000. 47(2-3): p. 85-118.
28. Allison, A.C. and E.M. Eugui, Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*, 2005. 80(2 Suppl): p. S181-90.
29. Ritter, M.L. and L. Pirofski, Mycophenolate mofetil: effects on cellular immune subsets, infectious complications, and antimicrobial activity. *Transpl Infect Dis*, 2009. 11(4): p. 290-7.
30. Minami, Y., et al., The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol*, 1993. 11: p. 245-68.
31. Nelson, B.H., J.D. Lord, and P.D. Greenberg, Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature*, 1994. 369(6478): p. 333-6.
32. Goebel, J., et al., Daclizumab (Zenapax) inhibits early interleukin-2 receptor signal transduction events. *Transpl Immunol*, 2000. 8(3): p. 153-9.
33. Forrest, K., et al., Daclizumab therapy in kidney transplantation-different mechanisms of action in- versus ex-vivo? *Transpl Immunol*, 2005. 14(1): p. 43-7.

34. Tkaczuk, J., et al., Effect of anti-IL-2Ralpha antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling. *Am J Transplant*, 2002. 2(1): p. 31-40.
35. 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): p. 1704-10.
36. McDyer, J.F., et al., IL-2 receptor blockade inhibits late, but not early, IFN-gamma and CD40 ligand expression in human T cells: disruption of both IL-12-dependent and -independent pathways of IFN-gamma production. *J Immunol*, 2002. 169(5): p. 2736-46.
37. 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): p. 249-55.
38. Vlad, G., et al., Anti-CD25 treatment and FOXP3-positive regulatory T cells in heart transplantation. *Transpl Immunol*, 2007. 18(1): p. 13-21.
39. Joyal, D., et al., Early experience with two-dose daclizumab in the prevention of acute rejection in cardiac transplantation. *Clin Transplant*, 2004. 18(5): p. 493-6.
40. Hershberger, R.E., et al., Daclizumab to prevent rejection after cardiac transplantation. *N Engl J Med*, 2005. 352(26): p. 2705-13.
41. Lopez, M.M., et al., Long-term problems related to immunosuppression. *Transpl Immunol*, 2006. 17(1): p. 31-5.
42. Everly, M.J., et al., Posttransplant lymphoproliferative disorder. *Ann Pharmacother*, 2007. 41(11): p. 1850-8.
43. Zeevi, A., et al., Monitoring immune function during tacrolimus tapering in small bowel transplant recipients. *Transpl Immunol*, 2005. 15(1): p. 17-24.
44. Gurgui, M. and P. Munoz, Infection in heart transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2007. 25(9): p. 587-97.
45. Bouza, E. and P. Munoz, Infectious complications in patients undergoing a heart transplant. *Rev Esp Cardiol*, 1995. 48 Suppl 7: p. 96-107.
46. Fishman, J.A., Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*, 2007. 357(25): p. 2601-14.
47. Avery, R.K., Prophylactic strategies before solid-organ transplantation. *Curr Opin Infect Dis*, 2004. 17(4): p. 353-6.
48. Perez-Sola, M.J., et al., Indirect effects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2008. 26(1): p. 38-47.
49. Humar, A., Reactivation of viruses in solid organ transplant patients receiving cytomegalovirus prophylaxis. *Transplantation*, 2006. 82(2 Suppl): p. S9-S14.
50. Humar, A. and M. Michaels, American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant*, 2006. 6(2): p. 262-74.
51. Avery, R.K., Prevention and treatment of cytomegalovirus infection and disease in heart transplant recipients. *Curr Opin Cardiol*, 1998. 13(2): p. 122-9.

52. Opelz, G. and B. Dohler, Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant*, 2004. 4(2): p. 222-30.
53. Danziger-Isakov, L. and G. Mark Baillie, Hematologic complications of anti-CMV therapy in solid organ transplant recipients. *Clin Transplant*, 2009. 23(3): p. 295-304.
54. Potena, L., et al., Frequent occult infection with Cytomegalovirus in cardiac transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *J Clin Microbiol*, 2007. 45(6): p. 1804-10.
55. Husain, S., C.E. Pietrangeli, and A. Zeevi, Delayed onset CMV disease in solid organ transplant recipients. *Transpl Immunol*, 2009. 21(1): p. 1-9.
56. Li, F., et al., Incidence and clinical features of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease in heart transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2007. 45(4): p. 439-47.
57. Baldanti, F., D. Lilleri, and G. Gerna, Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol*, 2008. 41(3): p. 237-41.
58. Fisher, R.A., Cytomegalovirus infection and disease in the new era of immunosuppression following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis*, 2009. 11(3): p. 195-202.
59. Valentine, H.A., et al., Impact of cytomegalovirus hyperimmune globulin on outcome after cardiothoracic transplantation: a comparative study of combined prophylaxis with CMV hyperimmune globulin plus ganciclovir versus ganciclovir alone. *Transplantation*, 2001. 72(10): p. 1647-52.
60. Bunde, T., et al., Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med*, 2005. 201(7): p. 1031-6.
61. Sester, U., et al., Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant*, 2005. 5(6): p. 1483-9.
62. Mocarski, E.S., Jr., Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol*, 2002. 10(7): p. 332-9.
63. Kotton, C.N., Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol*, 2010. 6(12): p. 711-21.
64. Torres-Madriz, G. and H.W. Boucher, Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 2008. 47(5): p. 702-11.
65. Carbone, J., et al., Immune monitoring to predict the development of infections after immunosuppression for solid organ transplantation and autoimmune diseases. *Curr Drug Saf*, 2008. 3(2): p. 91-9.
66. Daniel, V. and G. Opelz, Clinical relevance of immune monitoring in solid organ transplantation. *Int Rev Immunol*, 2009. 28(3-4): p. 155-84.
67. 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.

68. La Rosa, C., et al., Longitudinal assessment of cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses in liver transplant recipients at high risk for late CMV disease. *J Infect Dis*, 2007. 195(5): p. 633-44.
69. Sarmiento, E., et al., IgG monitoring to identify the risk for development of infection in heart transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 2006. 8(1): p. 49-53.
70. Eid, A.J., et al., A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transpl Int*, 2010. 23(5): p. 506-13.
71. Mawhorter, S. and M.H. Yamani, Hypogammaglobulinemia and infection risk in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*, 2008. 13(6): p. 581-5.
72. Yamani, M.H., et al., Hypogammaglobulinemia following cardiac transplantation: a link between rejection and infection. *J Heart Lung Transplant*, 2001. 20(4): p. 425-30.
73. Corales, R., et al., Significant post-transplant hypogammaglobulinemia in six heart transplant recipients: an emerging clinical phenomenon? *Transpl Infect Dis*, 2000. 2(3): p. 133-9.
74. Sarmiento, E., et al., Decreased levels of serum immunoglobulins as a risk factor for infection after heart transplantation. *Transplant Proc*, 2005. 37(9): p. 4046-9.
75. Munoz, P., et al., Clostridium difficile-associated diarrhea in heart transplant recipients: is hypogammaglobulinemia the answer? *J Heart Lung Transplant*, 2007. 26(9): p. 907-14.
76. Goldfarb, N.S., et al., Hypogammaglobulinemia in lung transplant recipients. *Transplantation*, 2001. 71(2): p. 242-6.
77. Kawut, S.M., et al., Risk factors and outcomes of hypogammaglobulinemia after lung transplantation. *Transplantation*, 2005. 79(12): p. 1723-6.
78. Yip, N.H., et al., Immunoglobulin G levels before and after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. 173(8): p. 917-21.
79. Boddana, P., et al., Hypogammaglobulinemia and bronchiectasis in mycophenolate mofetil-treated renal transplant recipients: an emerging clinical phenomenon? *Clin Transplant*. 2011 May-Jun;25(3):417-9.
80. Wieneke, H., et al., Predictive value of IgG subclass levels for infectious complications in renal transplant recipients. *Clin Nephrol*, 1996. 45(1): p. 22-8.
81. Broeders, E.N., et al., Evolution of immunoglobulin and mannose binding protein levels after renal transplantation: association with infectious complications. *Transpl Int*, 2008. 21(1): p. 57-64.
82. Cuervas-Mons, V., et al., Prognostic value of preoperatively obtained clinical and laboratory data in predicting survival following orthotopic liver transplantation. *Hepatology*, 1986. 6(5): p. 922-7.
83. Sarmiento, E., et al., Impaired anti-pneumococcal polysaccharide antibody production and invasive pneumococcal infection following heart transplantation. *Int Immunopharmacol*, 2006. 6(13-14): p. 2027-30.

84. Thomas, B., et al., Chronic respiratory complications in pediatric heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, 2007. 26(3): p. 236-40.
85. Harkiss, G.D., et al., Serial analysis of circulating immune complexes, complement, and antithymocyte globulin antibodies in heart transplant recipients. *J Clin Immunol*, 1983. 3(2): p. 117-26.
86. Manuel, O., et al., Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation*, 2007. 83(3): p. 359-62.
87. Khalaf, T.H., et al., Alterations in T and B lymphocytes in heart transplant patients early and late postoperatively. *J Clin Invest*, 1976. 58(1): p. 212-20.
88. Saas, P., et al., Immune monitoring of kidney transplant recipients: can markers predictive of over-immunosuppression be identified?. *Ann Pharm Fr*, 2008. 66(2): p. 115-21.
89. Castro, S.M., et al., Lymphocyte subpopulations during cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *Braz J Med Biol Res*, 2003. 36(6): p. 795-805.
90. Belles-Isles, M., et al., Monitoring of cytomegalovirus infections by the CD8+CD38+ T-cell subset in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 1998. 65(2): p. 279-82.
91. Ticha, O., et al., Monitoring of CD38^{high} expression in peripheral blood CD8+ lymphocytes in patients after kidney transplantation as a marker of cytomegalovirus infection. *Transpl Immunol*, 2010. 24(1): p. 50-6.
92. Wang, Y., et al., Monitoring of CD95 and CD38 expression in peripheral blood T lymphocytes during active human cytomegalovirus infection after orthotopic liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010. 25(1): p. 138-42.
93. Haveman, J.W., et al., Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transpl Infect Dis*, 1999. 1(3): p. 146-52.
94. Varani, S., et al., Impaired dendritic cell immunophenotype and function in heart transplant patients undergoing active cytomegalovirus infection. *Transplantation*, 2005. 79(2): p. 219-27.
95. Wahidi, M.M., et al., Diagnosis and outcome of early pleural space infection following lung transplantation. *Chest*, 2009. 135(2): p. 484-91.
96. Radha, R., et al., Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 2005. 5(1): p. 110-7.
97. Mattes, F.M., et al., Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant*, 2008. 8(5): p. 990-9.
98. Boland, G.J., et al., Early detection of primary cytomegalovirus infection after heart and kidney transplantation and the influence of hyperimmune globulin prophylaxis. *Transpl Int*, 1993. 6(1): p. 34-8.

99. Reusser, P., et al., Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J Infect Dis*, 1999. 180(2): p. 247-53.
100. Gerna, G., et al., Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant*, 2006. 6(10): p. 2356-64.
101. Lilleri, D., et al., Inconsistent responses of cytomegalovirus-specific T cells to pp65 and IE-1 versus infected dendritic cells in organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 2007. 7(8): p. 1997-2005.
102. Benz, C., et al., Activated virus-specific T cells are early indicators of anti-CMV immune reactions in liver transplant patients. *Gastroenterology*, 2002. 122(5): p. 1201-15.
103. Sund, F., et al., CMV-specific T-cell immunity, viral load, and clinical outcome in seropositive renal transplant recipients: a pilot study. *Clin Transplant*, 2010. 24(3): p. 401-9.
104. Shlobin, O.A., et al., Persistent cytomegalovirus-specific memory responses in the lung allograft and blood following primary infection in lung transplant recipients. *J Immunol*, 2006. 176(4): p. 2625-34.
105. Egli, A., et al., Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med*, 2008. 6: p. 29.
106. Drew, W.L., Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis*, 2007. 20(4): p. 408-11.
107. Boeckh, M. and S.R. Riddell, Immunologic predictors of late cytomegalovirus disease after solid organ transplantation--an elusive goal? *J Infect Dis*, 2007. 195(5): p. 615-7.
108. Hutchinson, P., et al., Laboratory assessment of immune function in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. 18(5): p. 983-9.
109. Blazik, M., et al., Leukocyte phenotype and function predicts infection risk in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. 20(10): p. 2226-30.
110. Giulieri, S. and O. Manuel, QuantiFERON(R)-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn*, 2011. 11(1): p. 17-25.
111. Kumar, D., et al., Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 2009. 9(5): p. 1214-22.
112. Kowalski, R.J., et al., Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation*, 2006. 82(5): p. 663-8.
113. 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): p. 504-8.
114. Ducloux, D., et al., Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int*, 2005. 67(6): p. 2454-61.
115. Cervera, C., et al., The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation*, 2007. 83(11): p. 1493-500.

116. Hoffmann, T.W., et al., Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet*, 2010. 47(1): p. 54-8.
117. Hoffmann, T.W., et al., Association between a polymorphism in the IL-12p40 gene and cytomegalovirus reactivation after kidney transplantation. *Transplantation*, 2008. 85(10): p. 1406-11.
118. Kijpittayarit, S., et al., Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis*, 2007. 44(10): p. 1315-20.
119. Worthley, D.L., et al., Donor mannose-binding lectin deficiency increases the likelihood of clinically significant infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis*, 2009. 48(4): p. 410-7.
120. Mitsani, D., et al., A polymorphism linked to elevated levels of interferon-gamma is associated with an increased risk of cytomegalovirus disease among Caucasian lung transplant recipients at a single center. *J Heart Lung Transplant*. 2011 May;30(5):523-9.
121. Rodrigo, E., et al., Cytokine polymorphisms and risk of infection after kidney transplantation. *Transplant Proc*, 2007. 39(7): p. 2219-21.
122. Morgun, A., et al., Molecular profiling improves diagnoses of rejection and infection in transplanted organs. *Circ Res*, 2006. 98(12): p. e74-83.
123. Inkinen, K., et al., DNA microarray-based gene expression profiles of cytomegalovirus infection and acute rejection in liver transplants. *Transplant Proc*, 2005. 37(2): p. 1227-9.
124. Sommerer, C., et al., Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine a in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies. *Transplantation*, 2006. 82(10): p. 1280-5.
125. Billing, H., et al., Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine A by NFAT-regulated gene expression and the relationship with infectious complications in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant*, 2010. 14(7): p. 844-51.
126. Alvarez, C.M., et al., Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. *Am J Transplant*, 2005. 5(4 Pt 1): p. 746-56.
127. Cortesini, R. and N. Suciú-Foca, The concept of "partial" clinical tolerance. *Transpl Immunol*, 2004. 13(2): p. 101-4.
128. Bettens, F., et al., Microchimerism after liver transplantation: absence of rejection without abrogation of anti-donor cytotoxic T-lymphocyte-mediated alloreactivity. *Liver Transpl*, 2005. 11(3): p. 290-7.
129. Gras, J., et al., Early immunological monitoring after pediatric liver transplantation: cytokine immune deviation and graft acceptance in 40 recipients. *Liver Transpl*, 2007. 13(3): p. 426-33.

