

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Estudio de las alteraciones de la inmunidad celular en
pacientes sometidos a distintas terapias biológicas utilizadas
en el trasplante**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sandra García Jiménez

Directores

**Javier Alberto Carbone Campoverde
Elizabeth Angélica Sarmiento Marchese**

Madrid

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD CELULAR
EN PACIENTES SOMETIDOS A DISTINTAS TERAPIAS BIOLÓGICAS
UTILIZADAS EN EL TRASPLANTE

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR
SANDRA GARCÍA JIMÉNEZ

DIRECTORES

JAVIER ALBERTO CARBONE CAMPOVERDE
Y
ELIZABETH ANGÉLICA SARMIENTO MARCHESE

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES
DE LA INMUNIDAD CELULAR
EN PACIENTES SOMETIDOS A
DISTINTAS TERAPIAS BIOLÓGICAS
UTILIZADAS EN EL TRASPLANTE

SANDRA GARCÍA JIMÉNEZ

DIRECTORES

JAVIER ALBERTO CARBONE CAMPOVERDE
ELIZABETH ANGÉLICA SARMIENTO MARCHESI



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Dar las gracias

Dedico esta tesis a mis padres Luis y Josefa, a mi hermano Luis y a mis abuelos (que, aunque ya no están conmigo, me guían desde el cielo) por haberme apoyado en cada uno de mis pasos y enseñar buenos valores, por la motivación constante que permitieron que hoy en día sea la persona que soy y por su amor incondicional.

Al Dr. Javier Carbone y la Dra. Elizabeth Sarmiento por guiarme en el camino de la investigación y darme la oportunidad de desarrollarme personal y científicamente. Gracias por la acertada orientación, el soporte y la discusión que me permitió un buen aprovechamiento en este trabajo y que esta tesis llegara a un buen término.

En especial merecen agradecimiento las personas cuya colaboración ha sido importante en el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Eduardo Fernández Cruz, por permitirme formar parte de este equipo y realizar esta tesis doctoral. A los Dres. Antonio Gallego y Joaquín Navarro porque gracias a su valiosa ayuda me han guiado hacia la culminación de esta tesis. A los cardiólogos y microbiólogos del Gregorio Marañón, en especial al Dr. Iago Souza, Dr. Zatarain, Dra. Ana Karenina y la Dra. Maricela Valerio. A la Dra. Laura Díez, responsable del servicio de citometría de flujo del instituto de investigación sanitaria, por permitirme realizar mi estancia en su unidad.

A mi tutora, la Dra. Narcisa Martínez, y a la Dra. María Ángeles Vicente, responsable del programa de doctorado de la UCM, por ayudar tanto con el papeleo, evaluaciones y trámites.

Gracias a las enfermeras del hospital de día de Cardiología, de terapias biológicas y a los técnicos de laboratorio de Inmunología, hematología y bioquímica, por ayudarme a pesar de darles más trabajo.

A mis colegas y amigos Leticia, César, Ikram, Judith, Alba, Christopher, Laura, Boris, Sergiu, Marisa, María Alejandra, por acompañarme, ayudarme, apoyarme y animarme.

Los miembros de mi comité de tesis han dado generosamente su tiempo y experiencia para mejorar mi trabajo. Les agradezco su contribución y su incondicional ayuda.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	19
SUMMARY	23
I. INTRODUCCIÓN	27
1 ACTIVIDAD DEL TRASPLANTE CARDIACO	29
2. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR	32
2.1. Fármacos que bloquean la producción de citocinas.....	35
2.1.1. Inhibidores de la Calcineurina (CNI)	35
2.1.2. Glucocorticoides	37
2.2. Inhibidores del mTOR: Everolimus y Sirolimus	39
2.3. Inhibidores de la síntesis de Nucleótidos: Micofenolato de Mofetil.....	41
2.4. Anticuerpos	43
2.4.1. Policlonales: Globulina Antitimocítica (ATG).....	43
2.4.2. Anticuerpos Monoclonales	44
3. TRATAMIENTO INMUNOMODULADOR: GGIV	47
3.1. Efectos dependientes de Fc	47
3.2. Efectos dependientes de Fab	49
3.3. Efectos dependientes de Fab y Fc	50
4. CÉLULAS T REGULADORAS.....	55
4.1. Perspectiva histórica	55
4.2. Poblaciones de células Treg	55
4.2.1. Naturales (naive, activadas).....	56
4.2.2. Células Treg inducibles Tregi (pTreg).....	57
4.3. Moléculas esenciales para el desarrollo de las células Treg	58
4.4. Mecanismo de acción de las células Treg:.....	59
4.5. Células Treg en trasplantes.....	61
4.6. Inmunoterapia basada en células Treg	63
4.7. Células Treg e infección.....	64
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
1. PACIENTES.....	71
2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	72
3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE POBLACIONES LINFOCITARIAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	73
4. ADQUISICIÓN DE MUESTRAS.....	75
5. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES.....	75
6. PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y OTROS PARÁMETROS.....	80
6.1. Parámetros inmunológicos.....	80
6.2. Parámetros Bioquímicos.....	81
6.3. Otros parámetros.....	82
6.3.1. Duración de supresión de CD25 en linfocitos T.....	82
6.3.2. Recuperación de expresión de CD25 en linfocitos T.....	82
7. BIOPSIAS ENDOMIOCÁRDICAS.....	83
8. ANTICUERPOS CITOTÓXICOS.....	85
9. DEFINICIÓN DE EVENTO INFECCIOSO.....	86
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	87
IV. RESULTADOS.....	89
ESTUDIO 1. ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DIFERENTES FENOTIPOS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T, B, NK EN PACIENTES TRASPLANTADOS QUE RECIBEN DIFERENTES PAUTAS DE ADMINISTRACIÓN DE BAS: 1 DOSIS (1D) O 2 DOSIS (2D).....	93
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.....	93
2. TERAPIA DE MANTENIMIENTO.....	97
3. EVENTOS CLÍNICOS POSTRASPLANTE.....	97
3.1. Hipersensibilización: desarrollo de anticuerpos anti-HLA.....	97
3.2. Tiempo libre de Rechazo.....	98
3.3. Análisis de resultados de las biopsias endomiocárdicas vs. dosis de inducción....	100
3.4. Infecciones.....	102
3.5. Desarrollo de CAV y tumores.....	107
3.6. Supervivencia.....	107
4. MONITORIZACIÓN DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS.....	109

4.1. Recuento de linfocitos totales	109
4.2. Recuento de neutrófilos totales	110
4.3. Linfocitos T	110
4.3.1. Linfocitos TCD3+	110
4.3.2. Linfocitos TCD4+	112
4.3.3. Linfocitos TCD8+	115
4.3.3.1. Expresión de CD25 en los linfocitos TCD8+	117
4.3.4. Células Treg	118
4.3.5. Linfocitos B	120
4.3.6. Células Natural Killer (NK)	121
4.3.7. Monocitos	122
4.3.8. Activación de linfocitos TCD8+ y monocitos	123
5. MONITORIZACIÓN DE PARÁMETROS HUMORALES	129
6. EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	134
7. MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA FASE DE MANTENIMIENTO	138
8. CORRELACIÓN CLÍNICA ENTRE LOS CAMBIOS OBSERVADOS EN POBLACIONES LINFOCITARIAS E INFILTRACIÓN LINFOCITARIA	141
ESTUDIO 2. ESTUDIO COMPARATIVO DE EXPRESIÓN DE CD25 ENTRE DOS REGÍMENES DE INDUCCIÓN ANTI-CD25 (BASILIXIMAB VS. DACLIZUMAB) . . .	145
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	145
2. MONITORIZACIÓN POBLACIONES LINFOCITARIAS	147
3. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS TCD4+ Y TCD8+	148
4. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE CD25 CON BASILIXIMAB (2D) Y DACLIZUMAB (2D) Y SU RELACIÓN CON RECHAZO	151
ESTUDIO 3. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE GGIV POLIVALENTES NO ESPECÍFICAS E HIPERINMUNE ANTI-CMV EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS EN DIFERENTES CONTEXTOS CLÍNICOS	155
1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE GGIV ADMINISTRADAS A ALTAS DOSIS EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS	155
1.1. Diseño y datos demográficos de pacientes	155
1.2. Efecto en diferentes poblaciones linfocitarias	156
1.2.1. Subpoblaciones T B y NK	156
1.2.2. Activación en linfocitos TCD8+	157
1.2.3. Expresión de CD25 en linfocitos TCD4+; TCD8+ y células Treg	158

2. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE GGIV ESPECÍFICA ANTI-CMV EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS	162
2.1. Diseño	162
2.2. Efecto en diferentes poblaciones linfocitarias	162
3. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE GGIV POLIVALENTES NO ESPECÍFICAS EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS EN TC.....	164
3.1. Diseño y características clínicas	164
3.2. Efecto en diferentes poblaciones linfocitarias	165
3.2.1. Linfocitos totales	165
3.2.2. Subpoblaciones T, B y NK	166
3.2.3. Activación en linfocitos TCD8+	167
3.2.4. Expresión de CD25 en linfocitos TCD4+, TCD8+ y células Treg	168
3.2.5. Porcentaje de monocitos y expresión de marcadores de activación	169
3.2.6. Variables inmunológicas humorales	170
V. DISCUSIÓN.....	171
1. ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DIFERENTES FENOTIPOS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T, B, NK EN TC QUE RECIBEN DIFERENTE PAUTA DE ADMINISTRACIÓN DE BAS: 1 DOSIS (1D) O 2 DOSIS (2D).....	173
1.1. Reducción de dosis de BAS y repercusión clínica	174
1.2. Cambios significativos producidos en poblaciones celulares.....	175
1.3. Cambios producidos en parámetros bioquímicos	181
2. COMPARACIÓN DE VARIABLES CLÍNICAS Y DURACIÓN DEL BLOQUEO DEL RECEPTOR CD25. DIFERENCIAS ENTRE BAS Y DAC	183
3 ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE DIFERENTES GGIV COMERCIALES EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS EN DIFERENTES CONTEXTOS CLÍNICOS	184
VI. CONCLUSIONES	189
VII. BIBLIOGRAFÍA	193
VIII. ANEXOS	213
ANEXO 1	215
ANEXO 2.	233
ANEXO 3.	239
ANEXO 4.	245

ABREVIATURAS

A

AMF: Ácido micofenólico

AcMo: Anticuerpo monoclonal

ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpos

aKIR: Receptor KIR activador

B

BAS: Basiliximab

BEM: Biopsia Endomiocárdica

BMT: Trasplante de médula ósea

BPARG: Rechazo agudo probado por biopsia

C

CaN: Calcineurina

CNI: Inhibidor de calcineurina

CAV: Vasculopatía del injerto (en inglés cardiac allograft vasculopathy)

CCI: Cambio de Isotipo

CD: Célula Dendrítica

CfA: Ciclofilina A

CMF: Citometría de Flujo

CMV: Citomegalovirus

CPA: Células presentadoras de antígeno

CPH: Complejo principal de histocompatibilidad

CsA: Ciclosporina A

Csp: Cantidad suficiente para

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

CVID: Inmunodeficiencia combinada severa

D

CDs: Célula Dendrítica

DAC: Daclizumab

DSA: Anticuerpos específicos de donante

DST: Transfusión específica de donante

DPI: Disfunción primaria del Injerto

E

ECMO: oxigenación de membrana extracorpórea (en inglés ExtraCorporeal Membrane Oxygenation)

ERGC: Elementos de respuesta a glucocorticoides

EVE: Everolimus

F

FK: Tacrolimus

FKBP12: Proteína unidora de FK506-12

FoxP3: Proteína P3 de la Forkhead box

G

GC: Glucocorticoides

GCR: Receptor de glucocorticoides

GITR: Factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoide

GM-CSF: Factor estimulante de granulocitos-monocitos

H

HCMV: Citomegalovirus

HSCT: Trasplante de células madre hematopoyéticas

HLA: Antígeno leucocitario humano

I

IFN γ : Interferón gamma

IVIG: Gammaglobulina intravenosa

Igs: Inmunoglobulinas

I κ B: Inhibidor del factor nuclear K β

IL: Interleucina

K

KIR: "Killer Inhibitory Receptor". Receptor inhibidor de NK

L

LAG-3: Activación del gen 3 linfocitario

M

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (en inglés major histocompatibility complex)

MMF: Micofenolato de mofetil

MISS: Miocardiopatía isquémica

MINS: Miocardiopatía no isquémica

N

NF-AT: Factor nuclear de las células T activadas

NFkB: Factor nuclear kB

NK: Natural Killer o célula asesina natural

N.S.: No significativo

O

ONT: Organización Nacional de Trasplantes

P

PBL: Linfocitos de sangre periférica

PT: Proteínas totales

PRA: Porcentaje de reactividad frente a células de un panel

R

Rpm: Revoluciones por minuto

S

SCI: Sin Cambio de Isotipo

SPSS: "Statistical Package for Social Sciences"

SRL: Sirolimus

SSC: "Side Scatter". Detector de dispersión lateral

T

TC: Trasplante cardiaco

TCD3+: Linfocito TCD3+

TCD4+: Linfocito TCD4+

TCD8+: Linfocito TCD8+

TCR: Receptor de células T

TGF-β: Transforming growth factor beta (en inglés transforming growth factor beta)

TH: Linfocito T colaborador o helper

TMO: Trasplante de médula ósea

HSCT: Trasplante de células hematopoyéticas (en inglés hematopoietic cell transplantation)

TNF: Factor de necrosis tumoral

TOS: Trasplante de órgano sólido

Treg: Células T reguladoras

Tregi o (pTreg): Células T reguladoras inducibles

X

nTreg (tTreg): Células T reguladoras naturales

V

VO: Vía Oral

RESUMEN / SUMMARY



RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La administración de agentes terapéuticos frente a la alorespuesta inmune que se desencadena tras el trasplante de órgano sólido humano (TOS), incluye terapias de inducción como los anticuerpos monoclonales anti receptor de interleucina 2 (anti IL2R o anti CD25) u otros anticuerpos policlonales. En el período peritrasplante se administran de forma estandarizada corticoides, inhibidores de la calcineurina (CNI) y fármacos antiproliferativos como micofenolato o inhibidores de m-TOR. Estos fármacos incrementan el riesgo de infecciones y neoplasias.

La efectividad del régimen de inmunosupresión de dos dosis (2D) de basiliximab (BAS) se determinó inicialmente en trasplantados renales, y se trasladó su uso a otros tipos de TOS confiriendo una inmunoprolifaxis entre 4 a 6 semanas. Se desconoce si la administración de 1 Dosis (1D) de BAS se correlaciona con menor duración y mayores complicaciones en el post-trasplante cardíaco (TC). No existen estudios que comparen la cinética de expresión de CD25 en diferentes subpoblaciones de linfocitos T en tratamientos con basiliximab (BAS) o daclizumab (DAC).

Las inmunoglobulinas intravenosas (GGIV) se utilizan en inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes y en pacientes trasplantados con hipogammaglobulinemia y alto riesgo de infecciones o rechazo mediado por anticuerpos. En la actualidad existen pocos estudios sobre su efecto *in vivo* en diferentes poblaciones linfocitarias.

HIPÓTESIS

Diferentes anticuerpos monoclonales anti-CD25 inducen cambios en porcentaje y número absoluto en diferentes poblaciones linfocitarias en sangre periférica que podrían relacionarse con complicaciones como rechazo, enfermedad vascular del injerto e infecciones tras el trasplante cardiaco (TC).

La administración de GGIV induce cambios en la distribución fenotípica de las poblaciones linfocitarias en distintas enfermedades inmunológicas que podrían relacionarse con un efecto inmunomodulador.

OBJETIVOS

1. Describir los cambios inducidos en el número y porcentaje de distintas subpoblaciones linfocitarias de dos regímenes distintos de BAS. Evaluar si la administración de una 1D se relaciona con aumento de las complicaciones post-TC.
2. Estudiar los efectos de dos pautas de tratamiento con anticuerpo monoclonal quimérico BAS y el humanizado DAC sobre la cinética de expresión de CD25 en linfocitos TCD4+ y TCD8+ en TC y su correlación con complicaciones clínicas.
3. Evaluar las modificaciones inmunofenotípicas de linfocitos T, B y NK en sangre periférica inducidas por el tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas (GGIV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres estudios:

- 1) Estudio observacional longitudinal prospectivo en TC de diferentes fenotipos de subpoblaciones linfocitarias T, B y NK con diferentes pautas de administración de BAS: una dosis (1D) n= 38 y dos dosis (2D) n=19 comparando la cinética de diferentes subpoblaciones linfocitarias y otros parámetros inmunológicos.
- 2) Estudio observacional longitudinal prospectivo analizando la expresión de CD25 en TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica de TC tratados con dos dosis de DAC, n=58 y dos dosis de BAS, n=19.

- 3) Estudio descriptivo del efecto de la administración de diferentes preparados de GGIV sobre las poblaciones leucocitarias. Se analizan dos grupos de pacientes tratados. En el primero se estudiaron 5 pacientes con dermatomiositis que recibieron GGIV polivalente a altas dosis y 5 pacientes tratados con GGIV hiperinmune anti-CMV. El segundo se realizó en 66 TC, de los cuáles 25 pacientes recibieron GGIV a dosis sustitutivas por hipogammaglobulinemia secundaria e infecciones severas.

RESULTADOS

En el primer estudio, la administración de una sola dosis de BAS no supuso mayor riesgo de rechazo ni infección respecto a 2D. No se observaron diferencias en el desarrollo de anticuerpos anti-HLA ni de vasculopatía del aloinjerto cardiaco (CAV) en el primer año. El número de episodios y tiempo libre de rechazo fue similar en ambos grupos. Los pacientes que recibieron 2D mostraron tendencia a tener menos días libres de infección en el primer mes. La recuperación de la expresión de CD25 en los linfocitos TCD4+ fue más precoz en los pacientes que recibieron 1D, observándose esta diferencia significativa a día 15. La cinética de la expresión de CD25 se correlacionó con una disminución transitoria en el porcentaje de células Tregs en ambos grupos, siendo esta reducción de porcentajes de Tregs en el grupo 2D a días 15 y día 30 de estudio. La co-expresión de marcadores de activación HLA-DR y CD38 en los linfocitos TCD8+ disminuyó de manera significativa a la semana post-TC en ambos grupos, en el caso del grupo 2D persistió hasta el mes. La activación en los monocitos disminuyó en ambos grupos, recuperando el valor basal a los 90 días. El porcentaje de linfocitos B aumentó de manera significativa a los 7d en ambos grupos. No se observaron diferencias en el porcentaje de linfocitos B naive ni de memoria. La disminución del porcentaje de células *natural killer* (NK) y TCD8+ a día 7 fue significativa para el grupo 1D. La recuperación de la expresión de CD25 en TCD8+ fue similar en ambos grupos. En cuanto a los niveles de inmunoglobulinas séricas se observaron menos concentraciones de IgM a día 30 en el grupo 2D. El grupo 2D recuperó la función renal a partir del primer mes post-TC, asemejándose al grupo 1D.

El segundo estudio mostró que la duración de la supresión de expresión de CD25 en los TCD4+ y TCD8+ fue significativamente más prolongada en el grupo que recibió DAC comparado con el grupo BAS, aunque no se evidenciaron diferencias significativas en el número de episodios de rechazo ni de infecciones.

En el tercer estudio, la administración de altas dosis de GGIV o de gammaglobulina hiperimmune anti-CMV tuvieron un efecto de disminución en la expresión de marcadores de activación tal como HLA-DR, CD38 en linfocitos TCD8+. En el caso de alta dosis GGIV la reducción de TCD8+HLA-DR+ en valores absolutos fue significativa.

La administración GGIV a dosis sustitutivas indujo un aumento significativo en el porcentaje de células Treg CD4+CD25^{+/high} CD127^{-/low}.

CONCLUSIONES

La monitorización de la expresión del receptor de interleucina 2 (CD25) en los linfocitos TCD4+ y TCD8+ en sangre periférica por citometría de flujo permite el seguimiento individualizado de la durabilidad y eficacia del efecto bloqueante en el período post trasplante inmediato.

La administración de 1D de BAS mostró una recuperación más rápida de la expresión de CD25 en TCD4+ y de Treg, sin un incremento de complicaciones clínicas.

La administración de GGIV a dosis sustitutivas y de CMV-GGIV mostró un efecto de reducción del estado de activación de los TCD8+. La terapia de reemplazo con GGIV en TC promovió un incremento en la proporción de células Treg, aunque dichos resultados requieren ser confirmados en ensayo clínico controlado.

SUMMARY

INTRODUCTION

Administration of therapeutic agents against the immune response that is triggered after solid organ transplantation (SOT), includes monoclonal antibodies (anti IL2R or anti CD25) and other polyclonal antibodies (antithymocyte or antilymphocyte globulins) are used in the induction phase. In the peri-transplant period, other agents such as corticosteroids, calcineurin inhibitors (CNI) and mTOR inhibitors are also administered sequentially and progressively. These drugs reduce the response to the graft, but also increase the risk of infections and neoplasms.

The effectiveness of the two-dose immunosuppression regimen of basiliximab (BAS) was initially determined in kidney transplant recipients, and its use was transferred to other types of TOS, conferring immunoprophylaxis between 4 to 6 weeks. It is currently unknown whether a single dose is correlated with shorter duration and greater complications in post-CT (heart transplantation). There are no studies that compare the different kinetics of CD25 expression in different subpopulations of T lymphocytes for both anti-CD25 antibodies.

The intravenous immunoglobulin (IVIG) are used in immunodeficiencies, autoinflammatory diseases and in transplant patients with hypogammaglobulinemia and high risk of infections or antibody-mediated rejection. At present there are few studies on its effect *in vivo* in different lymphocyte populations.

HYPOTHESIS

Monoclonal anti-CD25 antibodies induce changes in percentage and absolute number in the different lymphocyte populations in peripheral blood. These variations in HT are related to complications such as rejection, vascular graft disease, and infections after HT.

IVIg administration induces changes in the phenotypic distribution of lymphocyte populations in different immunological diseases that could be related to an immunomodulatory effect.

OBJECTIVES

1. To describe the kinetics of different T, B and NK lymphocyte subpopulations of two different BAS regimens. To assess whether a single dose is related to greater complications in the post-HT.
2. To study the kinetics of CD25 expression in TCD4 + and TCD8 + lymphocytes of two presentations of monoclonal antibodies (anti-CD25) BAS (chimeric) and DAC (humanized) on HT and its correlation with clinical complications.
3. Evaluate the immunophenotypic modifications on T, B and NK cells *ex vivo* after treatment with IVIG.

MATERIAL AND METHODS

- 1) Prospective observational study of different phenotypes of T, B and NK lymphocyte subpopulations in HT receiving different BAS administration guidelines (1D n=38; 2D n=19). We studied the kinetics of different lymphocyte subpopulations and other biochemical and clinical parameters were monitored during the study period.
- 2) Observational study comparing the expression of CD25 in TCD4+ and TCD8+ lymphocytes with two different anti-CD25 antibodies. It was performed in 58 HT who received DAC (2D) with 19 who received BAS (2D).
- 3) Three descriptive studies of IVIG effect on different lymphocyte subpopulations. 5 patients receiving non-specific high dose IVIG, 5 CMV-specific IVIG patients and in 66 CT undergoing BAS induction therapy with either one or two doses.

RESULTS

In the first study, a single dose of BAS did not imply an increased risk of rejection or infection. No differences were observed in the development of anti-HLA antibodies or cardiac allograft vasculopathy (CAV) in the first year. The number of episodes and rejection-free time was similar in both groups. Patients who received 2D tended to have fewer infection-free days in the first month. Recovery of CD25 expression in CD4+ T lymphocytes was earlier in patients who received 1D, this significant difference being observed on day 15. The kinetics of CD25 expression correlated with a transient decrease in the percentage of Treg cells in both groups, this being a reduction of Tregs percentages in group 2D on days 15 and 30 of the study. The co-expression of activation markers HLA-DR and CD38 in TCD8+ lymphocytes decreased significantly at week post-CT in both groups, in the case of group 2D it persisted until one month. Activation in monocytes decreased in both groups, recovering the baseline value at 90 days. The percentage of B lymphocytes increased significantly at 7d in both groups. No differences were observed in the percentage of naive or memory B lymphocytes. The decrease in the percentage of *natural killer* (NK) and TCD8+ cells on day 7 was significant for group 1D. Recovery of CD25 expression in TCD8 + was similar in both groups. Regarding serum immunoglobulin levels, a lower IgM concentration was observed at day 30 in group 2D. Group 2D recovered kidney function from the first month post-CT, resembling group 1D.

The second study showed that the duration of suppression of CD25 expression in TCD4 + and TCD8 + was significantly longer in the group that received DAC compared to BAS group, although no significant differences were evidenced in the number of rejection episodes or infections

In the third study, the administration of high doses of GGIV or anti-CMV hyperimmune gamma globulin had a decreasing effect on the expression of activation markers (HLA-DR, CD38) in TCD8 + lymphocytes. In the case of high-dose GGIV, the reduction in TCD8 + HLA-DR + was significant.

GGIV administration at replacement doses induced a significant increase in the percentage of Treg cells.

CONCLUSIONS

Monitoring of interleukin 2 (CD25) receptor expression in TCD4+ and TCD8+ lymphocytes in peripheral blood by flow cytometry allows individualized monitoring of the durability and efficacy of the blocking effect in the immediate post-transplant period.

The administration of a single dose of BAS showed faster recovery of CD25 expression in TCD4+ and Treg, without an increase in clinical complications.

The administration of GGIV at replacement doses and CMV-GGIV showed a reduction effect on the activation status of TCD8+. Replacement therapy with GGIV on HT promoted an increase in the proportion of Treg cells, although these results need to be confirmed in a controlled clinical trial.

I. INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

1 ACTIVIDAD DEL TRASPLANTE CARDIACO

El trasplante cardiaco (TC) se considera el tratamiento de elección para el manejo de los pacientes afectados por cardiopatías en situación funcional avanzada no mejorables con otros procedimientos médicos y/o quirúrgicos. La mejora progresiva en la supervivencia, los avances de la inmunosupresión, la selección adecuada de donantes y receptores, la disminución de las complicaciones derivadas de la inmunosupresión, han permitido mejorar la eficacia de este tratamiento. En la actualidad según datos que gestiona la ONT¹ desde hace 11 años en colaboración con la OMS, eleva a 135.860 el total de órganos trasplantados en todo el mundo en el último año, lo que representa un aumento histórico del 7,2% respecto al año anterior (con 126.670). De ellos, 89.823 fueron de riñón (41% de donante vivo), 30.352 de hígado (21% de donante vivo), 7.626 de corazón, 5.497 de pulmón, 2.342 de páncreas y 220 de intestino.

Referente a nuestro país según datos ONT (2020) se realizaron 4.427 trasplantes, de los cuales 2.702 fueron renales, 1.034 hepáticos, 336 pulmonares, 278 cardiacos, 73 de páncreas y 4 intestinales. La actividad de trasplante cardiaco hasta la actualidad ha sido de 9.112 trasplantados, en los últimos años ha experimentado un aumento, aunque sigue alejada del máximo histórico alcanzado en el año 2000, con 353 trasplantados, lo que supone una actividad de 5,9 trasplantes cardiacos por millón de población (p.m.p.). Según datos de la ONT² en 2020 se han producido 278 trasplantes, con un descenso de un 7% respecto a años anteriores.

I. INTRODUCCIÓN

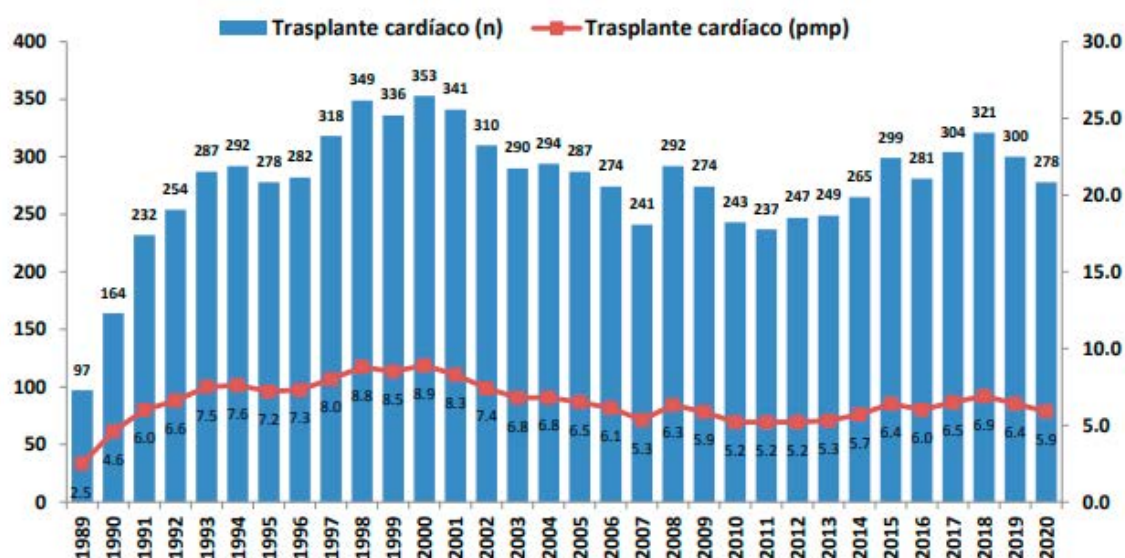


Figura 1. Actividad de trasplante cardíaco en España. 1989-2020

Números absolutos y procedimientos por millón de población (pmp). Fuente: Organización nacional de trasplantes (ONT). Datos 2020²

Los resultados en términos de supervivencia han ido mejorando constantemente a lo largo de la serie histórica. Asimismo, el periodo 2016-2018 muestra una tendencia clara a la mejora de la supervivencia respecto a la década previa. Los factores más destacables que afectan a la supervivencia son la edad del receptor y el tipo de asistencia circulatoria antes del trasplante. Los pacientes de mayor edad (>60 años) muestran un aumento de mortalidad del 70%. El uso de la oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) previo al trasplante conlleva un exceso del 40% en el riesgo de mortalidad respecto a los pacientes trasplantados sin asistencia. Sin embargo, los resultados de los receptores con asistencia ventricular son superponibles a los de los pacientes trasplantados sin asistencia.

Entre las causas del fallecimiento la más frecuente es el fallo primario del injerto (32,60), seguida de infección (22,90%), enfermedad vascular del injerto/muerte súbita (27,80%) y tumores (21,1%).

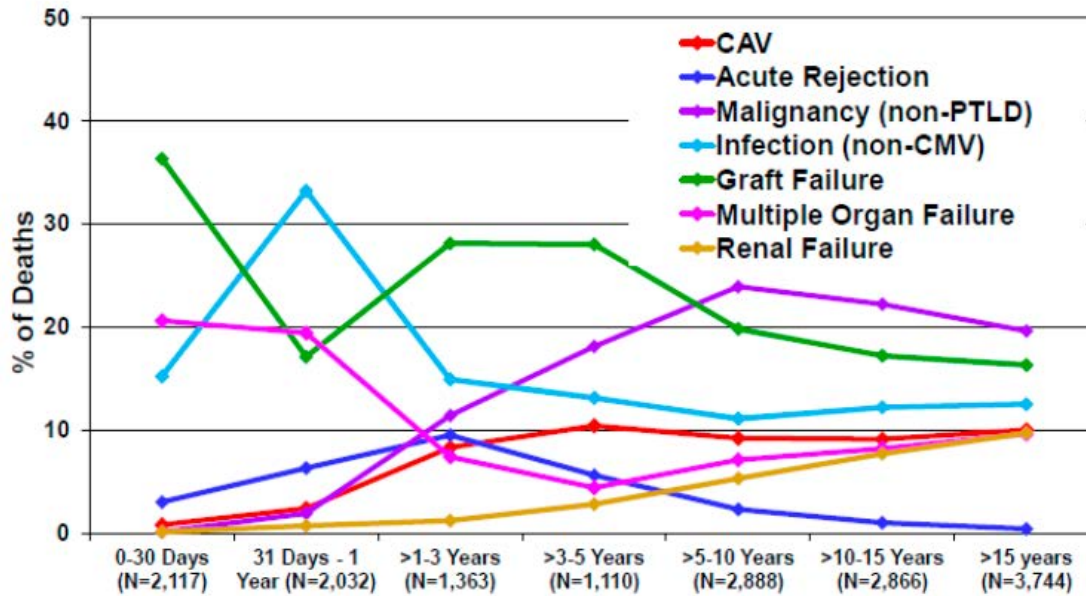


Figura 2. Incidencias de las principales causas de muerte en trasplantados cardíacos

Fuente: Informe ISHLT. 2018; Volumen 37, Issue 10, Pages 1155–1168³

En el último registro español de trasplante cardíaco³ se indicó que la causa de 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 primario del injerto; del primer mes hasta el primer año, la infección, y la enfermedad vascular del injerto/muerte súbita entre el primer y el quinto año. Respecto a la mortalidad del primer año, en 2019 se ha estabilizado la debida a fallo primario del injerto y a rechazo agudo. Por el contrario, en este año se ha producido una disminución a prácticamente la mitad de los pacientes fallecidos por infección en este periodo precoz.

2. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR

El éxito actual del trasplante de órganos se debe atribuir en gran parte al avance experimentado en la terapia inmunosupresora, gracias a la cual, se ha conseguido reducir el número de episodios de rechazo agudo.

Los linfocitos T tienen un papel fundamental en los eventos inmunes precoces que ocurren después de la exposición al injerto. De ahí que la mayoría de los fármacos inmunosupresores actúan inhibiendo su activación⁴. La mayoría de estas terapias se desarrollaron antes del descubrimiento de las células Treg. Un buen conocimiento de la interacción de estas terapias con estos linfocitos sería ideal para la generación de regímenes más tolerables.

La activación y proliferación de los linfocitos T requiere de al menos tres señales mediadas por la interacción con los aloantígenos. La señal 1 consiste en el reconocimiento del antígeno por el complejo TCR/CD3. La señal 2 consiste en el reconocimiento CD28-LinfocitoT-CD80/86-CPA (Respuesta coestimuladora). Ambas señales desencadenan 3 vías de activación intracelular: la vía Ca^{2+} -Calcineurina, la vía de las MAPs quinasas, y la vía de la quinaza C factor nuclear Kb (NFκB). 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 IL-2 desencadena la señal 3 mediada por la interacción IL-2/IL-2R que finalmente induce la proliferación celular⁵.

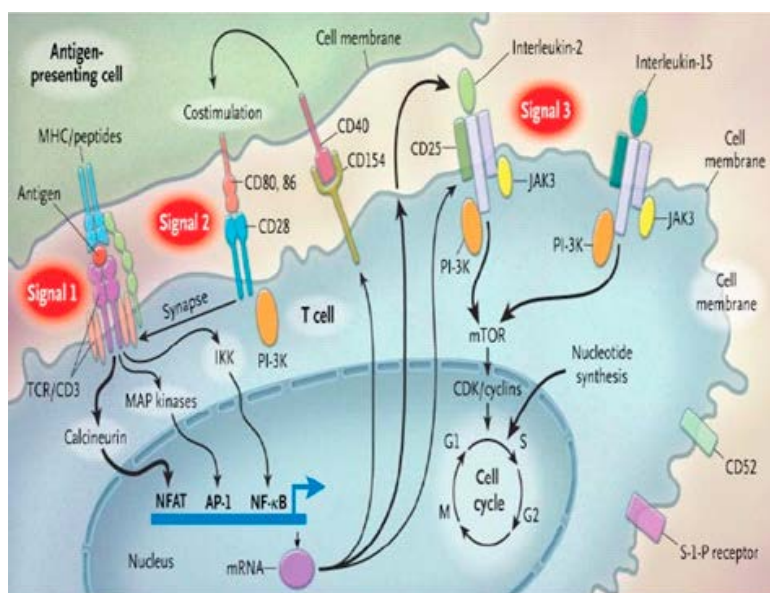


Figura 3. Modelo de activación de células T a través de 3 señales

Fuente: (Adaptado de Halloran P.F et al 2014) *N Engl J Med.* 2004 Dic 23; 351(26):2715-29⁵

Según su mecanismo de acción los inmunosupresores se pueden clasificar en cuatro grupos.

1. **Fármacos que bloquean la producción de citocinas:** los anticalcineurínicos como tacrolimus y ciclosporina, de forma indirecta, los glucocorticoides.
2. **Antiproliferativos o antagonistas del receptor IL2 o mTOR:** Everolimus y Sirolimus.
3. **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 de DNA, por lo que se inhibe la proliferación linfocitaria posterior a la activación.
4. **Anticuerpos monoclonales y policlonales:** Los anticuerpos policlonales son productos biológicos de origen animal (caballo, conejo) dirigidos contra la cadena α y β del TCR. Existen dos grupos, los anticuerpos policlonales contra el linfocito humano (globulina antilinfocítica, GAL) y los anticuerpos contra el timocito humano (globulina antitimocítica, GAT). Los anticuerpos monoclonales van dirigidos contra moléculas específicas como el anti-CD3 y anti-CD25 (Basiliximab-quimérico murino-humano y daclizumab-humanizado). Actúan produciendo citólisis de los linfocitos en el caso de los policlonales o bloqueando sus receptores en el caso de los monoclonales.

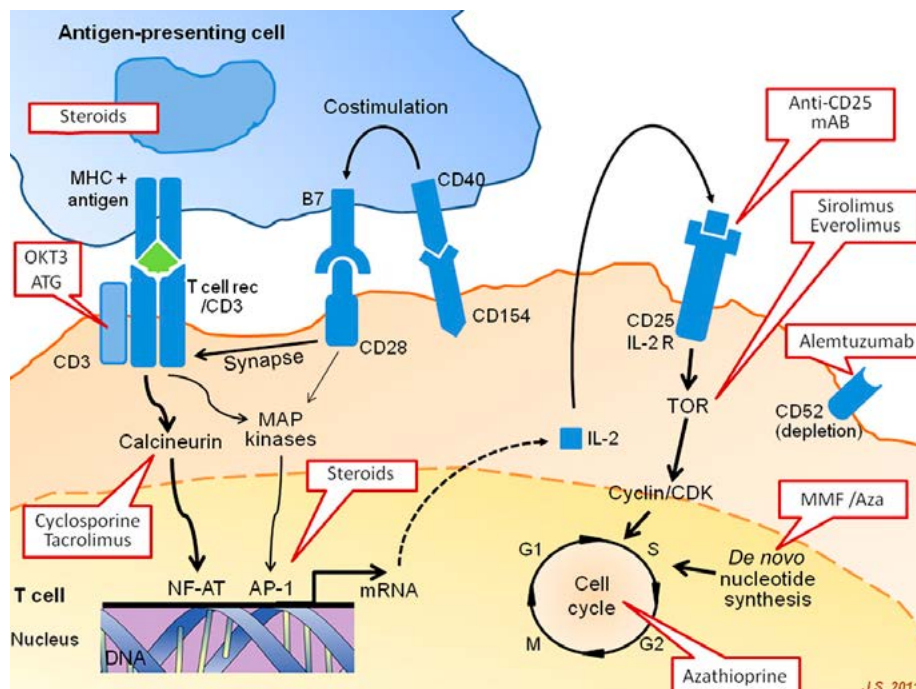


Figura 4. Mecanismo de acción de fármacos inmunosupresores

Fuente: Luis Alonso-Pulpón, Javier Segovia, Manuel Gómez-Buena, Pablo García-Pavía. Cardiac surgery heart transplantation: organisational aspects and current trends in immunosuppression—a view from Spain. Heart (British Cardiac Society) 98(11):878-89· junio 2012⁶

I. INTRODUCCIÓN

Los regímenes inmunosupresores se clasifican en inducción, mantenimiento y rescate.

- La inmunosupresión de inducción es una profilaxis (niveles altos de inmunosupresión) que se inicia en el momento del trasplante para prevenir el rechazo agudo inicial. Los agentes más comúnmente utilizados son anticuerpos monoclonales o policlonales junto con micofenolato y metilprednisolona.
- La inmunosupresión de mantenimiento es de menor potencia, pero permite su uso prolongado. Se basa en la triple terapia que clásicamente consiste en la combinación de un inhibidor de la calcineurina (CNI), un antimitótico, y corticoides.
- El tratamiento de rescate es igual de potente que el tratamiento de inducción, pero se aplica en caso de un episodio de rechazo.

En los últimos años se han introducido nuevos fármacos que han abierto las posibilidades de tratamiento. Pero todavía quedan algunas cuestiones pendientes, debido a la toxicidad asociada a su uso (infecciones, cáncer, nefrotoxicidad y alteraciones metabólicas) y a la posibilidad de interacciones con otros fármacos, lo cual complica su manejo y puede comprometer el pronóstico de estos enfermos.

Los principales objetivos en el campo de trasplante son: la elección del nivel óptimo de inmunosupresión, combinación de diferentes inmunosupresores para obtener un efecto sinérgico, adecuación del nivel de inmunosupresor a la cronología del rechazo con la finalidad de usar una mínima dosis que evite el rechazo y minimice las reacciones adversas. Sin embargo, actualmente existe una falta de consenso tanto en la combinación de inmunosupresores a emplear, como en las dosis e intensidad (niveles plasmáticos) de estos inmunosupresores.

Otro aspecto importante, en la inmunosupresión de mantenimiento es la intensidad y su evolución a lo largo del seguimiento post-TC. No se conocen las pautas y niveles de inmunosupresión ideales, y además es muy difícil lograr el equilibrio perfecto entre la inmunosupresión que evite el rechazo del injerto y la aparición de efectos adversos que condicionen la calidad de vida del paciente y su supervivencia a largo plazo.