130. Sommerer, C., et al., Cyclosporin A tapering monitored by NFAT-regulated gene expression: a new concept of individual immunosuppression. *Transplantation*, 2008. 85(1): p. 15-21.
131. Bayliss, J., et al., Increased vascular endothelial growth factor mRNA in endomyocardial biopsies from allografts demonstrating severe acute rejection: a longitudinal study. *Transpl Immunol*, 2008. 18(3): p. 264-74.
132. Kim, C.D., et al., Association of G-137C IL-18 promoter polymorphism with acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*, 2008. 86(11): p. 1610-4.
133. Girmita, D.M., et al., Genetic polymorphisms impact the risk of acute rejection in pediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Transplantation*, 2008. 85(11): p. 1632-9.
134. Pelzl, S., et al., Soluble CD30 as a predictor of kidney graft outcome. *Transplantation*, 2002. 73(1): p. 3-6.
135. Nozaki, T., et al., CD4 T cell-mediated rejection of cardiac allografts in B cell-deficient mice. *J Immunol*, 2008. 181(8): p. 5257-63.
136. Kreijveld, E., et al., Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS One*, 2008. 3(7): p. e2711.
137. Bestard, O., et al., Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4901-9.
138. Muthukumar, T., et al., Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*, 2005. 353(22): p. 2342-51.
139. Pretagostini, R., et al., Minimization of immunosuppressive therapy and immunological monitoring of kidney transplant recipients with long-term allograft survival. *Transpl Immunol*, 2008. 20(1-2): p. 3-5.
140. Blanco-Garcia, R.M., et al., Expression of HLA molecules on peripheral blood lymphocytes: a useful monitoring parameter in cardiac transplantation. *Transplant Proc*, 2007. 39(7): p. 2362-4.
141. Dubinski, B., et al., Activated cells in urine and monocyte chemoattractant peptide-1 (MCP-1)--sensitive rejection markers in renal graft recipients. *Transpl Immunol*, 2008. 18(3): p. 203-7.
142. Liu, W., et al., CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1701-11.
143. Chen, X., et al., CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol*, 2007. 123(1): p. 50-9.

144. Piqueras, B., et al., Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*, 2003. 23(5): p. 385-400.
145. Holm, A.M., et al., Gene expression analysis of peripheral T cells in a subgroup of common variable immunodeficiency shows predominance of CCR7(-) effector-memory T cells. *Clin Exp Immunol*, 2004. 138(2): p. 278-89.
146. Calarota, S.A., et al., Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients. *Transplantation*, 2012. 93(1): p. 112-9.
147. Blanco-Garcia, R.M., et al., CD28 and KIR2D receptors as sensors of the immune status in heart and liver transplantation. *Hum Immunol*, 2011. 72(10): p. 841-8.
148. Chen, M., et al., Reduced levels of both circulating CD4+ CD25+ CD127(low/neg) and CD4+ CD8(neg) invariant natural killer regulatory T cells in stable heart transplant recipients. *Clin Exp Immunol*, 2011. 163(1): p. 104-12.
149. Creemers, P., et al., Evaluation of peripheral blood CD4 and CD8 lymphocyte subsets, CD69 expression and histologic rejection grade as diagnostic markers for the presence of cardiac allograft rejection. *Transpl Immunol*, 2002. 10(4): p. 285-92.
150. Zeglen, S., et al., Lymphocyte subtypes CD3+, CD19+, CD16+CD56+, CD4+, CD8+, and CD3+HLA-DR+ in peripheral blood obtained from patients after thoracic organ transplantation. *Transplant Proc*, 2011. 43(8): p. 3055-7.
151. Schenk, A.D., et al., Effector functions of donor-reactive CD8 memory T cells are dependent on ICOS induced during division in cardiac grafts. *Am J Transplant*, 2009. 9(1): p. 64-73.
152. Newell, K.A., D. Phippard, and L.A. Turka, Regulatory cells and cell signatures in clinical transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*, 2011. 23(5): p. 655-9.
153. Yndestad, A., et al., Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T-cells from patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Res*, 2003. 60(1): p. 141-6.
154. Kuethe, F., et al., Immunopathogenesis of dilated cardiomyopathy. Evidence for the role of TH2-type CD4+T lymphocytes and association with myocardial HLA-DR expression. *J Clin Immunol*, 2006. 26(1): p. 33-9.
155. Badorff, C., et al., Cell-mediated cytotoxicity in hearts with dilated cardiomyopathy: correlation with interstitial fibrosis and foci of activated T lymphocytes. *J Am Coll Cardiol*, 1997. 29(2): p. 429-34.
156. Noutsias, M., et al., Expression of functional T-cell markers and T-cell receptor Vbeta repertoire in endomyocardial biopsies from patients presenting with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 2011. 13(6): p. 611-8.
157. Hall, B.M., Cells mediating allograft rejection. *Transplantation*, 1991. 51(6): p. 1141-51.
158. Krieger, N.R., D.P. Yin, and C.G. Fathman, CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection. *J Exp Med*, 1996. 184(5): p. 2013-8.

159. Musat, A.I., et al., The significance of donor-specific HLA antibodies in rejection and ductopenia development in ABO compatible liver transplantation. *Am J Transplant*, 2011. 11(3): p. 500-10.
160. Zarkhin, V., G. Chalasani, and M.M. Sarwal, The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplant Rev (Orlando)*, 2010. 24(2): p. 67-78.
161. Noorchashm, H., et al., B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. *J Immunol*, 2006. 177(11): p. 7715-22.
162. Baldwin, W.M., 3rd, et al., B cells in cardiac transplants: from clinical questions to experimental models. *Semin Immunol*, 2012. 24(2): p. 122-30.
163. Adams, A.B. and K.A. Newell, B cells in clinical transplantation tolerance. *Semin Immunol*, 2012. 24(2): p. 92-5.
164. Kwun, J., et al., The role of B cells in solid organ transplantation. *Semin Immunol*, 2012. 24(2): p. 96-108.
165. Wood, K.J., A. Bushell, and J. Hester, Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(6): p. 417-30.
166. Redfield, R.R., 3rd, et al., Essential role for B cells in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*, 2011. 23(5): p. 685-91.
167. Le Texier, L., et al., Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant*, 2011. 11(3): p. 429-38.
168. Chen, J., et al., A non-redundant role for IL-10 produced by B cells in the maintenance of murine heart allograft tolerance. *Am J Transplant*, 2011. 11: p. 517.
169. Lai, G., et al., Non-humoral functions of B cells is required for tolerance. *Am J Transplant*, 2011. 11: p. 105.
170. Newell, K.A., et al., Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*, 2010. 120(6): p. 1836-47.
171. Sagoo, P., et al., Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*, 2010. 120(6): p. 1848-61.
172. Pallier, A., et al., Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int*, 2010. 78(5): p. 503-13.
173. Lozano, J.J., et al., Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *Am J Transplant*, 2011. 11(9): p. 1916-26.
174. Hilgendorf, I., et al., The lack of memory B cells including T cell independent IgM+ IgD+ memory B cells in chronic graft-versus host disease is associated with susceptibility to infection. *Transpl Int*, 2012. 25(1): p. 87-96.
175. Kuzmina, Z., et al., Significant differences in B-cell subpopulations characterize patients with chronic graft-versus-host disease-associated dysgammaglobulinemia. *Blood*, 2011. 117(7): p. 2265-74.

176. Manuel, O., et al., An assessment of donor-to-recipient transmission patterns of human cytomegalovirus by analysis of viral genomic variants. *J Infect Dis*, 2009. 199(11): p. 1621-8.
177. Gerna, G., et al., Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant*, 2011. 11(11): p. 2463-71.
178. Pipeling, M.R., et al., Primary cytomegalovirus phosphoprotein 65-specific CD8+ T-cell responses and T-bet levels predict immune control during early chronic infection in lung transplant recipients. *J Infect Dis*, 2011. 204(11): p. 1663-71.
179. Gratama, J.W., et al., Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp65-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008. 74(4): p. 211-20.
180. Kirchner, A., et al., Dissection of the CMV specific T-cell response is required for optimized cardiac transplant monitoring. *J Med Virol*, 2008. 80(9): p. 1604-14.
181. Egli, A., A. Humar, and D. Kumar, State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis*, 2012. 55(12): p. 1678-89.
182. Zhu, J., et al., Discordant cellular and humoral immune responses to cytomegalovirus infection in healthy blood donors: existence of a Th1-type dominant response. *Int Immunol*, 2001. 13(6): p. 785-90.
183. Bunk, S., et al., Chlamydia pneumoniae-induced memory CD4+ T-cell activation in human peripheral blood correlates with distinct antibody response patterns. *Clin Vaccine Immunol*, 2010. 17(5): p. 705-12.
184. Dasari, V., et al., Recombinant glycoprotein B vaccine formulation with Toll-like receptor 9 agonist and immune-stimulating complex induces specific immunity against multiple strains of cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 2011. 92(5): p. 1021-31.
185. Sabbaj, S., et al., Glycoprotein B vaccine is capable of boosting both antibody and CD4 T-cell responses to cytomegalovirus in chronically infected women. *J Infect Dis*, 2011. 203(11): p. 1534-41.
186. Sarmiento, E., et al., Hypogammaglobulinemia after heart transplantation: use of intravenous immunoglobulin replacement therapy in relapsing CMV disease. *Int Immunopharmacol*, 2005. 5(1): p. 97-101.
187. Yamani, M.H., et al., Hypogammaglobulinemia after heart transplantation: impact of preemptive use of immunoglobulin replacement (CytoGam) on infection and rejection outcomes. *Transpl Infect Dis*, 2001. 3 Suppl 2: p. 40-3.
188. Hammoud, B., et al., HCMV-specific T-cell Therapy: Do Not Forget Supply of Help. *J Immunother*, 2013. Jan 30. [Epub ahead of print].
189. Carbone, J., et al., The potential impact of substitutive therapy with intravenous immunoglobulin on the outcome of heart transplant recipients with infections. *Transplant Proc*, 2007. 39(7): p. 2385-8.

ANEXOS

Tabla 1. Análisis transversal de las diferencias inmunofenotípicas a diferentes tiempos post-TC entre pacientes y controles sanos (CS).

| Parámetro (%) | TC (n=42) | | Punto de estudio | CS (n=36) | | Valor p^* |
|-----------------|--------------|--------|------------------|--------------|--------|-------------|
| LB | 13.8 | ± 7.5 | 30d | | | 0.023 |
| | 7.1 | ± 3.2 | 180d | 10.3 | ± 4.1 | <0.001 |
| | 6.4 | ± 4.3 | 365d | | | <0.001 |
| LB virgen | 68.5 | ± 13.0 | 90d | 62.3 | ± 14.5 | 0.05 |
| LT | 76.7 | ± 6.1 | 90d | | | 0.028 |
| | 78.7 | ± 7.3 | 180d | 73.0 | ± 7.6 | 0.002 |
| | 77.6 | ± 9.0 | 365d | | | 0.031 |
| LT CD8 | 27.2 | ± 9.8 | 180d | 22.9 | ± 6.2 | 0.021 |
| LT CD8 virgen | 24.7 | ± 15.2 | 180d | 32.5 | ± 15.5 | 0.028 |
| | 22.7 | ± 14.7 | 365d | | | 0.012 |
| LT CD8 MCT | 10.3 | ± 4.9 | 365d | 14.7 | ± 8.3 | 0.010 |
| LT CD8 MET2 | 36.7 | ± 21.3 | 30d | | | 0.033 |
| | 35.6 | ± 17.4 | 90d | 28.0 | ± 12.4 | 0.030 |
| | 38.6 | ± 20.2 | 180d | | | 0.007 |
| | 42.5 | ± 18.6 | 365d | | | 0.001 |
| LT CD4CD25+ | 1.1 | ± 1.3 | 7d | | | <0.001 |
| | 1.2 | ± 1.2 | 30d | | | <0.001 |
| | 38.3 | ± 30.3 | 90d | 59.3 | ± 11.3 | <0.001 |
| | 68.1 | ± 12.1 | 180d | | | 0.001 |
| | 67.5 | ± 11.4 | 365d | | | 0.005 |
| LT CD8CD25+ | 1.1 | ± 1.0 | 7d | | | <0.001 |
| | 1.3 | ± 1.1 | 30d | 14.3 | ± 10.2 | <0.001 |
| | 9.3 | ± 9.1 | 90d | | | 0.025 |
| Reguladoras | 2.5 | ± 1.9 | 7d | | | <0.001 |
| | 2.4 | ± 1.8 | 30d | | | <0.001 |
| | 3.2 | ± 2.1 | 90d | 5.4 | ± 1.5 | <0.001 |
| | 3.9 | ± 1.4 | 180d | | | <0.001 |
| | 3.5 | ± 1.3 | 365d | | | <0.001 |
| LT CD4 activado | 5.0 | ± 4.4 | 90d | 3.3 | ± 1.9 | 0.035 |
| | 4.6 | ± 2.8 | 180d | | | 0.023 |
| LT CD8 activado | 28.0 | ± 17.4 | 30d | | | <0.001 |
| | 27.7 | ± 15.1 | 90d | 10.7 | ± 6.4 | <0.001 |
| | 26.8 | ± 12.2 | 180d | | | <0.001 |
| | 23.1 | ± 11.0 | 365d | | | <0.001 |

Media ± desviación estándar. Definiciones fenotípicas: LB=CD19+; LB virgen=CD19+CD27-; LT=CD3+; LT CD8=CD3+CD8+; LT virgen=CD45RA+CCR7+; LT memoria central (MCT)=CD45RA-CCR7+; LT memoria efectora 2 (MET2)=CD45RA+CCR7-; Reguladoras=CD4+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3+; LT CD4 o CD8 activado=HLADR+CD38+. Porcentajes de las diferentes subpoblaciones referidos al total de linfocitos, células B, T CD4 o T CD8, según el caso. *Diferencia estadísticamente significativa utilizando prueba t para muestras independientes. En el resto de parámetros no se observan diferencias significativas en cada punto de estudio.

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de pacientes TC según la presencia o no de complicaciones post-trasplante.

| Parámetro | Rechazo (n=11) | No Rechazo (n=31) | Valor <i>p</i> | Infección (n=22) | No Infección (n=20) | Valor <i>p</i> |
|------------------------------|-------------------|----------------------|----------------|---------------------|------------------------|----------------|
| Edad (años) | 57.3±6.3 | 54.1±12.1 | 0.37 | 57.7±7.6 | 52.6±12.7 | 0.11 |
| Sexo masculino | 64 | 68 | 0.50 | 59 | 75 | 0.54 |
| Peso (Kg) | 71±13 | 66±10 | 0.47 | 69±11 | 66±11 | 0.41 |
| Etiología isquémica | 72.7 | 40 | 0.08 | 63.6 | 33.3 | 0.08 |
| NYHA tipo IV | 49 | 73 | 0.29 | 59 | 75 | 0.35 |
| FEVI | 24±11 | 22±10 | 0.61 | 20±10 | 24±10 | 0.29 |
| Trasplante urgente | 30.7 | 27.2 | 0.54 | 45.4 | 12.5 | 0.021 |
| Fallo renal pre-TC | 7.7 | 21.2 | 0.41 | 18 | 16.7 | 0.59 |
| Infección pre-TC | 9.1 | 12.9 | 0.56 | 13.6 | 10 | 0.66 |
| Edad donante (años) | 36±13 | 37±12 | 0.79 | 37±14 | 36±10 | 0.69 |
| Peso donante (Kg) | 68±19 | 70±14 | 0.65 | 75±12 | 64±16 | 0.025 |
| Antígenos HLA compartidos | 1.3±1.49 | 1.41±0.84 | 0.78 | 1.41±1.27 | 1.35±0.81 | 0.86 |
| Tiempo de isquemia (min) | 223±61 | 233±63 | 0.65 | 248±62 | 213±57 | 0.053 |
| CEC (min) | 158±54 | 145±49 | 0.45 | 156±54 | 142±47 | 0.34 |
| Tiempo en UCI (días) | 16±16 | 15±18 | 0.98 | 18±15 | 12±18 | 0.31 |
| Disfunción del injerto | 30.8 | 24.2 | 0.72 | 31.8 | 20.8 | 0.51 |
| DM post-TC | 50 | 61 | 0.73 | 50 | 35 | 0.37 |
| Rechazo celular agudo | - | - | - | 27.3 | 29.2 | 0.90 |
| Infección temprana (<3meses) | 46.2 | 39.4 | 0.75 | - | - | - |
| Tacrolimus 7d (ng/mL) | 9.35±4.33 | 9.88±5.07 | 0.77 | 10.1±4.8 | 9.3±4.9 | 0.64 |
| Micofenolato 7d (µg/mL) | 4.05±4.08 | 2.59±3.22 | 0.29 | 3.5±3.8 | 2.7±3.3 | 0.53 |
| Tacrolimus 30d (ng/mL) | 13.6±5.26 | 11.7±4.05 | 0.25 | 11±3.02 | 13.5±5.3 | 0.07 |
| Micofenolato 30d (µg/mL) | 2.69±2.15 | 2.37±2.49 | 0.72 | 2.21±2.11 | 2.65±2.63 | 0.56 |
| HGG IgG 30d (<630mg/dL) | 80 | 41.2 | 0.05 | 71 | 30.4 | 0.015 |

Media ± desviación estándar. Datos categóricos en %. NYHA: New York Heart Association, FEVI: Fracción de eyección ventricular izquierda, TC: Trasplante cardíaco, CEC: Circulación Extra-Corpórea, DM: Diabetes Mellitus, UCI: Unidad de Cuidados Intensivos, HGG IgG: Hipogammaglobulinemia IgG. Diferencias estadísticas calculadas utilizando prueba *t* para muestras independientes o χ^2 .

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de pacientes TC CMV-seropositivos según la presencia o no de infección por CMV.

| Parámetro | Infección CMV (n=13) | Sin Infección CMV (n=25) | Valor <i>p</i> |
|--|-------------------------|-----------------------------|----------------|
| Edad (años) | 52.08 (29-63) | 52.96 (22-66) | 0.81 |
| Sexo masculino | 6 (46) | 19 (76) | 0.08 |
| Serología CMV D+/R+ | 6 (46) | 20 (80) | 0.09 |
| Etiología isquémica | 7 (54) | 9 (36) | 0.32 |
| NYHA tipo IV | 5 (39) | 9 (36) | 0.88 |
| Trasplante urgente | 4 (31) | 5 (20) | 0.69 |
| Fallo renal pre-TC | 2 (15) | 3 (12) | 0.93 |
| DM pre-TC | 3 (23) | 5 (20) | 0.97 |
| Dispositivo de asistencia ventricular pre-TC | 2 (15) | 3 (12) | 0.98 |
| Infección pre-TC | 1 (8) | 3 (12) | 0.96 |
| Edad donante (años) | 41.5 (17-60) | 33.8 (16-54) | 0.11 |
| Tiempo de intubación (horas) | 30.1±27.6 | 22.1±13.9 | 0.31 |
| Tiempo en UCI (días) | 20.1±23.1 | 11.7±10.7 | 0.24 |
| Tiempo de isquemia (min) | 226.5±60.4 | 222.2±50.8 | 0.83 |
| CEC (min) | 175.3±81.7 | 138.2±29.1 | 0.15 |
| FEVI | 23.7±13.4 | 23±9.1 | 0.86 |
| Fallo primario del injerto | 5 (39) | 5 (20) | 0.26 |
| Rechazo celular agudo ⁽¹⁾ | 2 (15) | 7 (28) | 0.46 |
| Nº Infecciones bacterianas o fúngicas ⁽²⁾ | 2±1.7 | 0.6±0.9 | 0.002 |
| Tacrolimus 30d (ng/mL) | 11.5±3.3 | 12.9±5.05 | 0.36 |
| Micofenolato 30d (µg/mL) | 1.56±1.23 | 2.68±2.04 | 0.26 |

Media ± desviación estándar (ó Rango según se indique). Datos categóricos en %. TC: Trasplante cardiaco, CMV: Citomegalovirus, NYHA:New York Heart Association, DM:Diabetes Mellitus, UCI:Unidad de Cuidados Intensivos, CEC:Circulación Extra-Corpórea, FEVI: Fracción de eyección ventricular izquierda. ⁽¹⁾Biopsias endomiocárdicas VD de grado 2 o mayor (ISHLT). ⁽²⁾Todos requirieron tratamiento endovenoso antimicrobiano específico. Diferencias estadísticas calculadas utilizando prueba *t* para muestras independientes o χ^2 .

PUBLICACIONES

El trabajo presentado en esta tesis ha sido divulgado en las siguientes publicaciones:

1. Lanio N., Sarmiento E., Gallego A., Calahorra L., Jaramillo M., Navarro J., Palomo J., Fernandez-Yañez J., Ruiz M., Fernandez-Cruz E., Carbone J. **Alterations of naïve and memory B cell subsets are associated with risk of rejection and infection in heart recipients.** *Transplant Int.* (En revisión, 2013).

Rejection and infection are relevant causes of mortality in heart recipients. We evaluated the kinetics of the maturation status of B lymphocytes and its relationship with acute cellular rejection and severe infection in heart recipients. We analysed B-cell subsets using 4-color flow cytometry in a prospective follow-up study of 46 heart recipients. Lymphocyte subsets were evaluated at specific times before and up to 1 year after transplantation. Higher percentages of pre-transplant class-switched memory B cells (CD19+CD27+IgM-IgD- >14%) were associated with a 74% decrease in the risk of severe infection (Cox regression relative hazard [RH] 0.26, 95% confidence interval [CI], 0.07-0.86; p=0.027). Patients with higher percentages of naïve B cells at day 7 after transplantation (CD19+CD27-IgM+IgD+ >58%) had a 91% decrease in the risk of developing acute cellular rejection (RH 0.09; 95% CI, 0.01-0.80; p=0.02). Patients with infections showed a strong negative correlation between baseline serum B cell-activating factor (BAFF) concentration and absolute counts of memory class-switched B-cells (R=-0.81, p=0.01). The evaluation of the immunophenotypic maturation status of B lymphocytes could prove to be a useful marker for identifying patients at risk of developing rejection or infection after heart transplantation.

2. Lanio N., Sarmiento E., Gallego A., Navarro J., Palomo J., Fernandez-Yañez J., Ruiz M., Fernandez-Cruz E., Carbone J. **Kinetics of functionally distinct T-lymphocyte subsets in heart transplant recipients after induction therapy with anti-CD25 monoclonal antibodies.** *Transpl Immunol.* (Aceptado, 2013).

T cells are involved in the maintenance of immunocompetence and in the development of alloimmune responses in solid organ transplant recipients. The kinetics of functionally distinct T-cell subsets in peripheral blood has received

little attention in the field of heart transplantation. We performed a simultaneous analysis of the maturation, activation, and regulatory profiles of T cells using 4-color flow cytometry in a study of 77 heart recipients. Induction therapy included 2 doses of anti-CD25 monoclonal antibodies (daclizumab). Lymphocyte subsets were prospectively evaluated at different times before and up to 1 year after transplantation in 46 heart recipients. A separate cross-sectional study was performed in 33 heart recipients who had received a transplant more than 1 year previously to evaluate abnormalities persisting in the long term. As compared with baseline values, a decrease in regulatory CD4⁺ T-cell percentages (CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}FoxP3⁺) was observed from day 7 to 12 months after transplantation. Interestingly, T cells expressing the beta chain of IL-2 (CD122⁺) remained stable during the first 3 months. A significant decrease in the activation status of CD4 T cells was documented from day 7 to 1 year after transplantation, while the activation status of CD8⁺ T cells remained stable during follow-up. Compared with values for healthy controls (n=36), higher CD8⁺ terminally differentiated effector memory percentages (CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁻) were observed from baseline up to more than 1 year after transplantation. Rejection was associated with higher levels of these cells during the first 6 months after transplant. We characterized the abnormalities in distinct functional T-cell subsets at different times before and after heart transplantation. Some of these abnormalities should be further investigated as biomarkers of clinical complications.

3. Carbone J., Lanio N., Gallego A., Kern F., Navarro J., Muñoz P., Alonso R., Catalán P., Fernandez-Yañez J., Palomo J., Ruiz M., Fernandez-Cruz E., Sarmiento E. **Simultaneous Monitoring of Cytomegalovirus-Specific Antibody and T-cell levels in Seropositive Heart Transplant Recipients.** *J Clin Immunol.* 2012; 32(4):809-19.
4. Lanio N., Sarmiento E., Gallego A., Fernandez-Yañez J., Palomo J., Pérez-Rojas J., Carbone J. **The potential role of T-cell memory distribution as predisposing factor for rejection in heart transplant recipients.** *Transplantation Proceedings.* 2009; 41(6): 2480-84.

Simultaneous Monitoring of Cytomegalovirus-Specific Antibody and T-cell levels in Seropositive Heart Transplant Recipients

Javier Carbone · Nallibe Lanio · Antonio Gallego · Florian Kern · Joaquin Navarro · Patricia Muñoz · Roberto Alonso · Pilar Catalán · Juan Fernández-Yáñez · Jesús Palomo · Manuel Ruiz · Eduardo Fernández-Cruz · Elizabeth Sarmiento

Received: 13 November 2011 / Accepted: 13 February 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract

Purpose Human cytomegalovirus (CMV) active infection (CMV infection) poses serious risks to CMV-seropositive heart transplant recipients. We evaluated the usefulness of simultaneous assessment of CMV-specific values for parameters of the humoral (antibodies) and cellular (CD4+ and CD8+ T-cells) immune responses in the identification of heart recipients at risk of developing CMV infection after transplantation.

J. Carbone (✉) · N. Lanio · A. Gallego · J. Navarro · E. Fernández-Cruz · E. Sarmiento
Transplant Immunology Group, Clinical Immunology Department, Gregorio Marañón Hospital, Dr Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain
e-mail: jcarbone.hugum@salud.madrid.org

F. Kern
Division of Medicine, Brighton and Sussex Medical School, Brighton, UK

F. Kern · E. Sarmiento
Institute of Medical Immunology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

P. Muñoz · R. Alonso · P. Catalán
Microbiology Department, Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain

J. Fernández-Yáñez · J. Palomo
Cardiology Department, Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain

M. Ruiz
Cardiovascular Surgery Department, Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain

Methods We prospectively studied 38 CMV-seropositive heart recipients. Anti-CMV antibody titers were assessed using enzyme-linked immunosorbent assays. CD4+ and CD8+ T-cell responses to overlapping peptide pools of the CMV proteins pp65 and immediate early protein-1 (IE1) were evaluated by flow cytometry. Immunological studies were performed before transplantation and at 30 days after transplantation. Patients with CMV infection were compared with heart recipients without CMV infection.

Results During the 6-month follow-up period, 13 (34.2%) patients developed CMV infection. At baseline, the mean anti-CMV-IgG antibody titer was lower in patients who developed CMV infection. This difference remained at 30 days after transplantation. One month after transplantation, the mean percentage of IE1-specific CD8+ T cells that are IFN γ -positive (CD8/IFN γ +IE1) was lower in CMV-infected patients. The predictive value of these variables at 30 days was increased when they were combined. Cox regression analysis revealed an association between the risk of developing CMV infection and the combination marker (low anti-CMV titer [$<16,100$] and low CD8/IFN γ +IE1 percentages [$<0.40\%$], relative hazard, 6.07; $p=0.019$). The combination marker remained significant after adjustment for clinical variables.

Conclusions This novel approach of a simultaneous assessment of specific anti-CMV antibody titers and CD8/IFN γ +IE1 percentages might help identify heart transplant recipients with an increased risk of developing CMV infection.

Keywords Anti-cytomegalovirus antibodies · CD8 specific T-cell response · cytomegalovirus · heart transplantation · infection · immune monitoring

Introduction

Active human cytomegalovirus (CMV) infection remains one of the major clinical complications in heart recipients [1]. High rates of viral replication may lead to CMV disease, whereas lower levels of CMV viremia have been associated with more chronic abnormalities such as an increased risk of rejection and graft dysfunction, opportunistic infections, malignancy, and other clinical complications [2]. Universal prophylaxis with ganciclovir was introduced as an effective option to prevent CMV infection. [3]. However, there is no consensus on the duration of prophylaxis or the ideal antiviral agent for long-term prophylaxis. In any case, the occurrence of subclinical CMV infection [4], late CMV disease after interruption of prophylaxis [5], and ganciclovir-resistant disease [6] highlights the need for new strategies. As CMV disease occurs only when specific immune responses are compromised, early evaluation of an individual's protective capacity could improve the accuracy of current monitoring [7]. Monitoring CMV-specific immunity in immunocompromised hosts could help identify high-risk patients and allow prophylaxis to be tailored to individual needs [8].

We previously demonstrated that serum IgG monitoring is useful for detecting patients at risk of severe infectious complications after heart transplantation [9] and that quantitative assessment of specific anti-CMV antibodies identifies patients at risk of CMV disease [10]. Several studies have shown a positive correlation between CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts and viral protection [11–15].

Most studies have focused on patients at a high risk (D⁺/R⁻) for primary CMV infection [16–18]; however, despite universal use of ganciclovir, CMV-seropositive recipients may experience CMV infection.

Here, we investigated whether simultaneous assessment of CMV-specific values for parameters of the humoral (antibodies) and cellular (CD4⁺ and CD8⁺ T-cells) immune responses could help identify CMV-seropositive heart recipients with a high risk of developing CMV infection after transplantation.

Material and Methods

Patients and Controls

We prospectively studied 38 CMV-seropositive heart recipients from March 2006 to October 2008. Patients who died during the first month after transplantation were not included. Each patient was followed up for 6 months after transplantation. Clinical and laboratory data were collected prospectively using a standardized questionnaire during scheduled check-ups after transplantation. All patients received immunosuppressive induction therapy with

methylprednisolone and 2 doses of daclizumab (humanized anti-IL2-R-alpha monoclonal antibody) (days 0 and 14). Maintenance triple therapy was started 48 h after transplantation and included a calcineurin inhibitor (tacrolimus [$n=35$], or cyclosporin [$n=3$]) depending on the side effects, with mycophenolate mofetil and prednisone.