2.1. FÁRMACOS QUE BLOQUEAN LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

2.1.1. INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA (CNI)

Bloquean la transcripción de genes que codifican la interleucina 2 (IL-2) y otras citocinas inflamatorias. No consiguen inhibir por completo la producción de citocinas, sino que reducen su producción. Tanto CsA como TAC dependen de unos mediadores intracelulares para inhibir a la enzima calcineurina (fosfatasa activada por calmodulina/Ca²⁺).

La **ciclosporina (CsA)** es un péptido cíclico lipofílico compuesto por once aminoácidos aislado del hongo *Tolypocladium inflatum Gams*. En el caso de CsA la proteína intermediaria se llama ciclofilina y está presente normalmente en el citoplasma. En presencia de Ca⁺⁺ intracelular y de otra molécula llamada calmodulina, el complejo ciclofilina-CsA se une al sitio activo de la calcineurina. Esto hace que la calcineurina no pueda desfosforilar al factor nuclear de células T activadas (NFAT), que no puede entrar al núcleo, no siendo posible su unión a los promotores de citocinas bloqueando así su síntesis. De esta forma, se previene la proliferación y activación de los linfocitos T⁷. También se bloquea la síntesis del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) impidiendo que las células T progresen desde la fase G0 a la G1 del ciclo celular. Entre sus efectos adversos destaca la nefrotoxicidad con una disminución del aclaramiento de creatinina. También puede producir toxicidad hepática, hipertensión arterial, diabetes mellitus post-TC, hiperlipidemia, hirsutismo, hiperplasia gingival y toxicidad neurológica, caracterizada por temblores, parestesias y debilidad muscular⁸.

Farmacocinética

Su administración puede ser oral o intravenosa, la absorción a nivel gastrointestinal es variable, imprevisible e incompleta. En la actualidad se utiliza una formulación en microemulsión denominada CsA neoral con una biodisponibilidad mayor y absorción intestinal más regular, menos dependiente de la bilis o de los alimentos y, por tanto, con un perfil farmacocinético más predecible. La biodisponibilidad aumenta durante el tratamiento, por lo que la dosis oral ha de reducirse gradualmente para mantener concentraciones constantes del fármaco en sangre. Se metaboliza en gran parte por enzimas hepáticas del citocromo P-450 siendo frecuente su interacción con fármacos inhibidores y estimuladores del sistema enzimático microsomal. Su vida media oscila entre 12 y 17 horas. Su excreción se realiza fundamentalmente por la bilis, solo un 0,1% lo realiza por vía renal, por lo que la insuficiencia renal no afecta a sus niveles.

I. INTRODUCCIÓN

El **tacrolimus (FK)** es un macrólido aislado del *Streptomyces tsubaensis*, de naturaleza liposoluble, con un mecanismo de acción similar al de la CsA, a pesar de su distinta estructura química y con una potencia de 50 a 100 veces superior⁹. El FK actúa como profármaco activándose al unirse a la ciclofilina llamada (FKBP12). El complejo tacrolimus-FKBP12 se une a la calcineurina, inhibiendo la síntesis y liberación de calcio dependiente de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2. A diferencia de la CsA, el FK posee la propiedad adicional de interferir en la expresión de los receptores de IL-4 de los linfocitos B, de inhibir la síntesis de IL-5 (factor de diferenciación de los linfocitos B), de reducir la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales y bloquear la respuesta de los leucocitos a la IL-8. Se ha demostrado también su capacidad para inhibir la proliferación de células NK y su actividad citotóxica en respuesta a la IL-2¹⁰. Al igual que la CsA, el FK detiene el ciclo celular entre la fase G0 y G1.

FK ha demostrado ser más efectivo en la reducción en el número de episodios de rechazo. Los efectos adversos son similares a los descritos para la ciclosporina, pero con menor incidencia de hipertensión, hiperlipidemia e hirsutismo^{11,12}. En cambio, en comparación con la CsA, FK aumenta la incidencia de diabetes post-TC y los efectos nefrotóxicos, neurológicos y gastrointestinales.

Farmacocinética

Su administración puede ser oral e intravenosa. La velocidad de absorción disminuye en presencia de alimentos, sin embargo, la cantidad absorbida puede ser o no ser afectada, dependiendo del tipo de alimento ingerido. Existen grandes diferencias intra e interindividuales en su cinética por lo que la dosificación debe ser individualizada. Su concentración máxima se obtiene entre 1,5 y 2 horas de su administración por vía oral. Su biodisponibilidad es baja (20-25%) y su vida media oscila entre 8,5-17 horas. El 80% del fármaco se distribuye ampliamente por todo el organismo unido a los hematíes y el 98,9% a las proteínas plasmáticas, especialmente la albúmina. Las variaciones en el hematocrito y en las proteínas pueden modificar la fracción libre. Su metabolismo es fundamentalmente hepático, a través del citocromo P-450 y se elimina por la bilis. En caso de insuficiencia hepática es necesario su monitorización debido a un aumento en sus niveles plasmáticos y disminución del aclaramiento. Se elimina de forma activa (menos del 1%) por vía renal o fecal, por lo que no precisa modificar su dosis en caso de insuficiencia renal (a no ser que el fallo renal se atribuya al fármaco). De forma análoga a la CsA, aquellos fármacos que utilicen la vía del citocromo P-450 interaccionan con el FK.

Los CNIs perjudican directa e indirectamente la generación de células Treg. No solo afecta a su generación si no también a su capacidad supresora al interferir en la interacción NFAT-FoxP3. Los efectos en estas células son dosis y tiempo dependiente. Altas dosis, pero no bajas dosis, alteran su expresión génica¹³. Una proporción de NFAT reside constitutivamente en el núcleo de la mayoría de estas células Treg haciéndolas resistentes a bajas dosis de CNIs¹⁴. La combinación de IL-2 con CsA resulta en un incremento de Treg polarizando la IL-2 en su expansión y funcionalidad, evitando la conversión antígeno específica de las células T¹⁵.

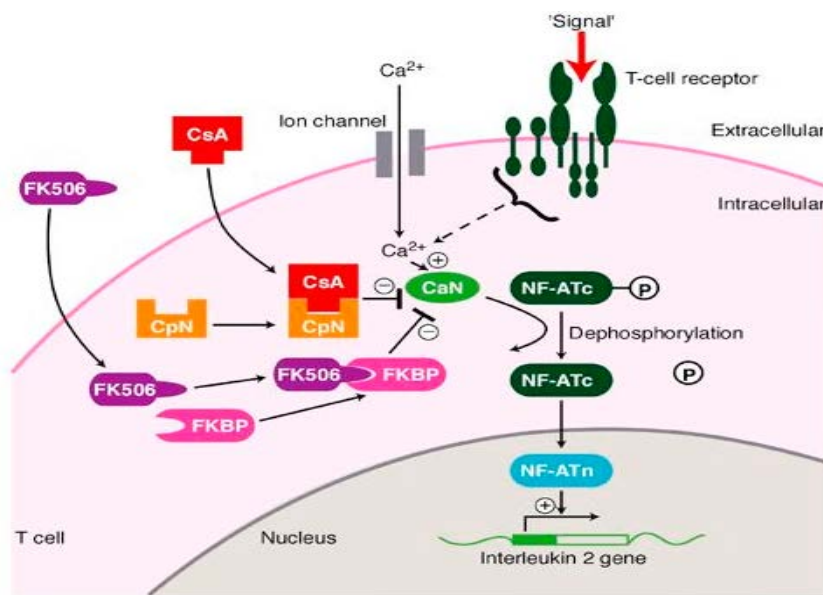


Figura 5. Mecanismo de acción de CsA y tacrolimus

Fuente: *Expert Reviews in Molecular Medicine 2000 Cambridge University Press*⁴

2.1.2. GLUCOCORTICOIDES

Fueron los primeros fármacos empleados como inmunosupresores debido a que poseen una potente acción antiinflamatoria y efectos inmunomoduladores específicos. 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 mientras que disminuyen linfocitos y monocitos. La expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase II en monocitos y macrófagos disminuye. Se disminuye la permeabilidad, la expresión de moléculas de adhesión y la síntesis de prostaglandinas en el endotelio vascular y la respuesta de los mastocitos a la IgE. Favorecen el balance de los linfocitos T hacia Th2 y células Treg¹⁶. Promueven la generación de células pTreg a partir de promover la expresión de una proteína (GILZ) y por

I. INTRODUCCIÓN

otros múltiples mecanismos como por ejemplo la modulación de la expresión local de citoquinas. La proteína GILZ favorece la expresión de FoxP3, pero la inhibición de esta proteína no inhibe completamente la expresión de FoxP3¹⁷. Referente a las células NK, estudios in vitro han determinado que disminuye tanto el número como su activación, además del receptor de activación NKG2D. No afectan a las células NKT¹⁸.

Sus efectos terapéuticos están mediados por dos tipos de mecanismos diferentes: genómicos y no genómicos. La vía genómica implica la unión a un receptor específico de localización citoplasmática, el receptor de glucocorticoides¹⁹. El GR se ubica en el citoplasma formando complejos heteroméricos con sistemas multiproteicos de chaperonas como hsp-90, hsp-70 y FKBP5117. Estas proteínas asociadas tienen gran importancia para la estabilización del receptor en el citoplasma, la afinidad por el ligando, la translocación nuclear y la recirculación intracelular. Una vez producida la interacción GC-cGCR, el complejo GR-chaperonas se disocia, desenmascarando un dominio de localización nuclear que induce la translocación al núcleo donde interacciona con el ADN en sitios conocidos como elementos de respuesta a glucocorticoides (ERGC), y de manera indirecta al interactuar con otros factores de transcripción regulando de ambas maneras la expresión de ciertos genes^{16,19}. La activación de estos ERGC induce dos mecanismos de acción genómica diferenciados: efecto inductor de genes antiinflamatorios (transactivación, ERGC+) y efecto represor de genes antiinflamatorios (transrepresión, ERGC-). En el primer caso el complejo (GC-cGCR) forma un homodímero que activa la transcripción y síntesis de proteínas antiinflamatorias como anexina-1 (lipocortina-1), 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, disminuyendo la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. Por el contrario, la interacción directa del complejo GC-cGCR con el ADN puede reprimir en lugar de inducir la expresión de genes proinflamatorios. Estos sitios se conocen como GRE negativos (ERGC-) y están descritos en escasos genes como el de proopiomelanocortina (POMC) o el promotor de Fas ligando (FasL). Por otra parte, los GC también pueden reprimir la expresión de dichos genes de forma indirecta, mediante interacciones proteicas con factores de transcripción nuclear (NFkB, NFAT, STAT5, AP1) o compitiendo con ellos mediante el secuestro de coactivadores necesarios para su función.

El mecanismo no genómico se inicia en la membrana y en el citoplasma con la interacción de GC con receptores que presentan una estructura relacionada con la del receptor nuclear clásico y llevan la producción de segundos mensajeros; receptores no clásicos que modifican la actividad de canales iónicos y sitios alostéricos de receptores a otros mensajeros químicos que producen diversos cambios en el funcionamiento celular.

El tratamiento prolongado tiene importantes efectos secundarios adversos entre los que se encuentran: aumento en la incidencia de infecciones, diabetogénesis, redistribución de los tejidos grasos, aterosclerosis, hipertensión, osteoporosis, miopatías, alteraciones de la cicatrización, edemas y producción de reacciones psicóticas²⁰.

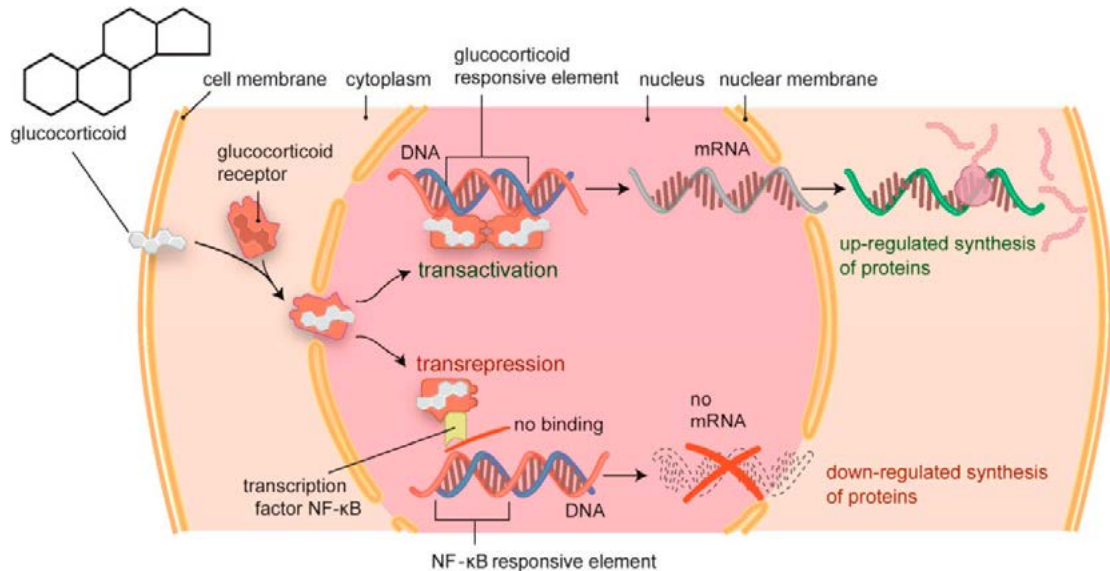


Figura 6. Mecanismo de acción Glucocorticoides

Fuente: Marlies C van der Goe et al. *The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases - positive and adverse effects.* *Arthritis Research & Therapy* 2014 16 (Suppl 2): S2²¹

2.2. INHIBIDORES DEL mTOR: EVEROLIMUS Y SIROLIMUS

El sirolimus (SRL) o rapamicina es un antibiótico macrólido producido por la fermentación natural de un hongo actinomiceto (*Streptomyces Hygroscopicus*) descubierto en la isla de Pascua (Rapa Nui) y presentado por primera vez en 1975 como fármaco antifúngico, demostrando posteriormente su actividad inmunosupresora in vitro. Everolimus (EVE) es un derivado semisintético de rapamicina o sirolimus. Pertenecen al grupo de inhibidores de la señal de proliferación.

En el citoplasma de la célula, el complejo sirolimus-fugifilina se une a unas proteínas mTOR (mammalian target of rapamycin). La proteína mTOR es una quinasa que transduce señales desde el receptor de IL-2 y otros receptores de factores de crecimiento hacia reguladores del ciclo celular.

I. INTRODUCCIÓN

Bloquean la señal de transducción requerida para la progresión de las células estimuladas por la IL-2 desde la fase G1 a la fase S, por tanto, suprimen la proliferación de las células T estimuladas por las citocinas. No afectan a la producción de IL-2. A diferencia de los CNI, bloquea la expansión de células T mediada por estímulos independientes del calcio²².

Son fármacos muy lipofílicos por lo que presentan una biodisponibilidad reducida. Se unen mayoritariamente a células sanguíneas, de manera que solo un 8% circula como fármaco libre. La eliminación depende del citocromo P450, fundamentalmente de la isoenzima CYP3A4 de la que son sustrato, pudiendo verse implicados en diferentes interacciones con fármacos inhibidores o inductores de esta isoenzima, al igual que los CNI.

Los efectos adversos de EVE son varios, produce hipercolesterolemia, leucopenia, hipertrigliceridemia, trombocitopenia y anemia, efectos reversibles que desaparecen al reducir la dosis y la exposición al fármaco. Potencian la nefrotoxicidad de los CNI²³.

En pacientes trasplantados renales, aquellos que tienen como terapia de mantenimiento SRL tienen 4-veces incremento de células Treg en circulación cuando comparas con pacientes que reciben como terapia de mantenimiento ciclosporina²⁴. Adicionalmente, el cambio de CNI a SRL produce un incremento de los niveles periféricos de células Treg. El efecto negativo de los CNI puede residir en la inhibición de la producción de IL-2, citocina imprescindible para la función y homeostasis de las células Treg. El SRL no sólo es capaz de expandir aquellas células nTreg, sino que células T CD4+CD25- naive se pueden diferenciar *in vitro* hacia células con fenotipo Tregi y expresión de FoxP3. Este efecto aún no está clarificado, además de ser reversible y requerir la presencia de manera continua de dosis bajas de SRL²⁵. Son selectivamente resistentes a la apoptosis inducida por rapamicina debido a una regulación al alza de genes anti-apoptóticos²⁶. Otro mecanismo es su capacidad de inhibir la maduración de las CDs, junto con un mantenimiento de la maduración de las Treg, favoreciendo el predominio de las Treg sobre las T efectoras. Estudios *in vitro* en ratones que carecen del complejo mTORC1 conduce a una disminución de células Treg y autoinmunidad sistémica, demostrando que mTORC1 es necesario para la adecuada activación de las células Treg²⁷.

Referente a las células NK el uso de SRL puede inhibir cambios en el repertorio de sus receptores y en su capacidad citotóxica²⁸.

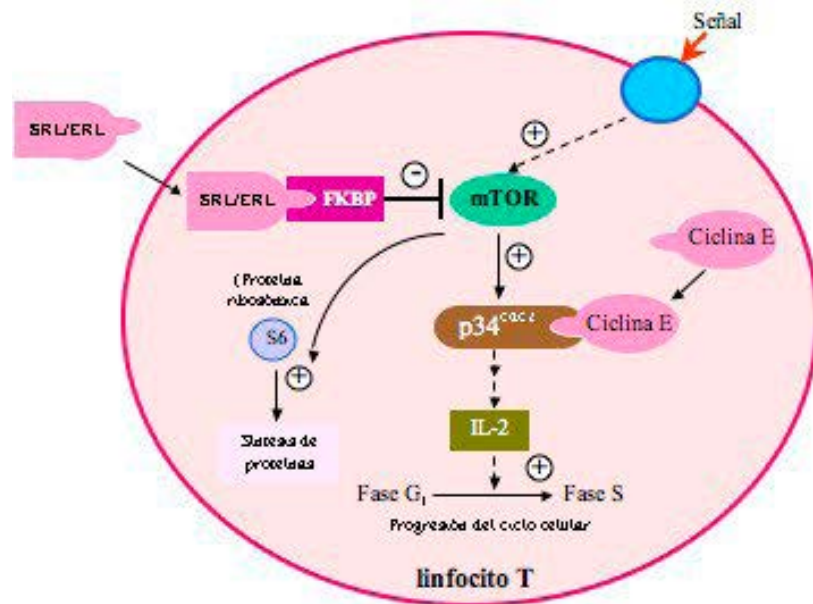


Figura 7. Mecanismo de acción de Everolimus y Sirolimus

(Fuente: *Expert reviews in molecular medicine 2000 Cambridge University Press*⁴)

2.3. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS: MICOFENOLATO DE MOFETIL

El Micofenolato de Mofetil (MMF) es un éster del ácido micofenólico (AMF) producido por especies de hongos del género *Penicillium*. A nivel hepático el MMF es 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). La IMPDH cataliza la conversión de la inosina monofosfato (IMP) en GMP. Existen dos isotipos. La IMPDH tipo I es predominante en células en reposo y la IMPDH II, enzima inducible que se expresa predominantemente en células activadas.

Dado que los linfocitos T y B carecen de mecanismo 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.

I. INTRODUCCIÓN

El efecto inhibitorio del AMF sobre la IMPDH provoca un agotamiento de los nucleótidos de guanina inhibiendo su síntesis de novo en linfocitos T y B, inhibiendo la proliferación de estos, impidiendo el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, suprimiendo la respuesta inmune celular y humoral⁹. Inhibe las fases iniciales de la proliferación y diferenciación de linfocitos B en lugar de la producción de anticuerpos por las células plasmáticas, sus efectos a largo plazo son útiles para atenuar el rechazo por un proceso crónico del injerto.

Inhibe la expresión de moléculas de adhesión y el reclutamiento de células inmunes en el foco de la inflamación, inhibición de la maduración de células dendríticas, la síntesis de citocinas, inducción de apoptosis en linfocitos T.

Sus principales efectos tóxicos son gastrointestinales, principalmente diarrea, hematológicos como la anemia y leucopenia y aumento de los procesos infecciosos de origen viral y fúngico²⁹.

En un estudio retrospectivo en el que se compara a pacientes que recibieron MMF o azatioprina, reportó que la incidencia de fallo crónico del injerto fue significativamente menor con el empleo de MMF³⁰.

El análisis de trasplantados renales con regímenes inmunosupresores estables han identificado valores elevados de células Treg en pacientes que reciben MMF *versus* everolimus³¹. Gregori S et al³² han demostrado en un estudio in vitro que la combinación del AMF junto con moléculas co-inhibidoras tales como PD-1 y CTLA4 produce un aumento de células Treg.

Respecto al efecto de MMF en las células NK Brehm et al³³ y Nagy et al³⁴ informaron una reducción significativa de IFN γ , IL-6 y otras citocinas secretadas por las células NK.

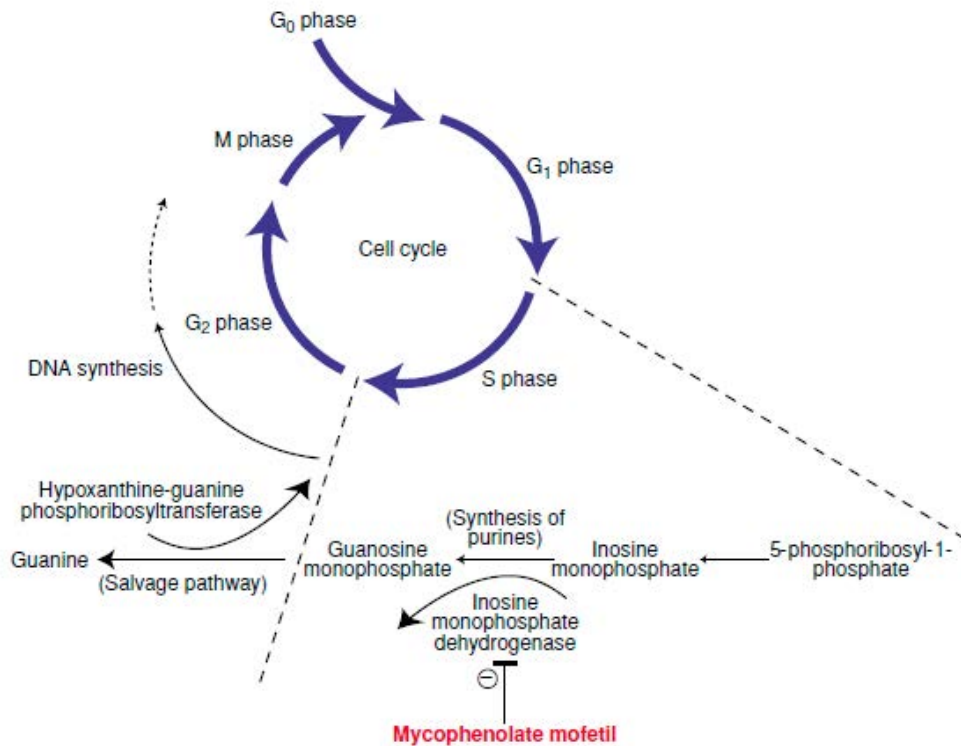


Figura 8. Mecanismo de acción Micofenolato de Mofetil

Fuente: *Expert Reviews in Molecular Medicine* © 2000 Cambridge University Press⁴

2.4. ANTICUERPOS

2.4.1. POLICLONALES: GLOBULINA ANTITIMOCÍTICA (ATG)

Es una preparación biológica de origen animal, conejos inmunizados con timocitos humanos, con una amplia especificidad contra antígenos expresados en los linfocitos, especialmente contra la cadena α y β del TCR. Se utiliza como terapia de inducción en pacientes con alto riesgo inmunológico, para retrasar la introducción de anticalcineurínicos, o para tratar rechazo celular corticorresistente. Depleciona los linfocitos T (CD4+ y CD8+) y células NK durante muchos meses, la recuperación del CD8+ es más rápida que la de CD4+³⁵. Entre los mecanismos del ATGAM incluye la apoptosis e inducción de anergia en los linfocitos T a bajas dosis, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) a dosis moderada, y la lisis linfocitaria mediada por complemento a altas dosis³⁶.

I. INTRODUCCIÓN

La inducción con ATG reduce el número de células Treg, pero menos que a células T convencionales, favoreciendo la alteración de la ratio Treg/Tconv. Además, la recuperación de las células Treg durante la reconstitución inmunológica es más rápida, contribuyendo a la elevación de la ratio Treg/Tconv³⁷. También modula la respuesta antigénica específica mediante la inducción de Treg de memoria, al igual que otras células T protectoras como linfocitos Th2 y células Tr1 productoras de IL-10³⁸. El efecto de cómo afecta la reducción de dosis de ATG³⁹ en las treg necesita ser estudiado en profundidad, debido a que se desconoce si se alcanzan concentraciones requeridas para inducir su generación.

2.4.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES

DAKLIZUMAB

Anticuerpo monoclonal inmunoglobulina IgG1 humanizado. El mecanismo de acción se desarrolla mediante la unión específica a la subunidad α (Tac/CD25) del receptor de interleucina-2 (IL-2R) de la superficie de los linfocitos T activados⁴⁰, impidiendo así la unión y actividad biológica de la IL-2, mediante un antagonismo competitivo, inhibiendo de esta forma la activación de los linfocitos. El IL-2R, está constituido por tres cadenas de proteínas transmembrana; α (CD25), β (CD122) y γ (CD132). El CD25 es específico para IL-2, CD122 forma parte del receptor de IL15 y CD132 es una cadena compartida por muchos receptores de citocinas⁴¹. En situación basal el heterodímero $\beta\gamma$ actúa como IL-2R de afinidad intermedia, aumentando su afinidad tras la unión de la subunidad α al unirse el linfocito. La acción bloqueadora de DAC inhibe la vía jak/STAT, previniendo los eventos de señalización intercelular desencadenados por la IL-2. Su acción antagonista puede ser revertida en presencia de dosis altas de IL-2, se ha sugerido que la expresión IL-2R de afinidad intermedia ($\beta\gamma$) podría actuar como vía alternativa en un intento del sistema por restaurar la homeostasis. Otros mecanismos inmunomoduladores son endocitosis del complejo DAC/IL-2R⁴², interfiriendo con la vía de señalización IL-15⁴³ e inhibición de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40L) y la síntesis de INF- γ ⁴⁴.

DAC tiene un perfil de toxicidad bajo al presentar poca inmunogenicidad y no induce la síntesis de anticuerpos clínicamente relevantes, no incrementa el número de infecciones oportunistas ni tumores.

DAC aumenta las CD56 NK^{high} por aumento de la biodisponibilidad de IL-2. Estas células NK suprimen la respuesta inmunológica acabando con células autólogas T activadas o células presentadoras de antígeno alogénicas⁴⁵.

BASILIXIMAB

Basiliximab (BAS) es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano (IgG1k) que actúa contra la cadena- α del IL-2R (antígeno CD25), el cual se expresa en la superficie de los linfocitos-T como respuesta a estímulos antigénicos. BAS se une específicamente y con gran afinidad (valor-KD 0,1 nM) al antígeno CD25 de los linfocitos-T activados que expresan el IL-2R, de gran afinidad. Esto impide la unión de la IL-2 al receptor, que es una señal crítica para la proliferación de las células T en la respuesta inmune celular implicada en el rechazo de órganos. El bloqueo completo y consistente del IL-2R se mantiene mientras los niveles séricos de basiliximab son superiores a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (normalmente hasta 4–6 semanas después de la administración). Cuando las concentraciones disminuyen por debajo de este nivel, la expresión del antígeno CD25 vuelve a los valores pretratamiento en 1–2 semanas.

Mehra MR⁴⁶ realizó un estudio multicéntrico doble ciego randomizado donde compararon BAS frente a placebo en pacientes TC. No se observaron diferencias en eventos adversos, infecciones ni rechazo en ambos grupos. Los pacientes con rechazo no aclaraban BAS de manera rápida o presentaban menor saturación de CD25 en comparación con pacientes libres de episodios de rechazo.

Mattei MF⁴⁷ comparó BAS frente a ATGAM en un ensayo clínico aleatorizado determinando que BAS presenta mejor tolerabilidad con similar eficacia, además de menor porcentaje de muerte asociado a infecciones.

Michel Carrier⁴⁸ comparó BAS frente a ATGAM en un ensayo clínico de no inferioridad indicando que BAS presenta valores mayores de CD3, CD4 y menores de NK, CD4/CD25 y CD8/CD25 que ATGAM. En el caso de ATGAM la linfopenia se mantiene desde el día 14 hasta los 3 meses. Además, BAS no muestra inferioridad en términos de incidencia de rechazo a los 6 meses.

Respecto al régimen de dosificación óptimo de BAS no existen estudios suficientes y aún debe ser determinado. La posología de BAS (2D de 20mg) se estableció originalmente en estudios en receptores de trasplante renal⁴⁹. Existen algunos estudios sobre el régimen de dosificación simplificado. En realidad, Verapras K et al,⁵⁰ sugieren que dicha pauta fue bien tolerada con una eficacia y seguridad favorables en 17 receptores cardíacos de bajo riesgo inmunológico que recibieron 2D de 10 mg (baja dosis). Dicha población de bajo riesgo no desarrolló un evento de rechazo a las dos semanas postrasplante, PRA<10% y un tiempo de isquemia menor a 18 horas. Branco⁵¹ evaluó la reducción de 2D de 20mg a 1D de 20mg (0+; 4+)

I. INTRODUCCIÓN

de manera similar a nuestro estudio con un tiempo libre de rechazo mayor para los pacientes que recibieron la pauta 2D.

En este trabajo se describe la cinética comparativa de 1D/2D, además de las variaciones clínicas, bioquímicas e inmunológicas producidas al simplificar 2D de BAS a una 1D en una cohorte de pacientes trasplantados cardíacos.

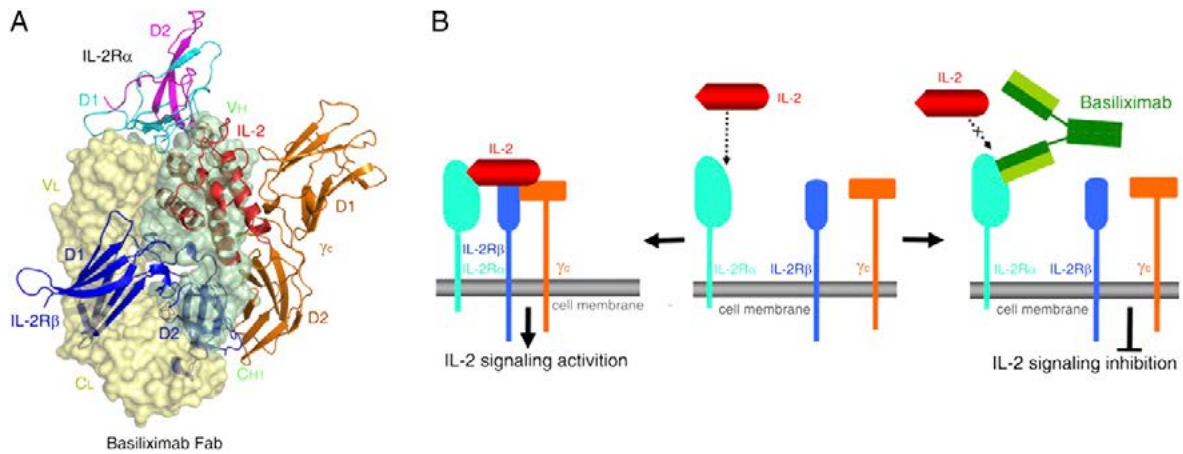


Figura 9. Estructura básica del bloqueo de IL-2 (basiliximab)

Fuente: Ding J et al *J Immunol.* 2010 Feb 1;184(3):1361-8⁵²

3. TRATAMIENTO INMUNOMODULADOR: GGIV

Las inmunoglobulinas son anticuerpos sintetizados por los linfocitos B, células plasmáticas que pueden reconocer un amplio espectro de determinantes antigénicos específicos, que constituyen la base de la respuesta inmune humoral. La estructura única de la molécula de inmunoglobulina asegura el amplio repertorio de especificidades de los anticuerpos. Los productos de inmunoglobulina intravenosa (GGIV) derivan del plasma humano agrupado de miles de donantes, lo que garantiza que estos preparados contienen una amplia diversidad de repertorio de anticuerpos con toda la gama de regiones variables (unión a antígeno) de anticuerpos en suero normal. Originalmente fueron usadas para el tratamiento de las inmunodeficiencias primarias y secundarias, actualmente se está incrementado su uso en el tratamiento de diferentes desórdenes inflamatorios y autoinmunes⁵³. La mayoría de las preparaciones GGIV consiste en una IgG intacta con una vida media de 3 semanas con trazas de IgA, CD4 y CD8 soluble, moléculas de HLA y ciertas citoquinas. El efecto bactericida y antiviral de la molécula de IgG depende del fragmento Fc. La porción Fc le permite interactuar con el receptor Fc (CD16) en los linfocitos CD19 y en otras células del sistema fagocítico, activación del complemento y aclaramiento de microorganismos.

Los mecanismos de acción de las GGIV son complejos, debido a que estas poseen una gran actividad inmunomoduladora, que se basa fundamentalmente en la modulación de la expresión de los receptores Fc, según el tipo celular y el estado de receptividad de la célula. Por esta razón, pueden ejercer efectos proinflamatorios y antiinflamatorios⁵⁴. Sus efectos biológicos se pueden dividir en aquellos dependientes de la porción Fc, los dependientes de la porción Fab, y los dependientes de ambas, Fc y Fab.

3.1. EFECTOS DEPENDIENTES DE FC

INHIBICIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Su capacidad de unión a los fragmentos C3b y C4b del complemento es una función específica de la región Fc de las moléculas de isotipo IgG. Esta función previene el depósito de fragmentos activos de C3 y C4 en los tejidos, lo que conlleva el bloqueo de la formación de la enzima convertasa C5 (C4b2a3b), previniendo de este modo el daño tisular mediado por el complemento. No está restringida a un solo isotipo de IgG.

I. INTRODUCCIÓN

En dermatomiositis el efecto beneficioso de la GGIV⁵⁵ se debe a la prevención de la deposición de fragmentos activos de C3 y C4 en células endoteliales en los capilares endomisiales, evitando la isquemia de fibras musculares y por tanto la debilidad muscular.

BLOQUEO O SATURACIÓN DE LOS RECEPTORES FC

Estos receptores permiten a las células del sistema inmune reconocer a los anticuerpos que se encuentran unidos a la superficie de microorganismos y de células infectadas, ayudando así a su reconocimiento y eliminación.

Este es el caso, por ejemplo, de las citopenias autoinmunes periféricas la GGIV satura los receptores Fc en monocitos y macrófagos, bloqueando la fagocitosis de los hematíes opsonizados por anticuerpos y conduciendo a un rápido incremento del número de plaquetas⁵⁶.

EXPANSIÓN DE CÉLULAS TREG (CD4+CD25+ FoxP3+)

La GGIV puede modular el sistema inmunológico mediante la expansión en número y potenciación de la función supresora de las células Treg. El mecanismo puede ser directo o indirecto a través del incremento de la producción de citoquinas o efectos en las CPA. Kessel et al⁵⁷ reportaron un incremento de la expresión intracelular de TGF- β , IL-10 y FoxP3 además de incrementar su función supresora. De Groot et al⁵⁸ mostraron que la molécula de IgG contiene regiones o epítomos llamados "Tregitopes" en la región Fc que son capaces de activar estas células Treg.

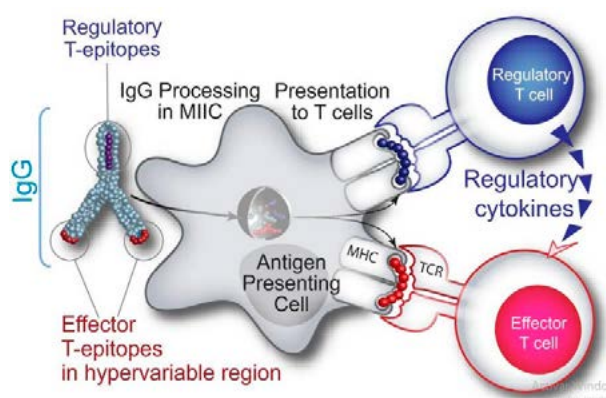


Figura 10. Mecanismo de acción GGIV en los linfocitos T

Fuente: Anne S. De Groot et al. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes" Blood. 2008 Oct 15; 112(8): 3303–3311⁵⁸

Las células dendríticas (CPA) internalizan pequeños péptidos de la porción Fc, conocidos como 'Tregitope', se unen a la molécula MHC II y son presentados a la célula Treg, activándose y suprimiendo el efecto de las células T efectoras

DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE MONOCITOS CD14+CD16+ PROINFLAMATORIOS

Los monocitos se clasifican en 2 subpoblaciones principales: CD14++CD16- (o clásicos) y los CD14+CD16++ (no-clásicos o proinflamatorios). Los monocitos CD14+CD16++ representan aproximadamente el 10% del total de monocitos en sangre y se caracterizan por la capacidad de producir citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-12.

En pacientes con CVID y XLA, Siedlar et al⁵⁹ observaron una reducción transitoria de monocitos proinflamatorios que regresaron a niveles basales después de la infusión de GGIV, además de la supresión de citoquinas proinflamatorias. Un posible mecanismo es la inducción de apoptosis a través de su unión y entrecruzamiento con CD32B. Otro posible mecanismo es la presencia de anticuerpos agonistas y antagonistas anti-CD95 que interaccionan con el CD16 incrementando la expresión de genes proapoptóticos.

3.2. EFECTOS DEPENDIENTES DE FAB

NEUTRALIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS Y/O INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTOS

La GGIV es capaz de interactuar específicamente con los determinantes idiotípicos de los autoanticuerpos, capacidad que le permite regular los clones de linfocitos B autorreactivos *in vivo*. La regulación de estos linfocitos autorreactivos neutraliza y bloquea la producción de autoanticuerpos⁶⁰.

ACTIVACIÓN O BLOQUEO FUNCIONAL DEL RECEPTOR DE MUERTE FAS (CD95)

Altzner et al demostraron⁶¹ que la GGIV puede inhibir o activar la muerte celular dependiente de caspasas al unirse al receptor Fas (CD95) de la membrana celular. En función del tipo celular y la dosis de IgG puede contener anticuerpos agonistas o antagonistas anti-CD95 favoreciendo o inhibiendo la muerte celular.

UNIÓN A LECTINAS

Von Gunten et al⁶² estudiaron el efecto de estos preparados en receptores tipo lectina (receptores del ácido siálico) expresados mayoritariamente en células del sistema inmune. Existen dos tipos de receptores:

- **Siglec-8:** expresados en eosinófilos, granulocitos y mastocitos que intervienen en la supervivencia/muerte. El efecto proapoptótico se incrementa en presencia de IL-5 y del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Este efecto podría resultar beneficioso en pacientes con hipereosinofilia en enfermedades alérgicas como la enfermedad de Churg-Strauss.
- **Siglec-9:** se expresa fundamentalmente en neutrófilos, granulocitos y monocitos. El efecto proapoptótico en neutrófilos se potencia en presencia de citoquinas proinflamatorias (GM-CSF, interferón IFN γ) e implica la liberación de especies reactivas de oxígeno y la activación de vías dependientes e independientes de caspasas.

3.3. EFECTOS DEPENDIENTES DE FAB Y FC

REGULACIÓN DE LOS LINFOCITOS B

Diversos mecanismos se han descrito para explicar el efecto que producen en los linfocitos B, desde interacción con receptores en la superficie del linfocito B hasta un estado de anergia.

Proulx et al⁶³ han demostrado que la presentación antigénica está inhibida por un mecanismo Fc γ R independiente. Este efecto inhibitorio ocurre por mecanismos intracelulares no aclarados mediante los cuales la GGIV es internalizada en el interior del linfocito B e interactúa con proteínas intracelulares involucradas en la presentación antigénica.

De Grandmont et al⁶⁴ indicaron que, bajo condiciones específicas de activación del linfocito B como la activación de CD40, la GGIV puede promover la diferenciación hacia células plasmáticas secretoras de IgG, aumentando la secreción de inmunoglobulinas reactivas frente a autoanticuerpos.

Mitrevski et al⁵³ observaron que la GGIV produce un estado de anergia en los linfocitos B bloqueando BAFF y APRIL, además de suprimir la vía de señalización PI3K.