Universal prophylaxis with intravenous (IV) ganciclovir or oral valganciclovir was administered. Prophylaxis also included cephazolin on the first day after transplantation, trimethoprim-sulphamethoxazole during the first year, nystatin during the first month, and norfloxacin during the first month. Itraconazole was indicated in patients with risk factors for invasive aspergillosis. None of the patients received intravenous immunoglobulin preparations before the 1-month assessment.

The investigators considered that it was important to take into account the potential effect of heart surgery on the immunological markers assessed. Therefore, a control group comprising 32 age-matched surgical patients (open heart surgery with extracorporeal circulation but no immunosuppression) was enrolled for cross-sectional comparison. The presurgery diagnoses of surgical controls were valvular heart disease ($n=27$; 85%), ischemic heart disease ($n=3$; 9%), and other conditions ($n=2$; 6%).

Definition of CMV Infection

In all heart recipients, CMV antigenemia testing was followed weekly from 2 to 4 weeks, every other week from 1 month to 3 months, and monthly from 3 months to 6 months after transplantation. Patients who had positive persistent detectable CMV antigenemia in whole blood samples (with 2 or more positive samples) during follow-up were considered to have active CMV infection. The first day of detection CMV antigenemia was considered to be the day of CMV infection. CMV infection was confirmed with viral DNA quantification using polymerase chain reaction (PCR [CMV viremia]). Quantification of CMV covered a range of 600 to 100,000 copies/mL.

Immunological Assessment Points

Immunological markers were evaluated at 2 points in heart recipients and surgical controls: baseline, when the patient was included on the transplantation or heart surgery waiting list and 1 month after transplantation or heart surgery.

Specific Anti-CMV Antibody Levels

Routine Screening for CMV IgG

Pretransplant screening for CMV IgG was performed with an automated system, the LIAISON CMV IgG assay

(DiaSorin, Saluggia, Italy), which uses chemiluminescent immunoassay technology for the quantitative determination of specific IgG antibodies to CMV.

Quantitative Studies of CMV IgG

Serum samples were divided into aliquots and stored at -70°C until further processing. Human CMV IgG was determined using a commercial indirect enzyme immunoassay (Enzygnost-CMV-IgG; Dade Behring, Marburg, Germany) according to the manufacturer's instructions. All samples were diluted 1:230 and incubated on a microtitration plate coated with inactivated antigen derived from human CMV-infected fibroblasts and simultaneously in wells coated with antigen from non-infected cells (control antigen). Optical density was measured using a SEAC Sirio S (RADIM) photometer at 450 nm and 620 nm within the first hour. Delta absorbances were calculated at different wavelengths and compared to those of the anti-CMV reference (human serum containing IgG antibodies to CMV antigens). For quantitative evaluation, measurements were corrected using the alpha-method (Excel data sheet provided by manufacturer). The results are given as virus-specific antibody titers [10].

A good correlation was found for anti-CMV antibody levels obtained with both methods ($r=0.722$, $p<0.001$) (Spearman Rho).

Specific Anti-CMV Cellular Immune Levels

Ex Vivo Interferon Gamma (IFN γ) Induction Assay

After isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from heparinized blood (Ficoll-Paque; Amersham Biosciences), PBMCs were washed twice in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium) and cultured in RPMI 1640 medium (Biochrome) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FCS (Biochrome), 2 mM L-glutamine (Biochrome), and 1% antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cells were incubated in bulk overnight for 16 h at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere in loosely covered Falcon 50-ml blue-cap conical tubes (BD Biosciences). Next day, 400 μL of the volume-adjusted cell suspension (2.5×10^6 cells/mL) was transferred to Falcon 15-mL conical polypropylene tubes (BD Biosciences). Immediately, 100 μL of RPMI/FCS medium containing the single CMV peptides IE1 or pp65 (4 μL of stock solutions) was added. At 2 h, 500 μL of RPMI/FCS medium containing 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of brefeldin A (BFA; Sigma-Aldrich) corresponding to 1 μL of BFA stock solution (10 mg/mL) was added. The final concentrations of each peptide and BFA were 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Unstimulated control samples were run in parallel (4

μL of pure DMSO instead of peptide stock solution). At 6 h, cells were washed with 3 mL of ice-cold PBS (430 g for 8 min at 4°C), and carefully vortexed for 30 s. Cells were then fixed with 1 mL of paraformaldehyde 4% for 10 min in the dark at room temperature and then washed with 3 mL of PBS containing 0.5% bovine serum albumin (wash buffer). The supernatant was removed and tubes were blotted dry. The pellets were resuspended in 500 μL of FACS-Perm Solution (BD Biosciences) for permeabilization, incubated for 20 min in the dark at room temperature, washed as before, resuspended, stained with monoclonal antibodies (80 μL total volume at 4°C for 30 min in the dark), and washed once more before acquisition. The procedure corresponds to that described by Bunde T. et al [11].

Monoclonal Antibodies and Peptides

The monoclonal antibodies used were as follows: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-IFN γ , phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD38, peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated anti-CD3, and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD8. All were purchased from Becton Dickinson (San Jose, California, USA).

Standard 15-amino acid peptides (11 overlaps) spanning the CMV IE-1 and pp65 proteins (Jerini Ag PepmixTM, Nr 301002 and 200902, respectively) were provided by Dr Florian Kern (Institut für Medizinische Immunologie der Charité, Berlin, Germany). Stock solutions (8 or 80 mg/mL in DMSO) were stored at -80°C .

Flow Cytometry

Cells were analyzed on a Becton Dickinson FACSCalibur[®] interfaced with an Apple PowerMac using Cellquest Pro software. The acquisition of at least 50,000 events within a CD3+ lymphocyte gate was required for the analysis to be valid. CD3+/CD8+ or CD3+/CD8- (used as surrogates for CD4 T cells) were displayed in a CD38 versus IFN γ dot plot for data analysis, and subsets of positive cells were expressed as a percentage of the respective reference population (Fig. 1). Positive events in the corresponding regions of unstimulated samples (DMSO) were used as negative controls. The background signal of DMSO was subtracted to obtain the frequencies of specific IE1 IFN γ -positive cells (Fig. 2). Percentages of CMV IE-1 and pp65-specific CD4+ and CD8+ T cells that are IFN γ -positive are presented as CD8 or CD4/IFN γ +IE1 or pp65.

Other Immunological Markers

We also aimed to analyze the specificity of the predictive value of the evaluated markers. For this purpose, we analyzed other humoral and cellular immunity markers and their

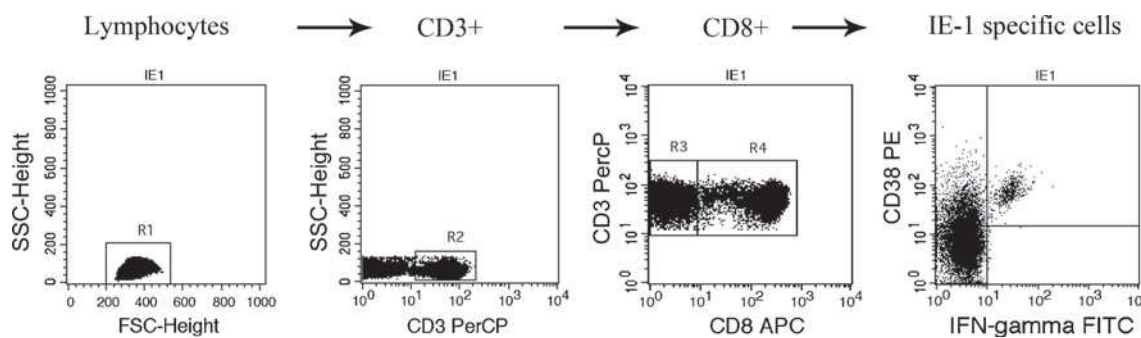


Fig. 1 Gating strategy for 4-color cytometric detection of the total specific CD3+CD8+/IFNg+IE1 cell pool. Lymphocytes were gated based on forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC) (R1). CD3+ T lymphocytes were gated by fluorescence intensity of CD3 versus SSC

(R2). CD3+/CD8+ or CD3+/CD8– (used as surrogates for CD4 T cells) were gated by fluorescence intensity of CD8 versus CD3 (R4). The percentage of IFNg-positive cells was displayed in a CD38 versus IFNg dot plot from R4

relation to CMV-specific parameters. Serum IFNg concentration was quantified by ELISA (Human high sensitivity IFNg ELISA Kit Diaclone SAS, France). Immunoglobulin levels and IgG subclasses were determined using nephelometry. Total CD3, CD4, CD8, NK, and B lymphocyte percentages, as well as activated CD4 and CD8 T-cell percentages, were determined by flow cytometry. These markers are studied on a routine basis in our hospital. We also tested serum samples for the concentration of specific IgG antibodies against other

viruses including anti-varicella zoster (ELISA, Binding Site, Birmingham, United Kingdom) and anti-hepatitis B surface antigen (ELISA, Ortho-Clinical Diagnostics, United Kingdom). Finally, we used 4-color flow cytometry to measure the proliferative response of peripheral CD3+, CD4+, and CD8+ T cells to phytohemagglutinin mitogen (PHA) using the fluorescent dye 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) in a subgroup of 12 heart recipients.

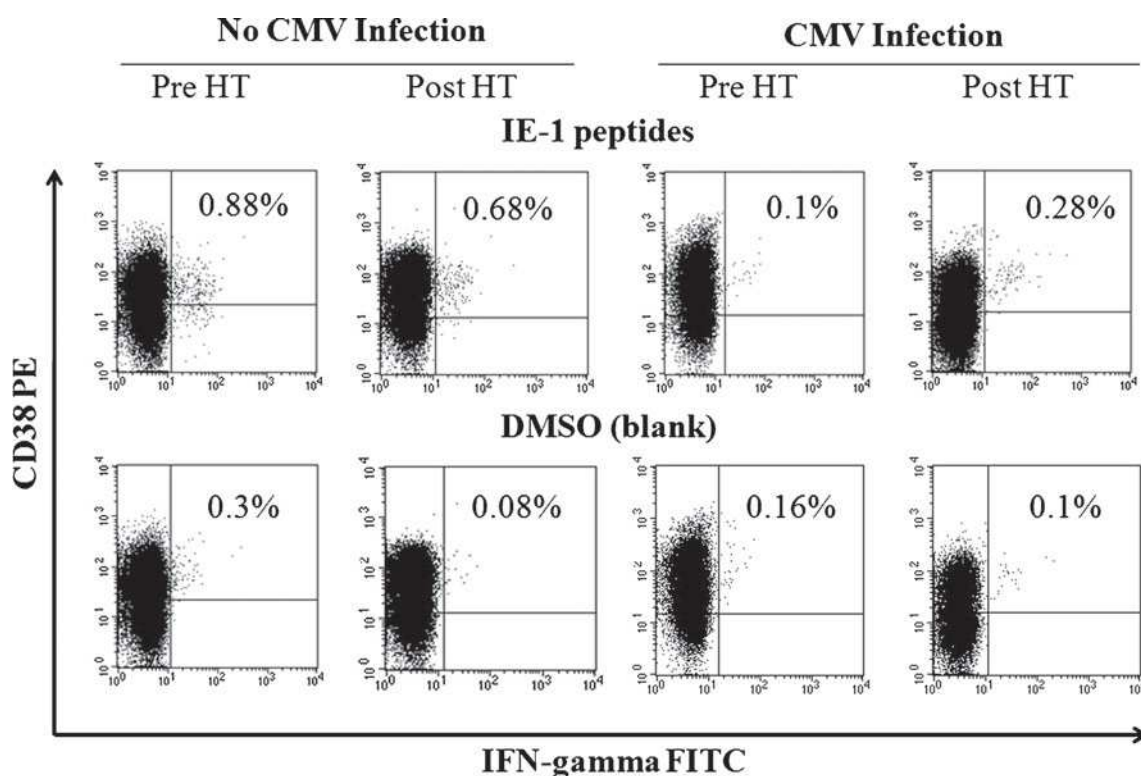


Fig. 2 Higher CD8/IFNg+IE1 percentages at one month after transplantation in a patient without CMV infection than in a heart recipient who developed CMV infection during follow-up. Control (DMSO)

represents nonspecific stimulated cells compared with specific stimulated cells (IE-1 peptides) and has to be subtracted to obtain the specific CD8/IFNg+ percentage

Statistical Analysis

Statistically significant differences between qualitative variables were calculated using the chi-square test. Differences between quantitative variables were determined using the Mann–Whitney test or *t* test as indicated. Overall differences between more than 3 groups were assessed using an analysis of variance. Significant differences were identified using the post hoc least significant difference test. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to identify cut-off levels of selected parameters. Time-to-event analyses were conducted using the Kaplan–Meier and Cox regression methods. The presence of CMV infection was considered an event. Time was calculated from the performance of the immunological test to the first demonstration of CMV infection in peripheral blood or to the end of follow-up. The log-rank test was performed to analyze the equality of progression curves. Correlations were assessed using Spearman's rho or Pearson Tests as indicated. *p* values less than or equal to 0.05 were considered statistically different. All analyses were performed using SPSS 16.0 statistical software for Windows (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, Illinois, USA).

The study protocol fulfilled the ethical requirements of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by our local research ethics committee. All patients provided their written informed consent.

Results

Clinical Data

During the 6-month follow-up period, 13 patients (34.2%) developed CMV infection. The mean value of CMV antigenemia was 15 (range, 1–90) cells. The mean value of CMV viremia was 14,313 (range 6,180–16,800) copies/mL. The mean time until development of CMV infection was 3.2 ± 1.4 months after transplantation (interval, 1.6–5 months). All episodes of CMV infection occurred after the post-transplant immunological study. Preemptive anti-CMV therapy was administered in 5 patients who were found to have more than 30 cells in the CMV antigenemia determination (IV ganciclovir [$n=3$], oral valganciclovir [$n=2$]). CMV disease was diagnosed in 3 patients (pulmonary [$n=1$], hematologic [$n=1$], gastrointestinal [$n=1$]). Patients who had developed CMV infection had a significantly higher prevalence of bacterial or fungal infections requiring specific intravenous antimicrobial therapy during the 6 months of follow-up (Table I). These infections were documented before and after CMV infection and were more virulent in CMV-infected recipients (8 out of 10 cases of aspergillosis, 3 out of 3 multiresistant *Acinetobacter*

baumannii infections, 4 out of 8 *Pseudomonas aeruginosa* infections and 5 out of 11 *Candida* infections). During follow-up, 1 of the 3 patients who developed varicella zoster infection was CMV-infected. There were no cases of hepatitis B during follow-up.

Time Course of CMV-specific Antibody and Cellular Levels

The mean time from baseline to post-transplant evaluation was similar in heart recipients with and without CMV infection. When we compared baseline with 30-day post-transplant values, patients with CMV infection disclosed a nonsignificant decrease in anti-CMV titers ($14,462 \pm 11,047$ vs $8,877 \pm 8,280$, $p=0.17$) and a significant decrease in the percentage of CD8/IFN γ +IE1 cells (0.40 ± 0.29 vs 0.17 ± 0.15 , $p=0.035$). There was no decrease in the percentage of CD8/IFN γ +IE1 cells in non-CMV-infected patients (0.41 ± 0.45 vs 0.53 ± 0.64 , $p=0.50$). A nonsignificant decrease in anti-CMV titers was also observed in these patients ($24,926 \pm 17,013$ vs $18,061 \pm 15,193$, $p=0.16$). Interestingly, the anti-CMV titer and the percentage of CD8/IFN γ +IE1 cells remained constant in the surgical controls.

Association Between Immunological Markers and Development of CMV Infection

Table I summarizes the patients' clinical data. There were no significant differences in the clinical parameters monitored. At baseline, the anti-CMV IgG titer was significantly lower in patients who later developed CMV infection. This difference between these groups remained statistically significant at 30 days after transplantation (Table II). Before transplantation, specific anti-CMV CD4 and CD8 T-cell percentages were similar in both groups. One-month after transplantation, the mean percentages of CD8/IFN γ +IE1 CMV T cells was lower in CMV-infected patients. The values for other humoral and cellular immunity parameters analyzed to assess specificity of the abnormalities encountered within the tested humoral and cellular specific anti-CMV markers were similar in both groups (Table III). Lymphoproliferative responses against nonspecific stimuli evaluated in a small subgroup of patients at 1 month after transplantation (CMV-infected $n=6$, non-CMV-infected $n=6$) disclosed similar results in both groups (Fig. 3).

Taking into account the differences observed in the comparison of means analysis, ROC analysis was performed to set levels at which a response above or below indicated a decreased or increased risk of CMV infection, respectively. Patients were split into 2 groups according to the 30-day post-transplant values of CMV IgG titer and CD8/IFN γ +IE1 percentages. Thresholds were established at 16,100 for CMV-IgG titer (sensitivity, 92%; specificity, 48%)

Table I Clinical characteristics of 38 heart recipients with and without CMV infection

| Parameter | Patients with CMV infection | Patients without CMV infection | p value |
|--|-----------------------------|--------------------------------|---------|
| Number of patients | 13 | 25 | |
| Age, years (range) | 52.08 (29–63) | 52.96 (22–66) | 0.81 |
| Male gender (%) | 6 (46.1) | 19 (76) | 0.084 |
| D+/R+serostatus (%) | 6 (46.1) | 20 (80) | 0.09 |
| Etiology (ischemic, %) | 7 (53.8) | 9 (36) | 0.32 |
| NYHA class IV (%) | 5 (38.5) | 9 (36) | 0.88 |
| Urgent transplant (%) | 4 (30.8) | 5 (20) | 0.69 |
| Pretransplant renal dysfunction (%) | 2 (15.4) | 3 (12) | 0.93 |
| Pretransplant treated diabetes (%) | 3 (23.1) | 5 (20) | 0.97 |
| Pretransplant left ventricular assist device (%) | 2 (15.4) | 3 (12) | 0.98 |
| Pretransplant infection (%) | 1 (7.7) | 3 (12) | 0.96 |
| Donor age, years (range) | 41.5 (17–60) | 33.8 (16–54) | 0.11 |
| Intubation time in hours | 30.1 (27.6) | 22.1 (13.9) | 0.31 |
| Time in intensive care unit, days | 20.1 (23.1) | 11.7(10.7) | 0.24 |
| Ischemia time, minutes | 226.5 (60.4) | 222.2 (50.8) | 0.83 |
| Extracorporeal circulation, minutes | 175.3 (81.7) | 138.2 (29.1) | 0.15 |
| LVEF | 23.7 (13.4) | 23 (9.1) | 0.86 |
| Primary allograft failure (%) | 5 (38.5) | 5 (20) | 0.26 |
| Acute Cellular Rejection (%) | 2 (15.4) | 7 (28) | 0.46 |
| Number of bacterial or fungal infections | 2 (1.7) | 0.6 (0.9) | 0.002 |
| Tacrolimus levels at day 30, ng/mL | 11.5 (3.3) | 12.9 (5.05) | 0.36 |
| Mycophenolate levels at day 30, ug/mL | 1.56 (1.23) | 2.68 (2.04) | 0.26 |

Results are expressed as the mean (standard deviation) unless otherwise indicated. Statistically significant differences were calculated using the chi-squared (Fisher exact) test and the *t* test. Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; NYHA, New York Heart Association; LVEF, left ventricular ejection fraction. Acute cellular rejection was defined as an ISHLT grade 1R or greater by protocolized endomyocardial biopsies. Bacterial and fungal infections were defined as infections requiring specific intravenous antimicrobial therapy during the 6 months of follow-up

and 0.40 for IE1 CD8/IFN γ +percentages (sensitivity, 92%; specificity, 42%).

A survival analysis was performed. Lower CD8/IFN γ +IE1 percentages and anti-CMV titers were associated with development of CMV infection (log rank, 4.17 [$p=0.04$] and 5.21 [$p=0.02$], respectively). Among the 25 heart recipients with anti-CMV antibody titers lower than 16,100, the 1-, 2-, and 3-month rates of development of CMV infection were

8%, 24%, and 28%, respectively, compared with 0%, 8%, and 8% for the 13 patients with higher concentrations of anti-CMV antibodies (>16,100) (Fig. 4).

We then evaluated whether the combination of markers was more suitable for detecting patients at risk of CMV infection. Results from the cross-table analysis are shown in Table IV. The significance value of testing each of the selected variables independently was improved when the

Table II Immunological parameters in heart recipients according to the presence or absence of CMV infection

| | Pre-heart transplant | | | Post-heart transplant (day 30) | | |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------|----------------------------------|-------------------------------|---------|
| | No CMV infection <i>n</i> =25 | CMV infection <i>n</i> =13 | p Value | No CMV infection <i>n</i> =25 | CMV infection <i>n</i> =13 | p Value |
| % CD4/IFN γ +IE1 | 0.08±0.02 | 0.05±0.06 | 0.74 | 0.15±0.46 | 0.08±0.18 | 0.63 |
| % CD8/IFN γ +IE1 | 0.41±0.45 | 0.40±0.29 | 0.97 | 0.53±0.64 | 0.17±0.15 | 0.013 |
| % CD4/IFN γ +pp65 | 0.13±0.10 | 0.13±0.08 | 0.72 | 0.13±0.14 | 0.19±0.23 | 0.31 |
| % CD8/IFN γ +pp65 | 0.80±0.86 | 1.01±1.01 | 0.94 | 0.75±0.76 | 1.05±1.03 | 0.32 |
| Anti-CMV IgG titers | 24,926±17,013 | 14,462±11,048 | 0.045 | 18,061±15,193 | 8,877±8,281 | 0.021 |

Values are expressed as the mean±standard deviation. Means were compared using a 2-tailed *t* test or Mann–Whitney test as indicated. CD4+ and CD8+ IFN γ -producing lymphocytes are expressed as a percentage of total CD4+ or CD8+ lymphocytes after antigenic stimuli

Table III Other immunological parameters in heart recipients according to the presence or absence of CMV infection

| | Pre-heart transplant | | | Post-heart transplant (day 30) | | |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------|---------|--------------------------------|-----------------------|---------|
| | No CMV infection n=25 | CMV infection n=13 | p Value | No CMV infection n=25 | CMV infection n=13 | p Value |
| IgG (mg/dL) | 1,137±444 | 1,168±386 | 0.86 | 707±333 | 673±194 | 0.69 |
| IgG1 (mg/dL) | 700±292 | 850±372 | 0.29 | 413±119 | 476±241 | 0.29 |
| IgG3 (mg/dL) | 59±40 | 51±27 | 0.80 | 29±14 | 31±19 | 0.80 |
| Anti-varicella (mIU/mL) | 730±131 | 643±237 | 0.29 | 615±269 | 652±213 | 0.69 |
| Anti-HBsAg (IU/mL) | 4.28±7.81 | 8.5±20.8 | 0.52 | 25.2±33.3 | 38±48.8 | 0.45 |
| IFN-gamma (pg/mL) | 3.42±6.45 | 5.21±9.80 | 0.64 | 2.33±3.74 | 1.44±2.64 | 0.25 |
| % CD3+ T cells | 75±7 | 71±6 | 0.12 | 75±9 | 71±9 | 0.29 |
| % CD4+ T cells | 51±11 | 47±8 | 0.30 | 51±14 | 48±10 | 0.49 |
| % CD4+CD38+DR+ | 7.12±4.57 | 6.60±4.67 | 0.81 | 4.92±4.97 | 5.42±4.72 | 0.77 |
| % CD8+T cells | 24±8 | 23±11 | 0.91 | 24±10 | 22±5 | 0.69 |
| % CD8+CD38+DR+ | 24.68±11.25 | 25.32±19.30 | 0.92 | 23.72±13.92 | 21.96±19.62 | 0.76 |
| % CD19+ B cells | 14±7 | 15±7 | 0.71 | 15±7 | 19±7 | 0.18 |
| % NK cells | 10±7 | 12±8 | 0.31 | 7±5 | 9±5 | 0.44 |

Values are expressed as the mean±standard deviation. Means were compared using a 2-tailed *t* test or Mann–Whitney test as indicated. IgG, serum immunoglobulin G. NK, natural killer cells (CD16+/CD56+CD3-). Anti-HBsAg, anti hepatitis B surface antigen antibodies. IFN-gamma: serum concentration of interferon-gamma

CMV IgG titer was combined with the CD8/IFNγ+IE1 percentage. The combination marker (lower CMV IgG titer and lower CD8/IFNγ+IE1 percentages 1 month after transplantation) was present in 85% (11/13) of CMV-infected patients and in only 36% (9/25) of the non-CMV-infected patients (Fig. 5). Cox regression analysis revealed an association between the risk of developing CMV infection and the combination marker (relative hazard [RH] 6.07; 95%

confidence interval, 1.34–27.48, *p*=0.019). This association remained significant after adjustment for distinct clinical variables in the multivariate analysis. RH and *p* values remained unchanged after adjustment for recipient sex (RH, 6.07; *p*=0.019), CMV serological status of donor (RH, 6.07; *p*=0.019), donor age (RH, 7.13; *p*=0.011), intubation time (RH, 11.7; *p*=0.02), time in the intensive care unit (RH, 7.04; *p*=0.011), and extracorporeal circulation time (RH, 7.39; *p*=0.010). These variables disclosed a trend

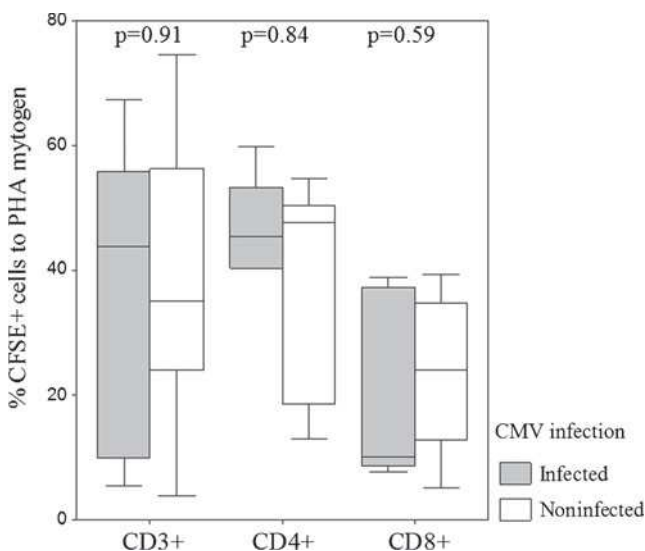


Fig. 3 Percentages of CD3+, CD8+, and CD4+ CFSE proliferating subsets to PHA at 1 month after transplantation were evaluated by gating on CD3+ T-cells and measuring sequentially proliferating CD8+ and CD4+ subsets within the CD3+ subset

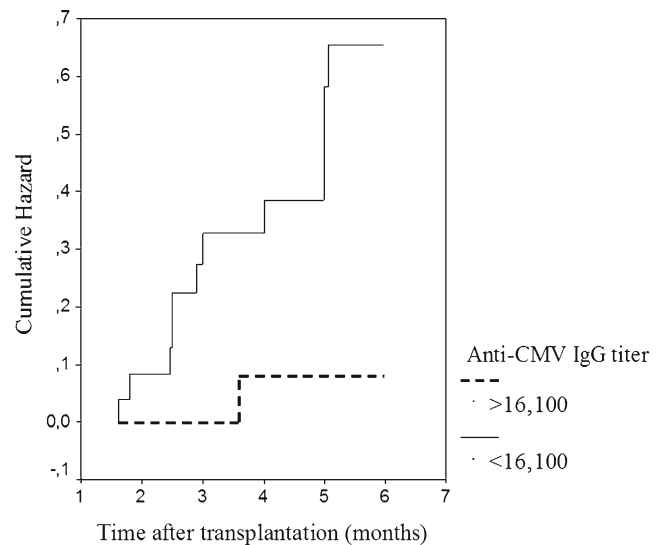


Fig. 4 Kaplan-Meier curves for the development of CMV infection in heart recipients stratified by specific anti-CMV titers at 1 month after transplantation

Table IV Association between immunological markers and development of CMV infection 1 month after transplant

| Immunological marker | Chi-square | p Value | SN | SP | PPV | NPV | LRP |
|---|------------|---------|----|------|-----|------|------|
| % CD8/IFN γ +IE1 <0.40% ^a | 4.66 | 0.033 | 92 | 44 | 46 | 92 | 1.6 |
| Anti-CMV IgG titers <16,100 ^a | 6.17 | 0.015 | 92 | 48 | 48 | 92 | 1.76 |
| Combination marker ^b | 8.108 | 0.006 | 85 | 66.6 | 55 | 88.8 | 2.5 |

^a Cut-off value obtained in ROC analysis

^b Combination marker: Anti-CMV titers <16,100 and CD8/IFN γ +IE1 cells <0.40%

SN sensitivity; SP specificity; PPV positive predictive value; NPV negative predictive value, LRP likelihood ratio positive

towards an association with development of CMV infection (Table II).

Correlation Between Immunological Markers

At baseline and 30 days after transplantation, there was no correlation between specific anti-CMV humoral and cellular parameters in patients with CMV infection. After transplantation, non-CMV-infected recipients displayed a weak positive correlation between CD8/IFN γ +IE1 cell percentages and anti-CMV IgG titers ($r=0.43$; $p=0.038$).

We found no significant correlations in either group between anti-CMV titers and CD8/IFN γ +IE1 percentages and other humoral and cellular immunity markers included to assess the specificity of the association between these markers and development of CMV infection (serum IFN γ concentration, total IgG concentration, IgG subclass concentration, and percentages of T, B, and NK cells, as well as activated CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets).