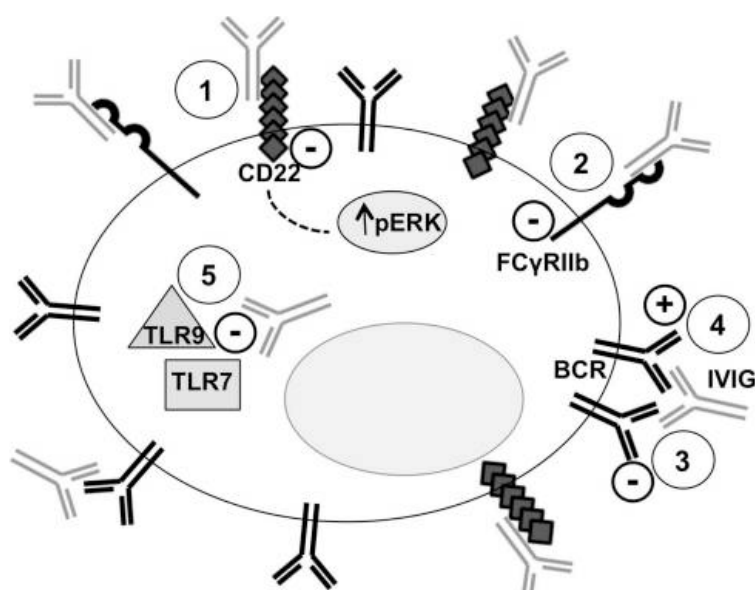


Figura 11. Interacción GGIV con los linfocitos B

Fuente. Mitrevski M et al Intravenous Immunoglobulin and Immunomodulation of B-Cell - in vitro and in vivo Effects. *Front Immunol.* 2015 Jan 22;6:4⁵³. Se han propuesto cinco mecanismos: **1 y 2:** Unión a receptores inhibidores en la superficie del LB (CD22 y FcγRIIb) **3** Unión antidiotípica con el BCR transmite señales negativas y modula la producción de autoanticuerpos. **4.** Patrones de superantígeno estimula la activación del LB **5.** Inhibición de TLR-9 y TLR7 y de producción de citoquinas proinflamatorias inducidas por TLR

DISMINUCIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T

Existe bastante controversia en referencia cuál es el mecanismo (interacción con receptores Fc del propio linfocito T o indirectamente con receptores Fc de CPA) y la molécula responsable del efecto (molécula intacta de IgG, alguna fracción de esta o moléculas accesorias).

Diversos estudios^{65,66} demostraron la capacidad que tienen estos preparados para suprimir la proliferación de linfocitos T en respuesta a mitógenos y la inhibición de la producción de citocinas.

Mac Millan⁶⁵ et al sugieren que tanto la molécula completa como los fragmentos de F(ab')₂ inhibieron directamente la proliferación de linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8, y que el mecanismo por el cual se produce se debe al bloqueo o interacción con receptores de superficie.

Aubin⁶⁶ et al demostraron que la GGIV suprime la activación de los linfocitos T mediante la alteración en la capacidad de las CPA de presentar antígenos mediante un nuevo mecanismo de internalización de las moléculas IgG (este mecanismo es independiente del receptor

I. INTRODUCCIÓN

FcγRIIb). Este mecanismo supone que la GGIV es sometida a un proceso de proteólisis en el interior de la CPA, en el cual se producen péptidos con la suficiente afinidad como para competir con los péptidos de los antígenos que son expuestos por las moléculas HLA de clase II. Este mecanismo podría explicar el conocido efecto antiinflamatorio de la GGIV en las enfermedades autoinmunes.

Trepanier et al⁶⁷ explicaron el efecto antiinflamatorio por el bloqueo de importantes moléculas en la superficie del linfocito TCD8+, como el TCR.

SUPRESIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS, INDUCTOR DE ANTAGONISTA DE ESTAS Y MODULACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Abe Y et al⁶⁸ han demostrado que la GGIV tiene capacidad de suprimir la producción de algunos mediadores de la inflamación (IL-1; TNF- α , TNF- β), por células mononucleares de sangre periférica estimuladas con superantígenos bacterianos o lipopolisacáridos, incrementando en paralelo la producción del antagonista del receptor de la IL-1, molécula antiinflamatoria que contrarresta los efectos de la IL-1. También se ha confirmado que producen disminución de moléculas de adhesión celular (ICAM-1, ELAM), aumento de quimiocinas y diversos genes inmunorreguladores⁶⁹.

MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Diferentes estudios^{70,71} han indicado que la GGIV inhibe la maduración de las CDs in vitro y anulan su capacidad para secretar IL-12 a la vez que mejora la producción de IL-10. Inhibe la expresión de moléculas coestimuladoras CD40, CD80, B7 y CD86 impidiendo así la activación de la célula T. Además, bloquea la diferenciación de los monocitos a CDs. En relación con los efectos de la GGIV (multímeros y dímeros de IgG) en CDs y células NK, se ha demostrado que facilita el reconocimiento de las células dendríticas maduras por las células NK vía receptor FcγRIII, facilitando la activación y producción de IFN γ de estas últimas. Además, predomina el fenotipo NK ^{bright}, con una expresión reducida de CD16, Nkp30, receptores KIR (CD158a, CD158b) y un aumento de expresión de quimiocinas CCR7 y CXCR3⁷¹.

Disminución diferenciación y producción moléculas coestimuladoras DC

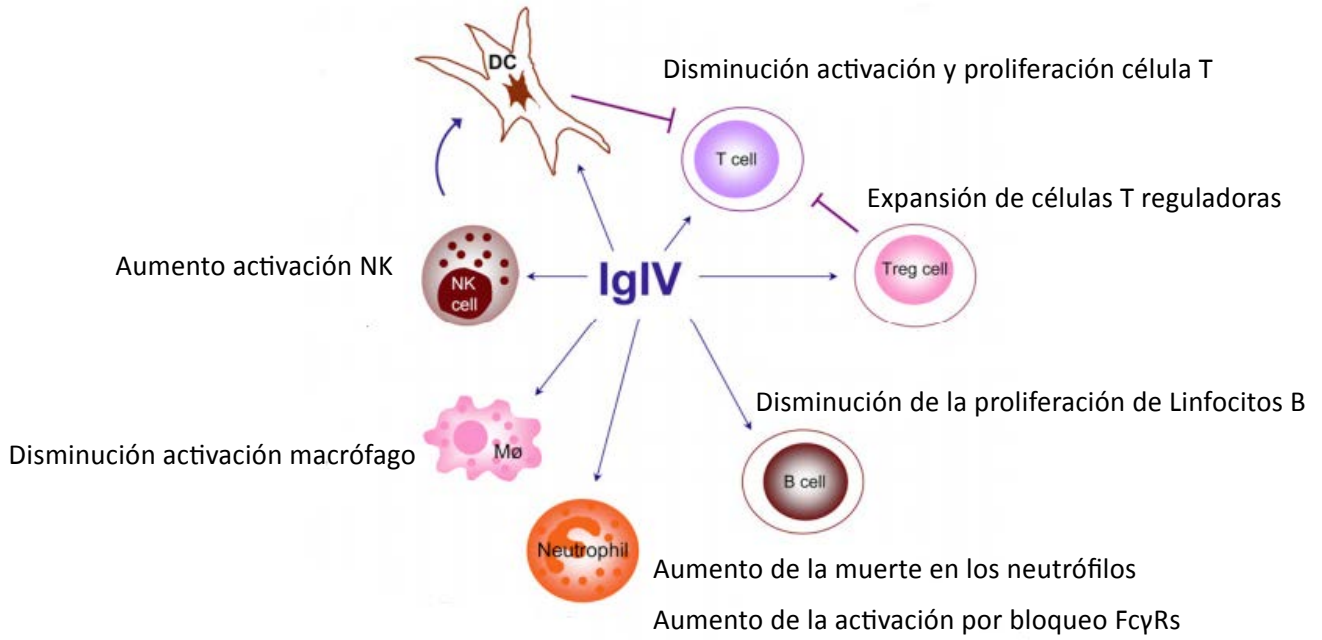


Figura 12. Mecanismo de acción GGIV

Fuente: Ballou M The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Feb;127(2):315-23⁵⁶

Tabla 1. *Conceptos claves GGIV*

Conceptos Clave GGIV

- La molécula de IgG podría ser la molécula natural inmunomoduladora del sistema inmune.
- Modula un número de caminos efectores, incluido el bloqueo del receptor Fc, neutralización, incremento en el aclaramiento de autoanticuerpos, disminución de la producción de citoquinas, bloqueo de moléculas de adherencia, modulación de apoptosis, inhibe la captación de componentes del complemento en los tejidos diana, modulación de la apoptosis y regulación de la función inmunitaria de linfocitos B y T.
- Regulación inmune a través del receptor FcγRIIb en macrófagos es un mecanismo de acción importante para la modulación de GGIV.
- El dominio Fc siálico de la molécula de IgG es importante en este mecanismo de acción y está mediado por el receptor DC-SIGN en la activación del receptor FcγRIIb.
- Las propiedades inmunoregulatoras de la GGIV en las enfermedades mediadas por células T debe ser potenciada por las Treg.
Implicaciones terapéuticas:
- Es una importante modalidad para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y desórdenes inflamatorios.
- Conociendo qué componente/s de la molécula de IgG son responsables del efecto inmunomodulador se puede facilitar el diseño de otras moléculas inmunomoduladoras específicas mediante ingeniería molecular.

Fuente: Ballou M: The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. J Allergy Clin Immunol. 2011 Feb;127(2):315-23⁵⁶

4. CÉLULAS T REGULADORAS

4.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

La evidencia de la inmunorregulación mediada por células TCD4+, especialmente en el trasplante, ha existido durante más de dos décadas. En diversos modelos de roedores se ha demostrado que la transferencia de células T frente a un determinado antígeno suprime la producción de anticuerpos frente a ese antígeno^{72,73,74}. A diferencia de los anteriores estudios donde las células supresoras fueron inicialmente identificadas dentro de la población de células TCD8+, en 1995 el grupo de Sakaguchi mostraron un modelo adoptivo de transferencia de autoinmunidad donde la supresión residía exclusivamente en las células TCD4+CD25+ (células Treg), y que dichas células derivan del timo a partir de células T convencionales y expresan el TCR $\alpha\beta$ ⁷⁵. La importancia crítica es indiscutible, sobre todo teniendo en cuenta la reciente demostración realizada en ratones adultos que sufrieron un ataque autoinmune masivo después de la depleción de dichas células Treg⁷⁶. La participación de estas células en la mayoría de los modelos de tolerancia aloespecífica está ahora bien documentada^{77,78,79}.

4.2. POBLACIONES DE CÉLULAS TREG

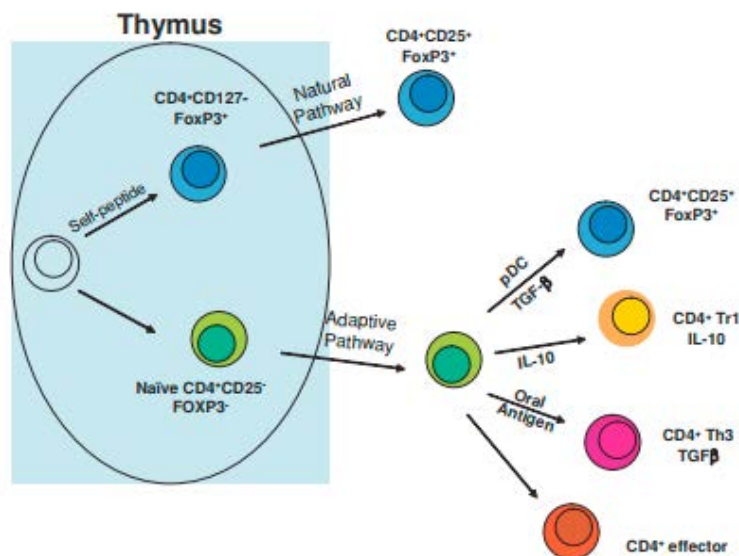


Figura 13. Origen de los diferentes Treg (naturales y adaptativas)

S. M. Kang CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Transplantation⁸⁰: Progress, Challenges and Prospects. *American Journal of Transplantation* 2007; 7: 1457–1463

4.2.1. NATURALES (NAIVE, ACTIVADAS)

Las células Treg naturales (**tTreg**, nTreg) se originan en el timo, y se ha demostrado que ejercen un papel fundamental en el control de enfermedades autoinmunitarias, además de suprimir una variedad de respuestas patológicas inflamatorias en un amplio espectro de antígenos no propios, pero no es antígeno específico. Representan del 3 al 10% del total de células TCD4+. Están menos implicadas en la respuesta inflamatoria que se desencadena en el rechazo que las células treg adaptativas o inducibles (**pTreg**, Tregi). Es posible que su desarrollo en el timo se debe a un reconocimiento intermedio de antígenos propios evitando posteriormente el proceso de selección negativa. Expresan constitutivamente una variedad de moléculas de superficie asociadas comúnmente a células T activadas o de memoria, como son el CD25, CD45RB low, CD62L, CD103, antígeno leucocitario T citotóxico (CTLA-4) ó CD152, proteína coestimuladora (ICOS), HLA clase II y el gen relacionado con la familia del receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR). En humanos, la mejor manera de seleccionarlas sería mediante la expresión elevada de CD25⁸¹. La molécula de FoxP3, en presencia de la combinación de CD4 y CD25, ha sido muy utilizada para identificar las Treg. Esta molécula está mayormente expresada en CD4+CD25+ TCR αβ, aunque muchas células que lo expresan no expresan el receptor de superficie CD25 y algunas son CD8+⁸². El hecho de que FoxP3 sea un factor de transcripción lo imposibilita para ser utilizado como marcador para seleccionar células vivas y realizar estudios funcionales. Se han buscado otras moléculas adicionales que permitan identificar mejor a las células Treg. Recientemente se ha descrito que la ausencia o baja expresión del receptor para el receptor de IL-7 (CD127) en los TCD4+ se correlaciona muy bien con la expresión de FoxP3 y con la actividad inmunorreguladora⁸³.

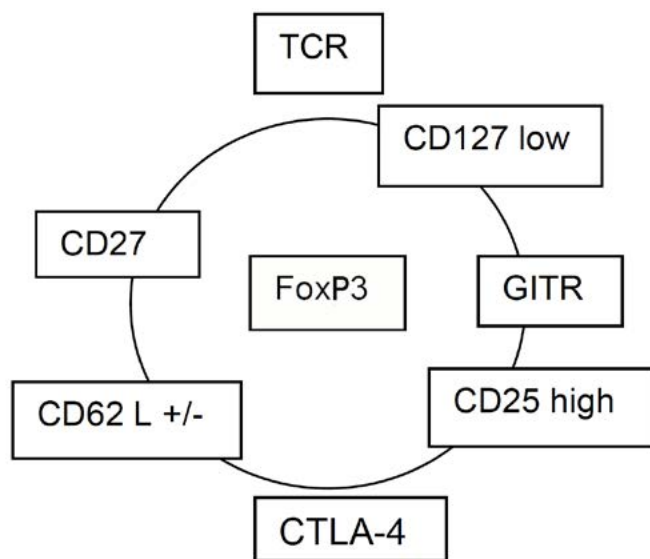


Figura 14. Marcadores fenotípicos tTreg

4. CÉLULAS T REGULADORAS

Las células tTreg se diferencian en dos diferentes estados de activación según la expresión del receptor de ICOS: naive (CD45RA⁺FoxP3⁺, ICOS⁺ o -) y activado/diferenciado (CD45RA⁻CD45RO⁺FoxP3⁺, ICOS⁺). Las tTreg ICOS⁺ ejercen su efecto supresor mediante IL-10 mientras que las células tTreg ICOS⁻ lo ejercen mediante TGF- β .

Tabla 2. Porcentaje de FoxP3 en células que expresan CD127.

	Median % FoxP3	Rango
CD4 ⁺ CD127 ^{lo/-}	41.5	22.8–58.5
CD4 ⁺ CD127 ⁺	2.5	1.2–5.0
CD4 ⁺ CD127 ^{lo/-} CD25 ⁺	86.6	67.4–93.6
CD4 ⁺ CD127 ^{lo/-} CD25 ⁻	25.5	14.8–39.5
CD4 ⁺ CD127 ⁺ CD25 ⁺	22.9	11.5–39.2
CD4 ⁺ CD127 ⁺ CD25 ⁻	1.8	1.0–3.3

Fuente: Weihong Liu et al. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 203, No. 7, July 10, 2006⁸³

4.2.2. CÉLULAS TREG INDUCIBLES TREGI (PTREG)

Son inducidas en sangre periférica por la conversión de células T inmaduras CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁻ (TH0) en presencia de un microambiente particular. Aunque presentan el mismo fenotipo y función que las tTreg, la duración de la expresión de FoxP3 es transitoria y de menor intensidad.

Las **células Tr1** pueden ser generadas a partir de linfocitos CD4 naive por estimulación antigénica en presencia de IL-10 tanto *in vivo* como *in vitro*,⁸⁴. No expresan de manera constitutivamente FoxP3. No se ha descrito ningún marcador que las diferencien. Secretan IL-10 y TGF- β , los cuales han demostrado ser críticos para su efecto inmunosupresor, aunque también pueden secretar IL-2, IL-5 e interferón γ (INF- γ). Suprimen las respuestas de células T naïve y memoria, así como la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas proinflamatorias por las CPAs. Pueden actuar en fases tardías para detener la respuesta inmunitaria y mantener la tolerancia.

Las **células Th3** son similares a las Tr1 en muchas características, son células TCD4⁺CD25⁺ inducidas por antígenos orales en los nódulos linfáticos mesentéricos, las cuales fabrican TGF- β y cantidades variables de IL-4 e IL-10⁸⁵. La citocina TGF- β ⁸⁶ es capaz de convertir células

I. INTRODUCCIÓN

T CD4+CD25–naive en células T CD4+CD25+ induciendo la expresión de FoxP3. Debido a que expresan FoxP3, no se pueden diferenciar a través de marcadores de las nTreg. Actúan primordialmente en células T efectoras.

Las células reguladoras **CD8+CD28-** expresan el ARNm de FoxP3. Actúan primordialmente en CPA⁸⁷. La exposición de estas células Treg con monocitos y CPA resulta en la expresión en las mismas de genes que codifican para ILT3 e ILT4, receptores pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas presentes en células NK. La expresión de estos motivos da lugar a la inhibición de la activación del factor nuclear-kB (NF-kB) y a una capacidad reducida de las CPA a transcribir moléculas coestimuladoras dependientes de NF-kB, dotándolas así de capacidad reguladora.

Tabla 3. Diferentes tipos de pTreg

Tipo de pTreg	Tr1	Th3	CD8+CD28-
Origen	TCD4CD25-naive	TCD4CD25-naive	CD8+
Fenotipo	CD4CD25(low)FoxP3- CD45RB (low)	CD4CD25(low) FoxP3+CD45RB (low)	
Localización	Sangre Periférica	Nódulos linfáticos mesentéricos	Sangre Periférica
Citoquinas que producen	IL-10 TGF-β	TGF-β IL-4, IL-10	
Función	-Supresión LT naive -Disminución expresión moléculas coestimuladoras en CPAs	-Supresión LT efectoras -Ayudan a los LB en la producción de IgA	-Disminución expresión moléculas coestimuladoras en CPAs

4.3. MOLÉCULAS ESENCIALES PARA EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS TREG

- **FoxP3:** Es el factor de transcripción derivado del gen forkhead (fkh) en *Drosophila melanogaster*. Pertenece a factores de transcripción con dominio “forkhead” relacionados con la diferenciación embrionaria. Es el principal regulador del desarrollo y función de las células Treg. Sobreexpresa CD25 y otras moléculas de superficie tales como CTLA-4 y GITR, mientras que disminuye la producción de IL-2, IFN-γ e IL-4.

- **IL-2:** Es conocido que tiene múltiples dianas, incluido los linfocitos CD4+ y CD8+, linfocitos B y las células NK, presenta funciones pleiotrópicas con efectos contradictorios. Facilita la diferenciación de linfocitos TCD4+ hacia Th1 y Th2 y la expansión de linfocitos TCD8+ de memoria y células NK. Por el contrario, promueve la apoptosis de células T activadas, impide la diferenciación de las células T naive hacia células Th17, y favorece la diferenciación de células T naive a células Treg. En resumen, las células T activadas no reguladoras contribuyen al mantenimiento, expansión y activación de células nTreg, mediante un mecanismo de feedback negativo.

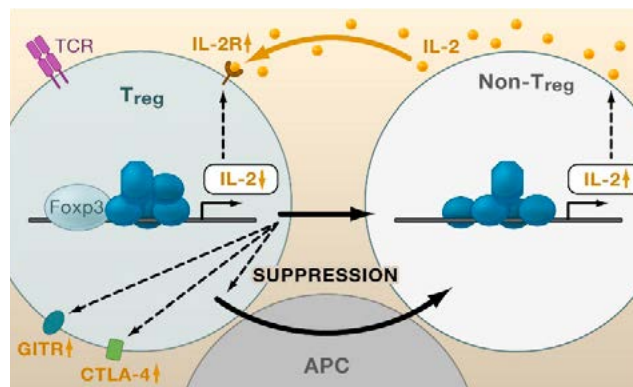


Figura 15. Función de la IL-2 en la homeostasis inmunológica

Fuente: Shimon Sakaguchi et al. *Regulatory T cells and immune tolerance. Cell. 2008 May 30;133(5):775-87*⁸⁸

4.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS CÉLULAS TREG

Las células Treg expresan TCR (reconoce antígenos propios y no propios) y son capaces de suprimir tanto la respuesta inmune específica adaptativa como la innata. Se dividen en 2 categorías: directo (dependiente de contacto celular y mediado por citoquinas) e indirecto (mediado por CPAs). Se han sugerido varios mecanismos de actuación ^{89,90,91}:

- Secreción de citoquinas inhibitorias IL-10, IL-35 y TGF- β , que actúan en las células T convencionales y células dendríticas:
 - IL-10 produce disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras en las CPAs y reduce la producción de citocinas proinflamatorias, además inhibe la producción de IL-2 y del factor de necrosis tumoral (TNF- α) en las células TCD4+⁹².

I. INTRODUCCIÓN

- TGF- β disminuye la función de las CPAs⁹³ e inhibe la proliferación y secreción de citocinas en las células T.
- La expresión de moléculas de membrana inhibitorias: CTLA4 y LAG-3 (activación del gen 3 linfocitario) puede suprimir la actividad de las CPAs consecuentemente la función de las células T efectoras.
- Secreción de perforina y granzima B que producen muerte celular en linfocitos TCD4+ y TCD8+⁹⁴.
 - Compiten con las células T efectoras activadas por la IL-2 para mantener sus niveles a nivel periférico, de manera que al secuestrar IL-2 impiden la activación de la célula T efectora ^{95,96}.
- La expresión de CTLA-4 en las células nTreg es capaz de inducir la expresión de indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y disminuir la expresión de CD80/CD86 en CDs induciendo un estado tolerogénico. La expresión de este enzima tiene efectos inmunomoduladores debido a múltiples mecanismos incluidos la depleción de triptófano (necesario para las funciones normales del linfocito T) y la producción de catabolitos derivados de triptófano que producen anergia en los linfocitos T⁹⁷.
- Conversión de células T efectoras en células pTreg, fenómeno denominado “tolerancia infecciosa”: Los mecanismos moleculares implicados en esta conversión requieren de más estudios, recientemente se ha observado que puede deberse a la inducción de al menos de cuatro enzimas que consumen aminoácidos esenciales por parte de las células Treg antígeno-específicas. Se reduce la señalización de la diana de rapamicina (mTOR) lo cual provoca la expresión de FoxP3 en las células T naïve que depende también del TCR y del sinergismo con TGF- β ^{98,99}.
- TGF- β produce modulación a la baja de este receptor (NKG2D) en las células NK¹⁰⁰.

4. CÉLULAS T REGULADORAS

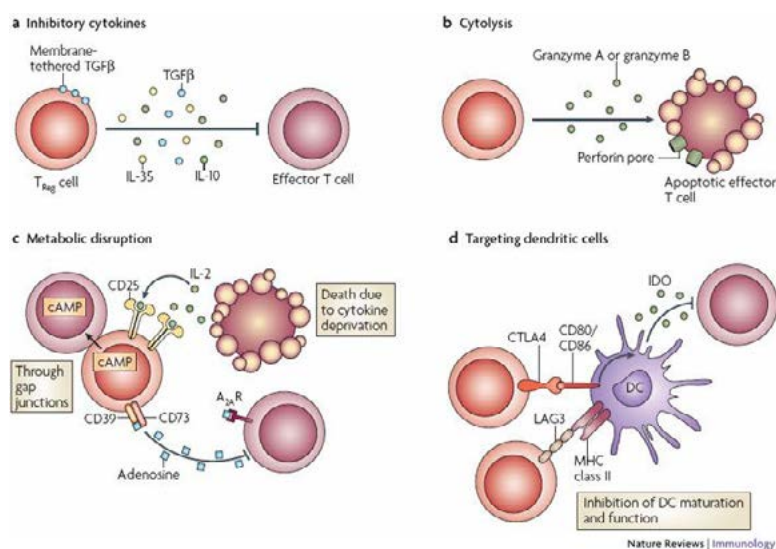


Figura 16. Mecanismo de acción células Treg

Fuente: Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 523-32⁹¹

4.5. CÉLULAS TREG EN TRASPLANTES

La tolerancia en el trasplante se define como un estado de no respuesta de los linfocitos T y B donantes específicos con función del injerto preservada con un mínimo uso crónico o no de inmunosupresores.

La tolerancia inmunológica está mediada por mecanismos centrales y periféricos. La tolerancia central conlleva la eliminación de linfocitos T intratímicos que reconocen autoantígenos expresados en el timo con alta avidéz. La observación del grupo de Medawar et al¹⁰¹ confirmaron que la tolerancia central frente a aloantígenos puede ser llevada a cabo por la inducción total o mixta de quimerismo hematopoyético. En este escenario las células del donante originadas, espontáneamente por el injerto o infundidas por protocolos terapéuticos (trasplante de médula ósea, TMO, trasplante de células madre hematopoyéticas, HSCT) pueden migrar al timo del receptor e inducir eliminación de células T reactivas del donante¹⁰².

La tolerancia periférica a antígenos propios y no propios es llevada a cabo por la eliminación y anergia de células T activadas. El encuentro de células T naive con CPA, principalmente células dendríticas, modula su diferenciación hacia células T efectoras y reguladoras. Estas células T efectoras pueden ser controladas por células Treg modulando la inmunogenicidad de las CPA y el microambiente local de citoquinas.

I. INTRODUCCIÓN

Las células T pueden reconocer los aloantígenos mediante dos vías. En la primera las CPAs del donante migran a los ganglios linfáticos y presentan en su superficie moléculas alógenas del MHC sin procesar a los linfocitos T del receptor (vía directa). En la vía indirecta las CPA del receptor pueden migrar al injerto donde capturan y procesan los péptidos derivados de las moléculas alógenas del MHC. Estos péptidos se ensamblan a moléculas propias de MHC. El reconocimiento directo es el responsable de rechazo agudo mientras que el indirecto puede ser responsable tanto de rechazo agudo como de rechazo crónico o pérdida a largo plazo del injerto. La vía de reconocimiento indirecto es la ruta dominante de inmunorregulación utilizada por Treg. La evidencia se ha observado de estudios de tolerancia oral¹⁰³, donde la administración oral de alopéptidos y células que expresan un tipo de MHC clase I del donante favorece la disminución de la respuesta aloespecífica. En otro estudio se demostró que pacientes que han recibido transfusiones sanguíneas previas al trasplante renal y que comparten al menos un MHC de clase II con el donante presentan una mejor evolución¹⁰⁴.

La primera evidencia del control de la alorespuesta por parte de las Treg se encontró en un modelo de trasplante cardíaco en ratas con tolerancia a largo plazo y donde se observó la capacidad que tenían estas células de transferir tolerancia⁷⁴.¹⁰⁵ Sakaguchi y Hara M¹⁰⁶ sugirieron que las células Treg implicadas en tolerancia requieren de IL10 a la vez que TGF- β *in vivo*, y responden a aloantígenos mediante la vía indirecta de reconocimiento. Además, en ausencia de Treg, varios tratamientos por sí solos no son capaces de inducir tolerancia al aloinjerto¹⁰⁷.

Después del trasplante la presencia continua de aloantígenos del donante procedentes del injerto promueve la generación de Treg; por tanto, el injerto es esencial para el mantenimiento de la tolerancia *in vivo*¹⁰⁸.

En estudios *in vivo*, se ha demostrado que las **Treg aloantígeno-específicas** son capaces de prevenir el rechazo iniciado por las células TCD4+ tanto en trasplante de órganos¹⁰⁵ como de médula ósea¹⁰⁹ así como prevenir la enfermedad de injerto contra huésped¹¹⁰.

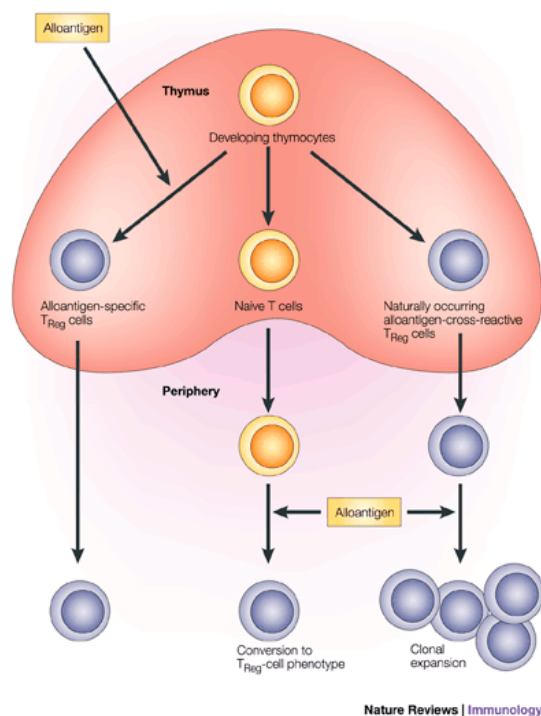


Figura 17. Origen de células Treg aloantígeno específicas

Fuente: Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):199-210. ⁷⁸ (www.nature.com/reviews/immunol)

Las células Treg antígeno específicas se pueden generar por selección positiva en el timo, por expansión clonal en la periferia de tTreg que presentan reactividad cruzada a aloantígenos y por conversión de células T naive

4.6. INMUNOTERAPIA BASADA EN CÉLULAS TREG

Recientemente varios protocolos se están usando para el desarrollo de células Treg. Se pueden obtener mediante conversión *ex vivo* de células T naive en células iTreg cultivando estas células CD25⁻ con TGF- β o mediante la combinación de vitamina D asociado a dexametasona. También se pueden expandir *in vivo* con el uso de varias drogas inmunomoduladoras como anticuerpos monoclonales, MMF junto con la forma activa de vitamina D e IL-10, regímenes terapéuticos donde se introduce más tarde el CNI, etc.

Jorge-gallego valle et al¹¹¹ demostraron la generación *in vitro* de células iTreg a partir de células T Naive de timocitos humanos en presencia de IL-2, TGF- β a través de la activación CD3/CD28. Indicaron que la estabilidad del fenotipo de las células Treg depende del microambiente, el estado epigenético de las células estimuladas y de la degradación de FoxP3.

4.7. CÉLULAS TREG E INFECCIÓN

Las células Treg producen una disminución de la respuesta inmunitaria hacia patógenos lo cual puede provocar una respuesta inadecuada frente a la infección. Sin embargo, estas células pueden ayudar a limitar el daño tisular causado por respuestas inmunológicas intensas contra patógenos. Las condiciones creadas por los agentes infecciosos (TGF- β , IL-2) favorecen la llegada y supervivencia de las células Treg¹¹². En el caso de pacientes trasplantados con riesgo de infección y/o enfermedad por CMV puede ser útil con el objetivo de promover una reconstitución inmune más rápida. Se están investigando estrategias terapéuticas para abolir o incrementar la respuesta de las células Treg en función de si interesa aclarar el patógeno o evitar los daños colaterales en el hospedador. Si interesa aclarar el patógeno se emplean sustancias que bloquean moléculas esenciales para su función reguladora tales como CTLA-4, TGF- β y IL-10 o incrementar su respuesta mediante citoquinas que favorecen su supervivencia (IL-2 y TGF- β) para evitar el daño excesivo en el hospedador¹¹³.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Diferentes anticuerpos monoclonales anti-CD25 inducen cambios en porcentaje y número absoluto en diferentes poblaciones linfocitarias en sangre periférica que podrían relacionarse con complicaciones como rechazo, enfermedad vascular del injerto e infecciones tras el trasplante cardiaco (TC).

La administración de GGIV induce cambios en la distribución y fenotipo de las poblaciones linfocitarias en distintas enfermedades inmunológicas y podrían relacionarse con un efecto inmunomodulador.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de diferentes tratamientos inmunomoduladores sobre la activación y/o diferenciación de distintas poblaciones leucocitarias mediante el análisis de diferentes marcadores por citometría de flujo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir los cambios inducidos en el número y porcentaje de distintas subpoblaciones linfocitarias de dos regímenes distintos de BAS. Evaluar si la administración de una sola dosis se relaciona con aumento de las complicaciones post-TC
2. Estudiar los efectos del anticuerpo monoclonal quimérico basiliximab (BAS) y humanizado (DAC) sobre la cinética de expresión de CD25 en linfocitos TCD4+ y TCD8+ en TC y su correlación con complicaciones clínicas.
3. Evaluar las modificaciones inmunofenotípicas de linfocitos T, B y NK en sangre periférica inducidas por el tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas (GGIV).

III. MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES

Los aspectos éticos-legales planteados en este trabajo fueron sometidos a aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM). Así mismo, a todos los pacientes y controles se les solicitó un consentimiento informado para participar en el estudio con la finalidad de garantizar su confidencialidad.

El proyecto se plantea como un estudio prospectivo para la caracterización inmunológica y clínica de TC que reciben por protocolo habitual 2D o 1D de BAS y de pacientes sometidos a terapia biológica con inmunoglobulina intravenosa (GGIV).

De 66 TC se analizaron aquellos con supervivencia mayor de 30 días y que recibieron como tratamiento de inducción BAS (n=57). Las características clínicas y demográficas de los pacientes se resumen en la tabla 12 (resultados). Las causas de mortalidad y tiempo de supervivencia se resumen en la tabla 27 (resultados).

Todos los pacientes recibieron como terapia inducción BAS 1D (n=39) o 2D de (n=19), micofenolato de mofetil (1000mg) y metilprednisolona (500mg). Pacientes con mayor riesgo de fracaso renal recibieron 2D de BAS para retrasar el uso del anticalcineurínico. A las 48 horas del trasplante se introdujo la triple terapia de mantenimiento que incluía un fármaco inhibidor de la calcineurina, tacrolimus (n= 64) o ciclosporina (n=2), micofenolato de mofetil y prednisona. Tres pacientes hicieron cambio a inhibidores de mTOR (sirolimus, everolimus). Como tratamiento profiláctico inmediatamente después del trasplante se administró ganciclovir IV 5mg/Kg c/12h durante 14 días, cefazolina 2 gr c/8h el primer día post-TC, trimetoprim-sulfametoxazol 160/800 mg vía oral (VO)/12 h dos veces por semana durante el primer año, nistatina 500.000 U VO/8h y norfloxacin 400mg VO/12h a lo largo del primer mes posterior

III. MATERIALES Y MÉTODOS

al trasplante e itraconazol en aquellos individuos con riesgo de aspergilosis. En pacientes con discordancia CMV (serología CMV R-/D+) se administró como tratamiento profiláctico inmunoglobulinas hiperinmunes anti-CMV (CMVIG, ®Cytotec, Biostest).

En caso de pacientes CMV seropositivos, se considera la ampliación del material genético (QNAT) el método de elección para la monitorización de la infección/ enfermedad por CMV¹¹⁴, siendo útil como indicador de reactivación o reinfección durante el seguimiento.

Se realizó un estudio observacional prospectivo en 5 pacientes que recibieron GGIV no específica a altas dosis (2g/kg/mes) y en 5 que recibieron inmunoglobulinas hiperinmunes anti-CMV (150 mg/kg). También se realizó un estudio de cohortes prospectivo para valorar las diferencias inmunológicas en 25 pacientes trasplantados cardiacos que recibieron GGIV a dosis sustitutivas (100mg/kg) por hipogammaglobulinemia secundaria e infecciones severas.

Aunque la tesis se centra en TC de manera excepcional se añadieron una pequeña serie de pacientes con enfermedades autoinmunes (dermatomiositis) debido a que no se pudieron conseguir pacientes que requiriesen GGIV a altas dosis en trasplante durante la fase de estudio de la tesis.

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

De cada paciente se recogieron 5ml en tubos tratados con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para realizar el conteo de células sanguíneas: leucocitos totales y subpoblaciones, neutrófilos y linfocitos de forma absoluta y porcentual.

También se recogieron 10 ml en tubos con heparina de sodio a partir de los cuales se obtuvo el plasma de la muestra mediante técnicas de centrifugación (3500 revoluciones por minuto durante cinco minutos, rpm), para la determinación de distintos parámetros bioquímicos e inmunológicos.

En el estudio 1 las muestras del punto basal (pretrasplante) fueron obtenidas cuando el paciente entró en lista de espera de TC (punto 0), o en el periodo 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). Las variables clínicas tuvieron un seguimiento de 1 año.

En el estudio 3 las muestras de sangre se recogieron antes de la infusión de GGIV (pre infusional t1), inmediatamente tras la infusión o tres días después (t2) y antes de la siguiente dosis (t3) en el caso de las inmunoglobulinas hiperinmune anti-CMV y altas dosis. En el estudio de TC tratados con basiliximab y GGIV se recogieron como pre el valor basal (antes del trasplante, t1) y como post el punto de estudio más próximo a la infusión (después del trasplante,t2).

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE POBLACIONES LINFOCITARIAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado¹¹⁵. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos parámetros son: tamaño (FSC), la complejidad de su núcleo y citoplasma (SSC) y de parámetros relacionados con características antigénicas de cada célula. La combinación de marcadores linfocitarios recibe el nombre de inmunofenotipo.

Para la caracterización fenotípica de las subpoblaciones linfocitarias se realizó el marcaje de las moléculas de superficie en sangre total (tubos con EDTA), con diferentes anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos conjugados con fluorocromo. Para la caracterización de los linfocitos B (tubo 3 tabla 8), previo a la tinción se realizó un lavado de la sangre con PBS (5 minutos a 550g= 1700 rpm) para eliminar la IgM sérica, ya que podría interferir en el marcaje de la IgM de membrana por inhibición competitiva del AcMo anti-IgM.

Se utilizó 100µl (200 µl en el caso de maduración B) de sangre total a la que se añadió 5µl del correspondiente AcMo. En la (tabla 8) se detalla el panel de AcMo empleados para la identificación de cada subpoblación. El AcMo que se utilizó para CD25 (clon 4E3) no interfiere con BAS y fue capaz de teñir correctamente la población CD25 independientemente de la concentración de BAS¹¹⁶. Después de la incubación se añadieron 2 ml de solución de lisis (Facslysing solution®, Becton Dickinson, San José, CA) para lisar la serie roja, y se incubaron las muestras en oscuridad durante 15 minutos más. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar 3 lavados para eliminar el exceso de AcMo sin fijar (lavar con 2 ml de PBS+ centrifugación a

III. MATERIALES Y MÉTODOS

500g=1600 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente). La preparación de PBS se realizó tras la disolución de 1 sobre de PBS P3813, Sigma, St. Louis®. MO. EE. UU en agua destilada csp 1L. Después de los 3 lavados el precipitado celular fue resuspendido en 0,5ml de PBS antes de adquirir las células en el citómetro de flujo.

Tabla 8. Caracterización inmunofenotípica de TC y pacientes tratados con GGIV

Fluorocromos

Tubo	FITC	PE	PERCP	PB	APC	Subpoblación de estudio
1	IgG1k	IgG2ak	IgG1k	IgG1	IgG1k	Control Isotípico
2	CD56	CD16		CD3	CD19	TBNK
3	CD27	IgD	CD19		IgM	Maduración B
4	HLA DR	CD38	CD14		CD8	Activación T
5	CD127	CD25	CD4	CD3	CD8	T reguladoras

FITC: isocianato de fluoresceína, PE: ficoeritrina, PerCP: proteína clorofila peridina; APC: alofocianina. Todos los anticuerpos de Macs Miltenyi excepto CD3 (PB), CD8 (APC), CD19 (PerCP) de Cytognos; IgD (PE), CD27 (FITC); IgM (APC); CD38; HLA-DR que son de BD; CD127 (e-Biosciences)

4. ADQUISICIÓN DE MUESTRAS

La calibración, compensación y adquisición de los datos se realizó en la unidad de CMF del pabellón experimental de la Fundación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón. El citómetro de flujo Gallius (Gallius Beckman Coulter, CA USA) está dotado de tres láseres con el que se pueden medir hasta 12 parámetros.

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

Para un análisis óptimo se adquirieron como mínimo 50000 eventos en la región de linfocitos, determinada por tamaño y complejidad (FSC vs. SSC).

5. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES

Las diferentes subpoblaciones están expresadas en porcentaje y referidas al total de linfocitos o a su población madre anterior. En la figura (18,19, 20 y 21) se muestran las estrategias de análisis realizadas para la caracterización de cada subpoblación.

Los porcentajes de células B de memoria sin cambio de isotipo y con cambio de isotipo están referidos a CD27+; en el caso de células B naive a CD19+. Se identificaron las subpoblaciones de células B de memoria a partir de CD19+/CD27+ (memoria SCI= CD19+/CD27+IgD+IgM+, memoria CCI= CD19+/CD27+IgD-IgM-) y a la población naive a partir de CD19+/CD27- (CD19+/CD27-/IgM+IgD+). Los linfocitos T activados se determinaron a partir de la población CD8+ mediante la expresión de HLA-DR, CD38. Las células Treg en los linfocitos CD4+ mediante la expresión de alta intensidad de CD25 (IL-2 α) y de baja intensidad de CD127 (CD4⁺CD25^{++/high} CD127^{-/low}). Se utilizó CD127 porque se correlaciona muy bien con la expresión de FoxP3 y con la actividad inmunoreguladora⁸³, además permite la separación específica de células nTreg viables por citometría de flujo para su utilización en estudios funcionales. Este marcador convierte al marcaje de membrana en una alternativa al marcaje intracelular de FoxP3, que representa la desventaja de requerir la permeabilización de las células para su identificación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Los archivos obtenidos tras la adquisición de la muestra (archivos LMD) se analizaron mediante el programa de análisis: Kaluza Flow Cytometry Analysis Software[®] (Beckman Coulter). Los Dot-Plots e histogramas presentados en esta tesis proceden de este programa.