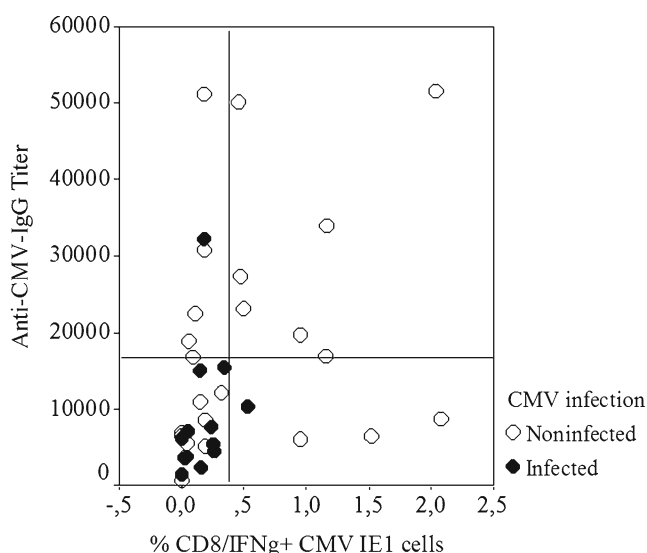


Fig. 5 Simultaneous assessment of CMV-IgG titer and IE-1 at 1 month after transplantation enables more accurate prediction of CMV infection

Correlation with Immunosuppressive Drug Levels

We found no significant correlations at 1 month after transplantation between anti-CMV titers, CD8/IFN γ +IE1 percentages, and immunosuppressive drug levels.

Comparison with Surgical Controls

At baseline, CMV-infected patients disclosed levels of anti-CMV antibodies and anti-CMV specific lymphocyte subsets similar to those of surgical controls. Interestingly non-CMV-infected recipients had a significantly higher mean titer of anti-CMV antibodies than controls ($24,926\pm 17,013$ vs $10,317\pm 10,179$, $p=0.001$). At 30 days after transplantation, CD8/IFN γ +IE1 percentages were significantly lower in CMV-infected patients than in controls (0.17 ± 0.15 vs 0.53 ± 0.71 , $p=0.018$). By contrast, non-infected patients had higher concentrations of anti-CMV antibodies than controls ($18,061\pm 15,193$ vs $10,558\pm 9,379$, $p=0.031$) and similar percentages of CD8/IFN γ +IE1 T cells.

Discussion

Our results show that lower CMV-specific values for parameters of the humoral (antibodies) and cellular (CD4⁺ and CD8⁺ T-cells) immune responses could be a predisposing factor for CMV infection. Even if the combination of both parameters had low specificity, it might help to identify a subgroup of heart recipients susceptible to developing CMV infection. CMV infection developed almost exclusively in patients in whom low anti-CMV antibody titers overlapped with a diminished response of CD8/IFN γ +IE1-specific T cells. If these data are confirmed in larger samples, the potential role of the combined evaluation in making clinical decisions about the prevention of CMV infection should be studied.

At a time when heart recipients are given universal prophylaxis or preemptive therapy guided only by serologic status and monitoring of CMV viremia, immunologic assays may make it possible to tailor prophylaxis, thus optimizing exposure to drugs and reducing the likelihood of toxicity.

Posttransplant immunological evaluation would enable clinicians to select seropositive candidates for long-term anti-CMV prophylaxis (rather than prescribe universal prolonged anti-CMV prophylaxis) and to identify an immunological cutoff for risk of CMV infection. This would make it possible to start anti-CMV prophylaxis in the absence of positive CMV viremia tests. Further investigation is necessary to determine whether these post-transplant immunological markers could indicate when to stop antiviral prophylaxis once a protective level is reached [19].

Since it is unlikely that any single marker could account for the overall risk of CMV infection, immune-monitoring strategies might also focus on specific immune profiles, rather than on the measurement of isolated immune monitoring markers. The simultaneous evaluation of distinct patterns of antibody and T-cell responses might also prove useful in the study of immune responses to other microorganisms [20].

Our results might also serve as a basis for the hypothesis that a prophylactic protocol that is able to elicit both humoral and cellular CMV-specific immune responses might be more effective in protecting individuals from CMV infection [21, 22]. A beneficial effect of prophylactic CMV immunoglobulin on total survival and prevention of CMV-associated death in solid organ recipients has been reported [23]. Adoptive transfer of virus-specific T cells has the potential to accelerate reconstitution of CMV-specific immunity [24].

Previous studies highlight the concept that CMV responses have to be explored simultaneously using different approaches. As far as the cellular immune response is concerned, there is no consensus on the best strategy for monitoring the risk of CMV infection or disease. Several groups have studied the CD8-mediated response after stimulation with the CMV peptides IE1 and pp65 in solid organ recipients [8, 11, 12, 17, 25]. Others suggest that a decrease in CMV-reactive CD4 T-cell percentages precedes clinical symptoms [14, 26] or even that both CD4 and CD8 T cells could be useful for monitoring patients after transplantation [27]. Kirchner et al presented results on the T-cell responses to pp65 and IE1, and showed the complexity of individual responses in terms of breadth, dominance, and recognized epitopes [28]. In our cohort, heart recipients who later developed CMV infection disclosed lower percentages of anti-CMV CD4/IFN γ +IE1 and CD8/IFN γ +IE1 T cells at 30 days, while at the same time, CD4+ and CD8+ responses to pp65 tended to be higher. In addition, we failed to identify a cut-off for CD8/IFN γ +pp65, CD4/IFN γ +IE1, and CD4/IFN γ +pp65 T-cell percentages that were associated with a risk of CMV infection (data not shown). As far as the humoral immune response is concerned, previous studies have focused mainly on Th1 responses, excluding from their analysis the potential effect of a protective Th2 pattern. It has been suggested that some patients who are exposed to CMV could fail to develop cellular immunity, but do in fact

develop an antibody response, and vice versa [29]. The observation that humoral and cellular anti-CMV responses may be divergent in healthy donors has been suggested [29] and could explain the lack of correlation or weak correlation between specific cellular responses and CMV IgG titer observed in our cohort of seropositive patients. Such discordance is an additional factor to be considered when analyzing total (cellular and humoral) protective capacity.

We also found that the kinetics of the humoral and cellular anti-CMV specific antibody responses might be relevant. Assessment before and after transplantation could help to determine the loss (or not) of intensity in specific responses. In our study, a significant decrease in CD8/IFN γ +IE1 percentages up to 1 month after transplantation was only observed in seropositive heart recipients who later developed CMV infection. Interestingly, heart surgery might not have a relevant effect on this lymphocyte population as suggested by our observations in the surgical controls.

Individual baseline characteristics might also have been associated with protection from CMV infection. In our study, the mean baseline titer of anti-CMV antibodies was higher in the group of patients who did not develop CMV infection after transplantation than in CMV-infected patients and controls. Seronegative recipients are usually considered to have a high risk of developing CMV disease, even though prevalence in terms of absolute numbers of cases of CMV disease is greater in D+/R+ recipients. Manuel et al [30] showed that seropositive recipients presented transmission or reactivation of multiple CMV strains from the donor or from reactivation of a recipient's own strains. These authors also observed that, in transplant recipients with CMV disease, mixed glycoprotein-B genotype CMV infections are frequent (49% of patients with CMV disease) and that this was associated with higher viral loads and delayed viral clearance, irrespective of CMV serostatus at baseline and other factors. Consequently, seropositivity does not necessarily confer a specific CMV advantage or protection against severe CMV infection (after immunosuppressive therapy) [30, 31]. Further studies are necessary to determine whether protection from CMV infection might depend on baseline immunological status (e.g. anti-CMV antibody titer in seropositive recipients).

As low anti-CMV antibody levels and hyporesponse of CD8/IFN γ +IE1 T cells might merely reflect a compromised immune response, we tested other immune markers to assess the specificity of these abnormalities and found that they seem to be specifically associated with the risk of developing CMV infection. Serum IFN γ , total IgG, IgG1, and IgG3 concentrations, which are associated with control of viral infections, were similar in both groups. In addition, the titers of antibodies against other viruses were indistinguishable in CMV-infected and non-CMV-infected heart recipients. On the other hand, we found no significant differences in the distribution of total T, B, and NK cell subsets in either

group. In addition, the lack of correlations between these markers and the routine markers of humoral and cellular immunity we assessed might also indicate that these abnormalities reflect a distinct functional deficit that made these patients more susceptible to CMV infection. Finally, post-transplant nonspecific lymphocyte proliferative responses evaluated in a subgroup of patients were similar in CMV-infected and non-CMV-infected patients.

In our study, the frequency of acute cellular rejection was lower in CMV-infected patients, although this difference was not significant. The relationship between specific CD4+ and CD8+ anti-CMV responses and acute cellular rejection remains undefined. A higher CMV-specific CD4 T-cell immune response in the first month after heart transplantation has been associated with a protective rather than a deleterious effect on cardiac allograft rejection [32]. Studies performed in kidney recipients found an association between higher specific anti-CMV T-cell responses and a lower prevalence of cellular rejection [33]. On the other hand, it has been suggested that virus-specific memory T cells cross-react with allogeneic HLA molecules [34] and that CMV infection induces CD8+ cytotoxic responses, thus leading to acute rejection [35]. We did not find a significant association between specific CD4+ or CD8+ anti-CMV responses and development of acute cellular rejection (data not shown).

Our study is limited by the small size of the cohort. Nevertheless, the immunological parameters assessed were the only variables associated with the risk of CMV infection that affected more than 30% of the cohort. Evaluation of distinct clinical and routine immunological markers failed to reveal an association with the risk of CMV infection. The low frequency of patients with CMV disease we observed prevented us from assessing the risk for developing this complication. This may be due to the universal anti-CMV prophylaxis regimen or the introduction of preemptive therapy. Another limitation of our study is that we did not analyze neutralizing anti-CMV titer for fibroblasts or for epithelial cells. Lack of antibodies against the antigen domain 2 epitope of CMV glycoprotein B is associated with CMV disease after renal transplantation [36]. On the other hand, multifunctional CMV-specific CD4 and CD8 T-cell responses should be evaluated. Further evaluation of both humoral and cellular anti-CMV specific responses is anticipated in the search for immune profiles associated with risk of CMV infection in solid organ recipients.

Acknowledgments We thank members of the Department of Immunology, cardiologists and nursing staff of the Cardiology and Cardiovascular Surgery for their continued support and to the patients for their generous collaboration. N del Pozo performed ELISA tests for specific anti-varicella antibodies. L Valor performed the substudy of lymphoproliferative responses to PHA. M Jaramillo performed ELISA tests for serum IFN γ concentration J Romero contributed to the graphic design and Thomas O'Boyle proofread the manuscript.

Funding Sources This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (projects numbers 05/0839, 08/1430), and Grifols Internacional, Barcelona, Spain awarded to Javier Carbone. Elizabeth Sarmiento had a grant from the ERA-EDTA Fellowship Programme administrated by the European Molecular Biology Organization.

Conflict of interest statement None of the authors have a financial or proprietary interest in the subject matter or materials discussed, including, but not limited to, employment, consultancies, stock ownership, honoraria, and paid expert testimony.

References

- Gurgui M, Munoz P. Infection in heart transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(9):587–97.
- Pérez-Sola MJ, Castón JJ, Solana R, Rivero A, Torre-Cisneros J. Indirect effects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(1):38–47.
- Avery RK. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection and disease in heart transplant recipients. *Curr Opin Cardiol*. 1998;13(2):122–9.
- Potena L, Holweg CT, Vana ML, et al. Frequent occult infection with Cytomegalovirus in cardiac transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1804–10.
- Kijpittayarit-Arthurs S, Eid AJ, Kremers WK, et al. Clinical features and outcomes of delayed-onset primary cytomegalovirus disease in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(10):1019–24.
- Li F, Kenyon KW, Kirby KA, et al. Incidence and clinical features of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease in heart transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2007;45(4):439–47.
- Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol*. 2008;41(3):237–41.
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2010;89(7):779–95.
- Sarmiento E, Rodríguez-Molina JJ, Fernández-Yañez J, et al. IgG monitoring to identify the risk for development of infection in heart transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2006;8(1):49–53.
- Sarmiento E, Lanio N, Gallego A, et al. Immune monitoring of anti cytomegalovirus antibodies and risk of cytomegalovirus disease in heart transplantation. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(6):649–52.
- Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med*. 2005;201(7):1031–6.
- Sester U, Gärtner BC, Wilkens H, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005;5(6):1483–9.
- Gerna G, Lilleri D, Fornara C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6(10):2356–64.
- Egli A, Binet I, Binggeli S, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med*. 2008;6:29.
- Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, et al. Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8(5):990–9.
- Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a

- critical role for IFN-gamma-producing CD4⁺ T cells in protection against CMV disease. *Blood*. 2003;101(7):2686–92.
17. La Rosa C, Limaye AP, Krishnan A, Longmate J, Diamond DJ. Longitudinal assessment of cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses in liver transplant recipients at high risk for late CMV disease. *J Infect Dis*. 2007;195(5):633–44.
 18. Opelz G, Döhler B, Ruhstroth A. Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant*. 2004;4(6):928–36.
 19. Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, et al. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant*. 2011;11(11):2463–71.
 20. Bunk S, Schaffert H, Schmid B, et al. Chlamydia pneumoniae-induced memory CD4⁺ T-cell activation in human peripheral blood correlates with distinct antibody response patterns. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(5):705–12.
 21. Dasari V, Smith C, Zhong J, Scott G, Rawlinson W, Khanna R. Recombinant glycoprotein B vaccine formulation with Toll-like receptor 9 agonist and immune-stimulating complex induces specific immunity against multiple strains of cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 2011;92:1021–31.
 22. Sabbaj S, Pass RF, Goepfert PA, Pichon S. Glycoprotein B vaccine is capable of boosting both antibody and CD4 T-cell responses to cytomegalovirus in chronically infected women. *J Infect Dis*. 2011;203(11):1534–41.
 23. Bonaros N, Mayer B, Schachner T, et al. CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: a meta-analysis. *Clin Transplant*. 2008;22:89–97.
 24. Peggs KS, Thomson K, Samuel E, et al. Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2011;52:49–57.
 25. Engstrand M, Lidehall AK, Totterman TH, Herrman B, Eriksson BM, Korsgren O. Cellular responses to cytomegalovirus in immunosuppressed patients: circulating CD8⁺ T cells recognizing CMVpp 65 are present but display functional impairment. *Clin Exp Immunol*. 2003;132(1):96–104.
 26. Sester M, Sester U, Gärtner B, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*. 2001;71(9):1287–94.
 27. Gratama JW, Brooimans RA, van der Holt B, et al. Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp 65-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(4):211–20.
 28. Kichner A, Hoffmeister B, Cherepnev-G G, et al. Dissection of the CMV specific T-cell response is required for optimized cardiac transplant monitoring. *J Med Virol*. 2008;80(9):1604–14.
 29. Zhu J, Shearer GM, Marincola FM, et al. Discordant cellular and humoral immune responses to cytomegalovirus infection in healthy blood donors: existence of a Th1-type dominant response. *Int Immunol*. 2001;13(6):785–90.
 30. Manuel O, Pang XL, Humar A, et al. An assessment of donor-to-recipient transmission patterns of human cytomegalovirus by analysis of viral genomic variants. *J Infect Dis*. 2009;199(11):1621–28.
 31. Manuel O, Asberg A, Pang X, et al. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin Infect Dis*. 2009;49(8):1160–6.
 32. Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, et al. T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation*. 2006;114(15):1608–15.
 33. Nickel P, Bold G, Presber F, et al. High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol*. 2009;20(4):238–42.
 34. Amir AL, D'Orsogna LJ, Roelen DL, et al. Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood*. 2010;115(15):3146–57.
 35. Ouwehand AJ, Balk AH, Baan CC, Vaessen LM, Jutte NH, Bos E, Claas FH, Weimar W, et al. Cytomegalovirus infection and allo-specific cytotoxic activity of graft-infiltrating cells after heart transplantation. *J Med Virol*. 1994;42(2):175–81.
 36. Ishibashi K, Tokumoto T, Shirakawa H, et al. Lack of antibodies against the antigen domain 2 epitope of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B is associated with CMV disease after renal transplantation in recipients having the same glycoprotein H serotypes as their donors. *Transpl Infect Dis*. 2011;13(3):318–23.