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS CÉLULAS TREG

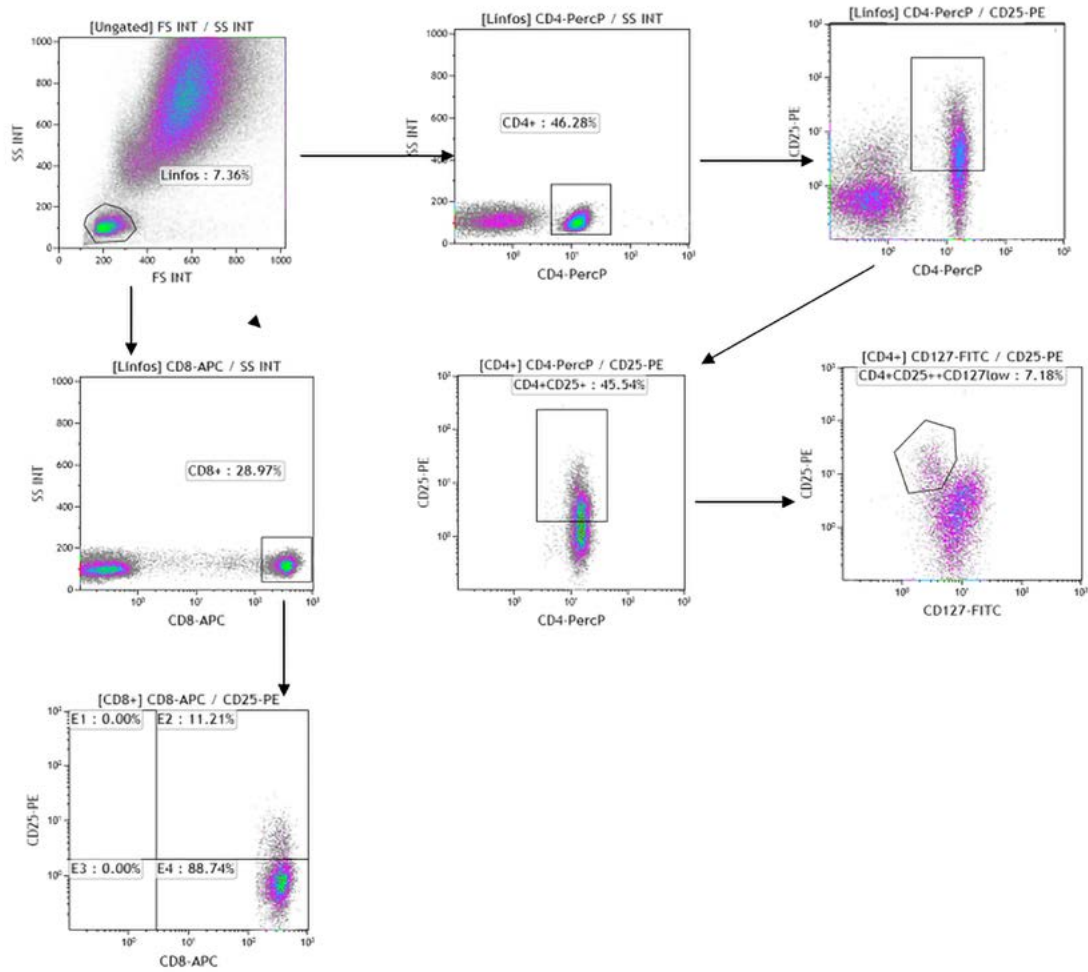


Figura 18. Estrategia de análisis células Treg $CD4^+CD25^{+/high}CD127^{-/low}$.

Las células $CD4^+CD25^+$ (activadas) incluyen tanto las células $CD25^{low}$ y $high$. Las células Treg se pueden identificar con la alta expresión de $CD25^+$ ($IL-2\alpha$) y baja expresión de $CD127$

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS LINFOCITOS T Y MONOCITOS

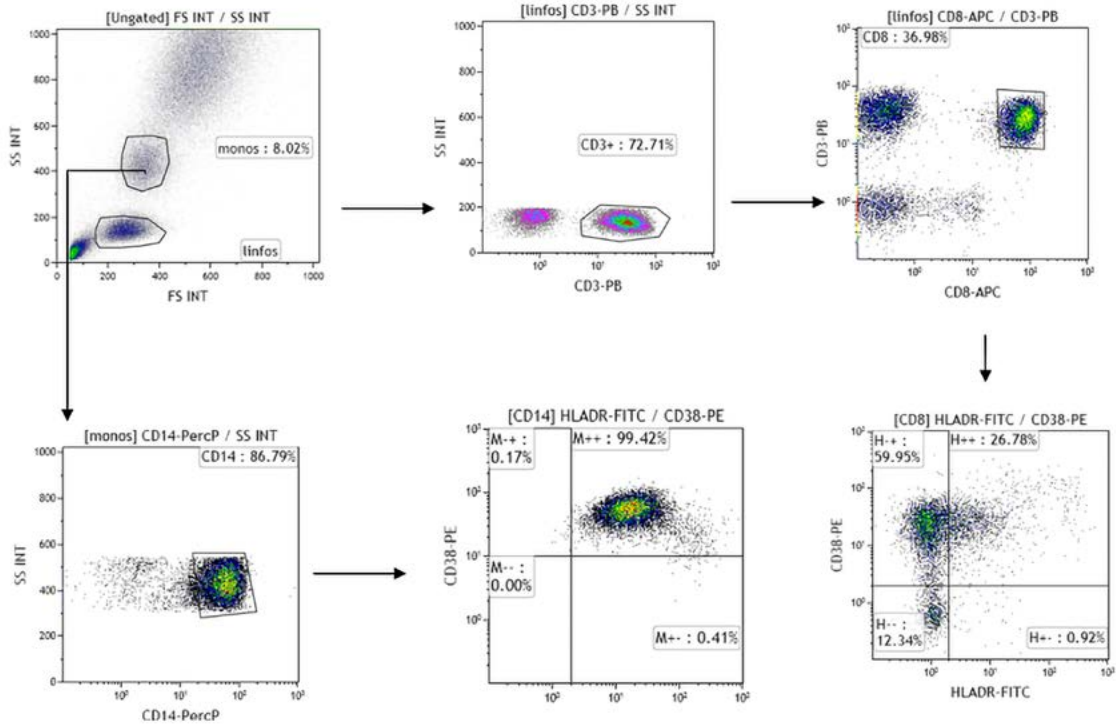


Figura 19. Estrategia de análisis activación linfocitos TCD8+ y monocitos

Los monocitos se identificaron CD3-CD14+ (se engloban tanto los CD16+ como los CD16-) y por tamaño y complejidad. Los CD8+ proceden de CD3+ CD8+. La activación en ambas poblaciones mediante la expresión de HLA-DR y CD38

III. MATERIALES Y MÉTODOS

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS MADURACIÓN LB

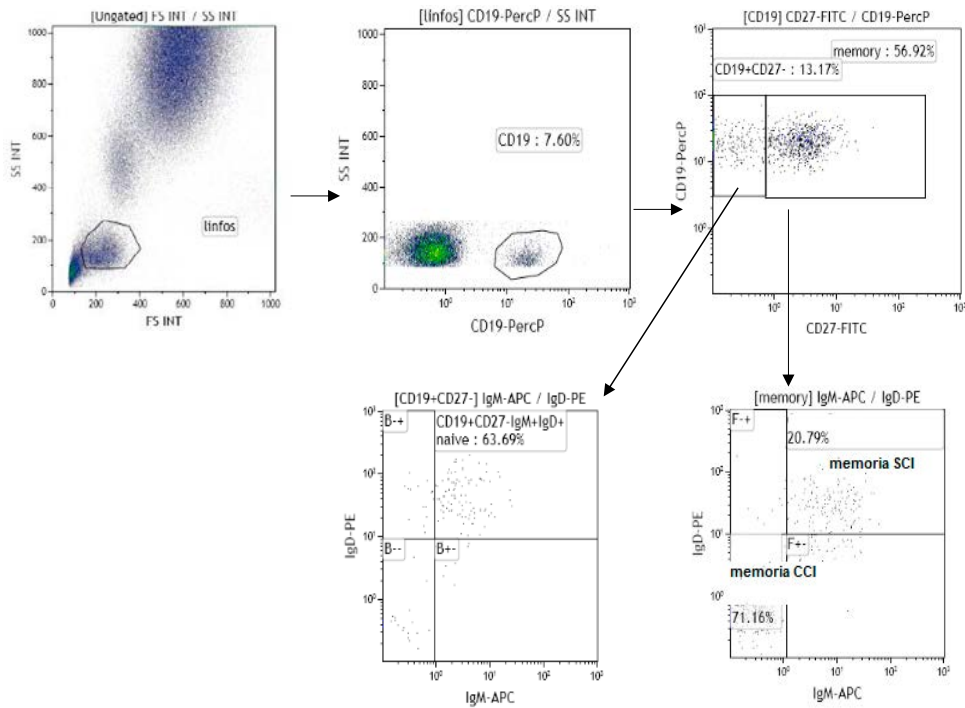


Figura 20. Estrategia de análisis maduración linfocitos B

Identificación de las subpoblaciones B memoria a partir de CD19+CD27+ (memoria SCI=CD19+/CD27+IgD+IgM+, memoria CCI=CD19+/CD27+IgD-IgM-). Identificación de la población B Naïve a partir de la región CD19+CD27- (CD19+/CD27-/IgM+IgD+)

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS TBNK

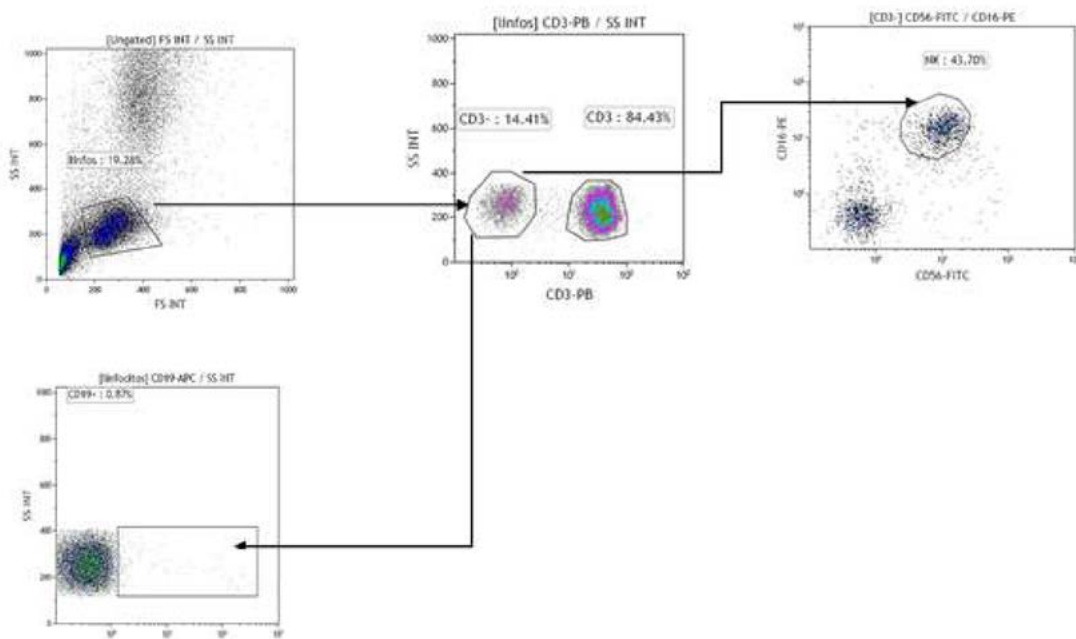


Figura 21. Estrategia de análisis TBNK

Las células T se identificaron con el marcador CD3+, las células B con CD19+ y las células NK (CD3-CD16+/56+)

6. PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y OTROS PARÁMETROS

6.1. PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

En el estudio de caracterización inmunológica y clínica de pacientes trasplantados cardíacos que reciben 2D vs. 1D de BAS se incluyeron determinaciones de rutina realizadas en el laboratorio de Inmunología (IgG, IgA e IgM, C3, C4 y PCR). También se recogieron valores de rutina del laboratorio de bioquímica (creatinina, albúmina, urea, proteínas totales, concentración de inmunosupresores en sangre).

La determinación de diferentes isotipos de inmunoglobulinas y complemento se realiza por nefelometría y la de PCR por turbidimetría.

La **inmunonefelometría y turbidimetría** tienen su base en una reacción inmunológica. La inmunonefelometría mide el aumento de la intensidad de la luz dispersada por los inmunocomplejos generados. La detección de la dispersión se realiza a 90° respecto a la emisión. En el caso de la **inmunoturbidimetría** se mide la reducción de la intensidad de la luz transmitida a 180° por la formación de inmunocomplejos.

- **Determinación cuantitativa en suero sanguíneo de factor del complemento C3, C4, IgG, IgA e IgM:** mediante ensayo nefelométrico cinético, midiendo la tasa de incremento de la dispersión de la luz de las partículas suspendidas en solución como resultado de la formación de complejos durante la reacción antígeno-anticuerpo.

Se utilizó el test Sistemas inmunoquímicos IMMAGE® de Beckman Coulter Ireland, Inc., Mervue Business Park, Mervue, Galway, Ireland.

- **Determinación en suero sanguíneo de proteína C reactiva (PCR),** mediante ensayo inmunoturbidimétrico potenciado con partículas. La PCR humana se aglutina con partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-PCR¹¹⁷. El precipitado se determina mediante turbidimetría en un analizador automático de tipo COBAS c 711 (Roche).

6.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

La determinación de proteínas totales¹¹⁸, albúmina¹¹⁹, creatinina¹²⁰ y urea¹²¹ se realiza mediante técnica de espectrofotometría de absorción molecular en un analizador automático de tipo COBASc 711 (Roche).

La determinación de fármacos se realizó mediante técnicas inmunoquímicas cuantitativas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo:

La técnica del enzoinmunoanálisis (EIA)¹²² utiliza las propiedades catalíticas de las enzimas para detectar y cuantificar las reacciones inmunológicas, midiendo así la actividad del enzima marcador. Son susceptibles de marcar tanto antígenos como anticuerpos. Tras la formación del inmunocomplejo, se añade un sustrato que es catalizado por el enzima transformándolo en un compuesto coloreado lo que permite la medida de la actividad enzimática con un espectrofotómetro. Para la determinación de MMF se utilizó test “Emit 2000 Mycophenolic Acid Assay” de Dade Behring Inc, Milton Keynes, United Kingdom.

El inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA)¹¹⁵ es un inmunoensayo competitivo en el que un antígeno marcado con un trazador (fluoresceína) se disputa, con el antígeno presente en la muestra, la unión del anticuerpo específico. Implica que cuanto mayor sea la concentración de antígeno (sustancia a medir) en la muestra, menor será la polarización detectada debido a que existirán menos uniones anticuerpo-antígeno-trazador. Para la determinación en sangre total de ciclosporina A se utilizó mediante tecnología FPIA el test “cyclosporine monoclonal whole Blood” de Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany.

El inmunoensayo por micropartículas (MEIA)¹²² es una técnica de inmunoensayo no competitivo que utiliza el aislamiento de complejos antígeno/anticuerpo en una superficie de fase sólida de pequeñas esferas denominadas micropartículas. La relación entre la emisión de fluorescencia y la concentración del analito a medir es directamente proporcional. Para la determinación de tacrolimus se utilizó mediante tecnología MEIA el test “IMx Tacrolimus II” de Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany.

Se ha utilizado la **determinación de leucocitos totales, linfocitos y neutrófilos** en sangre total (tubos EDTA), mediante citometría de flujo y cámara de recuento STKS. Coulter LH 750 (Beckman-Coulter).

Mediante la tecnología VCS, basada en la medida del volumen (impedancia), conductividad celular (relación núcleo/citoplasma) y dispersión laser (Scatter) en función de la granulación celular, se lleva a cabo la identificación de distintas subpoblaciones leucocitarias de linfocitos y neutrófilos.

6.3. OTROS PARÁMETROS

6.3.1. DURACIÓN DE SUPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS T

Amlot determinó la actividad biológica del anti-CD25⁴⁹ como la diferencia entre la última supresión completa de CD25 y la recuperación de valores basales, observando una correlación entre la dosis y la actividad biológica (a mayor dosis mayor duración del efecto biológico). Kovarik en trasplantados renales¹²³ estimó esa duración como el tiempo que las concentraciones de BAS están por encima de un valor umbral ($\geq 0,2\mu\text{g}/\text{ml}$) y coinciden con la supresión completa de CD25 ($\leq 3\%$ CD25+TCD4+).

La duración de la supresión completa de CD25 en este estudio se determinó utilizando la cinética de expresión de CD25 en los linfocitos TCD4+ por citometría (figuras 36 y 37). Se calculó como la diferencia de días desde la fecha del trasplante hasta el último punto de estudio con $\leq 3\%$ CD25+ en los linfocitos TCD4+¹²³.

6.3.2. RECUPERACIÓN DE EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS T

Amlot⁴⁹ y Kovarik¹²³ observaron que cuando las concentraciones plasmáticas de BAS estaban por encima de un umbral determinado se correlaciona con la supresión de expresión de CD25, de modo que una vez que las concentraciones están por debajo de ese umbral la expresión de CD25 recupera el valor basal en 1-2 semanas.

Para el cálculo de la media de días de recuperación de expresión de CD25 en los linfocitos T se tuvo en cuenta el punto de estudio donde el porcentaje o número absoluto fue similar al valor previo al trasplante.

7. BIOPSIAS ENDOMIOCÁRDICAS

Se realizan biopsias programadas seriadas, sobre todo durante el primer año del trasplante. Se realizan según el protocolo del centro: cada semana (durante el primer mes), cada 2 semanas (del primer al tercer mes), cada mes hasta el 6 mes, luego cada 3 meses hasta el año y luego anual, salvo que haya algún criterio de sospecha de rechazo. Se realizan según el protocolo clásico de Stanford y se informan según la clasificación renovada de la ISHLT. La realización de biopsias endomiocárdicas continúa siendo el “gold standard” de diagnóstico de rechazo.

En grado 0R se incluyeron biopsias sin alteraciones significativas (SAS) y con cambios mínimos (CM).

Tabla 9. ISHLT Grado de estandarización de las biopsias cardiacas

2004	1990
Grado 0 No rechazo	Grado 0 No rechazo
Grado 1R, medio. Infiltrado intersticial y/o perivascular con uno o más focos de daño miocítico	Grado 1, medio Infiltrado focal intersticial y/o perivascular A-Focal infiltrado difuso sin daño miocítico asociado B-Difuso infiltrado difuso sin daño miocítico
Grado 2R, moderado Dos o más focos de infiltrados asociados a daño miocítico	Grado 2, moderado (focal) un foco de infiltrado asociado a daño miocítico edema±hemorragia±vasculitis
Grado 3R, severo. Infiltrado difuso con daño miocito multifocal ±edema±hemorragia±vasculitis	Grado 3, moderado A-Focal infiltrado multifocal con daño miocítico B-Difuso infiltrado difuso con daño miocítico Grado 4, severo Infiltrado difuso polimorfo con extensivo daño miocito±±edema±hemorragia±vasculitis

Se considera rechazo celular agudo el daño miocítico acompañado con edema junto con hemorragia y vasculitis¹²⁴

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 10. Criterios diagnósticos ISHLT para rechazo mediado por Anticuerpos (AMR)

2004	1990
AMR 0	
Negativo para rechazo mediado por anticuerpos	
AMR 1	Rechazo Humoral
Positivo para AMR	(Inmunofluorescencia positiva, vasculitis o edema severo en ausencia de infiltrado celular) registrar como información adicional requerida
Encuentros histológicos de AMR.	
Inmunofluorescencia positiva o tinción de inmunoperoxidasa para AMR (CD68 positivo, C4d)	
<i>PAMR 0 Ausencia de P</i>	
<i>PAMR 1(H+) Indica la presencia histológica</i>	
<i>PAMR 1(I+) tinción histológica C4d (+C3d o CD68) pero no evidencia de PAMR</i>	
<i>PAMR2 hallazgo histológico e inmunopatológico positivo</i>	
<i>PAMR3 forma más severa de PAMR donde hemorragia y edema se encuentra asociada al principal hallazgo histológico</i>	

Los pacientes con biopsias catalogadas con 1R se clasificaron en dos grupos:

- $50\% \geq 1R$ cuando más de un 50% del grupo de biopsias estaban clasificadas como grado 1R o mayor.
- $50\% < 1R$ cuando más de un 50% de biopsias estaban clasificadas con grado 0R.

8. ANTICUERPOS CITOTÓXICOS

La determinación de anticuerpos anti-HLA se realizó en el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. Los anticuerpos anti-HLA de los pacientes incluidos en lista de espera de trasplante y de los pacientes ya trasplantados se realizaron cada 3 meses o cada vez que el paciente recibió una transfusión o presentó un episodio de rechazo. Se realizaron por dos técnicas: citotoxicidad mediada por anticuerpos y por citometría de flujo (Luminex®).

En el caso de la citotoxicidad mediada por anticuerpos el suero del receptor en el pre-trasplante se enfrenta con las células del potencial donante (un panel que sea representativo de la población, preferiblemente entre 30-50 donantes distintos) a la concentración celular adecuada, observando si se produce la lisis de las células mediada por complemento obteniéndose el PRA (panel reactive activity)¹²⁵.

La técnica de Luminex® detecta la presencia de anticuerpos anti-HLA mediante el uso de anticuerpos frente a inmunoglobulinas humanas conjugados a fluorocromos, sin necesidad de que el complemento se fije. El empleo de fluorescencia hace a esta técnica mucho más sensible que la de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) clásica. Esta técnica nos permite detectar la especificidad antigénica y además cuantifica la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) a la que reacciona¹²⁶.

En el caso de pacientes trasplantados se mide la aparición de anticuerpos anti-HLA específicos contra alguno de los antígenos del donante (anticuerpos específicos de donante [DSA]). Este es uno de los criterios, junto con los datos histológicos de la biopsia, para el diagnóstico del rechazo mediado por anticuerpos o rechazo humoral (agudo o crónico).

9. DEFINICIÓN DE EVENTO INFECCIOSO

Toda infección grave definida como evento infeccioso ocurrida durante los primeros 6 meses post-TC, que requiere la administración de tratamiento antimicrobiano específico por vía intravenosa.

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

Se consideró infección CMV¹¹⁴ : evidencia de CMV independiente de los síntomas (diferente del CMV latente) definida como el aislamiento del virus o la detección de proteínas virales (antígenos) o ácido nucleico en cualquier líquido corporal o muestra de tejido.

Se consideró enfermedad CMV¹¹⁴: evidencia de infección por CMV atribuible a síntomas, se puede categorizar como síndrome viral (fiebre, leucopenia, y/o trombocitopenia), o invasión de los tejidos.

En el cálculo del score inmunológico¹²⁷ se determinó según una puntuación inmunológica basada en los niveles de inmunoglobulina, factores de complemento, recuentos de células TCD4+ y de células NK.

Factores de riesgo inmunológico	Puntos
C3<80 mg/dl	5
C4<18 mg/dl	2
CD4<350 células/ml	3
NK<30 células/ml	4
IgG<600 mg/dl	2



Figura 22. Marcadores inmunológicos utilizados para el cálculo del score inmunológico de riesgo de infección. El puntaje se estableció en función del Hazard ratio (HR) otorgado para cada alteración inmunológica

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS® versión 20. Resultados estadísticamente significativos fueron definidos para $p < 0,05$. Se consideró tendencia la p definida entre 0,05 y 0,1. Para determinar la distribución normal de las variables numéricas se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. Se compararon las variables numéricas entre dos grupos usando el test de Student o test de Mann-Whitney según proceda y el test Chi-cuadrado (χ^2) en el caso de variables categóricas. Para n pequeñas se utilizaron variables cuantitativas descriptivas tales la mediana y el rango intercuartilico (IQR). El análisis de supervivencia se determinó por la prueba no paramétrica Kaplan-Meier.

IV. RESULTADOS



ESTUDIO 1

Estudio observacional de diferentes fenotipos de subpoblaciones linfocitarias T, B, NK en pacientes trasplantados que reciben diferente pauta de administración de BAS: 1 dosis (1D) o 2 dosis (2D)



ESTUDIO 1.

ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DIFERENTES FENOTIPOS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T, B, NK EN PACIENTES TRASPLANTADOS QUE RECIBEN DIFERENTE PAUTA DE ADMINISTRACIÓN DE BAS: 1 DOSIS (1D) O 2 DOSIS (2D)

Se realizó un análisis prospectivo longitudinal para evaluar el efecto que producen dos pautas diferentes de administración de BAS. Se estudiaron 66 pacientes sometidos a trasplante entre 2013 y 2017.

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Las características clínicas se describen en la tabla 12 y tuvieron un seguimiento de un año. Los pacientes del grupo 2D presentaron mayor tendencia en la edad del donante y receptor (Edad media receptor 1D= 50,62±12,84 años; Edad media receptor 2D= 55,89±10,78 años $p=0,073$). El 95% de los receptores que recibieron 2D eran hombres ($p=0,058$). El 97% de los pacientes que recibieron 1D y 90% en el caso de 2D fueron seropositivos para CMV. La causa principal para el trasplante fueron las miocardiopatías isquémicas (MIIS) y no isquémicas (MDNI) para ambos grupos. En el caso del grupo 1D hubo mayor número de pacientes que fueron trasplantados por enfermedad de origen valvular o congénita. El 50% de los pacientes que recibieron 1D presentaron un dispositivo auriculoventricular previo al trasplante y un 42% en 2D. Ningún paciente de 2D tuvo una asistencia de tipo pulsátil. Respecto a las infecciones previas al trasplante son más frecuentes en los pacientes que recibieron 2D ($p=0,012$). Entre los pacientes trasplantados de urgencia cero fue más frecuente la administración de 1D en lugar de 2D.

Gráficos etiología trasplante cardiaco:

1. 1D BAS

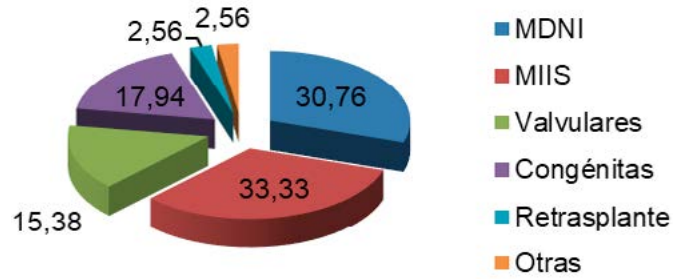


Figura 23. Enfermedad de base

MDNI: miocardiopatía dilatada no isquémica; MIIS: miocardiopatía isquémica. Otras: retrasplante; cáncer, etc

2. 2D BAS

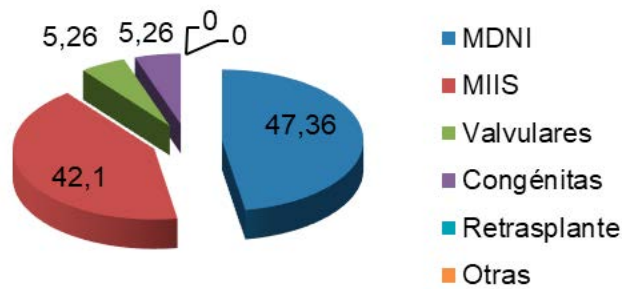


Figura 24. Enfermedad de base

MDNI: miocardiopatía dilatada no isquémica; MIIS: miocardiopatía isquémica. Otras: retrasplante, cáncer

Tabla 11 Características demográficas y clínicas receptor y donante (población de estudio)

VARIABLES	1D/2D	p
n (pacientes)	38/19	
EDAD RECEPTOR (años)	51±13/ 56±11	0,073 ^a
Rango	(20-69/27-69)	
SEXO RECEPTOR (%) (%varón)	74/95	0,058 ^b
EDAD DONANTE (años)	33±15/41±16	0,067 ^a
SEXO DONANTE (%) (%varón)	63/53	0,402 ^b
SEROLOGÍA CMV (n)		
Donante	30/14	0,724 ^b
Receptor	36/17	0,130 ^b
Discordancia CMV donante-receptor	6/3	0,805 ^b

Los datos se expresan en número o porcentaje, media±desviación típica. El valor de p está indicado: a= t de Student; b= Chi-Cuadrado y c= Mann-Whitney

Tabla 12. Características demográficas y clínicas de TC que reciben diferente pauta de inducción de BAS

VARIABLES	1D/2D	p
n (pacientes)	38/19	
ENFERMEDAD DE BASE (n)		0,722 ^b
Miocardopatía no isquémica (MINS)	11/9	
Miocardopatía isquémica (MIIS)	13/8	
Valvulares	6/1	
Congénitas	7/1	
Otras	1/0	
ASISTENCIA VENTRICULAR PREVIA (Si/No)	19/19 vs. 8/11	0,584 ^b
TIPOS DE ASISTENCIA (n)		0,226 ^b
Bciao	5/1	
Ecmo	2/3	
Pulsátil	6/0	
Continuo	6/4	
CR PRE (mg/dl)	0,97/1,26	0,011^a
URGENCIA CERO (n)	12/4	0,503 ^b
RETRASPLANTE (n)	1/0	0,238 ^b
TIEMPO INGRESO (días)	52/51	0,910 ^b
TIEMPO DE ISQUEMIA (minutos)	214/197	0,450 ^a

Los datos se expresan en número o porcentaje. El valor de p está indicado: a= t de Student; b= Chi-Cuadrado y c=Mann-Whitney

Tabla 13 Complicaciones en TC que reciben diferente pauta de inducción de BAS

VARIABLES	1D/2D	p
n (pacientes)	38/19	
RECHAZO (BPAR)≥2R (mayor o igual) (n)		
6m	3/2	0,545 ^a
12m	4/2	0,681 ^b
MUERTE (n)	6/3	0,639 ^b
Antes 30 días (*)	2/1	
Después 30 días	4/2	
INFECCIONES		
Infección previa (n)	1/3	0,083 ^b
Episodios de infección severa (n)	14/8	0,150 ^b
Episodios de infección severa CMV (n)	11/6	0,377 ^b
Sistémica (n/%)	9 (23,68) / 6 (31,57)	
Órgano específico (n/%)	2 (5,26)/ 0	
CAV (n)	1/1	ns ^b
TUMORES (n)	1/3	ns ^b
ANTICUERPOS CITOTÓXICOS		
Pre (n)	2/3	0,749 ^b
Específicos de novo (n)	4/2	0,661 ^b
HIPOGAMMAGLOBULINEMIA		
IgG<600 mg/dl (n/%)	25 (65,78)/ 15 (78,94)	0,204 ^b
IgG<400 mg/dl	5 (13,15)/ 3 (15,78)	0,504 ^b

Los datos se expresan en número o porcentaje. El valor de p está indicado: a= t de Student; b= Chi-cuadrado y c= Mann-Whitney. El número de episodios de infección severa [están incluidos los episodios infección bacteriana, fúngica y viral incluido CMV]. BPAR= rechazo agudo probado por biopsia. CAV=vasculopatía por aloinjerto cardiaco

2. TERAPIA DE MANTENIMIENTO

Todos los pacientes recibieron triple terapia que incluye tacrolimus (FK), micofenolato de mofetil (MMF) y corticoides, solo un paciente hizo el cambio a sirolimus y tres a everolimus.

En relación con el uso de FK existen diferencias significativas en los niveles a los 7d post-TC, siendo su concentración menor en los pacientes de 2D además de un retraso en su administración.

3. EVENTOS CLÍNICOS POSTRASPLANTE

3.1. HIPERSENSIBILIZACIÓN: DESARROLLO DE ANTICUERPOS ANTI-HLA

Presentaron anticuerpos anti-HLA positivos previos al TC:

- 5,26% de los pacientes que recibieron 1D.
- 15% en el caso de los que recibieron 2D.

Desarrollaron anticuerpos DSA anti-HLA de novo:

- 10,52% en ambos grupos.

Evento de rechazo:

- 1 paciente de cada grupo de los que desarrollaron anticuerpos DSA anti-HLA.

Tabla 14. Ac anti-HLA en los pacientes

	1D	2D
Acs anti-HLA pre	<p>Paciente 1 Acs DSA Anti-DPA1*02:01 (MFI=2000; cPRA= 60)</p> <p>Paciente 2 Acs No DSA Anti-B*12 (MFI=6000; cPRA= 27)</p>	<p>Paciente 1 Acs IgM positivos no anti-HLA I ni anti-HLA II (Anti-Mica Eplet 14G MFI= 9000)</p> <p>Paciente 2 Acs DSA DQA1*02 (MFI=4200; cPRA=22)</p> <p>Paciente 3 Acs No DSA Anti- C*05,08 (MFI=13000; cPRA= 24)</p>
Acs anti-HLA novo Donante específico (DSA)	<p>Paciente 1 Acs DSA Anti-A*02 (MFI= 2600; cPRA=48)</p> <p>Paciente 2 Acs DSA Anti-A*11; B*18 (MFI= 4000; cPRA= 30)</p> <p>Paciente 3 Acs DSA Anti-DR*53 (MFI=6000 cPRA= 80)</p> <p>Paciente 4 Acs DSA Anti-DPB1*09, DQA1*05 (MFI=2000; cPRA= 75)</p>	<p>Paciente 1 Acs DSA Anti-C*07 (MFI=4000; cPRA=24)</p> <p>Paciente 2 Acs DSA (DQA1* 02:01, 06:01 (MFI=10000 cPRA=50)</p>

TC. Acs: Anticuerpos

3.2. TIEMPO LIBRE DE RECHAZO

EN ESTE APARTADO SE ANALIZÓ EL TIEMPO LIBRE DE EVENTOS DE RECHAZO RESPECTO A LAS DOSIS DE BAS

Los episodios de rechazo tratados ($\geq 2R$) fueron similares en ambos grupos. Un 10,52% de los pacientes en ambos grupos presentaron rechazo dentro de los primeros 180 días. Los eventos de rechazo ocurrieron a los 21, 74, 127 y 240 días para el grupo 1D; 140 y 180 días para el grupo 2D. No hubo diferencias significativas respecto al tiempo libre de rechazo para ambos grupos (180d 1D= 171,63±31,47; 2D=177,89±9,17; p=0,442; 1 año 1D= 338,02±83,06; 2D= 343; 42±64,97; p=0,631).

3. EVENTOS CLÍNICOS POSTRASPLANTE

El 24% de los pacientes del grupo 1D presentaron biopsias catalogadas (50%>1R), tres de ellos desarrollaron después un episodio de rechazo 2R. En el grupo 2D un 10% de pacientes presentaron biopsias (50%>1R), y uno de ellos presentó un rechazo 2R. No hubo diferencias significativas respecto al tiempo libre de infiltración linfocitaria (1D= 23,76±21,66 2D=28,75±17,78 p=0,687).

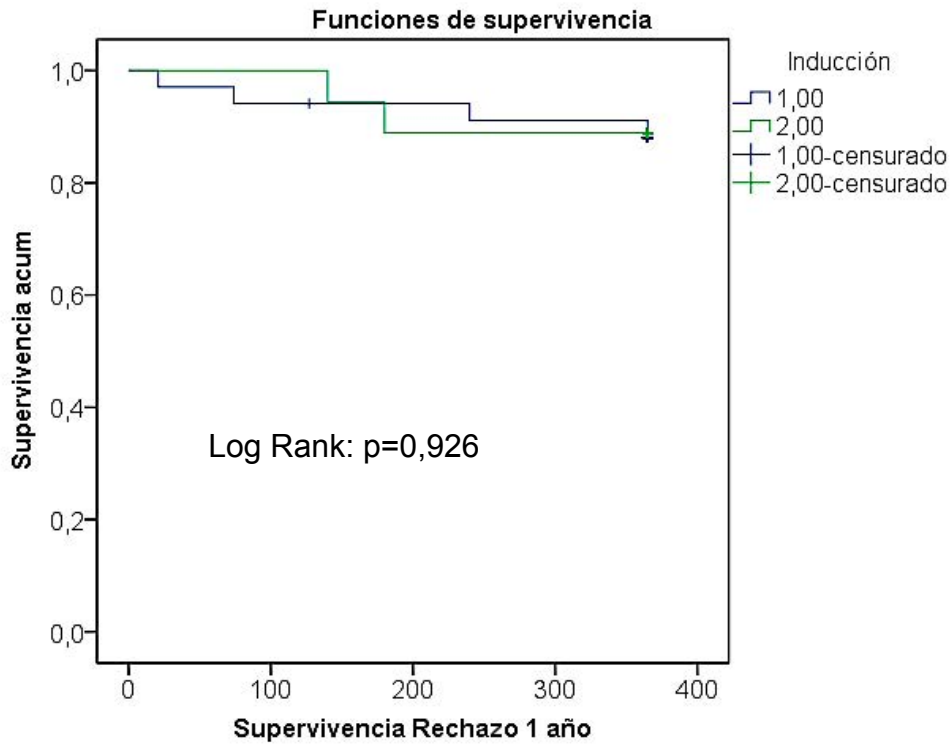


Figura 25. Tiempo libre de rechazo en el primer año

El análisis Kaplan-Meier no muestra diferencias entre ambos grupos ($p=0,926$)

Tabla 15. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia en rechazo según pauta de inducción

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,009	1	,926
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,011	1	,916

3.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LAS BIOPSIAS ENDOMIOCÁRDICAS VS. DOSIS DE INDUCCIÓN

EN ESTE APARTADO SE ANALIZA EL INFILTRADO LINFOCITARIO EN LAS BIOPSIAS RESPECTO A LAS DOSIS DE BAS Y A PRESENTACIÓN DE EVENTOS DE RECHAZO

Se realizó una revisión histopatológica de los resultados de las biopsias endomiocárdicas para evaluar el impacto de la inducción con 1D o 2D en el infiltrado linfocitario. Se excluyeron los pacientes fallecidos antes de los 30 días. El grupo 1D incluyó 37 casos con un total de 420 biopsias y en el 2D incluyó 18 casos con 206 biopsias. El grupo grado 0R incluye sólo casos cuyas biopsias estaban catalogadas como SAS y CM; el grupo grado 1R incluye casos cuyas biopsias están catalogadas como 0R o 1R y el grupo grado 2R incluye los casos cuyas biopsias están catalogadas como 2R y que requirieron tratamiento anti rechazo.

No se encontraron diferencias en la distribución del porcentaje de biopsias estratificando por grados de rechazo según pauta de inducción.

La mayoría de los pacientes que recibieron 1D no suprimieron la expresión de CD25 en los linfocitos TCD4+ según la definición de Kovarik¹²³ independientemente del grado de biopsia (tabla 18). La duración de la supresión completa de expresión de CD25 en los linfocitos TCD4+ fue mayor en el grupo 2D.

Se observaron depósitos de C4d>10% y CD68>10% en las biopsias de cuatro pacientes, dos de cada grupo. Uno de los pacientes que recibió 2D después desarrolló rechazo celular.

Tabla 16. Grado de infiltración en las biopsias miocárdicas según pauta de inducción con basiliximab

Dosis	1D	2D	P
N total de casos (%)	37 (100 %)	18(100%)	
Grado 0 R n (%)	5 (13,51)	2 (11,11)	0,802 ^b
Grado 1 R	28 (75,67)	14 (77,78)	0,863 ^b
Grado 2 R	4 (10,81)	2 (11,11)	0,974 ^b
Grado 1 R+2 R	32 (86,48)	16 (88,88)	0,533 ^b
≥50% de sus biopsias 1 R o >	9 (28)	3 (19)	0,480 ^b
<50% de sus biopsias 1 R o >	23 (72)	13 (81)	

Los datos se expresan como n y %. Prueba t para muestras no relacionadas a=t de Student; b=Chi cuadrado

Tabla 17 Distribución media de biopsias endomiocárdicas según el diagnóstico anatómico-patológico y pauta de inducción con basiliximab

	Biopsias		P
	1D	2D	
Total	11,37±3,14 (100)	11,44±2,81 (100)	0,940 ^a
Grado 0 R	6,45 ±6,53 (57)	6,94±3,53 (61)	0,544 ^a
Grado 1 R (0 R +1 R)	3,78±2,30 (33)	3,50±2,68 (30)	0,699 ^a
Grado 2 R	1,14±0,37 (10)	1,00±0,15 (9)	0,626 ^a

Los datos se expresan como media±DT. Prueba t para muestras no relacionadas a=t de Student; b=Chi cuadrado

*** De la tabla 18 podemos concluir que los pacientes que reciben 2D presentan mayor porcentaje de supresión de la expresión de CD25 sobre linfocitos T en sangre periférica a la semana post trasplante que aquellos que recibieron sólo 1D (p=0,080). La mayoría de los pacientes que recibieron 1D no suprimieron la expresión de CD25 sobre los linfocitos TCD4+ independientemente del grado de biopsia

Tabla 18. Expresión de CD25+ sobre linfocitos T de sangre periférica según pauta de inducción con basiliximab

Grado biopsias	N (%) pacientes que suprimen expresión CD25 7d (1)		N (%) pacientes que no suprimen 7d (2)		P
	1D	2D	1D	2D	
	Grado 0 R	1:5 (20%)	2:2 (100%)	4:5 (80%)	
Grado 1 R	8:28 (28%)	7:14 (50%)	20:28 (72%)	7:14 (50%)	0,199 ^b
Grado 2 R	0:4 (0%)	1:2 (50%)	4:4 (100%)	1:2 (50%)	0,121 ^b
Total	9:37 (25%)	10:18 (55%)	28:37 (75%)	8:18 (45%)	0,080 ^b

Los datos se expresan como n y %. Prueba t para muestras no relacionadas a=t de Student; b=Chi cuadrado

(1) Se consideran que suprimieron cuando el porcentaje de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ es inferior al 3% a la semana

(2) Se considera que no suprimieron cuando el porcentaje de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ es superior al 3% a la semana

3.4. INFECCIONES

Las infecciones son las complicaciones más frecuentes en los primeros meses post-TC. No hubo diferencias significativas en el número de episodios de infección y en el tiempo libre de infección al año.

Tabla 19. Media de episodios de infección que requieren ingreso

Variable	BAS	n	Media	DT	ET	P
Episodios infecciosos	1D	38	1,73	1,7658	0,29524	0,590 ^a
	2D	19	1,47	1,6454	0,37709	

Los datos se expresan como media ± DT=Desviación Típica; n= número de casos; ET= Error típico de la Media. El valor de p está indicado: a=t de Student; b= Chi-cuadrado y c= Mann-Whitney

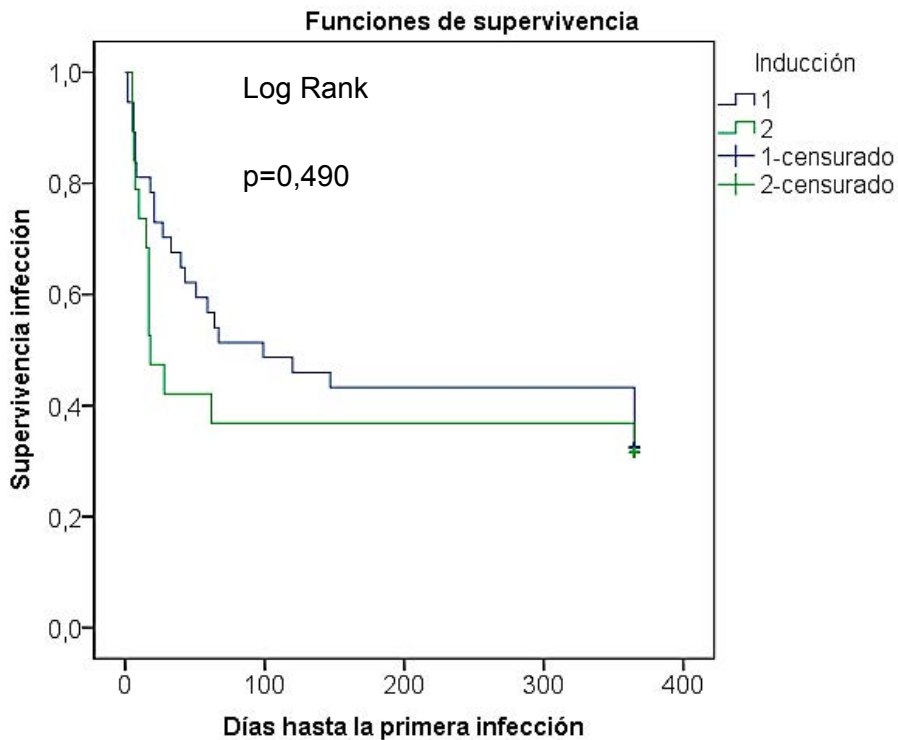


Figura 26. Tiempo libre de infección en el primer año

El análisis Kaplan-Meier no muestra diferencias entre ambos grupos (p=0,490)

Tabla 20. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia según pauta de inducción a 365 días

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,477	1	,490
Breslow (Generalized Wilcoxon)	1,221	1	,269

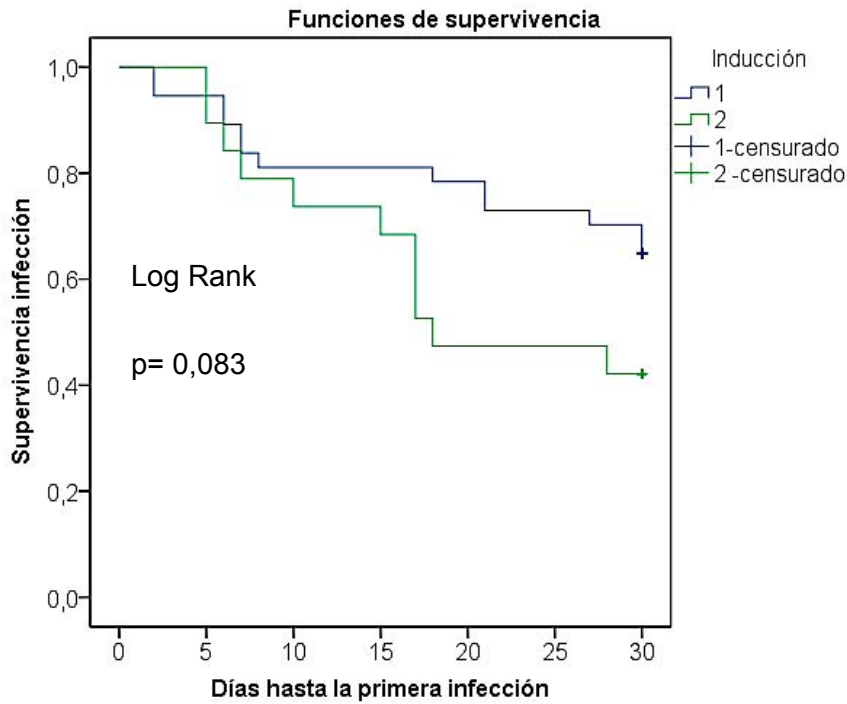


Figura 27. Tiempo libre de infección en los primeros 30 días

El análisis Kaplan-Meier no muestra diferencias entre ambos grupos ($p=0,083$)

Tabla 21. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia de infección según pauta de inducción a 30 días

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,005	1	,083
Breslow (Generalized Wilcoxon)	2,861	1	,091

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

38% del total de pacientes estudiados desarrollaron infecciones bacterianas que requirieron tratamiento antibacteriano. En el grupo 1D, catorce pacientes desarrollaron infecciones bacterianas o fúngicas, de los cuales tres tuvieron coinfección fúngica por *Trychophytum* spp, *Aspergillus*, *Gymnascella* spp y uno presentó coinfección por *parainfluenza*. En el grupo 2D, ocho desarrollaron infecciones bacterianas de los cuales dos pacientes coinfección fúngica por *Aspergillus* y *Candida* spp.

Tabla 22. Número de infecciones bacterianas o fúngicas según pauta de inducción

Tabla de contingencia infección bacteriana o fúngica *según pauta de inducción

Infección bacteriana o fúngica	Inducción		N (%)	P
	1D n (%)	2D n (%)		
No	24 (64)	11 (58)	35 (61%)	0,452 ^a
Si	14 (36)	8 (42)	22 (38%)	
Total	38	19	57	

Los datos se expresan como n= número de casos; N=número total de casos.; %=porcentaje. El valor de p está indicado (a= t de Student; b=Chi-cuadrado y c= Mann-Whitney)

Tabla 23. Tabla de contingencia de coinfección bacteriana y fúngica según pauta de inducción

Tabla de contingencia coinfección bacteriana y fúngica * según pauta de inducción

Coinfección bacteriana y fúngica	Inducción		N	P
	1D n (%)	2D n (%)		
No	35 (92)	16 (93,7)	53	0,714 ^a
Si	3 (8)	2 (6,31)	4	
Total	38	19	57	

Los datos se expresan como n= número de casos; N=número total de casos.; %=porcentaje. El valor de p está indicado (a= t de Student; b=Chi-cuadrado y c= Mann-Whitney)

El 30% de los pacientes presentaron infección viral CMV. En el grupo 1D once pacientes desarrollaron infección por CMV, cuatro presentaron a la vez coinfección bacteriana y CMV. En el grupo 2D solo seis desarrollaron CMV y tres presentaron a la vez coinfección bacteriana y CMV.

Tabla 24. *Tabla de contingencia infecciones virales: CMV según pauta de inducción***Tabla de contingencia infecciones virales: CMV * según pauta de inducción**

Infección CMV	Inducción		N (%)	P
	1D n (%)	2D n (%)		
No	27 (72)	13 (63)	39 (70%)	0,377 ^a
Si	11 (28)	6 (32)	17 (30%)	
Total	38	19	57	

Los datos se expresan como n= número de casos; N=número total de casos.; %=porcentaje. El valor de p está indicado (a= t de Student; b=Chi-cuadrado y c= Mann-Whitney)

Tabla 25. *Tabla de contingencia coinfección bacteriana y CMV según pauta de inducción***Tabla de contingencia coinfección bacteriana y CMV * según pauta de inducción**

Infección bacteriana o CMV	Inducción		N	Valor P
	1D n (%)	2D n (%)		
No	34 (89)	16 (84)	50	0,429 ^a
Si	4 (11)	3 (16)	7	
Total	38	19	57	

Los datos se expresan como n= número de casos; N=número total de casos.; %=porcentaje. El valor de p está indicado (a= t de Student; b= Chi-cuadrado y c= Mann-Whitney)

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

Tabla 26. Agentes infecciosos aislados en TC que reciben diferente pauta de inducción

Microorganismo	1D (n=38)		2D (n=19)	
	n	%	n	%
Infecciones bacterianas	43	74,13	19	70,37
Pseudomonas	13	22,41	6	22,22
Serratia	4	6,89	1	3,70
Burkholderia	6	10,34	2	7,40
Enterococos	3	5,17	1	3,70
Bacteroides	2	3,44	0	
Micobacterias	1	1,72	0	
Clostridium	4	6,89	2	7,40
Klebsiella	2	3,44	1	3,70
E coli	0		1	3,70
No filiado	8	13,79	5	18,51
Infecciones virales	12	20,68	6	22,22
CMV	11	18,96	6	22,22
Influenza	1	1,72	0	
Fúngica	3	5,17	2	7,40
Aspergillus	1	1,72	1	
Candida	0		1	3,70
<i>Dermatofito</i>	1	1,72		
<i>Gymnascella spp</i>	1	1,72		
Total de agentes infecciosos	58		27	

Los datos se expresan como n: número total de agentes infecciosos y % (porcentaje)

Según el score inmunológico de Sarmiento et al¹²⁷ los pacientes del grupo 2D tuvieron un puntaje significativamente mayor respecto al grupo 1D a 7d (6,3824±5,52 vs. 9,611±4,3269 p=0,036).

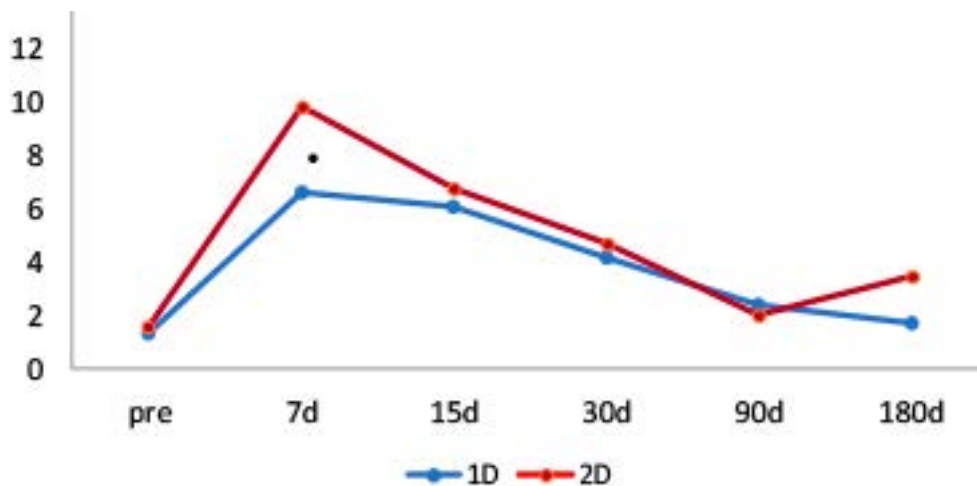


Figura 28. Score inmunológico de riesgo de infección en pacientes trasplantados que reciben diferente pauta de inducción

3.5. DESARROLLO DE CAV Y TUMORES

Referente a las complicaciones a largo plazo sólo dos pacientes desarrollaron vasculopatía del injerto (CAV) al año. De esos dos pacientes solo un paciente que recibió 2D había desarrollado previamente anticuerpos anti-HLA *de novo*. El otro paciente que recibió 1D presentó previamente una asistencia circulatoria de tipo pulsátil. Respecto al desarrollo de tumores sólo ocurrió en tres pacientes que recibieron 2D y en uno que recibió 1D al año de seguimiento.

3.6. SUPERVIVENCIA

El tiempo medio de supervivencia fue similar para ambos grupos (1D= 324,42±103,18; 2D= 320,15±111,83 p=0,860. Para este estudio se incluyeron todos los pacientes excepto aquellos que murieron en el perioperatorio inmediato. En total, seis pacientes murieron en el grupo 1D y tres en el 2D. Las causas de mortalidad en los primeros 30 días fueron por disfunción primaria del injerto (DPI) en un paciente en el grupo 2D y en dos pacientes en el grupo 1D. Después de los 30 días fueron por sepsis por invasión fúngica en dos pacientes en el grupo 2D y por infecciones y rechazo crónico en cuatro pacientes en el grupo 1D.

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

Tabla 27. Tiempo de supervivencia de TC que reciben diferente pauta de inducción de BAS al año

Inducción	Tiempo de supervivencia	IQR
1D	324,42±103,18	308,44; 372,40
2D	320,15±111,83	267,81;372,49

El tiempo se expresa como la media de días de supervivencia desde el trasplante. IQR: rango intercuartílico

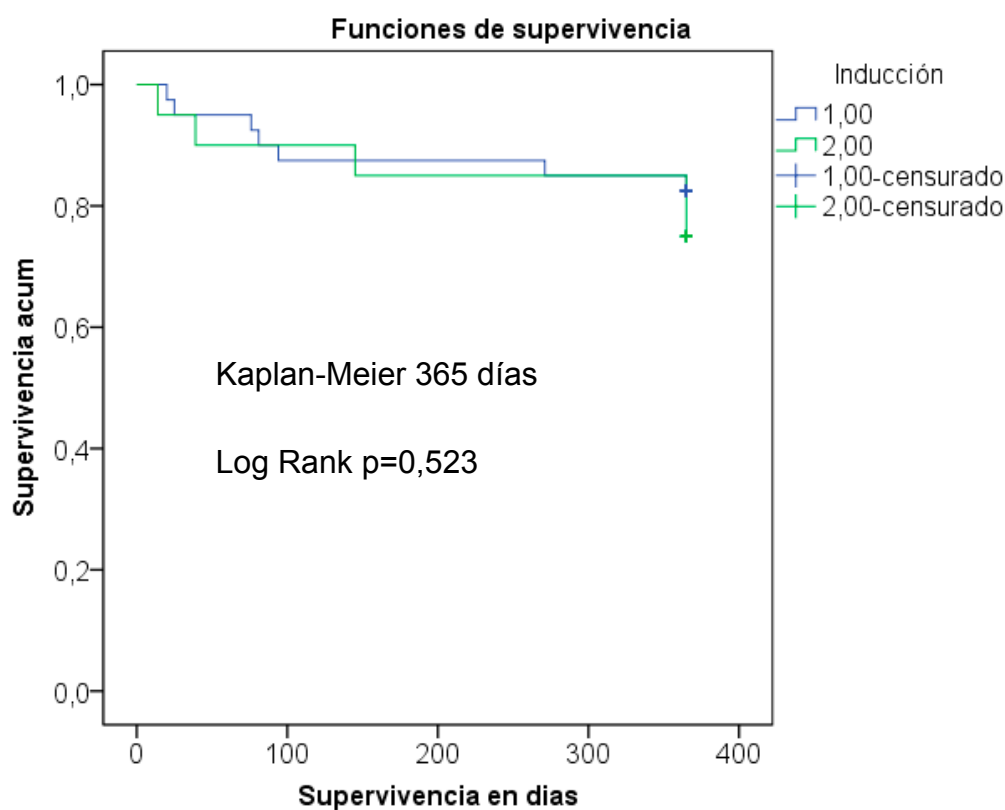


Figura 29. Supervivencia durante los primeros 365 días

El análisis Kaplan-Meier no muestra diferencias entre ambos grupos ($p=0,834$)

Tabla 28. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes dosis de inducción al año

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,408	1	,523
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,382	1	,536

4. MONITORIZACIÓN DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS

Tras el TC se observaron variaciones en el porcentaje y número absoluto de las siguientes poblaciones linfo-monocitarias (datos complementarios en anexo 1).

4.1. RECUENTO DE LINFOCITOS TOTALES

Se observó un descenso significativo del número total de linfocitos a los 7d, 15d y 30d post-TC recuperando valores basales a los 60d para ambos grupos. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Anexo I, tabla 1).

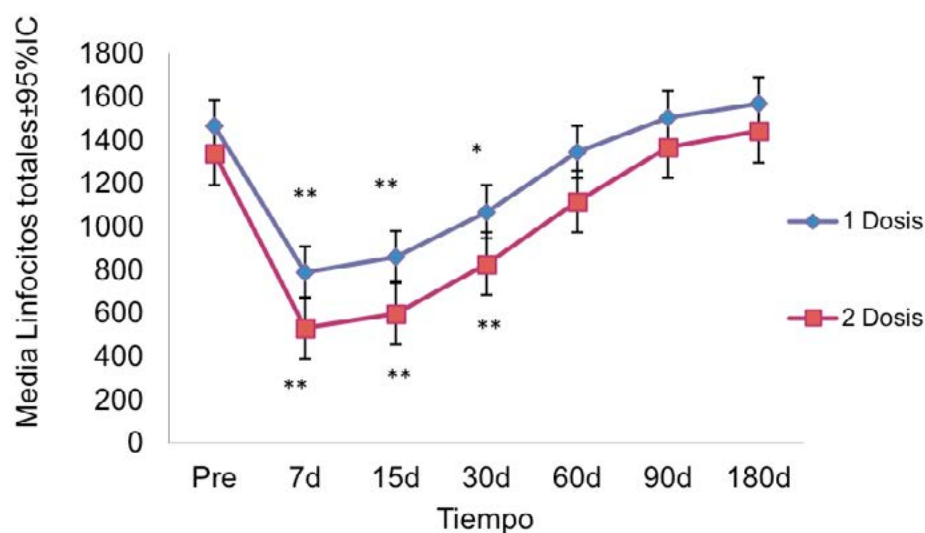


Figura 30. Recuento de linfocitos totales

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.2. RECUENTO DE NEUTRÓFILOS TOTALES

Los neutrófilos aumentaron en ambos grupos de manera significativa a los 7d respecto a valores basales para posteriormente descender a los 30d y disminuyeron aún más hasta los 180d. Se observó un grado de significación estadística de la diferencia de medias en los puntos de estudio 7d, 15d y 180d frente al valor basal en ambos grupos y a los 90d en el grupo 2D (Anexo I, tabla 1).

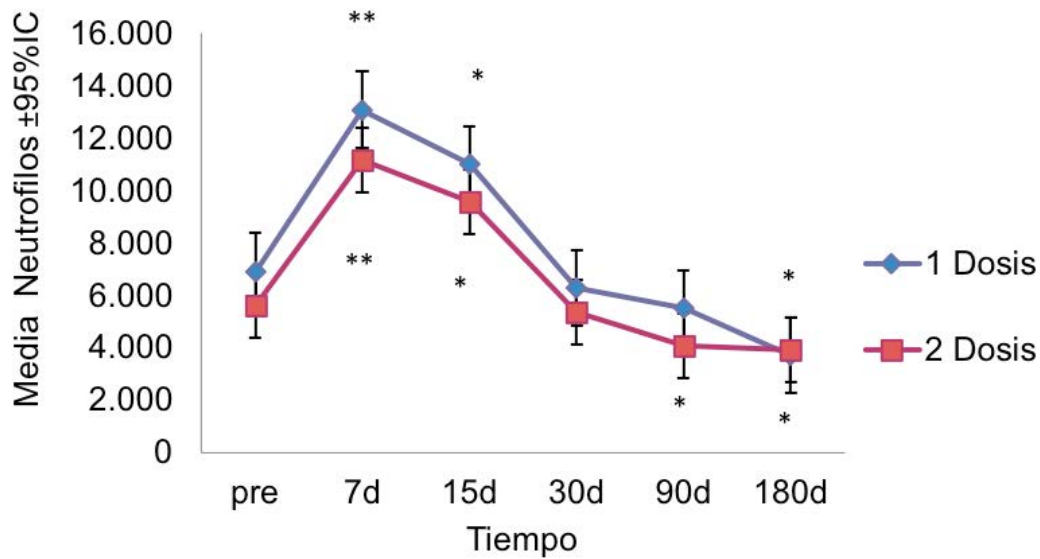


Figura 31. Recuento de neutrófilos totales

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3. LINFOCITOS T

4.3.1. LINFOCITOS TCD3+

Los linfocitos TCD3+ en porcentaje en ambos grupos sufrieron un descenso a los 7d post-TC, recuperando valores basales a los 60d e incrementándose hasta los 180d. En porcentaje dicho descenso solo fue significativo hasta los 15d en el grupo 1D. En número absoluto se observó una cinética similar, observándose un descenso significativo hasta los 15d en ambos grupos. Adicionalmente ese descenso continuó hasta los 30d para el grupo 2D. A partir de los 60d se recuperaron valores basales, aumentando de manera significativa con respecto al basal en el grupo 1D en el punto 180d (Anexo I, tabla 2).

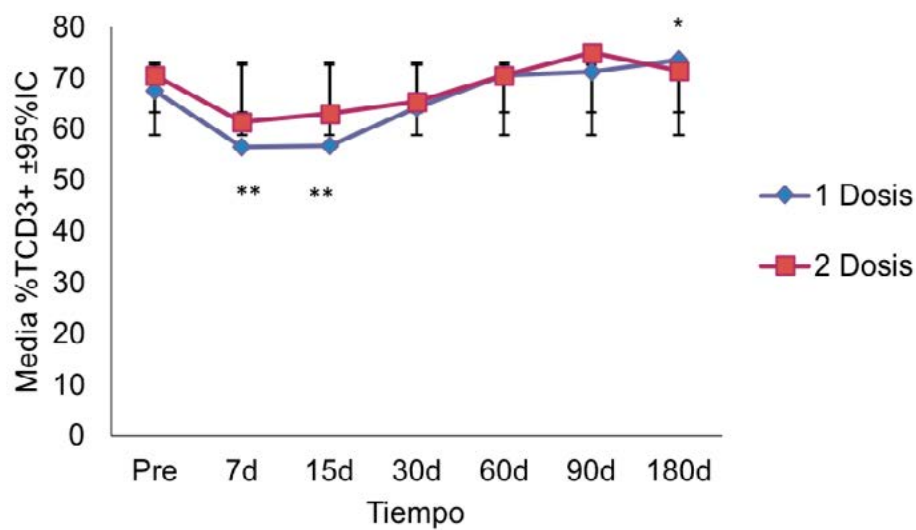


Figura 32. Cinética % TCD3+

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$. En el resto de puntos no se observaron diferencias significativas

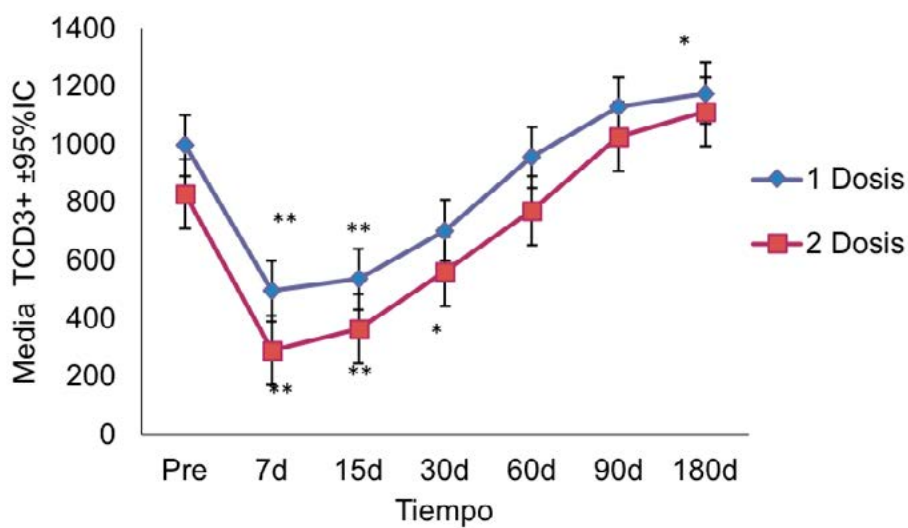


Figura 33. Cinética de linfocitos TCD3+ en número absoluto

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.2. LINFOCITOS TCD4+

En ambos grupos el porcentaje de linfocitos TCD4+ sufrió un descenso a los 7d post-TC (siendo solo significativo para 1D), aumentando hasta recuperar valores basales a los 60d. Esta caída fue conjunta con la caída de linfocitos TCD3+ en el grupo 1D. En número absoluto se observó una cinética similar, siendo significativo ese descenso a los 7d para ambos grupos. A la semana hubo tendencia en la disminución en el número absoluto de linfocitos TCD4+ en el grupo 2D respecto al 1D (322 ± 267 ; 199 ± 130 ; $p=0,068$) (Anexo I, tabla 5).

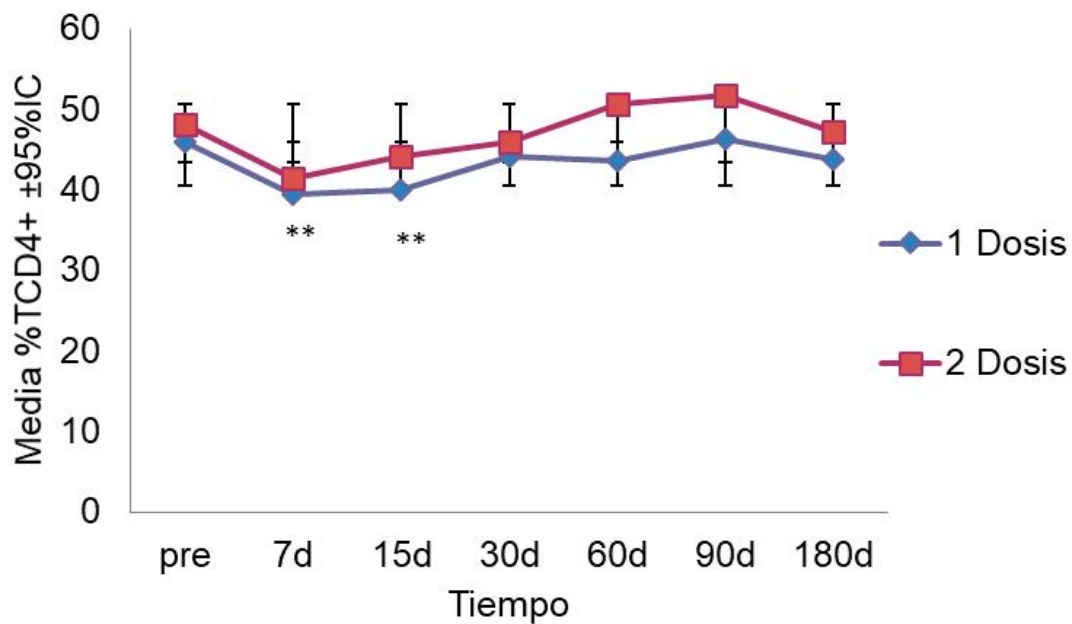


Figura 34. Cinética %TCD4+

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando *t* para muestras relacionadas: ** $p<0,01$ y *t* para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones, • $p<0,05$

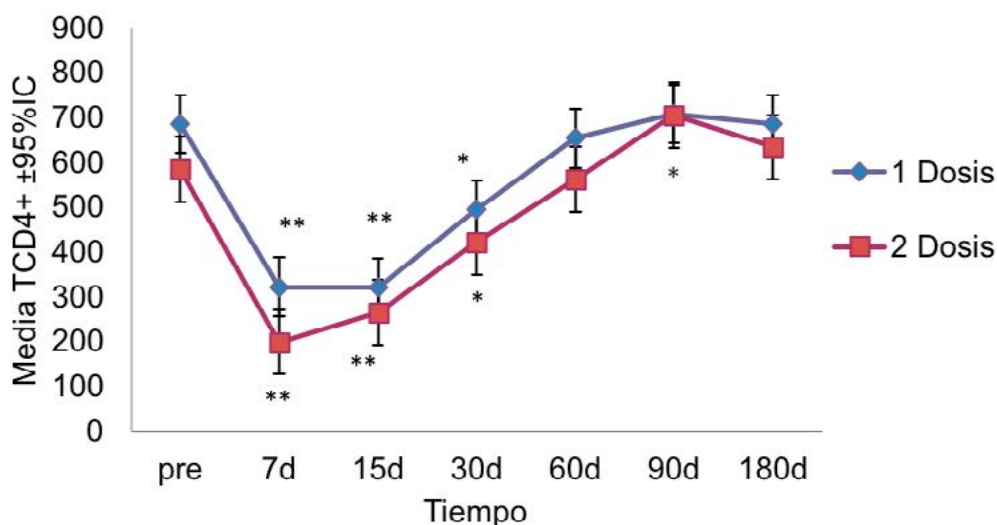


Figura 35. Cinética de linfocitos TCD4+ en número absoluto

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.2.1. EXPRESIÓN DE CD25 EN LOS LINFOCITOS TCD4+

Respecto a los linfocitos activados TCD4+CD25+ se observó un descenso significativo a los 7d tanto en porcentaje como en número absoluto. La recuperación de valores basales en porcentaje fue más rápida para 1D que 2D ($40,92 \pm 26,32$ días vs. $52,46 \pm 44,02$ días $p = 0,307$). A los 15d los pacientes con 2D tuvieron el menor número de linfocitos CD4+CD25+ (%CD4+CD25+ 15d 1D = $31,55 \pm 25,03$; %CD4+CD25+ 15d 2D = $13,28 \pm 16,08$ $p = 0,02$). Asimismo, a los 30 días el grupo 2D presentaba menor número absoluto de linfocitos TCD4+CD25+ respecto al basal (CD4+CD25+ 30d = 297 ± 211 vs. 140 ± 152 ; $p = 0,014$) lo cual era esperable en relación a las dosis administradas (Anexo I, tabla 6).

DURACIÓN DE SUPRESIÓN DE CD25 EN LOS LINFOCITOS TCD4+

El 68% de los pacientes que recibieron 2D consiguieron una supresión total de la expresión de CD25; por el contrario, solo el 36% en el grupo 1D. Los pacientes que recibieron 2D tuvieron un tiempo de supresión más largo (1D = $21,20 \pm 22,41$ IQR: 15,50 rango: 7-75 días; 2D = $27,40 \pm 19,17$ IQR: 15 rango: 7-83 días, t de Student = 0,396).

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

Tabla 29. Media de días supresión completa de expresión de CD25 y recuperación del nivel basal

	Días supresión <3%CD25+				Días recuperación porcentaje basal			
	Media	ET	p25	p75	Media	ET	p25	p75
1D	21,20	22,41	7	23	40,92	26,32	30	60
2D	27,40	19,17	15	30	52,46	44,02	30	60
p	0,119 ^a				0,307 ^a			

ET (ET: Error típico de la Media) p25 (percentil 25) p75 (percentil 75) a= t de Student c= Mann-Whitney

Tabla 30. Tabla de porcentaje de linfocitos TCD4+CD25+ distribuidos por percentiles y tiempo de estudio

Punto	7d		15d		30d		60d		90d		180d	
	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
p25	2,83	2,50	5,70	1,75	19,80	4,35	32,70	20,15	41,66	31,02	48,77	46,22
p50	11,80	6,10	24,30	6,60	49,80	43,50	61,70	50,40	59,03	53,35	61,57	60,32
p75	38	13	53	18	61,70	66,45	74,20	74,50	71,22	71,22	70,65	72,20

Según la tabla de percentiles se observa que el percentil 50 y el percentil 75 de los valores de TCD4+CD25+% son menores en los pacientes que reciben 2D que en los que recibieron 1D (p50 a día 7 es 6.1% vs. 11.8% y el p50 a día 15 es 6.6% vs. 24.3% mientras que el p75 a día 7 es 13% vs. 38% y a día 15 es 18% vs. 53%). Mientras que a día 30 solamente el p25 son 4,35% (2D) y 19,8% (1 D).

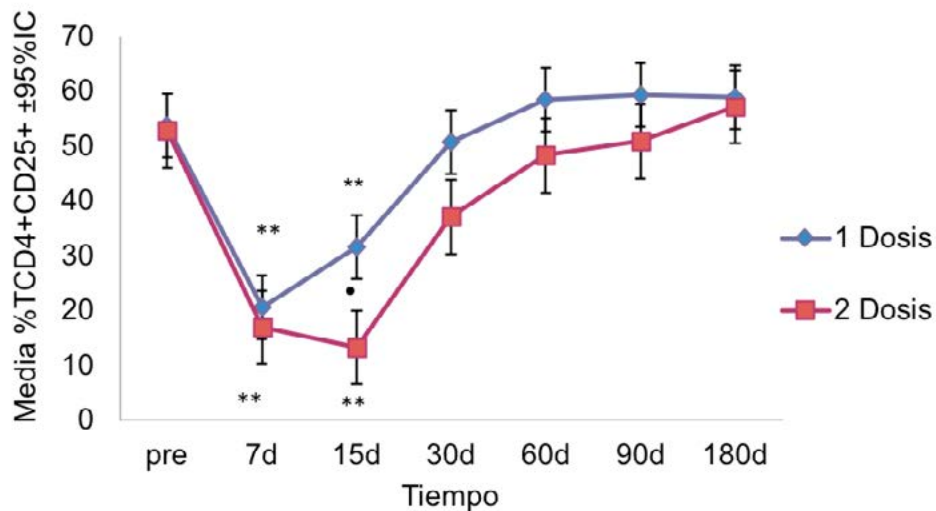


Figura 36. Cinética %TCD4+CD25+

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas *p<0,05; **p<0,01 y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones •p<0,05

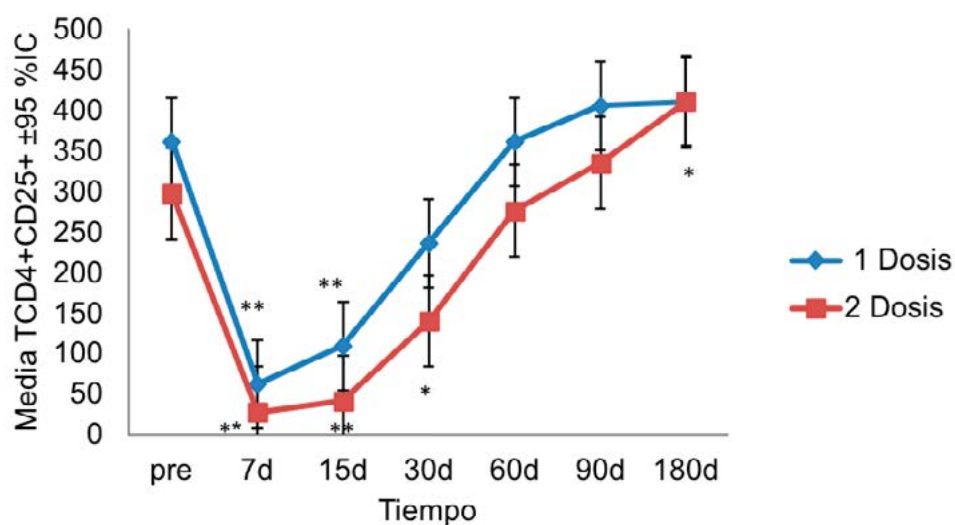


Figura 37. Cinética TCD4+CD25+ en número absoluto

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.3. LINFOCITOS TCD8+

En ambos grupos el porcentaje y número absoluto de linfocitos TCD8+ sufrieron un descenso a los 7d, recuperando valores basales a los 60d y aumentando de manera progresiva hasta los 180d. En porcentaje se observó una disminución significativa en el grupo 1D a los 7d. En el caso del grupo 2D en número absoluto este descenso continuó siendo significativo hasta los 30d. Después de 60 días se observó un incremento significativo respecto al basal para ambos grupos tanto en porcentaje como en número absoluto. A los 7d en número absoluto se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($CD8+ 1D = 138,78 \pm 108,88$; $CD8+ 2D = 69,71 \pm 64,34$; $p = 0,037$) (Anexo I, tabla 8).

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

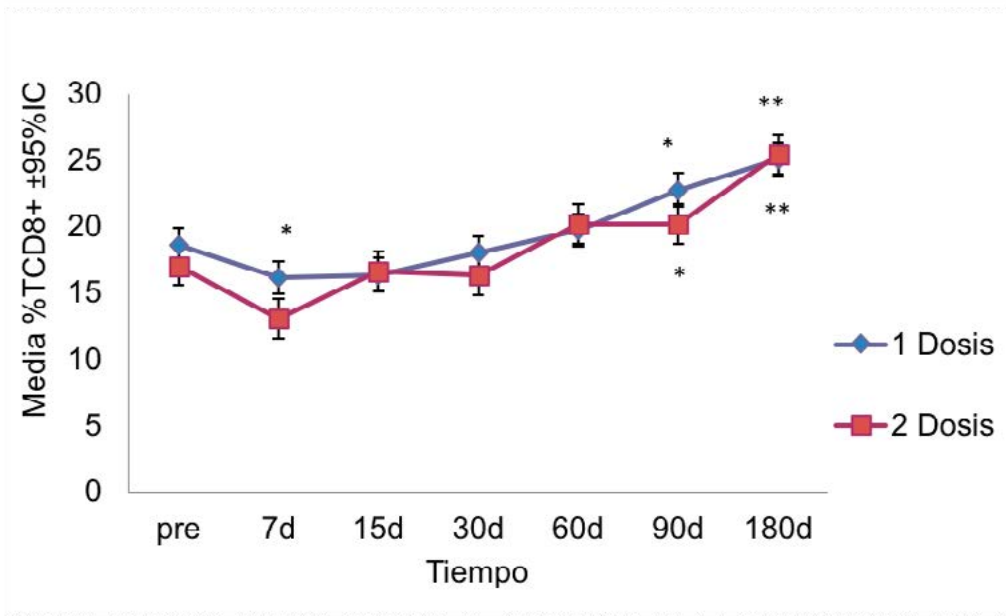


Figura 38. Cinética %TCD8+

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

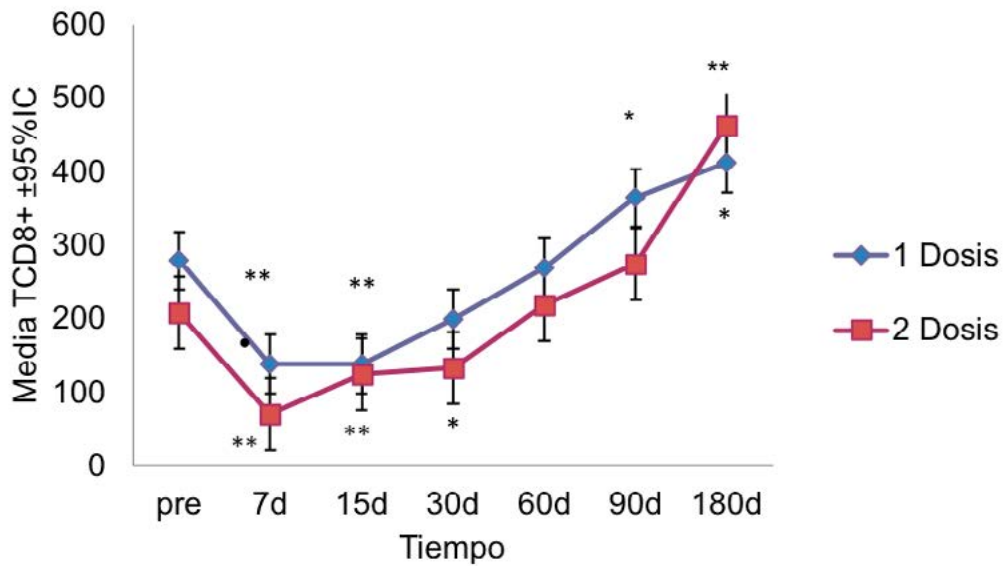


Figura 39. Cinética de linfocitos TCD8+ en número absoluto

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones • $p < 0,05$

4.3.3.1. EXPRESIÓN DE CD25 EN LOS LINFOCITOS TCD8+

Se observó una disminución significativa tanto en porcentaje como en número absoluto hasta los 15d en ambos grupos, siendo mayor para el grupo 1D. Después se recuperaron valores basales a los 60d, para posteriormente disminuir hasta los 180d en ambos grupos. Los pacientes que reciben 2D tuvieron una expresión más baja de CD25 a la semana (tendencia) en número absoluto que los que recibieron 1D ($55,20 \pm 76,52$; $16,10 \pm 17,34$; $p=0,086$). No existieron diferencias en el tiempo (días) de recuperación de expresión de CD25 tanto en porcentaje como en número absoluto en ambos grupos (1D= $59,30 \pm 64,54$, 2D= $63,46 \pm 62,96$; $p=0,23$ 1D= $69,04 \pm 56,45$, 2D= $70,14 \pm 55,04$ $p=0,32$) (Anexo I, tabla 9).