The Potential Role of T-Cell Memory Distribution as Predisposing Factor for Rejection in Heart Transplant Recipients

N. Lanio, E. Sarmiento, A. Gallego, J. Fernández-Yáñez, J. Palomo, J. Pérez-Rojas, and J. Carbone

ABSTRACT

CD4 T cells play a significant role in the pathogenesis of rejection, providing help to alloreactive CD8 and B cells, however, the exact contribution of each memory compartment in vivo has not been defined. They are also important for the maintenance of tolerance due to regulatory activity of specialized subsets. In this study, we assessed changes in frequencies of functionally distinct lymphocyte subsets of peripheral blood (PBLs) in 26 heart transplant recipients (HT) in association with rejection episodes. Patients who developed rejection ($n = 7$), namely Grade 3B ($n = 1$), 3A ($n = 4$), or 2 ($n = 2$), in comparison with those with stable graft function displayed at baseline (pre-HT) higher percentages of naive (CCR7+CD45RA+) CD4 T cells (median 48 vs 36.6%; $P = .035$) and lower percentages of central memory (CCR7+CD45RA-) CD4 T cells (33.3 vs 46.5%; $P = .035$). At 30 days post-HT, CD4/CD127^{low}FoxP3+ T cells were significantly reduced among patients with rejection episodes (0.84 vs 2.15%; $P = .042$). CD8 final effector T cells were increased at 90 days post-HT among those patients who experienced rejection (TEM2: 60.8 vs 31.9%; $P < .1$), at the expense of shrinking CD8 central memory compartment (TCM: 8.6 vs 12.9%; $P = .046$). The potential role of T-cell memory distribution should be further evaluated in HT patients as possible markers to discriminate patients at risk for rejection.

REJECTION episodes are one of the major complications after solid organ transplantation, despite improved induction and maintenance therapies. Although mechanisms underlying allograft rejection remain to be fully elucidated, CD4 T lymphocytes are known to be crucial for the pathogenesis, not only by stimulating differentiation/activation of cytotoxic CD8 T cells,¹ but also by causing direct lysis of graft cells through inflammatory functions and complement activation.^{2,3} The critical role of memory T cells in rejection has been demonstrated in animal models,⁴ but their possible function has been less investigated in human patients. All individuals possess a high precursor frequency of T cells that exhibit alloreactivity^{5,6} and generation of allo-specific memory depends on direct exposure to alloantigen after the transplantation. The present study assessed whether immune monitoring of the distribution of memory T cells could be useful to identify patients at greater risk of rejection episodes.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Healthy Donors

This prospective study performed at a single center enrolled 26 heart transplantation patients for 1 year follow-up. Their median

age was 59 ± 9 years (range, 34–68); there were 7 women and 19 men. The incidence of rejection episodes between the HT date and September 2008 (mean time of clinical follow-up, 109 ± 121 days) was registered together with measurements at pre-HT, 7 days, 30 days, 90 days, 180 days, and 365 days after HT. The etiology requiring transplantation was ischemic cardiopathy ($n = 13$), dilated cardiomyopathy ($n = 8$), valvular heart disease ($n = 4$), or other causes ($n = 1$). Maintenance immunosuppressive treatment included tacrolimus ($n = 25$) or cyclosporine ($n = 1$) plus mycophenolate mofetil and prednisone. For induction therapy we used a 2-dose regimen of daclizumab 1 mg/kg (days 0–14). Prophylaxis of infections was performed with cephazolin

From the Clinical Immunology Unit (N.L., E.S., A.G., J.C.), Cardiology Department (J.F.-Y., J.P.), Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, and Clinical Immunology Unit (J.P.-R.), Hospital Nacional Guillermo Almenara Irgoyen, Lima, Perú.

Supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (FIS 05/0839). The authors declare no competing financial interest.

Address reprint requests to Dr. Javier Carbone, Clinical Immunology Unit, Immunology Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Doctor Esquerdo 46, Madrid, Spain. CP: 28007. E-mail: carbone@teleline.es

trimethoprim-sulfamethoxazole, nystatin and either itraconazole or fluconazole (if indicated), and gancyclovir. Cytomegalovirus (CMV) hyperimmune globulin was indicated in high-risk HT patients (D+/R-). Preoperative immunizations included anti-pneumococcal and anti-hepatitis B (if indicated). Serial endomyocardial biopsy specimens were obtained using right cardiac catheterization at various times after HT. During the first year after HT rejection events were described based on right ventricular endomyocardial biopsy specimens as grade 2 (ISHLT) or greater. Over the follow-up period, 7/26 patients (27%) had at least 1 acute rejection episode at a mean time after HT of 3.6 months (range, 1–8). The distribution of rejections was as follows: Grade 3B (n = 1); 3A (n = 4), and 2 (n = 2).

As a control group we enrolled 26 age- and gender-matched healthy controls (HC) of median age 51 ± 6 years (range, 44–62) including 3 women and 23 men.

The study protocol was conducted according to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and approved by our hospital research ethics committee. Informed consent was obtained from all subjects.

Cell Surface and Intracellular Staining

Blood samples were collected into tubes containing ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) for cell surface staining using various combinations of fluorochromes conjugated to monoclonal antibodies (MoAbs). Briefly, 100 μL whole blood (WB) added to mixtures of directly conjugated MoAbs at saturating concentrations was incubated for 20 minutes at room temperature. Then, erythrocytes were lysed by addition of 2 mL lysis

buffer (Facslysing solution, Becton Dickinson, San Jose, Calif, United States) for 15 minutes prior to washing twice with phosphate buffered saline PBS before acquisition. To avoid antibody staining, inhibition of membrane immunoglobulin (Ig)M by pentameric IgM from serum, WB was washed to remove it before surface staining.

For intracellular staining of FoxP3 cells were fixed with 1 mL paraformaldehyde (4%) for 10 minutes in the dark prior to washing with 3 mL PBS containing 0.5% bovine serum albumin. The supernatant was removed and the tubes were blotted dry. Permeabilization was performed with 500 μL of FACS-Perm Solution (BD Biosciences) incubated for 20 minutes in the dark at room temperature followed by washing, and staining with the corresponding monoclonal antibody at 4°C for 30 minutes in the dark. Finally, cells were washed once more before acquisition.

MoAbs

To determine lymphocyte subsets we used the following MoAbs: fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-CD27, CD45RA, HLA-DR, CD56, and CD127 (eBioscience Inc., San Diego, Calif, United States; phycoerythrin (PE) conjugated anti-IgD, CCR7 (R&D Systems Inc., Minneapolis, Minn, United States), CD38, CD25, and CD16; peridinin chlorophyll protein (PerCP) conjugated anti-CD19, CD4, and CD3; and allophycocyanin (APC) conjugated anti-IgM, CD8, CD19, and FoxP3 (eBioscience Inc.). IgG1 and IgG2a isotypes were used as controls (all, but detailed exceptions were obtained from Becton Dickinson).

Table 1. Baseline Relative Numbers of Different Lymphocyte Subsets From HT Patients With/Without Acute Rejection Episodes and HC Reference Values

| | R (n = 7) | SGF (n = 19) | HC (n = 26) | P Value (R vs SGF) |
|---------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------------|
| % CD 19+ | 4.29 ± 1.1 | 6.33 ± 6.7 | 9.6 ± 3.9 | .248 |
| % B Naive | 71.25 ± 22 | 52.02 ± 19 | 58.93 ± 17 | .340 |
| % B Memory nonswitched | 7.71 ± 8.6 | 8.61 ± 10 | 17.29 ± 11 | .402 |
| % B Memory class-switched | 12.30 ± 11 | 14.56 ± 10 | 15.74 ± 9.1 | .583 |
| % NK (CD3-CD56+CD16+) | 10.02 ± 1.7 | 11.10 ± 9.4 | 10.50 ± 5.6 | .665 |
| CD4:CD8 ratio | 2.57 ± 2 | 2.13 ± 1.4 | 1.9 ± 0.8 | .435 |
| % CD4+ | 47.71 ± 10 | 42.42 ± 12 | 46.91 ± 8.2 | .285 |
| % CD4 naive | 48.04 ± 13 | 36.56 ± 16 | 32.70 ± 15 | .035* |
| % CD4 TCM | 33.32 ± 14 | 46.54 ± 11 | 48.13 ± 13 | .035* |
| % CD4 TEM1 | 8.60 ± 7.9 | 15.83 ± 9.7 | 12.99 ± 8.6 | .157 |
| % CD4 TEM2 | 2.34 ± 2.4 | 1.02 ± 4.3 | 0.67 ± 2.9 | .370 |
| % CD8+ | 17.22 ± 12 | 20.70 ± 10 | 24.08 ± 6.5 | .665 |
| % CD8 naive | 20.65 ± 9.8 | 18.73 ± 14 | 30.97 ± 15 | .402 |
| % CD8 TCM | 7.27 ± 7.9 | 11.11 ± 10 | 14.97 ± 8.1 | .260 |
| % CD8 TEM1 | 20.66 ± 7.7 | 23.30 ± 16 | 22.94 ± 12 | .665 |
| % CD8 TEM2 | 50.10 ± 19 | 38.48 ± 22 | 29.31 ± 12 | .506 |
| % CD4/DR+CD38+ | 6.51 ± 2.8 | 6.87 ± 4.8 | 2.94 ± 2.1 | .712 |
| % CD4/CD25+ | 60.76 ± 9.4 | 65.42 ± 11 | 61.19 ± 11 | .795 |
| % CD8/DR+CD38+ | 20.22 ± 11 | 25.01 ± 18 | 10.40 ± 6.8 | .658 |
| % CD4 regulatory cells | 7.47 ± 4 | 6.17 ± 7 | 5.00 ± 1.5 | .637 |
| % Monocytes | 6.59 ± 3 | 5.76 ± 2.6 | 5.06 ± 1.3 | .610 |
| % Monocytes/DR+ | 86.94 ± 5.5 | 92.82 ± 19 | 91.90 ± 6.9 | .308 |

Abbreviations: R, rejection; SGF, stable graft function.

Note: Median Values ± SD. B, T, and NK lymphocyte are expressed as percentage of total PBLs; B subsets as percentages of CD19+; T subsets as percentages of CD4+ and CD8+. Phenotypic definitions on M&M (flow cytometric analysis).

*Statically significant difference using Mann-Whitney U test.

Flow Cytometric Analysis

Acquisition and analysis were performed on FACSCalibur (Becton Dickinson) using Macintosh CellQuest Pro software. For optimal analysis we acquired a minimum of 20,000 events within a lymphocyte or monocyte light-scatter gate. Naive B cells were established as CD19+/CD27-IgM+IgD+; nonswitched memory as CD19+/CD27+IgM+IgD+ and class-switched memory were established as CD19+/CD27+IgM-IgD-. For the T-cell maturation profile CD4 and CD8 subsets were analyzed on the basis of CD45RA and CCR7 expression. RA+CCR7+ characterized naive T cells; RA-CCR7+ T central memory (TCM); RA-CCR7-T effector memory (TEM1); and RA+CCR7- comprises final effector cells (TEM2). HLA-DR, CD38, and CD25 were assessed as activation markers. Regulatory cells were evaluated as CD4/CD25^{high}CD127^{low}FoxP3+. Because induction therapy made us unable to identify this subset due to transient blockade

of CD25 during the first 3 months, regulatory cells were identified by CD127^{low}FoxP3+ phenotype.

Statistical Analysis

Because most values were not normally distributed (Shapiro-Wilk test) statistical comparisons among different groups (rejection vs normal graft function) were performed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test. $P < .05$ was considered to be significant. All analyses were performed using SPSS 16.0 statistical software for Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill, United States).

RESULTS

To assess possible changes in PBL subsets, we evaluated a cohort of 26 HT patients before and after the transplantation. The protocol included the distribution of B-

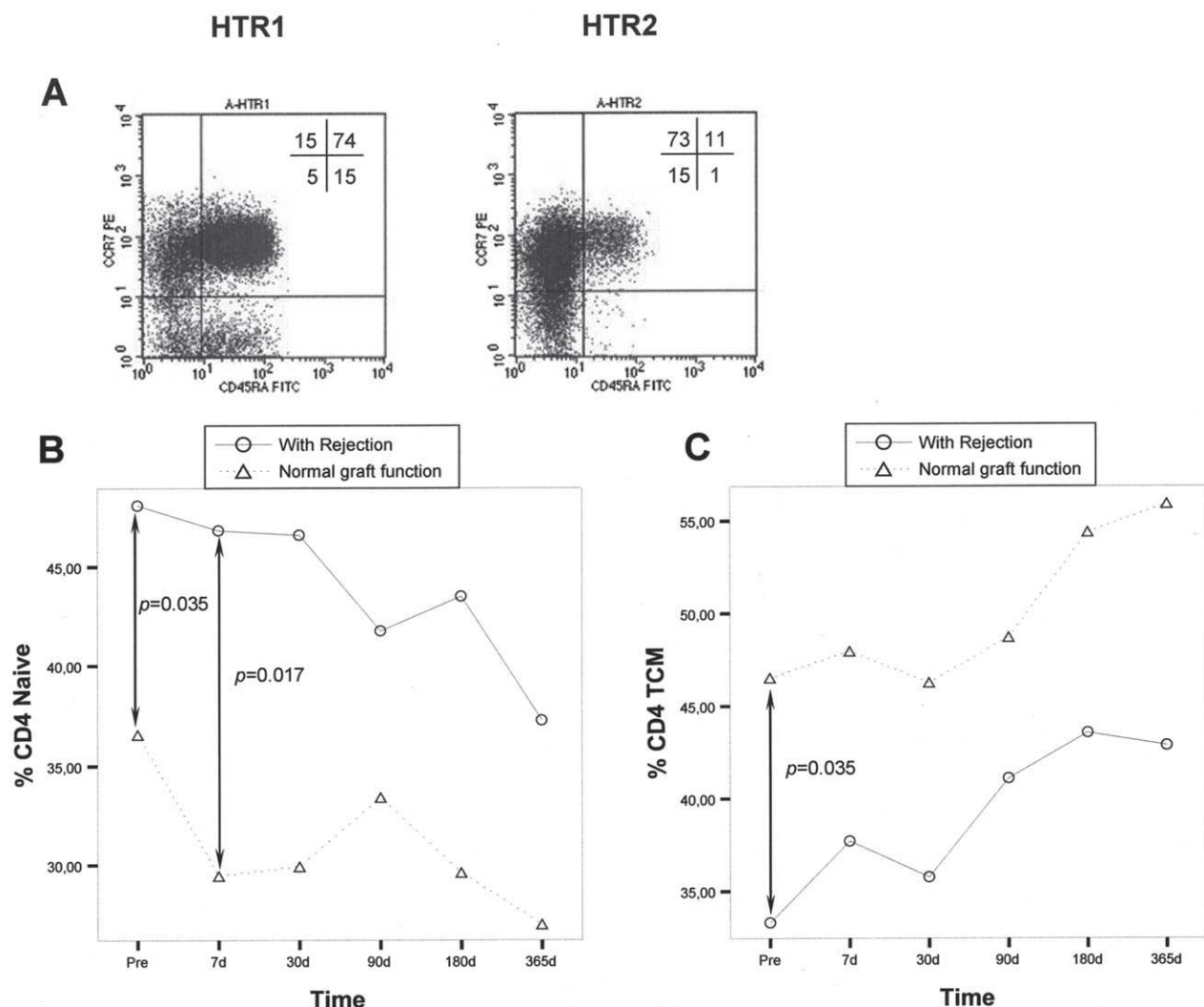


Fig 1. (A) Dot plots from 2 representative HT patients, with rejection (HTR1) and stable graft function (HTR2) showing CD4 T-cell memory profile at baseline. Relative frequencies of each quadrant are indicated. Line graphs show longitudinal assessment of CD4 naive (B) and CD4 TCM (C) subsets, for 1-year follow-up. Solid lines represent median values for positive rejection patients and broken lines represent median values for stable graft function patients. Nonparametric Mann-Whitney *U* test was performed.

and T-cell memory as well as regulatory CD4 cells, and activation markers on T lymphocytes and monocytes. Table 1 shows the frequencies of various subsets before HT among patients who developed rejection after HT compared with those subjects with normal graft function. We have also indicated HC reference values. In general, both groups displayed similar frequencies of analyzed subsets. Only the distribution of memory CD4 T cells displayed differential behavior among rejecting patients, with greater percentages of the naive subset and subsequently lower central memory frequencies. These differences remained statistically significant at 7 days for CD4 naive (median, 46.8 vs 29.5%; $P = .013$), but not for the CD4 TCM subset (Fig 1).