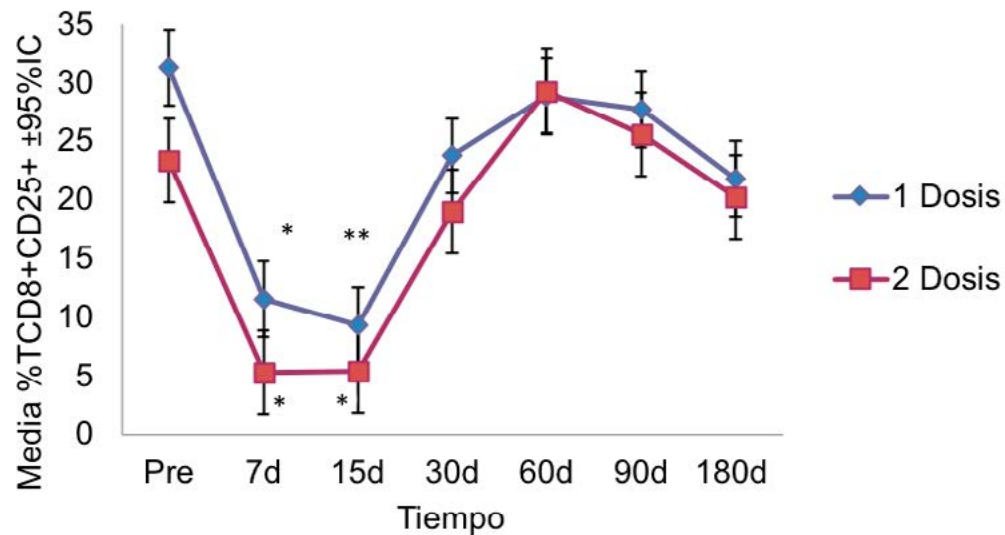


Figura 40. Cinética % expresión de CD25+ en los linfocitos TCD8+

Diferencias de medias respecto al valor basal, t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

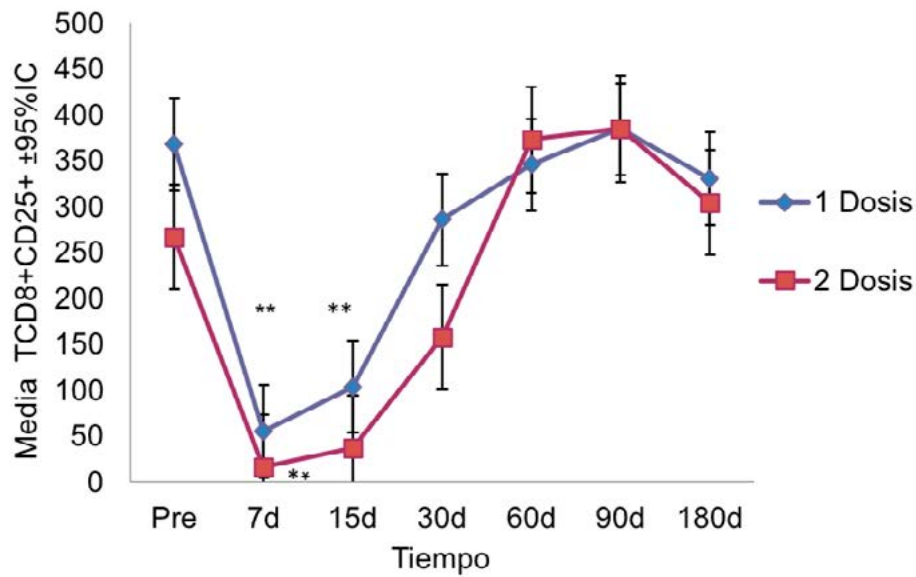


Figura 41. Cinética de la expresión de CD25+ en los linfocitos TCD8+ en número absoluto. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.4. CÉLULAS TREG

Las células Treg tienen un fenotipo heterogéneo, las cuales no pueden ser identificadas con un solo marcador. Se identificaron según la estrategia de análisis descrita en la figura 18 de materiales y métodos.

Se observó una disminución significativa del porcentaje a los 30d post-TC para el grupo 2D. En número absoluto se observó una disminución significativa hasta los 15 días en el grupo 1D y hasta los 30 días en el grupo 2D. Entre ambos grupos en porcentaje se observaron diferencias significativas a los 15d y 30d (Treg 15d 1D= $5,38 \pm 5,19$; Treg 15d 2D= $2,84 \pm 2,73$ ($p=0,036$) y Treg 30d 1D= $5,95 \pm 3,32$; Treg 30d 2D= $3,27 \pm 2,69$ ($p=0,040$). Se observó una recuperación (días) más precoz en porcentaje para 1D que 2D (1D= $25,71 \pm 26,52$; 2D= $49,71 \pm 45,54$ $p=0,046$) (Anexo I, tabla 7).

4. MONITORIZACIÓN DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS

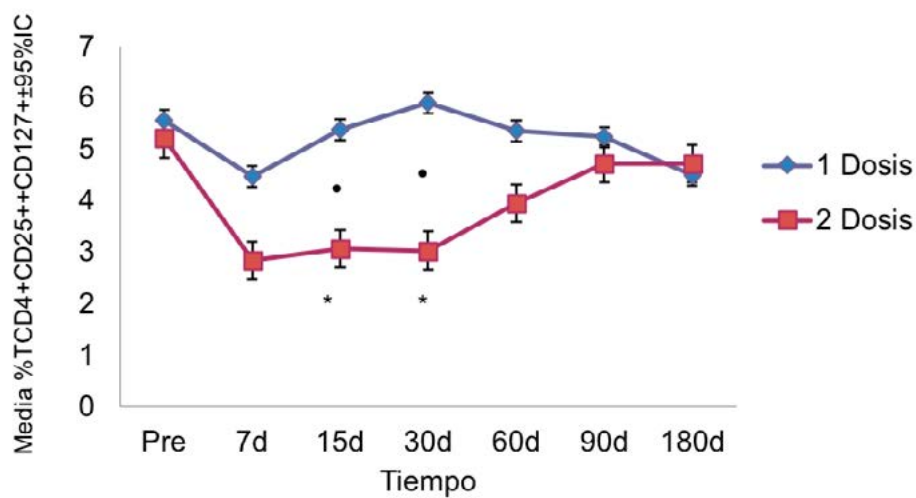


Figura 42. Cinética % células Treg

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones • $p < 0,05$

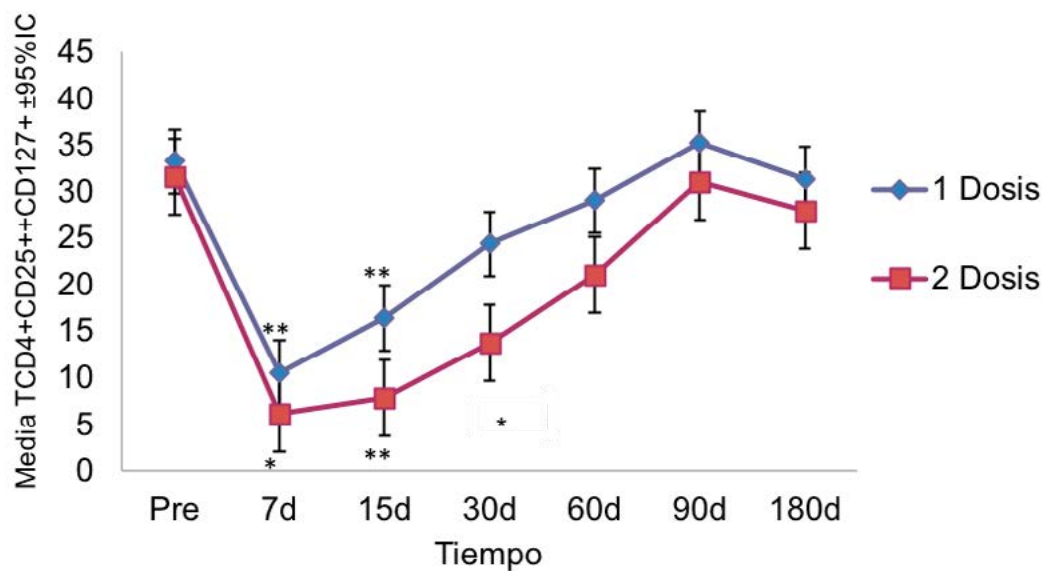


Figura 43. Cinética de células Treg en número absoluto

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.5. LINFOCITOS B

Los **linfocitos B** en porcentaje y en número absoluto en ambos grupos sufrieron un aumento porcentual a la semana post-TC (siendo significativo solo en porcentaje), reduciéndose los valores desde los 30 hasta 180 días. En porcentaje resultados estadísticamente significativos entre ambos grupos en el punto 7d (% LB 7d 1D=18,46 vs. % LB 7d 2D=12,52; $p=0,034$; LB 7d 2D= $186,57 \pm 229,98$ vs. LB 7d 1D= $76,38 \pm 72,69$; $p=0,027$) (Anexo I, tabla 3).

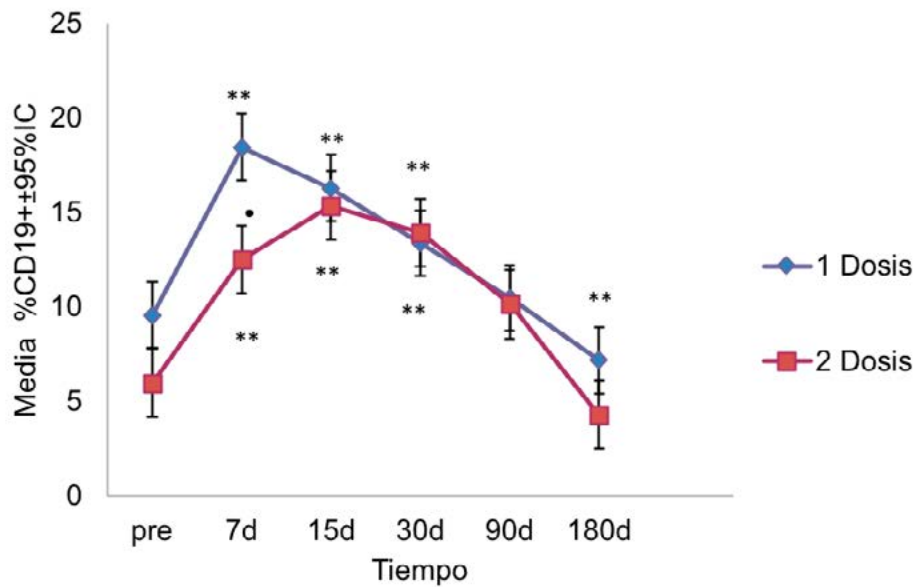


Figura 44. Cinética % linfocitos B

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas $**p<0,01$ y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones $\bullet p<0,05$

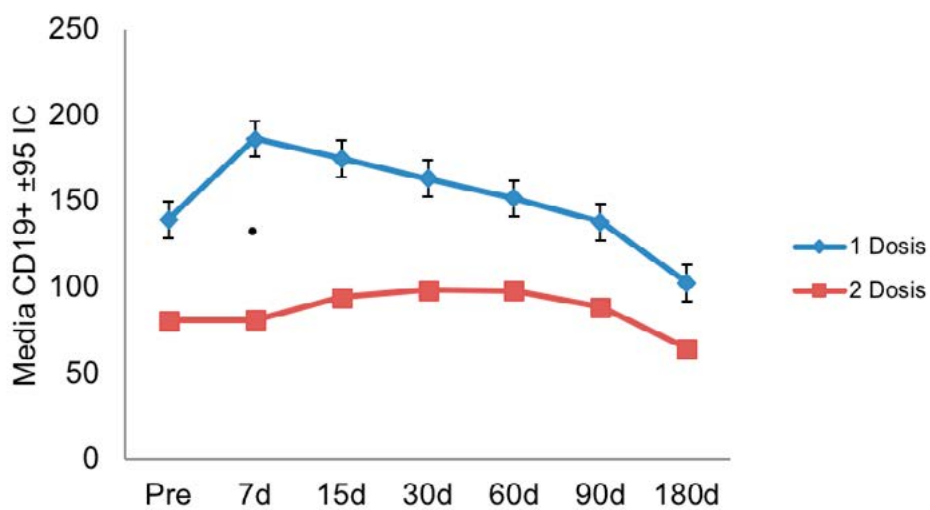


Figura 45. Cinética de linfocitos B en número absoluto

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones $\bullet p<0,05$

Los linfocitos B naive en porcentaje relativo y en número absoluto oscilaron en valores similares durante el pre-TC y los 7d, sin variaciones significativas. Tampoco se observaron diferencias en el porcentaje y número absoluto de linfocitos B de memoria, permaneciendo estables (anexo 1, tabla 12).

4.3.6. CÉLULAS NATURAL KILLER (NK)

Las células NK en ambos grupos sufrieron un descenso tanto en porcentaje como en número absoluto a los 7d aumentando de manera progresiva hasta los 180d. Tanto en número absoluto como en porcentaje valores ligeramente aumentados en 2D respecto a 1D. Este descenso es significativo para 1D en porcentaje a los 7d y en número absoluto a los 7d, 15d y 30d (Anexo I, tabla 4).

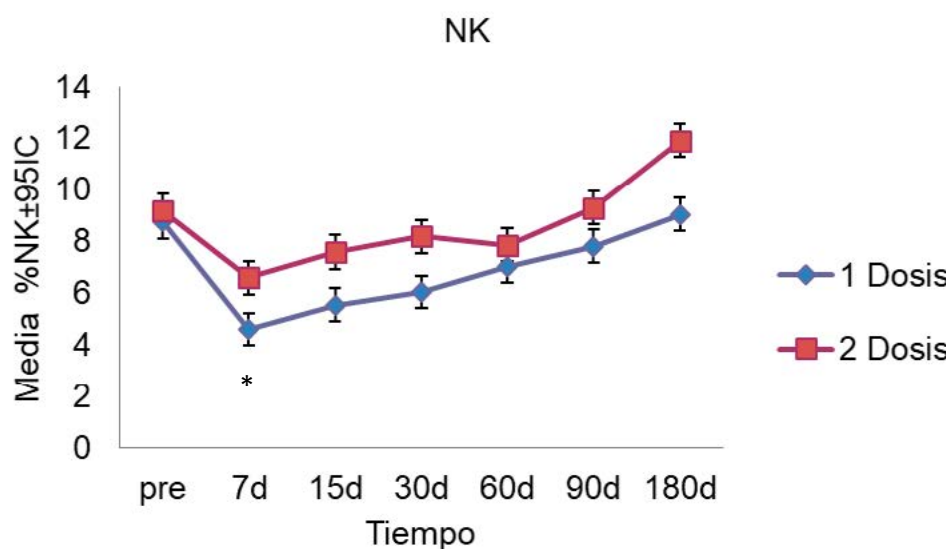


Figura 46. Cinética % Células NK

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

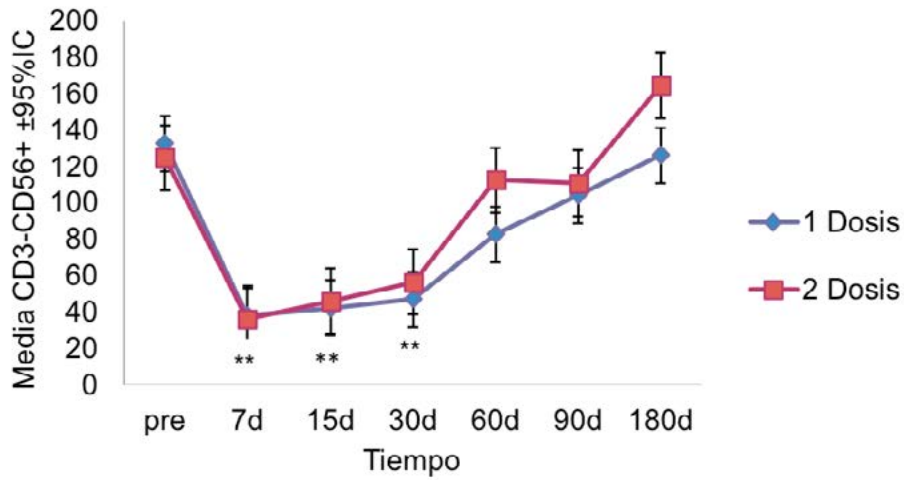


Figura 47. Cinética de células NK en número absoluto

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$

4.3.7. MONOCITOS

Los monocitos describieron una cinética similar a los linfocitos T, con una caída significativa en porcentaje a los 7d (1D) seguida de un aumento sostenido entre los 30d y 90d (Anexo I, tabla 1).

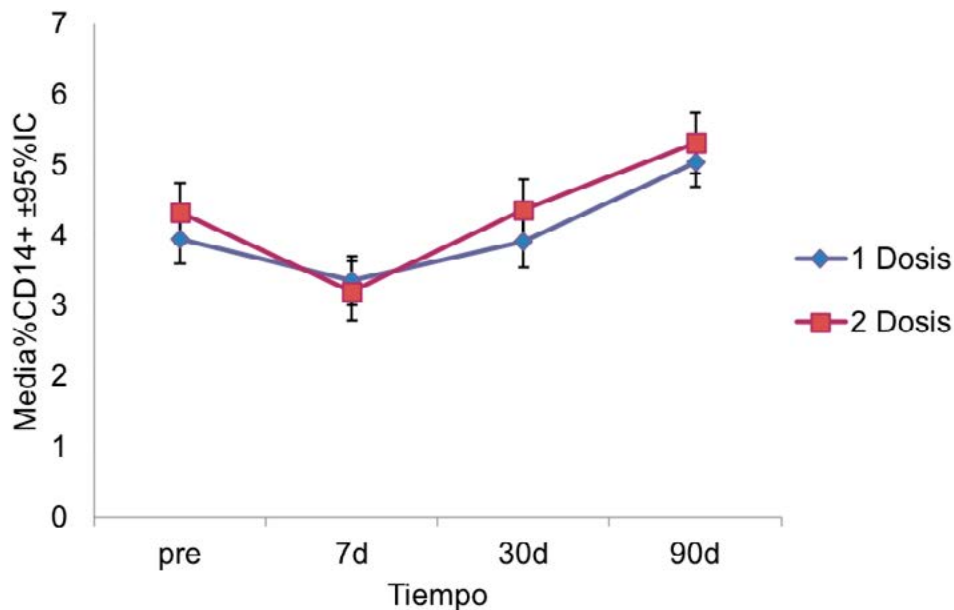


Figura 48. Porcentaje de monocitos

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$

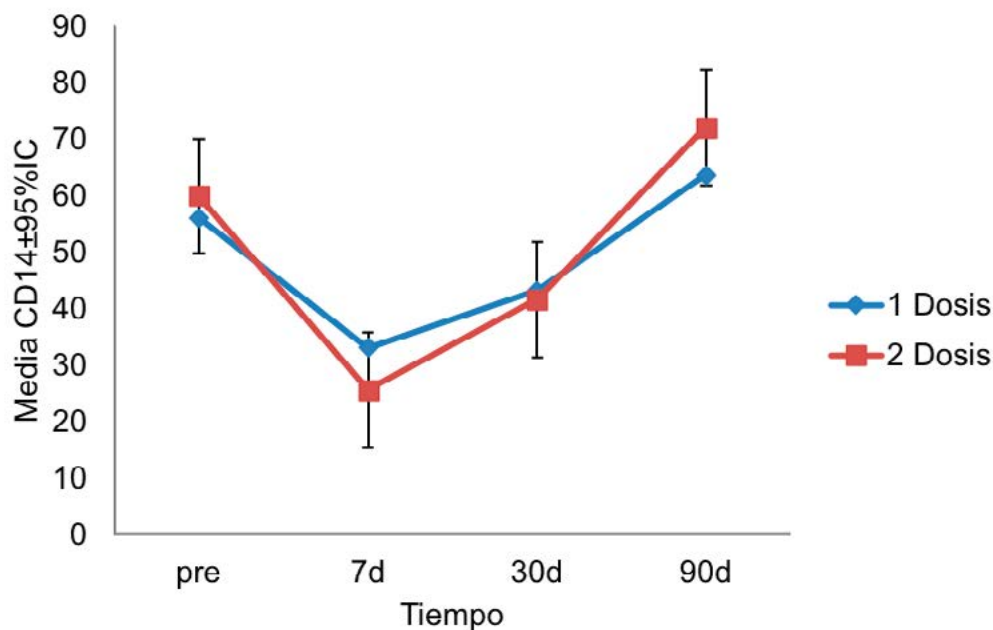


Figura 49. Número de monocitos totales

No hubo diferencias en relación al valor basal

4.3.8. ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS TCD8+ Y MONOCITOS

El perfil de activación de monocitos y linfocitos T CD8+ solo tuvo un seguimiento de 90 días.

Se estudiaron en base a la coexpresión de los marcadores HLA-DR y CD38 en TCD8+. Al tratarse de marcadores de infección crónica (HLA-DR) y aguda (CD38) se evaluó también la expresión individual de ambos. Se observó un descenso no significativo de la coexpresión en porcentaje a los 7d y 90d, recuperando el valor basal a los 30d en ambos grupos. En número absoluto se observaron diferencias significativas con respecto al valor basal a la semana para ambos grupos y a los 30d para 2D (Anexo I, tablas 10 y 11).

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

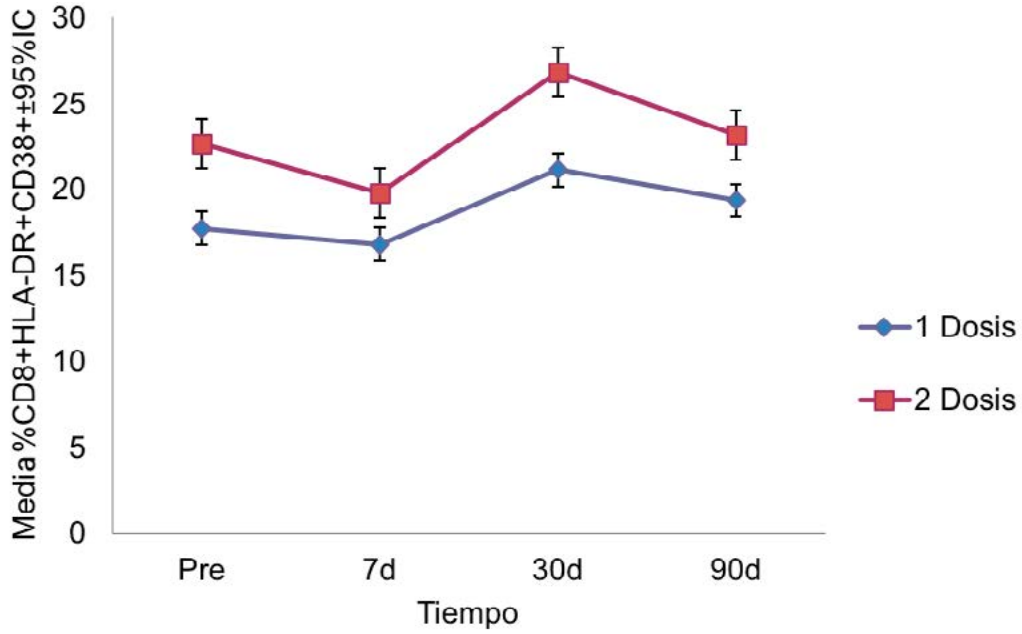


Figura 50. Cinética de activación linfocito %TCD8+HLA-DR+CD38

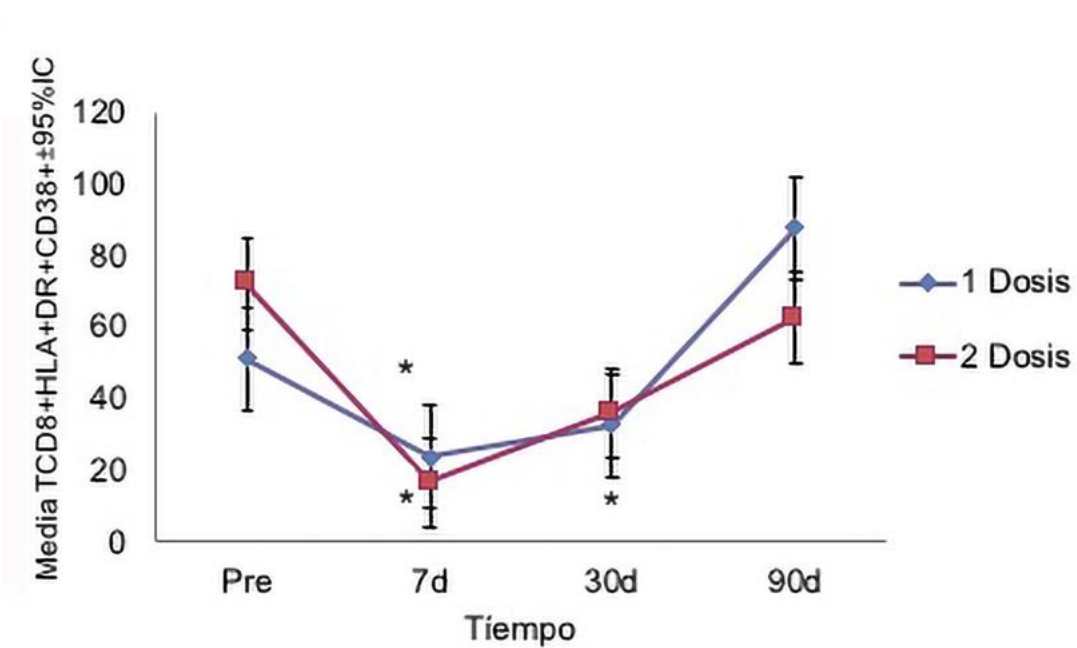


Figura 51. Cinética de linfocitos TCD8+ activados (HLA-DR+CD38+) en número absoluto

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras no relacionadas *p<0,05

Al desglosar las frecuencias de células HLA-DR+ y CD38+ también se observó un descenso porcentual a los 7d y 90d. En número absoluto se observó un descenso en la expresión

de HLA-DR a los 7d en ambos grupos y hasta los 30d en el grupo 2D. Se recuperaron valores basales a los 90d en ambos grupos. En la tabla 11 (anexo 1) se indica el grado de significación estadística de la diferencia de medias de los puntos de estudio con relación al basal para ambos grupos.

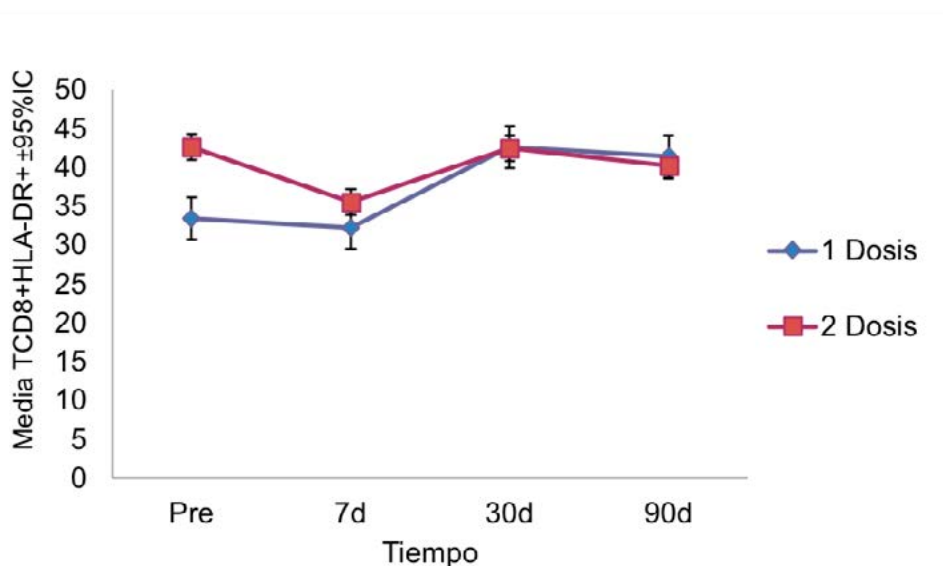


Figura 52. Cinética de activación %TCD8+HLA-DR+

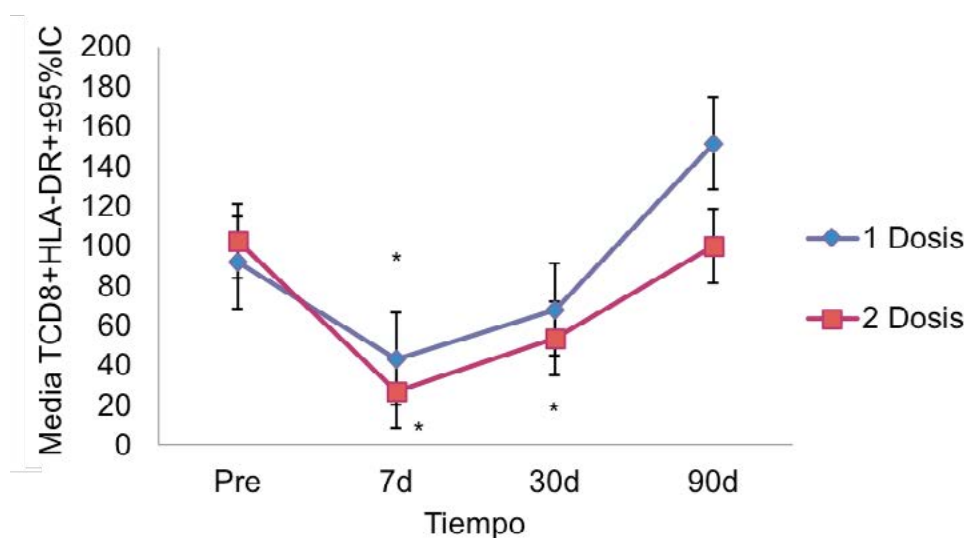


Figura 53. Cinética de activación TCD8+HLA-DR+ en número absoluto

Diferencias de media en relación al valor basal, t para muestras no relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

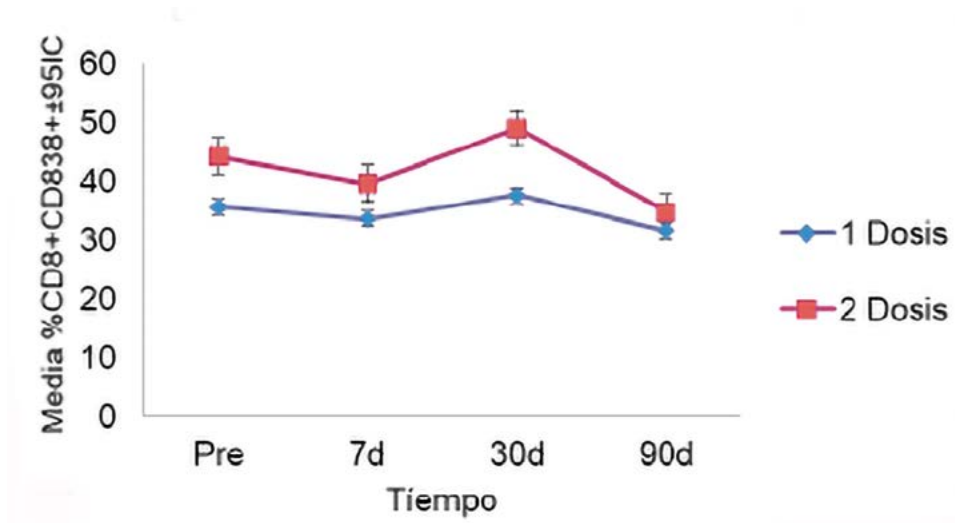


Figura 54. Cinética de activación %TCD8+CD38+

En ninguno de los puntos hubo diferencias significativas entre ambos grupos y el valor basal

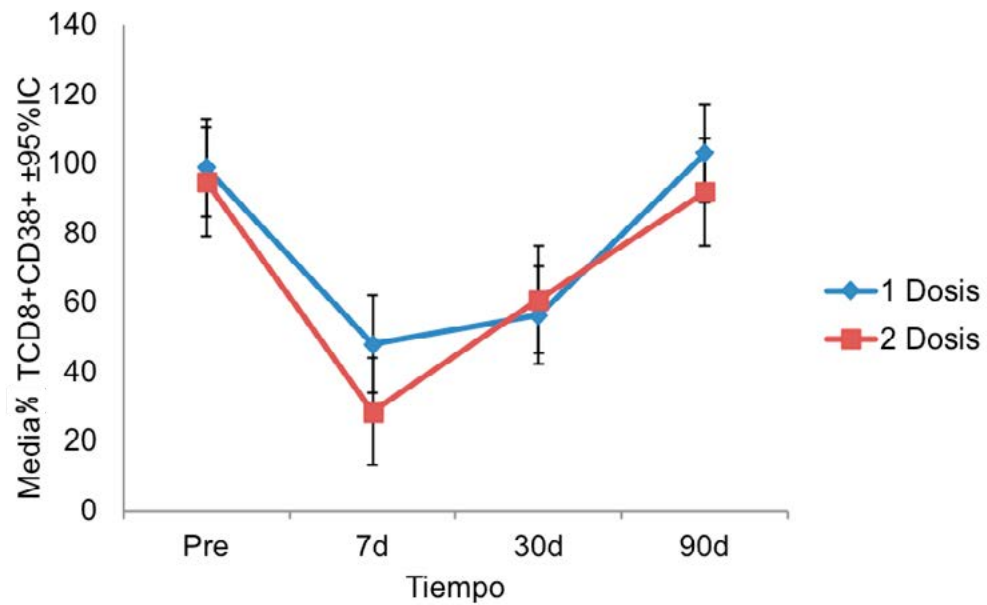


Figura 55. Cinética de activación TCD8 CD38+ en número absoluto

En ninguno de los puntos hubo diferencias significativas entre ambos grupos y el valor basal

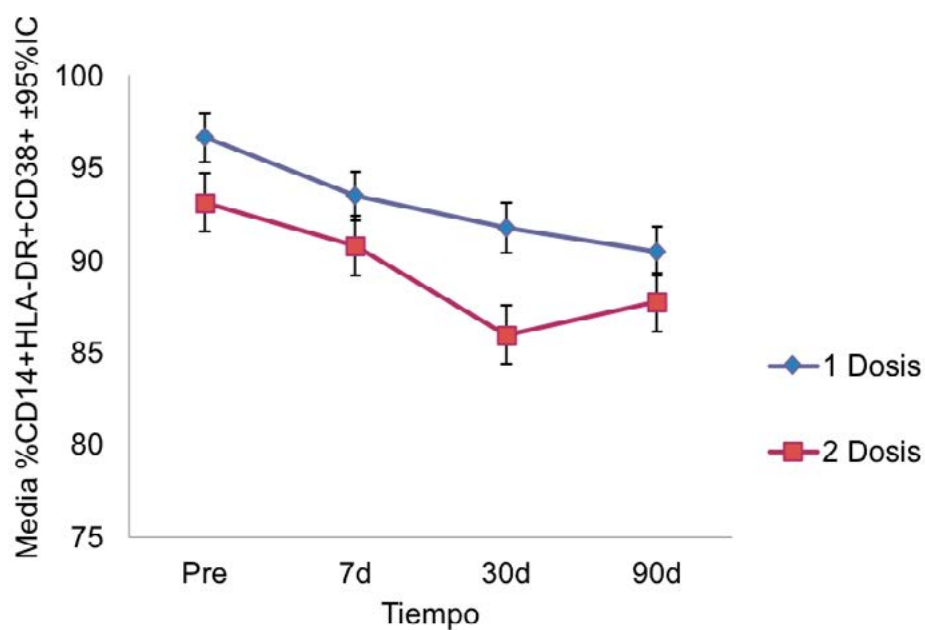


Figura 56. Cinética de activación % CD14+HLA-DR+CD38+

No hubo diferencias significativas entre ambos grupos y el valor basal

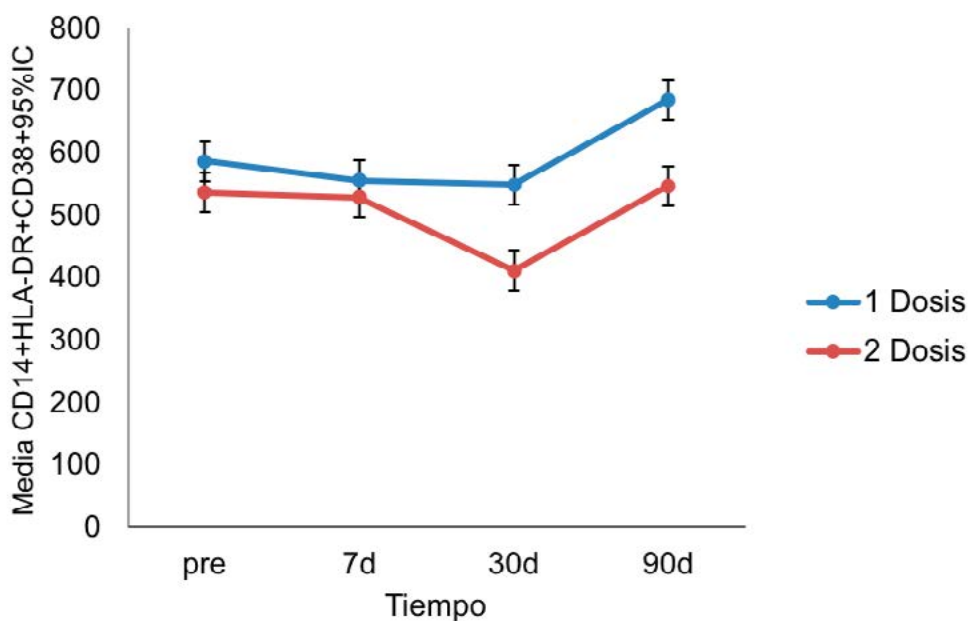


Figura 57. Cinética de activación CD14+HLA-DR+CD38+ en número absoluto

No hubo diferencias significativas entre ambos grupos y el valor basal

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

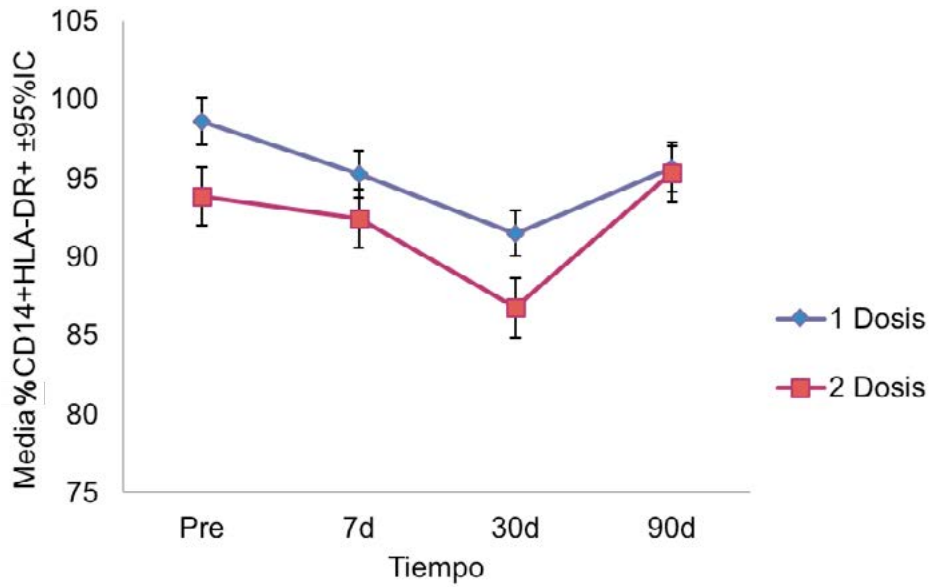


Figura 58. Cinética de activación %CD14+HLA-DR+

No hubo diferencias significativas entre ambos grupos y el valor basal

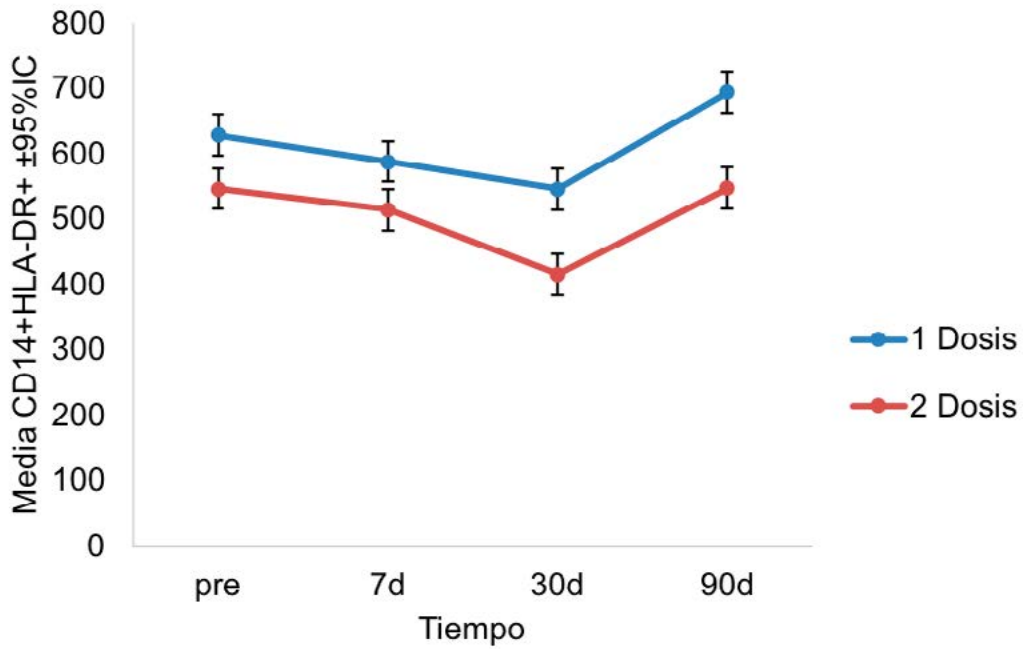


Figura 59. Cinética de activación CD14+HLA-DR+ en número absoluto

No hubo diferencias significativas entre ambos grupos y el valor basal

Los marcadores de activación HLA-DR+ y CD38+ disminuyeron porcentualmente y en número absoluto hasta los 30d en monocitos, aumentando posteriormente hasta los 90d en ambos grupos. Entre ambos grupos no se observaron diferencias significativas en ninguno de los puntos de estudio (Anexo I, tabla 13).