In prospective follow-up studies, at 30 days patients with rejection episodes showed a significant decrease in CD127^{low}FoxP3 frequencies (median, 0.84 vs 2.15; $P = .042$). Also, CD8 memory subsets revealed a distinct distribution between patients with allograft dysfunction versus those with stable function. At 90 days post-HT rejecting patients displayed increased levels of CD8 final effector T cells (median, 60.8 vs 31.9; $P < .1$) and a low percentage of CD8 central memory elements (median 8.6 vs 12.9; $P = .046$; Fig 2).

DISCUSSION

It has been proposed that frequency of circulating alloreactive memory T cells correlates with allograft rejection in

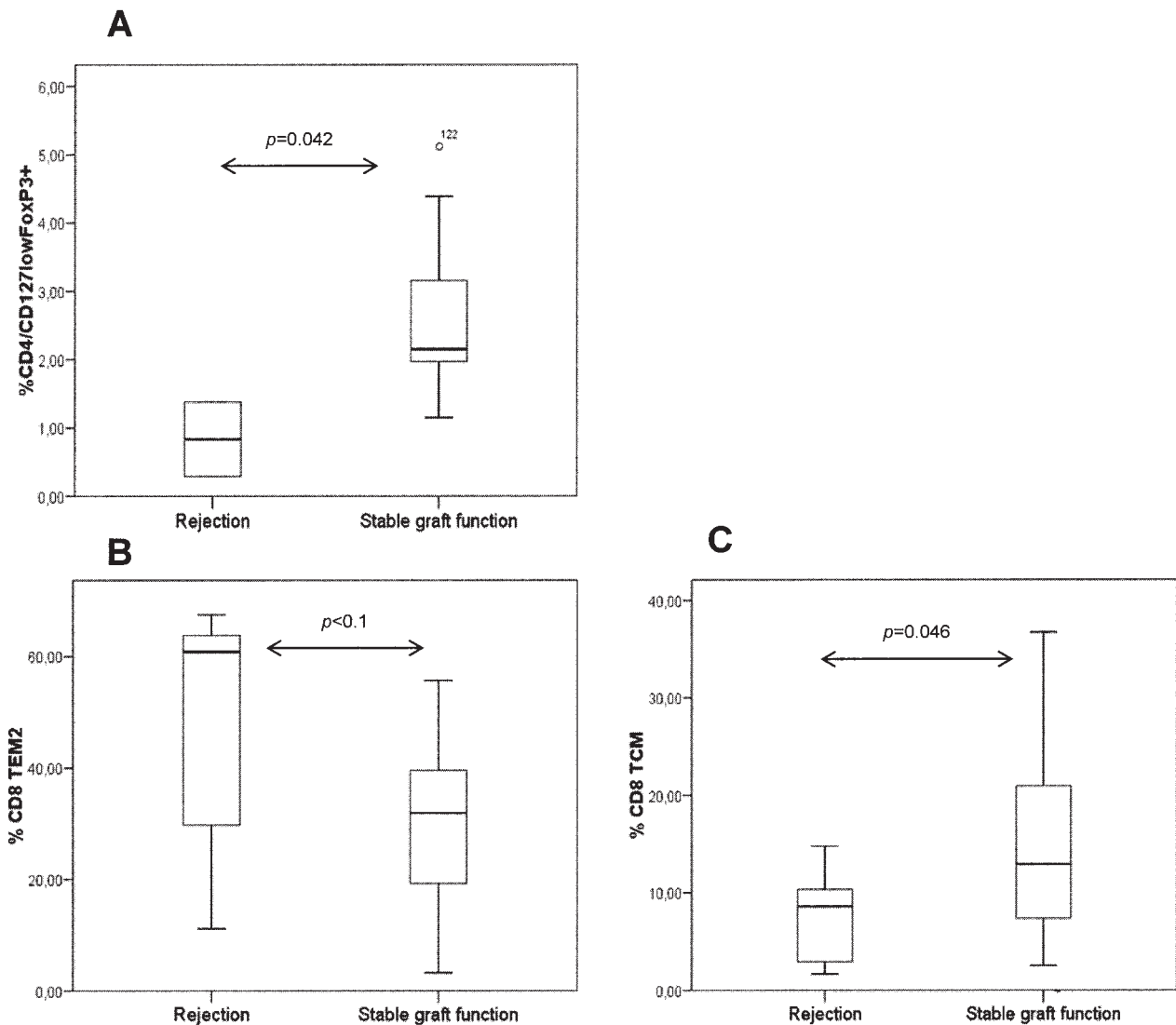


Fig 2. Frequencies of specific subsets in HT patients with allograft rejection and stable graft function. **(A)** Regulatory T cells at 30 days post-HT; **(B)** CD8 final effector cells (TEM2 CD45RA⁺CCR7⁻); and **(C)** CD8 central memory cells (TCM CD45RA⁻CCR7⁺) at 90 days post-HT. Box plots show median, 25th, and 75th percentiles, and extreme values. Nonparametric Mann-Whitney U test was performed.

animal models,^{4,7} but the exact contribution of each memory compartment *in vivo* is unknown. In the human solid organ setting, naive/memory distribution is altered due to antigenic stimulation by graft alloantigens and immunosuppressant treatment. Some authors have proposed that enhanced CD4 T-cell differentiation from a central memory to an effector memory phenotype identified stemcell transplant recipients at higher risk to develop graft-versus-host disease.^{8,9} In our cohort we observed that patients who at the baseline disclosed a distinct memory profile, characterized by higher frequencies of CD4 naive T cells, developed rejection episodes after HT. Memory T cells specific for alloantigen are generated after naive cells are exposed to the implanted graft. Because all patients included in this study were transplanted *de novo*, one may expect that alloantigen-memory generation is favored by increasing naive circulation in the periphery. Once the graft is recognized, and specific alloantigen-memory repertoire is generated, the presence of increased percentages of CD8 cytotoxic final effector cells (TEM2) could raise cellular rejecting functions. In this regard, recent findings in murine skin graft models have shown that either CD8 TCM or TEM can mediate allograft rejection, but TEM cells have an advantage over TCM in immune surveillance of peripheral tissues.¹⁰

CD25 high expression characterizes a subset of CD4 regulatory T cells (Tregs) that are considered to be essential mediators of peripheral tolerance in transplant settings. Some studies have shown a positive correlation between Treg function and allograft survival.¹¹⁻¹³ The expression of FoxP3 on graft infiltrating cells has also been associated with donor-specific hyporesponsiveness, and less severe chronic changes on kidney transplant biopsy specimens,¹⁴ Daclizumab, a humanized MoAb directed against the α -chain of interleukin-2 (IL-2) receptor (CD25) has shown efficacy to prevent acute rejection episodes after solid organ transplantation.¹⁵ Some authors have report that anti-CD25 MoAb injection results in functional inactivation, not depletion, of regulatory cells.^{16,17} Although CD25 levels are normally undetectable for the first 90 days after HT, the presence of CD4/FoxP3+ cells resemble regulatory functions of classic Tregs as demonstrated by others workers.^{18,19} Furthermore, CD127 low expression also identifies a cell subset with highly suppressive functions.²⁰ In agreement with previous studies, we also demonstrated decreased frequencies of the regulatory CD4/CD127^{low}Foxp3+ subset at 30 days among patients who developed rejection episodes. These data indicated that the presence of a circulating Treg subset, even after daclizumab treatment, may be important for the induction and maintenance of allograft acceptance. Additional studies are needed to investigate the potential impact of altered distribution of naive, memory, effector, and regulatory T cells for the outcome of HT patients.

REFERENCES

- Hall BM: Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 51:1141, 1991
- Nozaki T, et al: CD4 T cell-mediated rejection of cardiac allografts in B cell-deficient mice. *J Immunol* 181:5257, 2008
- Krieger NR, Yin DP, Fathman CG: CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. *J Exp Med* 184:2013, 1996
- Zhang Q, Chen Y, Fairchild RL, et al: Lymphoid sequestration of alloreactive memory CD4 T cells promotes cardiac allograft survival. *J Immunol* 176:770, 2006
- Bingaman AW, Farber DL: Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am J Transplant* 4:846, 2004
- Wang XN, Proctor SJ, Dickinson AM: Frequency analysis of recipient-reactive helper and cytotoxic T lymphocyte precursors using a combined single limiting dilution assay. *Transpl Immunol* 4:247, 1996
- Shiao SL, Kirkiles-Smith NC, Shepherd BR, et al: Human effector memory CD4+ T cells directly recognize allogeneic endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 179:4397, 2007
- Yamashita K, Choi U, Woltz PC, et al: Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4(+) effector memory cells relative to central memory cells. *Blood* 103:3986, 2004
- Fukunaga A, Ishikawa T, Kishihata M, et al: Altered homeostasis of CD4(+) memory T cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: chronic graft-versus-host disease enhances T cell differentiation and exhausts central memory T cell pool. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:1176, 2007
- Oberbarnscheidt MH, Ng YH, Chalan G: The roles of CD8 central and effector memory T-cell subsets in allograft rejection. *Am J Transplant* 8:1809, 2008
- Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, et al: Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 12:277, 2006
- Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, et al: Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 77:762, 2004
- Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, et al: Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*, 14:1643, 2003
- Bestard O, Cruzado JM, Mestre M, et al: Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J Immunol* 179:4901, 2007
- Vincenti F, Kirkman R, Light S, et al: Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N Engl J Med* 338:161, 1998
- Kohm AP, McMahon JS, Podojil JR, et al: Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 176:3301, 2006
- Kreijveld E, Koenen HJ, Klasen IS, et al: Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+CD25+ regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 7:249, 2007
- Toso C, Edgar R, Pawlick R, et al: Effect of different induction strategies on effector, regulatory and memory lymphocyte sub-populations in clinical islet transplantation. *Transpl Int* 22:182, 2009
- Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER, et al: Anti-CD25 treatment and FOXP3-positive regulatory T cells in heart transplantation. *Transpl Immunol* 18:13, 2007
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al: CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701, 2006

OTRAS PUBLICACIONES

Otras publicaciones relacionadas

1. Sarmiento E., Lanio N., Gallego A., Rodríguez-Molina J., Navarro J., Fernandez-Yañez J., Palomo J., Rodríguez-Hernández C., Ruiz M., Alonso R., Fernandez-Cruz E., Carbone J. **Immune monitoring of anti cytomegalovirus antibodies and risk of cytomegalovirus disease in heart transplantation.** *Int Immunopharmacol.* 2009; 9(6):649-52
2. Carbone J., Lanio N., Gallego A., Sarmiento E. **Immune monitoring to predict the development of infections after immunosuppression for solid organ transplantation and autoimmune diseases.** *Curr Drug Saf.* 2008; 3(2):91-9
3. Carbone J., Sarmiento E., Palomo J., Fernandez-Yañez J., Muñoz P., Bouza E., Rodríguez-Molina J., Lanio N., Fernandez-Cruz E. **The potential impact of substitutive therapy with intravenous immunoglobulin on the outcome of heart transplant recipients with infections.** *Transplant Proc.* 2007; 39(7):2385-8
4. Sarmiento E., Rodríguez-Hernández C., Rodríguez-Molina J., Fernández-Yáñez J., Palomo J., Anguita J., Pérez J.L., Lanio N., Fernández-Cruz E., Carbone J. **Impaired anti-pneumococcal polysaccharide antibody production and invasive pneumococcal infection following heart transplantation.** *Int Immunopharmacol* 2006; 6(13-14):2027-30

Otras publicaciones

1. Martínez-Pomar N., Lanio N., Romo N., Lopez-Botet M., Matamoros N.
Functional impact of A91V mutation of the PRF1 perforin gene. Hum Immunol. 2013; 74(1):14-7
2. Del Pozo N., Sarmiento E., Lanio N., Gallego A., Largo J., Carbone J.
Immunophenotypic abnormalities of CD8+ T-cell subsets in a patient with unusual Good's Syndrome. Allergol Immunopathol. 2010; 38(2):102-5
3. Carbone J., Gallego A., Lanio N., Chean C., Navarro J., Sarmiento E.
Peripheral blood CD8+DR+ T-cell count: a potential new immunologic marker of unexplained recurrent abortion. Fertil Steril. 2010; 94(1):360-1
4. Carbone J., Gallego A., Lanio N., Navarro J., Orera M., Aguaron A., Fernandez-Cruz E., Sarmiento E. **Quantitative abnormalities of peripheral blood distinct T, B and NK cell subsets and clinical findings in obstetric antiphospholipid syndrome.** J Rheumatol. 2009; 36(6): 1217-25
5. Lanio N., Sarmiento E., Gallego A., Carbone J. **Immunophenotypic profile of T cells in common variable immunodeficiency: is there an association with different clinical findings?** Allergol Immunopathol. 2009; 37(1):14-20
6. Carbone J., Lanio N., Gallego A., Sarmiento E. **Lower levels of regulatory T-cells in a patient with HTLV-I associated myelopathy.** Rev Neurol. 2009; 48(4):219-21