5. MONITORIZACIÓN DE PARÁMETROS HUMORALES

En cuanto al comportamiento cinético de los parámetros inmunológicos de inmunidad humoral se observó:

INMUNOGLOBULINA G (IgG):

En ambos grupos descendieron significativamente las concentraciones a los 7d, manteniéndose entre los 7d y 30d, recuperándose desde los 30d (sin llegar a valores basales), para volver a disminuir a partir de los 90d. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Anexo I, tabla 14).

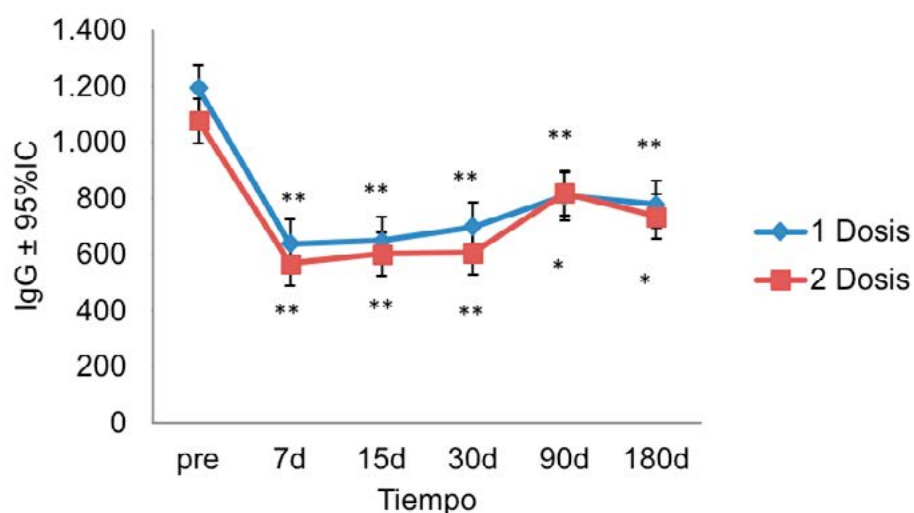


Figura 60. Cinética IgG (mg/dl)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras no relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

INMUNOGLOBULINA A (IgA):

Disminuyeron significativamente las concentraciones en ambos grupos a los 7d. En el caso de 1D las concentraciones se estabilizaron hasta los 180d post-TC; pero sin alcanzar valores basales. Sin embargo; en el caso de 2D se estabilizaron solo hasta los 30d para posteriormente disminuir hasta los 180d sin recuperar valores basales. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Anexo I, tabla 14).

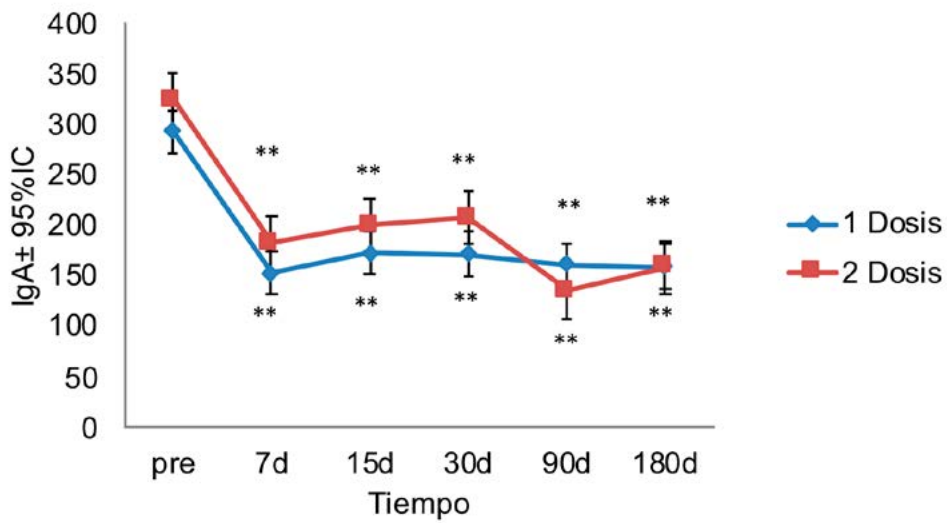


Figura 61. Cinética de IgA (mg/dl)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras no relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

INMUNOGLOBULINA M (IgM):

Disminuyeron las concentraciones a los 7d en ambos grupos, para posteriormente disminuir más lentamente hasta los 180d, sin recuperar los valores basales. Esta disminución fue significativa en el grupo 1D en todos los puntos; sin embargo, en el grupo 2D solo fue a los 30 y 180d. Se observaron concentraciones significativamente mayores a los 30d en el grupo 1D (IgM 30d 1D= 89,87±46,23; IgM 30d 2D= 60,80±36,40 p= 0,035) (Anexo I, tabla 14).

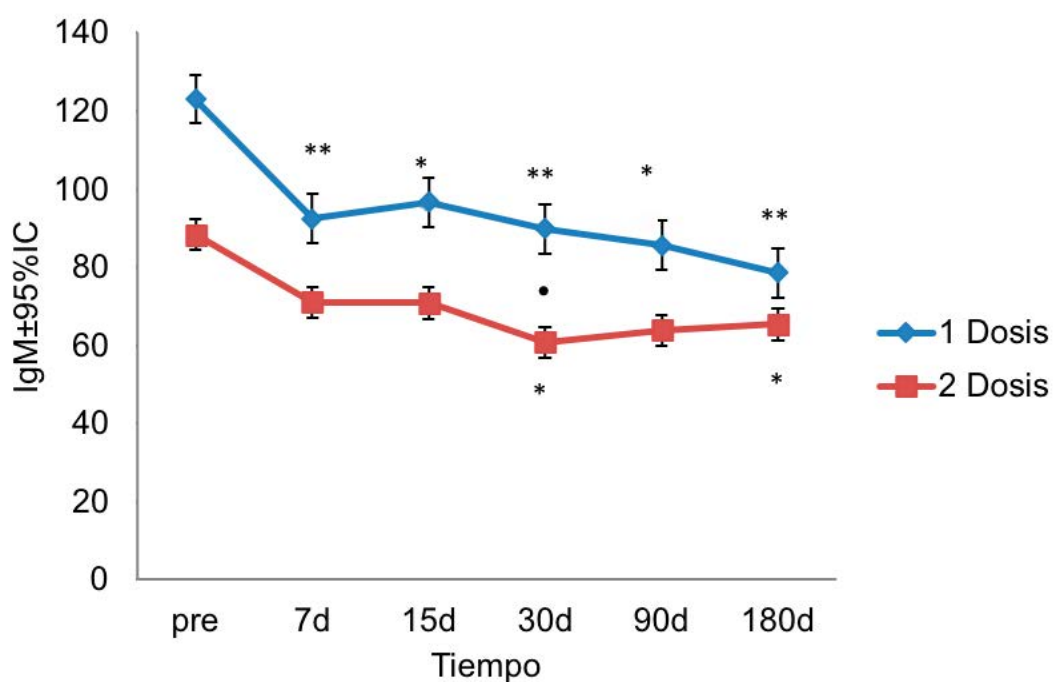


Figura 62. Cinética de IgM (mg/dl)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas *p<0,05; **p<0,01 y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones •p<0,05

NIVELES SÉRICOS FACTOR DEL COMPLEMENTO C3, C4 Y PCR

Siguen una pauta cinética similar, tras disminuir significativamente sus concentraciones durante la primera semana respecto a niveles basales (Anexo I, tabla 15).

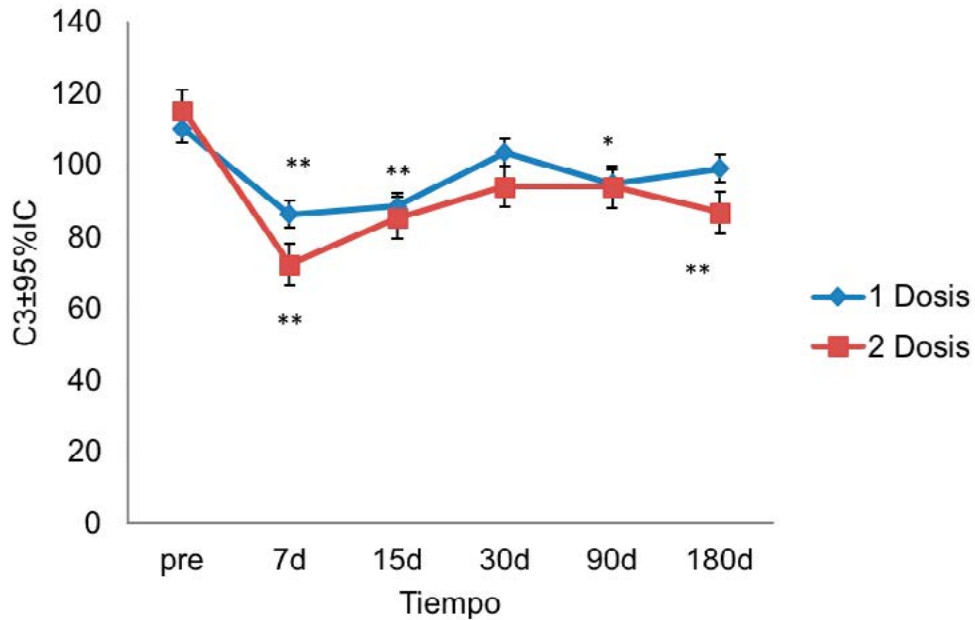


Figura 63. Cinética C3 (mg/dl)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

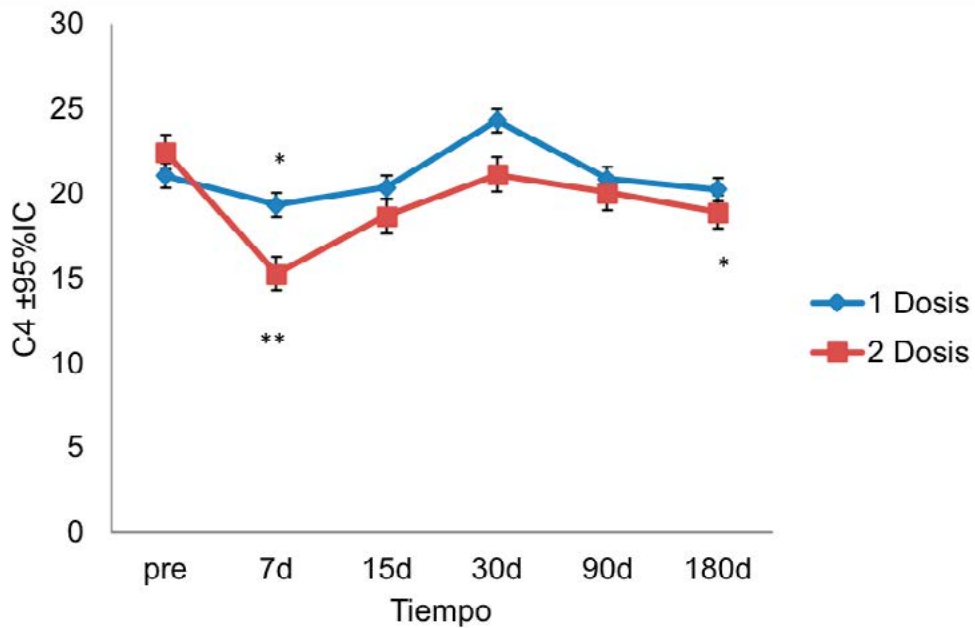


Figura 64. Cinética C4 (mg/dl)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5. MONITORIZACIÓN DE PARÁMETROS HUMORALES

Los niveles de **PCR** disminuyeron hasta los 7d o 15d, recuperándose a los 30d en el caso de 1D; pero sin llegar a valores basales, para posteriormente disminuir hasta los 180d. La disminución a partir de los 30d es mayor en el grupo 1D sin ser, estadísticamente significativa (Anexo I, tabla 15).

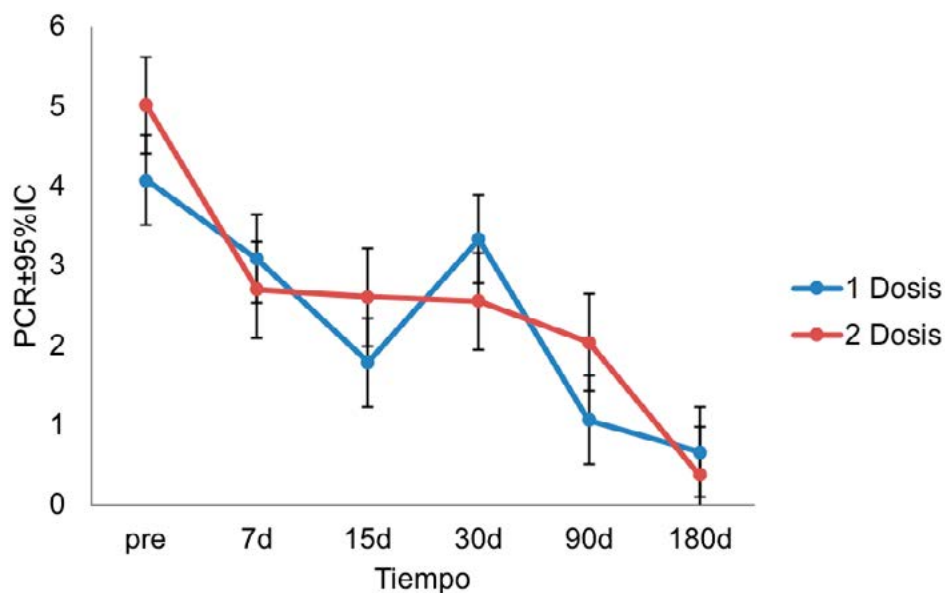


Figura 65. Cinética PCR (mg/dl)

En ninguno de los puntos hubo diferencias significativas entre ambos grupos y el valor basal

6. EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

En cuanto a la cinética de los parámetros bioquímicos se ilustran en las figuras (66-68). Las proteínas totales y albúmina tienen una cinética similar, disminuyeron ligeramente a la semana para ir progresivamente recuperando valores basales a los 90d. En el caso de las proteínas se observaron diferencias entre ambas dosis a los 30 y 90d (proteínas 30d 1D= $5,81 \pm 0,76$; proteínas 30d 2D= $5,31 \pm 0,71$; $p=0,027$ proteínas 90d 1D= $6,34 \pm 0,60$; proteínas 90d 2D= $6,00 \pm 0,44$; $p=0,044$). Sin embargo, en el caso de la albúmina se observaron diferencias significativas entre ambas dosis a los 15d (albúmina 15d 1D= $3,3 \pm 0,45$; albúmina 15d 2D= $2,9 \pm 0,43$; $p=0,029$) (Anexo I, tabla 16).

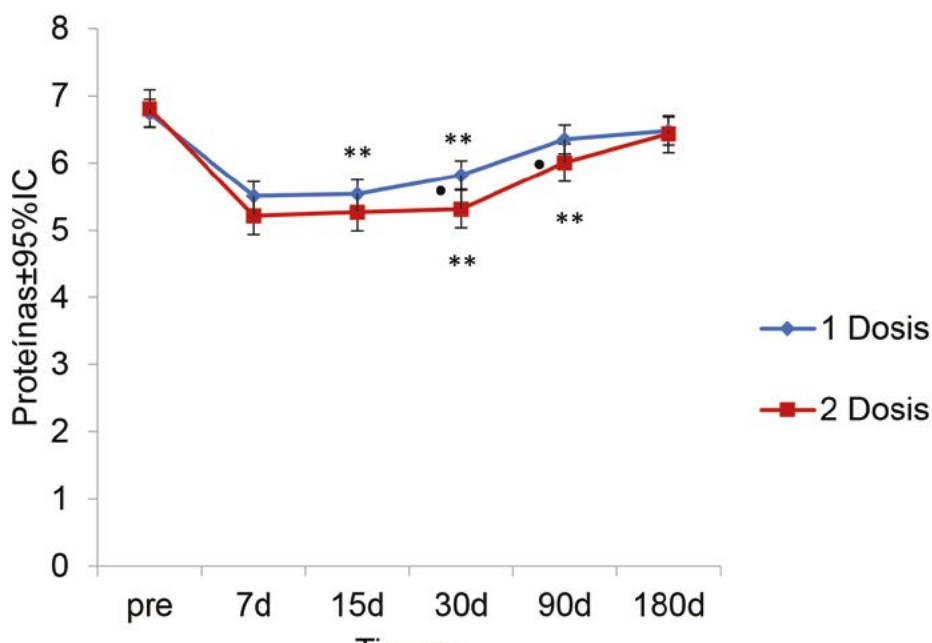


Figura 66. Cinética de concentraciones de proteínas (g/dl)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones • $p < 0,05$

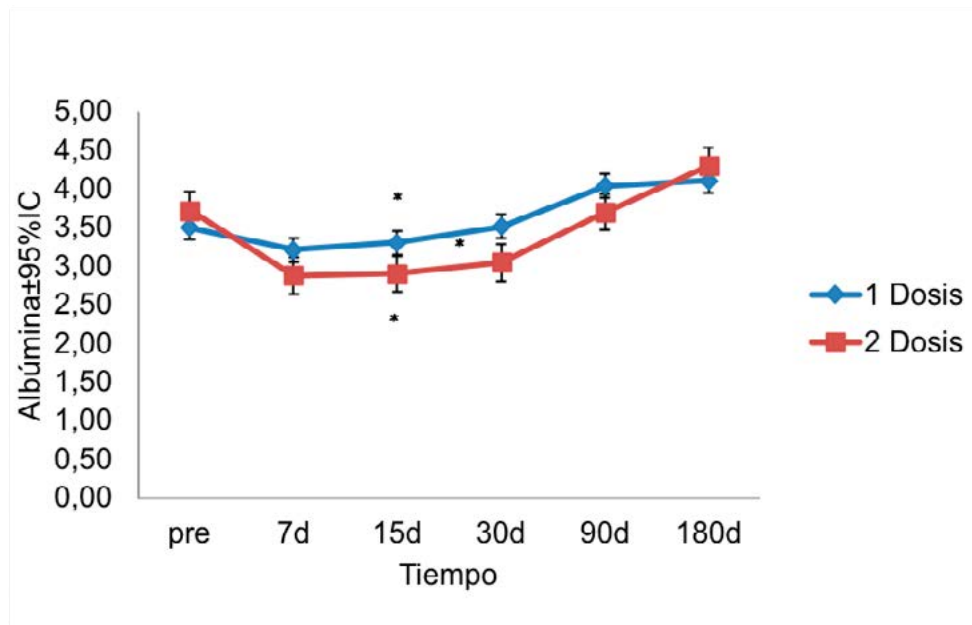


Figura 67. Cinética de concentraciones de albúmina (g/dl)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones * $p < 0,05$

La **creatinina** aumentó su concentración a los 7d, disminuye entre los 7-15d para 1D y entre los 7-30d para 2D (siendo significativa esta disminución a los 30d para 2D), para después aumentar hasta los 180d recuperando valores basales a los 90d. A partir de los 90d aumenta más el nivel con respecto al basal para 1D que 2D (siendo significativo para 1D). Los pacientes que recibieron 2D presentaron mejor funcionalidad renal a partir de los 30 días, igualándose a los pacientes de 1D (Anexo I, tabla 16).

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

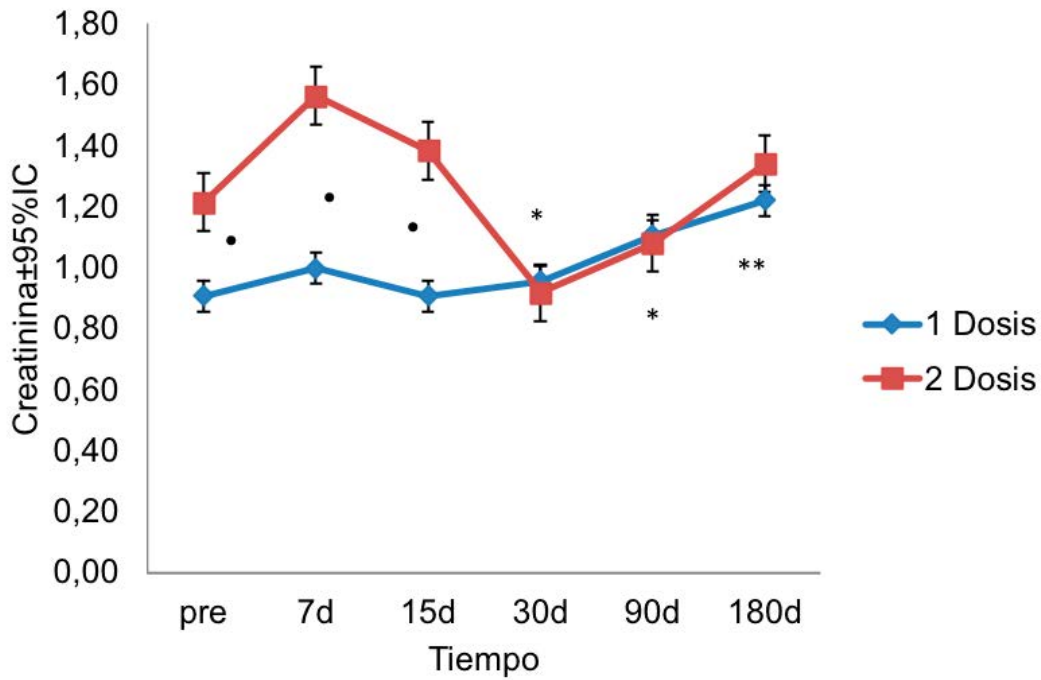


Figura 68. Cinética de concentraciones de creatinina sérica (mg/dl)

Diferencia de medias en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones * $p < 0,05$

En nuestro hospital se utilizan los valores de creatinina para valorar la función renal ya que los niveles séricos son más constantes y no varían por factores externos. Se observaron diferencias significativas en los valores de creatinina para ambas pautas en los puntos de estudio pre, 7d y 15d (creatinina pre 1D= $0,90 \pm 0,34$, creatinina pre 2D= $1,21 \pm 0,41$; $p = 0,007$; creatinina 7d 1D= $1,03 \pm 0,50$, creatinina 7d 2D= $1,56 \pm 1,22$ $p = 0,016$; creatinina 15d 1D= $0,92 \pm 0,81$, creatinina 15d 2D= $1,38 \pm 0,92$; $p = 0,025$).

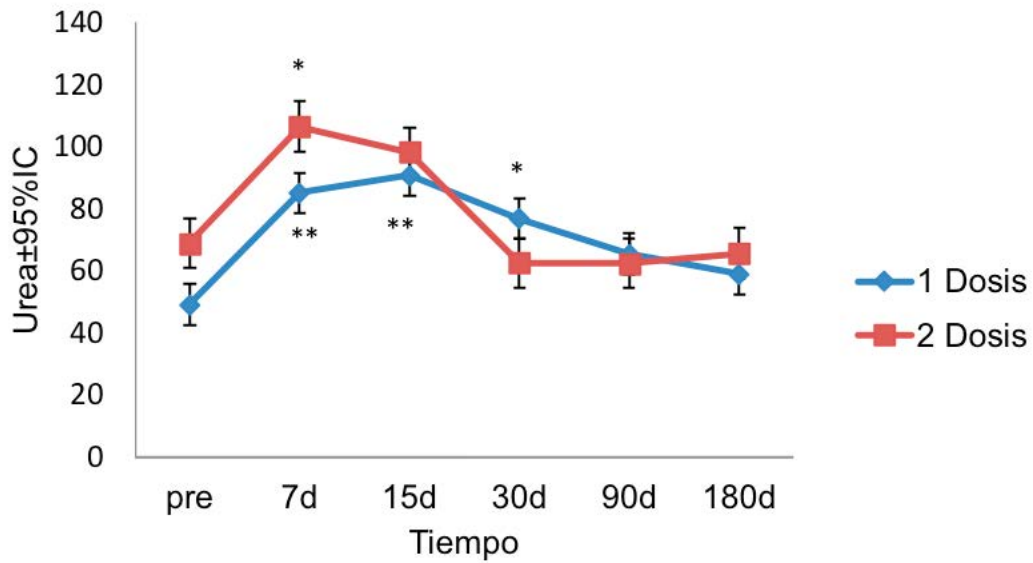


Figura 69. Cinética de concentraciones de Urea (mg/dl)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

La cinética de urea, aumentó su concentración de manera significativa a los 7d, para después disminuir inmediatamente en el caso de 2D y desde los 15d en una 1D. A partir de los 30d las concentraciones continúan disminuyendo lentamente hasta los 180d en el grupo 1D, sin embargo, en el grupo 2D permanecen estables. En el grupo de 1D valores por encima del valor basal en todos los puntos (Anexo I, tabla 16).

7. MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA FASE DE MANTENIMIENTO

Tabla 31. Niveles fármacos utilizados en la fase de mantenimiento

VARIABLES	1D/2D	p
TACROLIMUS		
Retraso en inicio (días)	5±3/9±3	0,000 ^a
Niveles a día 7 (ng/ml)	6,18±4,28 / 3,53±3,00	0,030 ^a
Tiempo en alcanzar >10 ng/ml (días)	12±10/27±30	0,24 ^a
MICOFENOLATO		
Niveles a día 7	1,23±0,87/1,87±1,59	0,256 ^a

Los valores se expresan media± desviación típica. El valor de p está indicado como t de Student

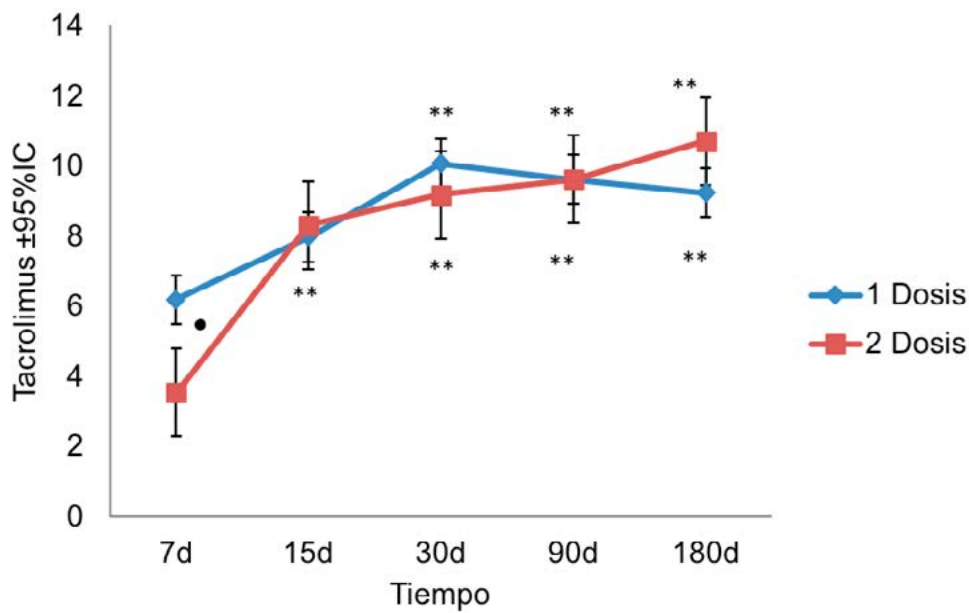


Figura 70. Cinética de concentraciones de Tacrolimus (ng/ml)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas. *p<0,05; **p<0,01 y t para muestras no relacionadas entre ambas dosificaciones •p<0,05

Los niveles de FK aumentaron hasta los 30d observándose una estabilización de los valores hasta los 180d. Se observaron diferencias significativas a los 7d (FK 7d 1D=6,18±4,22; FK 7d 2D= 3,53±3,41 p= 0,025) (Anexo I, tabla 17).

Los niveles de MMF se mantienen estables hasta los 30d post-TC, experimentando un ligero aumento posterior y mantenido hasta el año. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Con respecto al valor basal se observaron diferencias significativas a los 180d en ambos grupos (Anexo I, tabla 17).

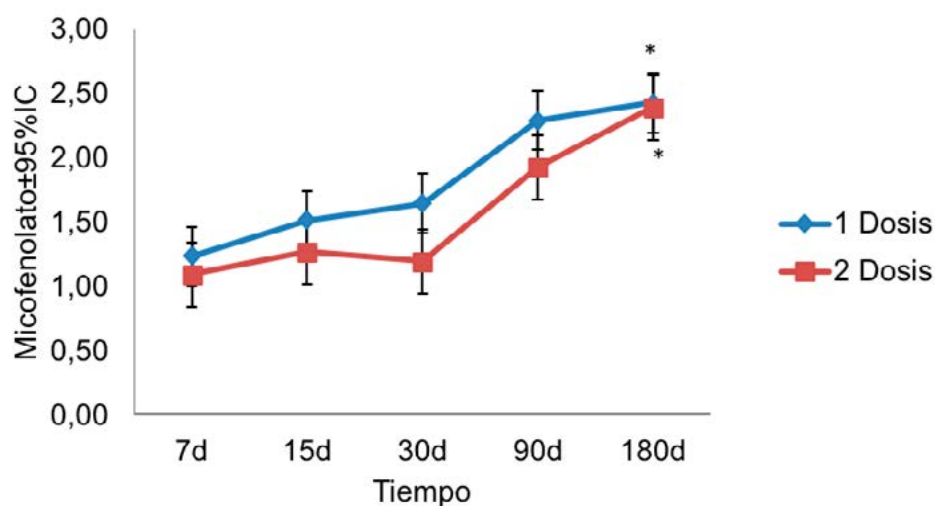


Figura 71. Cinética de concentraciones de micofenolato ($\mu\text{g/ml}$)

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas. * $p < 0,05$

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

Tabla 32. Diferencias inmunológicas BAS 1D/2D

Variable	1D	2D	p
% Treg 7d	4,47±3,46	2,84±2,73	0,052 ^a
CD8+ 7d	138,78±108,88	69,71±64,34	0,022^a
%CD19 7d	18,46±9,43	12,52±6,91	0,034^a
CD19 7d	186,57±229,98	76,38±72,69	0,027^a
% CD4+CD25+ 7d	20,86±21,74	16,92±23,88	0,584 ^a
%CD8+CD25+ 7d	10,38±16,48	5,31±25,10	0,180 ^c
CD8+CD25+ 7d	55,20±76,52	16,10±17,34	0,086 ^c
%HLADR+CD8+ 7d	32,18±22,35	35,56±26,59	0,637 ^a
Tacrolimus g/dl 7d	6,18±4,22	3,53±3,41	0,034^a
% CD4+CD25+ 15d	31,55±25,03	13,28±16,08	0,020^a
% Treg 15d	5,38±5,19	2,84±2,73	0,039^a
%CD4+CD25+ 30d	50,73±25,62	37,05±29,10	0,096 ^a
% CD8+CD25+ 30d	21,45±22,45	18,97±20,03	0,159 ^a
% Treg 30d	5,95±3,32	3,27±2,69	0,040^a

Los datos se expresan como media ±DT. Prueba t para muestras no relacionadas a=t de Student; c= Mann-Whitney

Tabla 33. Diferencias bioquímicas BAS 1D/2D

Variable	1D	2D	p
Creatinina Pre	0,90±0,34	1,21±0,41	0,007^a
IgG 7d	639,48±203,28	567,28±218,97	0,362 ^a
C3 7d	86,29±25,80	72,33±25,38	0,165 ^a
PCR 7d	3,10±3,25	2,70±4,08	0,860 ^a
Creatinina 7d	1,03±0,50	1,56±1,22	0,027^a
Albúmina 15d	3,30±0,45	2,9±0,43	0,029^a
Creatinina 15d	0,90±0,45	1,38±1,03	0,025^c
IgM 30d	89,87±46,23	60,80±36,40	0,024^a
Proteínas 30d	5,81±0,76	5,31±0,71	0,027^a
Albúmina 30d	3,49±3,40	3,04±0,40	0,058 ^a
Proteínas 90d	6,34±0,60	6,00±0,44	0,044^a

Los datos se expresan como media ±DT. Prueba t para muestras no relacionadas a=t de Student; c= Mann-Whitney

8. CORRELACIÓN CLÍNICA ENTRE LOS CAMBIOS OBSERVADOS EN POBLACIONES LINFOCITARIAS E INFILTRACIÓN LINFOCITARIA

Entre los pacientes con mayor infiltración linfocitaria no se pudo establecer una correlación con la expresión de CD25 y ratio CD4/CD8. Se observó un mayor porcentaje de expresión de HLA-DR+CD38+ en los linfocitos CD8+ a los 30d en los pacientes de 2D.

Tabla 34. Correlación entre diferentes poblaciones linfocitarias en pacientes que recibieron BAS (1D,2D) con infiltración linfocitaria

1D	>50% 1-R (n=9)	<50%1-R (n=28)	p
Ratio CD4/CD8 pre	2,93±1,27	3,75±3,75	0,756 ^a
% CD4+CD25 pre	56,14±14,77	52,56	0,453 ^a
%CD8+CD25+pre	35,05±34,56	28,69±25,11	0,619 ^a
%Treg pre	5,58±2,61	5,78±2,65	0,784 ^a
% Treg 30d	5,21±3,13	4,87±3,70	0,392 ^a
% Treg 90d	4,12±1,51	5,15±1,99	0,380 ^a
%CD8+HLA-DR+CD38+ pre	17,22±11,43	18,25±14,58	0,951 ^a
%CD8+HLA-DR+CD38+ 30d	12,67±6,00	22,85±20,48	0,466 ^a
%CD8+HLA-DR+CD38+ 90d	12,20±24,28	24,28±21,04	0,916 ^a
2D	>50% 1-R (n=3)	<50%1-R (n=15)	p
Ratio CD4/CD8 pre	2,80±1,23	3,15±1,46	0,678 ^a
%CD4+CD25+ pre	56,03± 24,29	45,22 ±23,42	0,477 ^a
%CD8+CD25+pre	54,25±33,97	12,47±8,30	0,045 ^a
% Treg pre	4,86±3,76	5,41±3,08	0,773 ^a
% Treg 30d	2,28±3,21	3,57±3,21	0,467 ^a
% Treg 90d	3,52±5,11	5,11±1,82	0,215 ^a
%CD8+HLA-DR+CD38+ pre	40,32±22,04	23,68±21,88	0,678 ^a
%CD8+HLA-DR+CD38+30d	55,63±13,59	25,08±18,93	0,030^a
%CD8+HLA-DR+CD38+ 90d	30,90±18,01	18,01±7,40	0,133 ^a

Los datos se expresan como media ±DT (desviación típica). Prueba t para muestras no relacionadas a= t de Student; c= Mann-Whitney

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 1

Respecto al total de pacientes (1+2D) de BAS se observó que los pacientes con mayor infiltración linfocitaria presentaron porcentajes mayores n.s. de activación CD8+ y menores de Treg en todos los puntos de estudio. La expresión de CD25+ en los linfocitos TCD8+ en el Pre-TC fue significativamente mayor en los pacientes con mayor infiltración.

Tabla 35. Correlación entre diferentes poblaciones linfocitarias en pacientes que recibieron BAS (1D+2D) con infiltración linfocitaria

	>50%1-R (n=12)	<50%1-R (n=43)	p
Ratio CD4/CD8 pre	2,89±1,19	3,51±3,02	0,513 ^a
%CD8+CD25+ pre	42,70±33,86	22,79±21,92	0,033 ^a
%CD4+CD25+ pre	56,10±17,55	50,19±20,80	0,401 ^a
%Treg pre	5,14± 2,35	5,53±2,68	0,675 ^a
% Treg 30d	4,78±3,68	5,05±3,64	0,728 ^a
% Treg 90d	4,19± 1,61	5,27±1,95	0,144 ^a
%CD8+HLA-DR+CD38+ pre	25,62±18,97	19,80±16,73	0,353 ^a
%CD8+HLA-DR+CD38+ 30d	31,08±25,59	23,43±19,75	0,391 ^a
%CD8+HLA-DR+CD38+ 90d	20,51±15,04	22,72±18,63	0,753 ^a
%CD8+HLA-DR+pre	41,42±28,89	35,23±18,98	0,442 ^a
%CD8+HLA-DR+ 30d	45,24±20,90	41,89±26,43	0,343 ^a
CD8+HLA-DR+90d	39,60±22,92	41,63±19,63	0,753 ^a
%CD8+CD38+pre	42,65±23,96	37,03±26,46	0,462 ^a
%CD8+CD38+ 30d	47,11±30,87	33,63±22,32	0,112 ^a
%CD8+CD38+ 90d	29,78±17,30	33,53±21,67	0,614 ^a

Los datos se expresan como media ±DT (desviación típica). Prueba t para muestras no relacionadas a= t de Student; c= Mann-Whitney

ESTUDIO 2

Estudio comparativo de expresión de CD25 en dos regímenes de inducción anti-CD25 (basiliximab vs. daclizumab)



ESTUDIO 2.

ESTUDIO COMPARATIVO DE EXPRESIÓN DE CD25 EN DOS REGÍMENES DE INDUCCIÓN ANTI-CD25 (BASILIXIMAB *VS.* DACLIZUMAB)

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Se comparó a 58 pacientes que recibieron 2D de DAC con 19 que recibieron 2D de BAS. Las características demográficas y clínicas se describen en la tabla 36.

Tabla 36. Características demográficas TC que reciben dos regímenes de anti-CD25

	BAS n= 19	DAC n=58	p
Edad (Rango)	56 (27-69)	54,7 (23-68)	0,518 ^a
Sexo (% masculino)	18 (95%)	28 (67%)	0,051 ^b
Episodios de infección n (%)	12 (63%)	22 (52%)	0,318 ^b
CMV n (%)	6 (31,57%)	19 (45%)	0,118 ^b
Muerte n (%)	3 (15,78%)	6 (10,34%)	0,687 ^b
Rechazo ≥2R n (%)	2 (10,52%)	11 (26%)	0,216 ^b
CAV año	1 (5,26%)	2 (3,44%)	0,723 ^b

Prueba t para muestras no relacionadas a= t de Student; b=Chi cuadrado

52% del grupo de DAC desarrollaron al menos una complicación infecciosa durante el primer año vs, un 63,15% 2D de BAS (chi-cuadrado p=0,233).

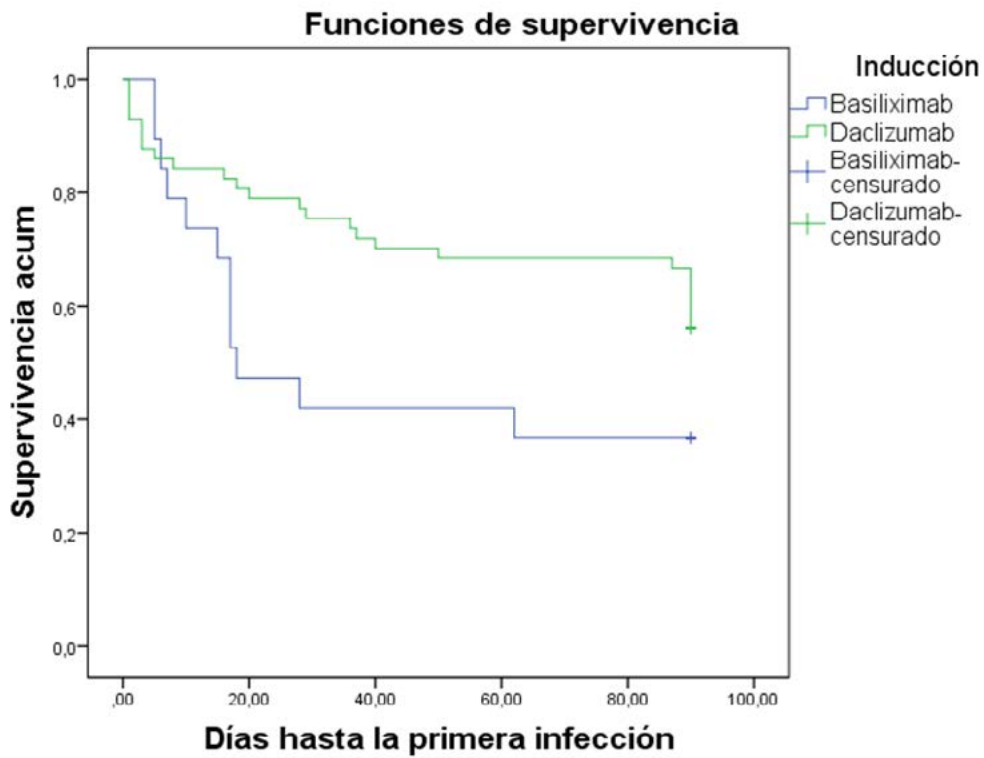


Figura 72. Tiempo libre de infección en los primeros 90 días

El análisis Kaplan-Meier no muestra diferencias entre ambos grupos ($p=0,066$)

Tabla 37. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia de infección para diferentes regímenes (BAS vs. DAC) durante los primeros 90 días

	Comparaciones globales		
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,373	1	,066

2. MONITORIZACIÓN POBLACIONES LINFOCITARIAS

Tabla 38. Diferencias supoblaciones TBNK en pacientes que reciben dos regimenes inmunosupresores anti-CD25 (BAS O DAC)

	BASILIXIMAB	DACLIZUMAB	p
% NK pre	9,19±8,00	10,81±6,90	0,481
% NK 7d	7,58±5,02	11,95±7,79	0,049
% NK 30d	8,18±5,21	10,95±7,15	0,098
% NK 90d	9,29±5,12	9,23±4,09	0,752
% NK 180d	12,24±5,46	11,02±6,59	0,397
% LB pre	6,34±4,89	5,04±3,83	0,069
% LB 7d	12,36±13,15	12,74±14,25	0,544
% LB 30d	13,15±10,96	10,39±7,20	0,160
% LB 90d	8,18±7,41	7,50±5,53	0,845
% LB 180d	5,09±5,85	4,62±3,02	0,739
% CD4 pre	48,00±	44,71±10,67	0,294
% CD4 7d	44,16±	40,32±13,48	0,753
% CD4 30d	45,86±	45,31±13,58	0,854
% CD4 90d	51,73±	48,49±10,69	0,911
% CD4 180d	47,17±	47,21±11,59	0,878
% CD8 pre	17,02±4,17	22,93±10,75	0,033
% CD8 7d	13,02±7,35	17,31±8,71	0,119
% CD8 30d	16,29±6,71	21,50±9,63	0,050
% CD8 90d	20,14±7,12	24,18±8,14	0,067
% CD8 180d	25,40±10,02	27,43±8,67	0,813
CD19 Naive pre	52,69±22,81	59,12±17,66	0,278
CD19 Naive 7d	55,19±13,70	60,41±15,35	0,518
CD19 memoria pre	38,67±19,91	31,54±16,08	0,137
CD19 memoria 7d	36,64±16,44	29,81±13,38	0,358
CD8DRCD38 pre	28,13±21,86	26,15±15,51	0,718
CD8DRCD38 7d	23,10±21,91	25,45±18,24	0,697
CD8DRCD38 90d	34,25±22,28	25,66±14,04	0,270

Los datos se expresan como media±DT. Los datos estadísticos se calcularon utilizando la prueba t de Student

3. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS TCD4+ Y TCD8+

Se observó mayor duración de supresión de CD25 en el grupo de DAC en comparación con BAS ($p=0,021$). La recuperación de los niveles basales fue más rápida en el grupo de BAS ($p=0,000$).

Con BAS se observó una disminución significativa de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ y TCD8+ durante el primer mes con una reconstitución completa a los tres meses. Sin embargo, con DAC se observó una disminución significativa de CD25+ en ambos tipos celulares durante los primeros tres meses, con una reconstitución que se completa a los 6 meses. A pesar de una reconstitución más rápida para BAS no implica mayor número de episodios de rechazo.

Tabla 39. Media de días de supresión de CD25 y recuperación de TCD4+CD25+ basal de dos anticuerpos anti-CD25 distintos

	DAC n= 58	BAS n=19	p
nº días supresión <3% TCD4+CD25+	45,35±33,52	27,40±19,17	0,021^a
IQR (Rango)	22,50 (7-180)	15 (7-75)	
nº días en recuperar TCD4+CD25+% basal	141±45,36	52,46±44,02	0,000^a

Los datos se expresan media±DT, IQR= rango intercuartílico. a= t de Student; b=Chi cuadrado

3. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS TCD4+ Y TCD8+

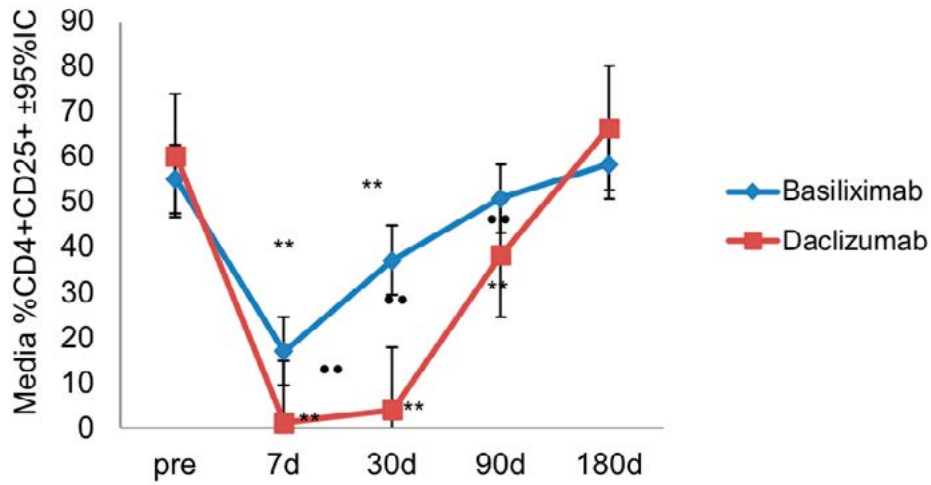


Figura 73. Cinética de expresión de CD25+ en TCD4+ en porcentaje

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas y * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y t para muestras no relacionadas entre ambos grupos •• $p < 0,01$

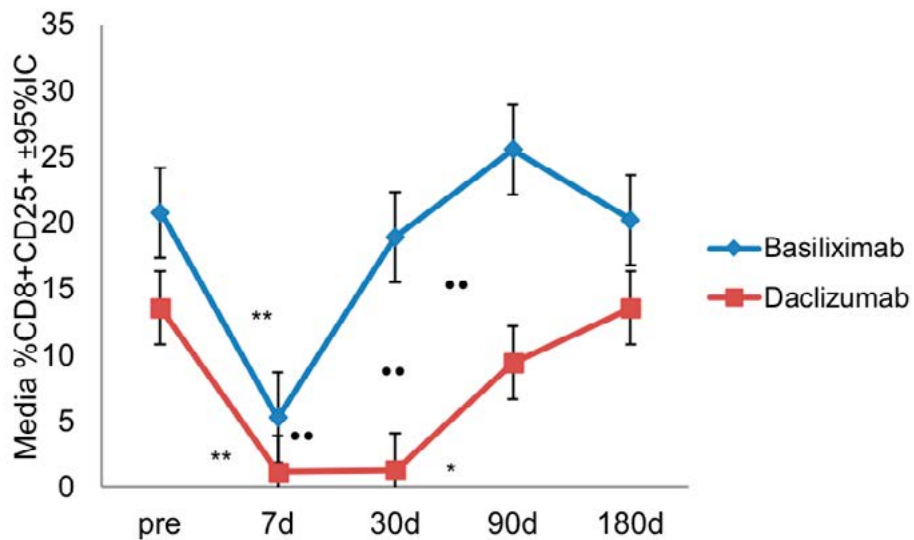


Figura 74. Cinética de expresión de CD25+ en TCD8+ en porcentaje

Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas y * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y t para muestras no relacionadas entre ambos grupos •• $p < 0,01$

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 2

Tabla 40. Porcentaje de expresión de CD25 en linfocitos T en diferentes puntos de estudio

Variable	BAS	DAC	p
%CD4+CD25+ pre	52,75±17,04	62,88±10,69	0,111
%CD4+CD25+ 7d	16,92±23,88	1,01± 0,99	0,000
%CD4+CD25+ 30d	37,05±29,10	3,948±12,44	0,000
%CD4+CD25+ 90d	50,79±22,97	38,1±30,78	0,001
%CD4+CD25+ 180d	57,16±14,34	66,39±15,87	0,094
%CD8+CD25+ pre	23,30±25,93	13,56±11,15	0,207
%CD8+CD25+ 7d	5,28±9,87	1,13±1,03	0,000
%CD8+CD25+ 30d	18,97±20,03	1,30±1,12	0,000
%CD8+CD25+ 90d	25,57±28,55	9,41±9,13	0,002
%CD8+CD25+ 180d	20,24±23,89	13,57±7,75	0,195

Los datos se expresan como media±DT. Los datos estadísticos se calcularon utilizando la prueba t de Student

4. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE CD25 CON BASILIXIMAB (2D) Y DACLIZUMAB (2D) Y SU RELACIÓN CON RECHAZO

Durante el período de seguimiento (primer año post-trasplante) el 26% desarrollaron al menos un episodio de rechazo celular (ISHLT grado $\geq 2R$) que requirió tratamiento en el caso de DAC y un 10,52% de los que recibieron BAS ($p=0,216$). El tiempo medio transcurrido hasta el evento de rechazo fue de $156\pm 39,80$ días (rango 30, 267 días) en el caso de DAC y $177,89\pm 9,17$ (rango 21-240 días) en BAS ($p=0,676$).

No se observaron diferencias en el tiempo de supresión total de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ ni en su recuperación. El tiempo (días) de recuperación de Treg entre rechazadores y no rechazadores fue similar (tablas 41 y 42).

Tabla 41. Recuperación de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ y Treg en pacientes que recibieron DAC

DAC	nº días supresión <3% TCD4+CD25+	nº días recuperación TCD4+CD25+ basal	nº días recuperación Treg basal
Rechazo n=11	40,90 \pm 24,21	157 \pm 41,66	42,33 \pm 42,85
No rechazo n=47	47,03 \pm 36,66	135 \pm 46,05	35,80 \pm 51,94
p	0,612	0,236	0,848

Los datos se expresan como media \pm DT. Los datos estadísticos se calcularon utilizando la prueba t de Student

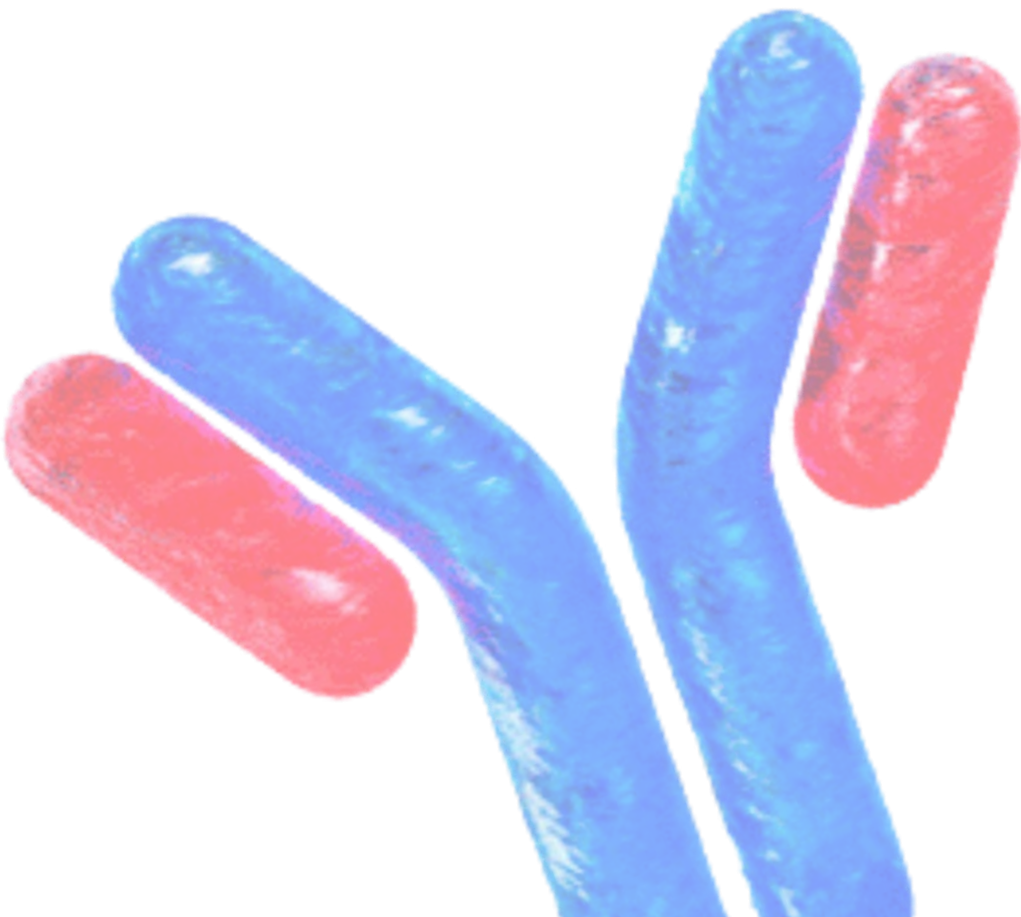
Tabla 42. Recuperación de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ y Treg en pacientes que recibieron BAS

BAS	nº días supresión <3% TCD4+CD25+	nº días recuperación TCD4+CD25+ basal	nº días recuperación Treg basal
Rechazo n=2	11 \pm 5,65	22 \pm 10,60	45,00 \pm 21,03
No rechazo n=17	24,54 \pm 13,86	47,23 \pm 44,06	58,67 \pm 47,19
p	0,213	0,457	0,231

Los datos se expresan como media \pm DT. Los datos estadísticos se calcularon utilizando la prueba t de Student

ESTUDIO 3

Estudio descriptivo del efecto de GGIV polivalentes no específicas e hiperimmune anti-CMV (GGIV comerciales) en diferentes poblaciones linfocitarias en diferentes contextos clínicos



ESTUDIO 3.

ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE GGIV POLIVALENTES NO ESPECÍFICAS E HIPERINMUNE ANTI-CMV (GGIV COMERCIALES) EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS EN DIFERENTES CONTEXTOS CLÍNICOS

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE GGIV ADMINISTRADAS A ALTAS DOSIS EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS

1.1. DISEÑO Y DATOS DEMOGRÁFICOS DE PACIENTES

Se realizó un estudio observacional prospectivo en 5 pacientes con dermatomiositis que no respondieron a terapia convencional, a quienes se les aplicó tratamiento con GGIV. La pauta de administración fue de 2g/kg distribuidos en 5 días mensualmente. Las muestras fueron recogidas según el esquema indicado en la figura 75.

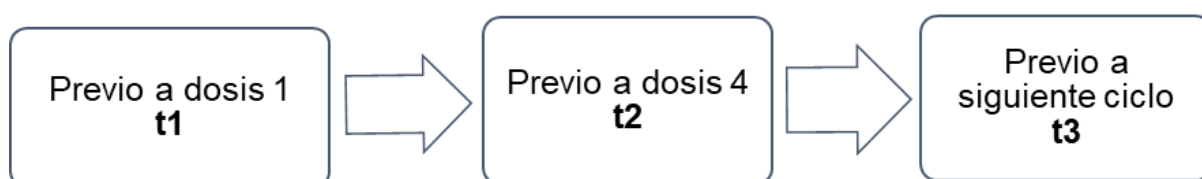


Figura 75. Esquema de recogida de muestras de pacientes tratados con GGIV administrada a altas dosis

Tabla 43. Datos demográficos de pacientes que reciben inmunoglobulinas a altas dosis

Paciente	Edad	Sexo	Diagnóstico	Medicación previa	Medicación concomitante	Ciclos previos GGIV
1	58	H	DMio-SS	MMF, PRED, RTX	PRED, HDXC	2
2	56	M	DMio	MTX, PRED, HDXC, RTX	DFZ	12
3	49	M	DMio-P	PRED+RTX	PRED*	1
4	50	M	DMio	AZA+PRED+RTX	PRED, HDXC	19
5	54	M	DMio- hipolgM	MTX+MMF+CyA+PRED+RTX	PRED*	14

H: hombre y M: mujer. DMio: dermatomiositis, DMio-P: dermatosis paraneoplásica, SS: esclerodermia, MMF: mico-fenolato de mofetil PRED: prednisona, PRED*: prednisona en pauta descendente; RTX: rituximab HDXC: hidroxiclora-quina; MTX: metotrexato; CyA: ciclosporina; AZA: azatioprina

1.2. EFECTO EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS

1.2.1. SUBPOBLACIONES T B Y NK

No se observaron variaciones significativas tanto en porcentaje como en número absoluto de células B y NK antes y después de la infusión. Se observó una disminución significativa en el porcentaje de TCD8+ y células NKT previo a la cuarta dosis con recuperación de los niveles basales antes del siguiente ciclo (Anexo 2, tabla 1, 3 y 6).

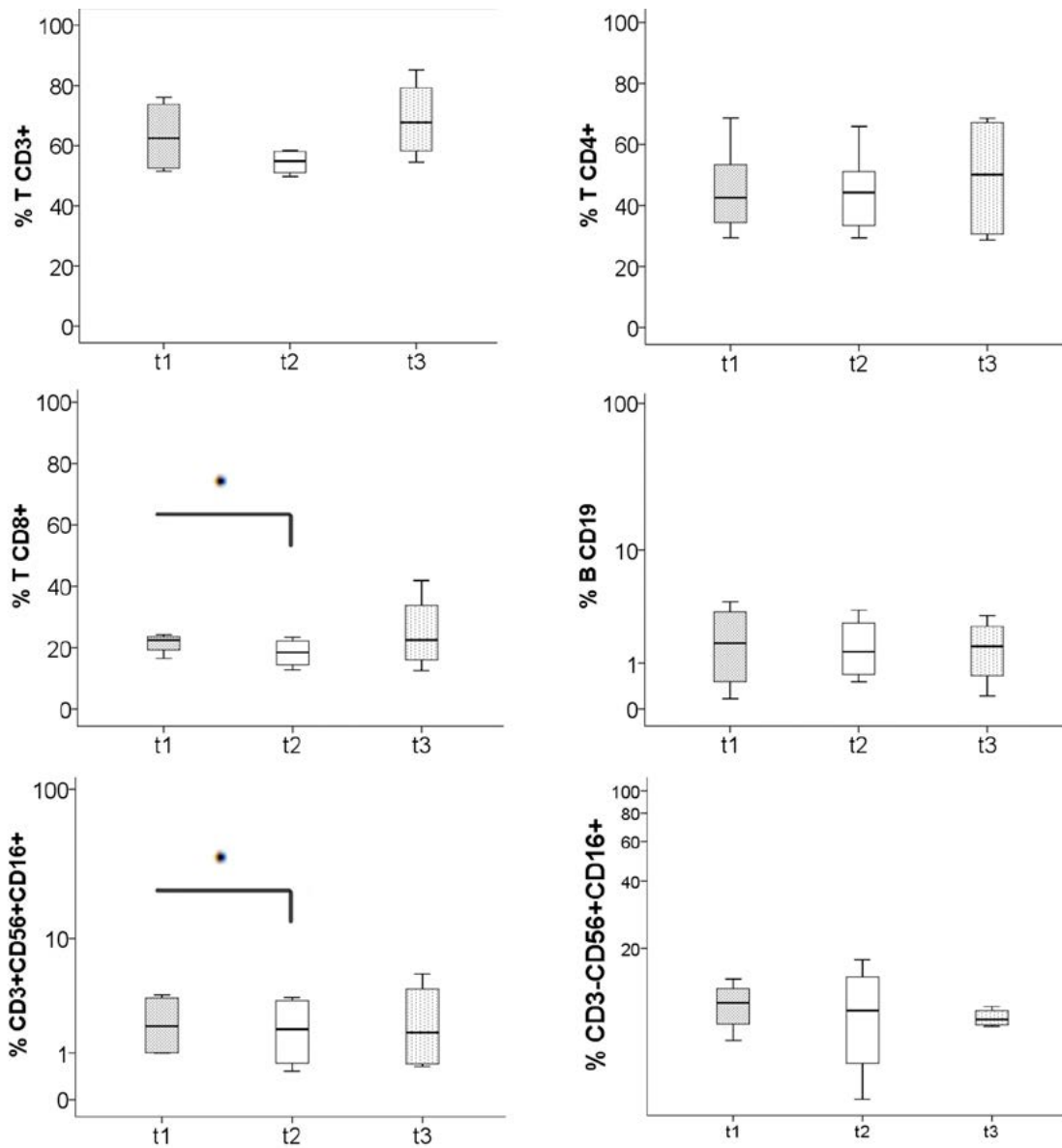


Figura 76. Efecto GGIV en diferentes subpoblaciones de linfocitos (T, B y NK)

Se representa el porcentaje correspondiente de cada subpoblación T, B y NK en los tiempos de estudio t1, t2 y t3

1.2.2. ACTIVACIÓN EN LINFOCITOS TCD8+

La coexpresión de ambos marcadores de activación en porcentaje disminuyó de manera no significativa (tendencia) antes del siguiente ciclo de infusión. En el caso de su expresión por separado, se observó una disminución significativa en el número absoluto de expresión de HLA-DR en los linfocitos TCD8+.

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 3

- Porcentaje de la coexpresión de ambos marcadores de activación (HLA-DR+, CD38+): HLA-DR+/CD38+/CD8₁⁺=26,31 (11-27); HLA-DR+/CD38+/CD8₃⁺= 13,06 (9-19); p=0,080).
- Porcentaje de expresión de marcadores de activación por separado: (HLA-DR+/CD8₁⁺= 29,30 (21-45); HLA-DR+/CD8₃⁺= 21,86 (19-41); p=0,080; CD38+/CD8₁⁺= 75,22 (41-82); CD38+/CD8₂⁺= 73,02 (41-79); p=0,032) .

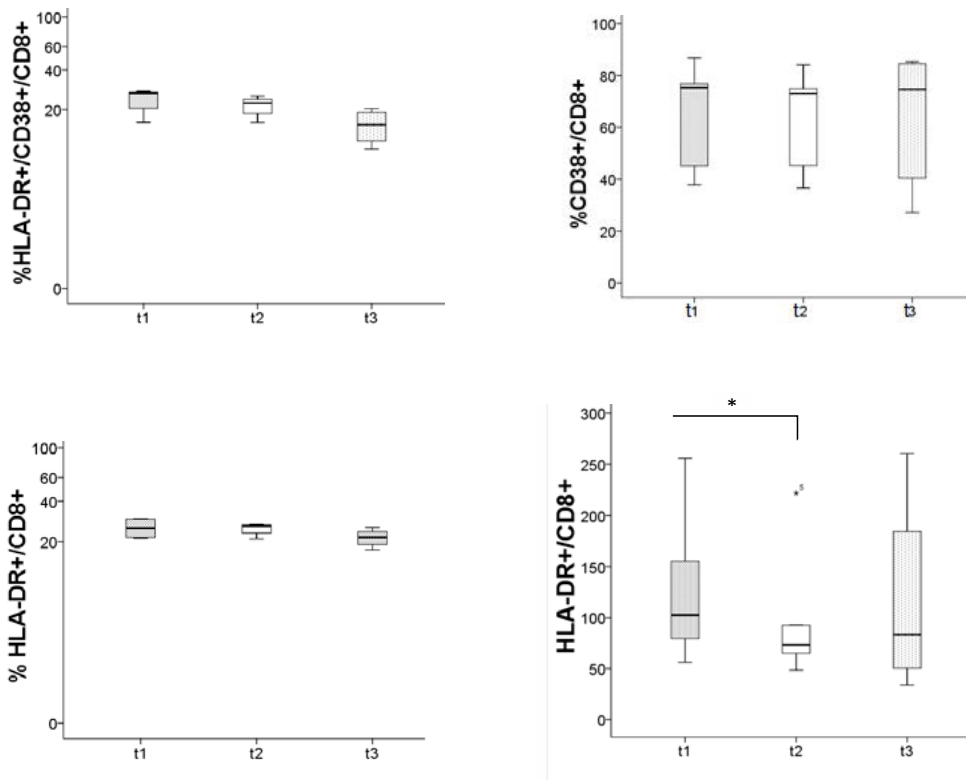


Figura 77. Efecto GGIV en la activación linfocitos TCD8+

Se representa el porcentaje de coexpresión y expresión de HLA-DR+ y CD38+ en los linfocitos TCD8+ en los tiempos de estudio t1, t2 y t3

1.2.3. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS TCD4+; TCD8+ Y CÉLULAS TREG

No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD25 en los linfocitos TCD4+ y TCD8+ en porcentaje y número absoluto. Las células Treg también permanecieron estables en porcentaje y en número absoluto.

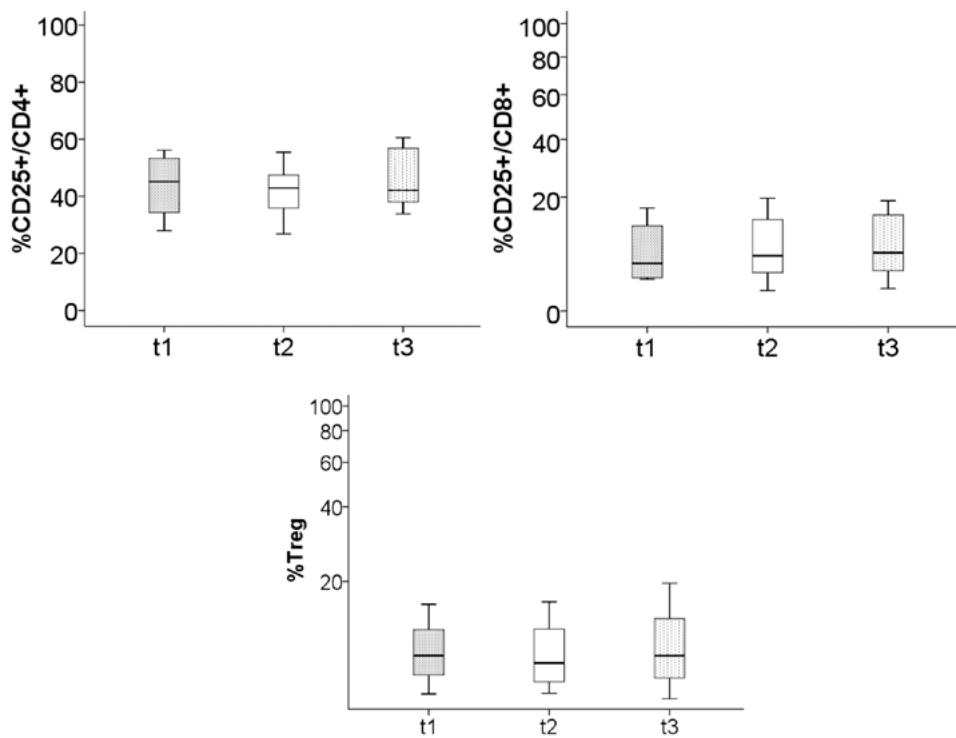


Figura 78. Efecto GGIV en la expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ y TCD8+ y células Treg

Se representa el porcentaje de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ y TCD8+ y el porcentaje de células Treg en los tiempos de estudio t1, t2 y t3

PORCENTAJE DE MONOCITOS Y EXPRESIÓN DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN

Se observó una disminución significativa en el porcentaje y una tendencia a la disminución en el número absoluto de monocitos después de la infusión (%CD14₁: 5,60 (3-10); %CD14₂: 2,75 (2-5) p=0,043; CD14₁: 700 (400-900); CD14₂: 500 (300-700) p=0,102).

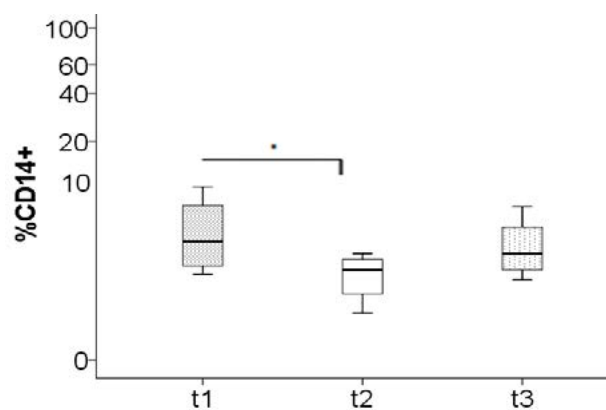


Figura 79. Efecto GGIV en el porcentaje de monocitos

Se representa el porcentaje de expresión de CD14+ en los tiempos de estudio t1, t2 y t3

IV. RESULTADOS / ESTUDIO 3

La coexpresión de marcadores de activación permanecieron estables en porcentaje y disminuyeron de manera significativa en número absoluto (% HLA-DR+/CD38+/CD14+₁ = 98,44 (96-99); HLA-DR+/CD38+/CD14+₂ = 95,70 (94-98) p=0,225 HLA-DR+/CD38+/CD14+₁ = 695 (395-868) ; HLA-DR+/CD38+/CD14+₂ = 493 (284-669) p=0,043.

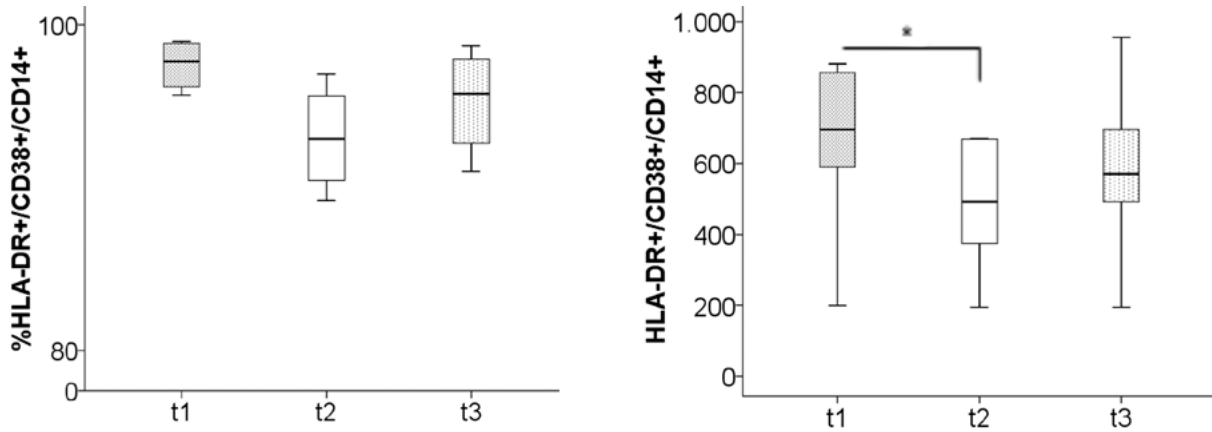


Figura 80. Efecto GGIV en la coexpresión de marcadores de activación

Se representa el porcentaje de coexpresión (A) y número absoluto (B) de HLA-DR+y CD38+ en los monocitos en los tiempos de estudio t1, t2 y t3

MADURACIÓN B

Se observó una tendencia en la disminución en el porcentaje y número absoluto de linfocitos B de memoria (%CD19 Memoria₁=22,85 (7-33); %CD19 Memoria₂=21,43 (6-32); CD19 Memoria₁=7,50 (2-12); CD19 Memoria₂=5,38 (1-11)).

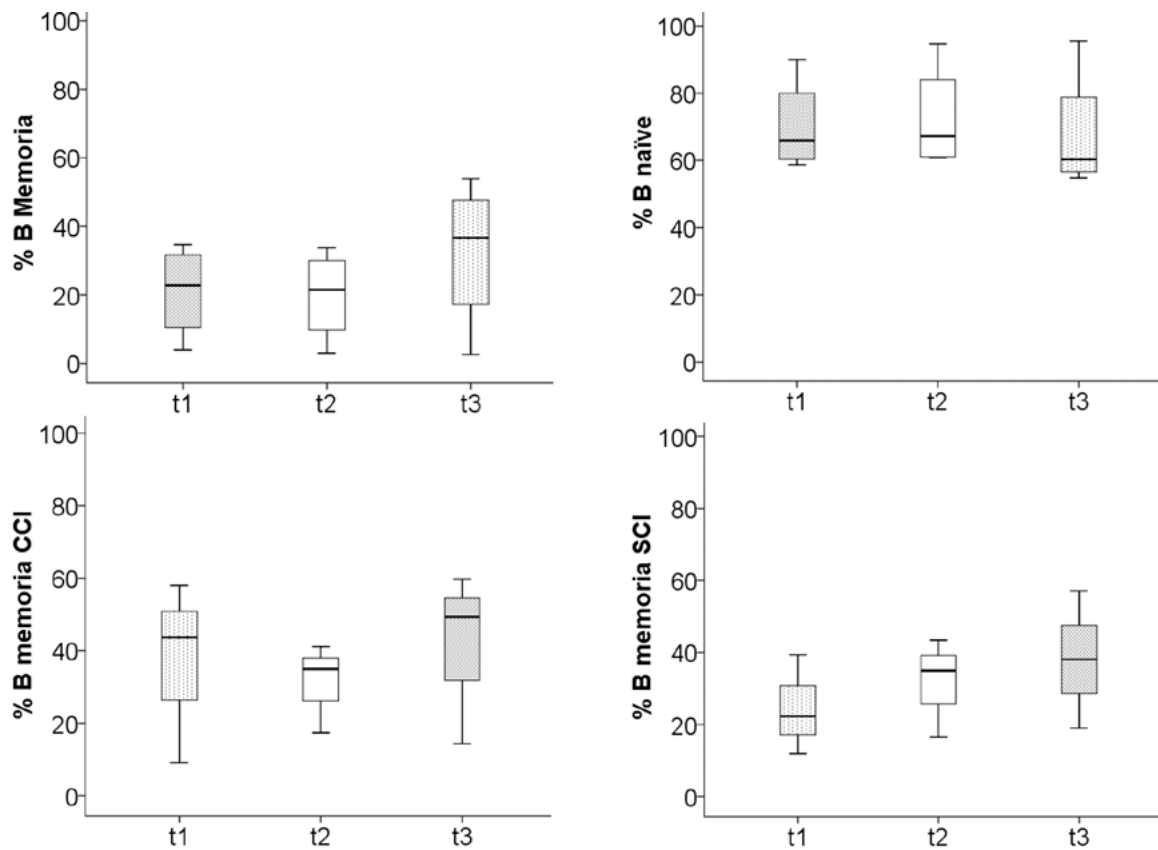


Figura 81. Efecto GGIV en la maduración de linfocitos B

Se representa el porcentaje correspondiente de cada población naïve y de memoria en los tiempos de estudio t1, t2 y t3

2. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE GGIV ESPECÍFICA ANTI-CMV EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS

2.1. DISEÑO

Se realizó un estudio observacional prospectivo en 5 TC con infección activa CMV, los cuales recibieron tratamiento con inmunoglobulinas específicas anti-CMV. La pauta de administración fue 1D de 150 mg/kg en los primeros días post-TC y 6D de 100 mg/kg al largo de los primeros 70 días. El tiempo de recogida de muestras se realizó según el esquema indicado en la figura 82.

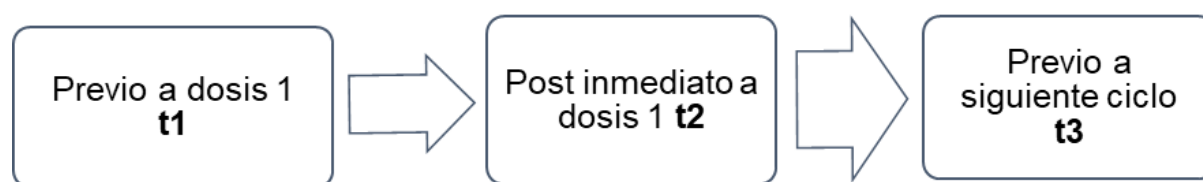


Figura 82. Esquema de recogida de muestras en los pacientes que reciben GGIV hiperinmune anti-CMV

2.2. EFECTO EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS

No se observaron variaciones significativas tanto en porcentaje como en número absoluto de todas las subpoblaciones T, B, NK, células Treg, monocitos, antes y después de las infusiones. Tampoco se observaron variaciones en la maduración de células B y en la expresión de marcadores de activación en los monocitos.

La coexpresión de ambos marcadores de activación y su expresión por separado en TCD8+ presentaron tendencia a la disminución previo al siguiente ciclo de infusión.

- Porcentaje de coexpresión de ambos marcadores: HLA-DR+/CD38+/CD8₁⁺=18,90 (8-23); HLA-DR+/CD38+/CD8₃⁺= 10,05 (3-13); p= 0,090).
- Porcentaje de expresión de marcadores por separado: HLA-DR+/CD8₁⁺=21,90 (8-28); HLA-DR+/CD8₃⁺= 13,92 (4-23); p= 0,144).

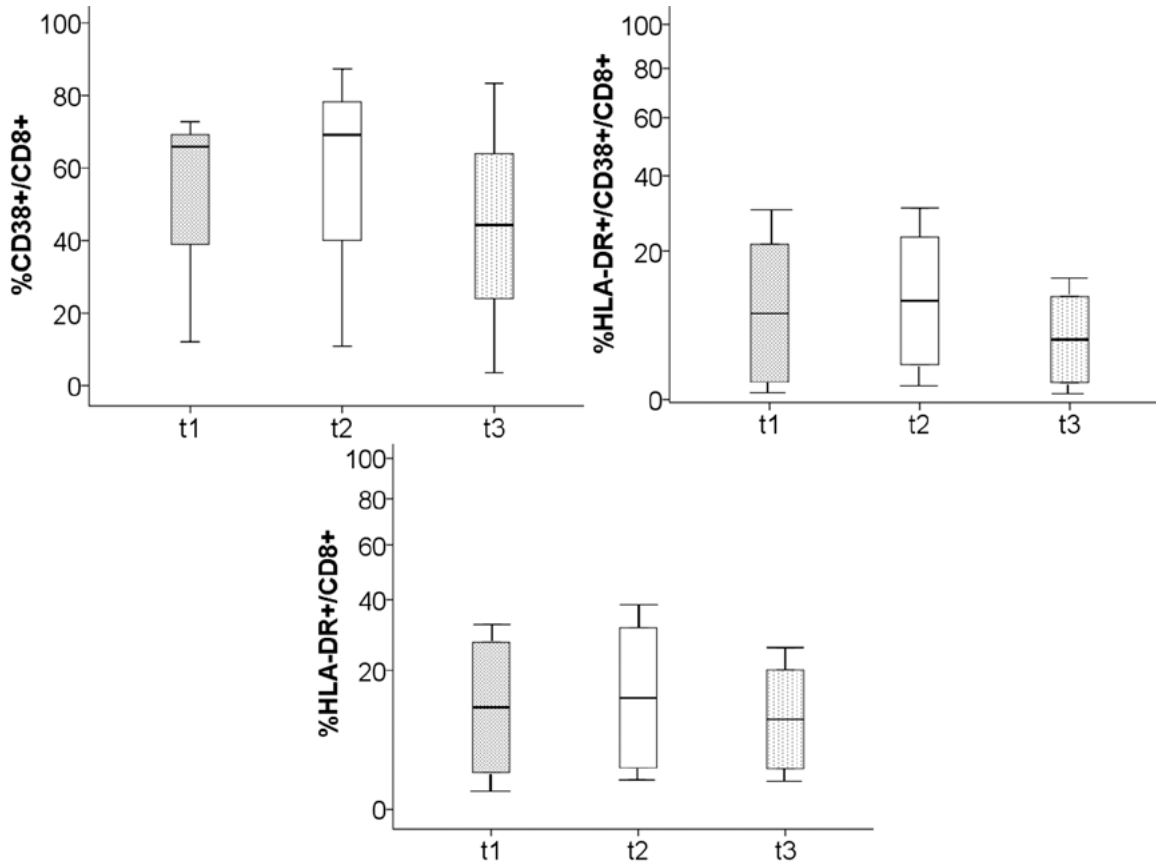


Figura 83. Efecto GGIV en la activación del linfocito TCD8+

Se representa el porcentaje de coexpresión y expresión por separado de HLA-DR+ y CD38+ en los linfocitos TCD8+ en los tiempos de estudio t1, t2 y t3

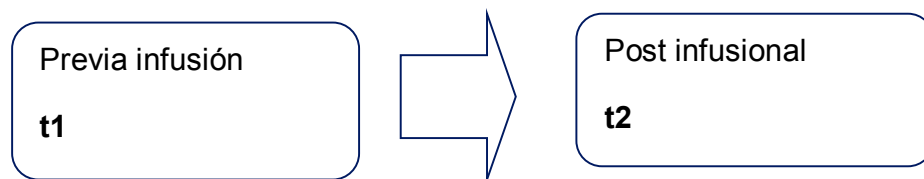
3. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE GGIV POLIVALENTES NO ESPECÍFICAS EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS EN TC

3.1. DISEÑO Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo para comparar las cinéticas de diferentes variables inmunológicas en TC tratados con GGIV. Se realizó en 66 TC sometidos a inducción con BAS con pauta de 1D y 2D, de los cuáles 25 pacientes recibieron GGIV a dosis sustitutivas por hipogammaglobulinemia secundaria e infecciones severas. El tiempo medio de infusión después del trasplante fue de $35,91 \pm 31,86$ días y el número medio de infusiones recibidas por paciente fue de $6,15 \pm 0,98$.

El tiempo de recogida de muestras se indica en la figura 84. Se comparó el efecto que producen dichos preparados en TC tratados (casos) y en no tratados (controles).

Casos



Controles

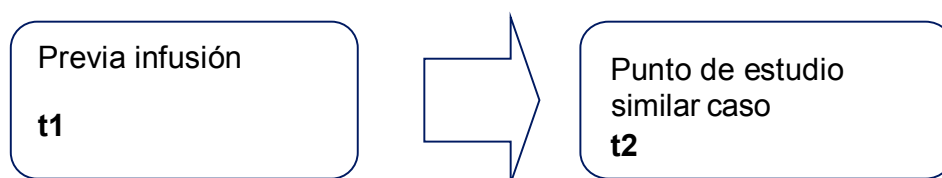


Figura 84. Esquema de recogida de muestras de TC que reciben GGIV

Tabla 44. Características clínicas de TC que reciben GGIV vs. no reciben

	GGIV (+) n=25	GGIV (-) n= 32	p
1D/2D	16/9	22/10	0,706 ^b
Edad media (DT)	55,76 (7,35)	50,10 (14,85)	0,096 ^a
Sexo, masculino (%)	76,92%	75,86%	0,331 ^b
Asistencia ventricular previa (%)	10 (38,46)	14 (48,27)	0,624 ^b
Citotóxicos <i>de novo</i> (%)	4 (16)	2 (6,25)	0,297 ^b
Tiempo de isquemia, minutos (DT)	190,95 (66,82)	215,86 (75,94)	0,232 ^a
Rechazo 365 días (%)	2 (8)	4 (12,50)	0,461 ^b
Muerte (%)	5 (19,23)	4 (13,79)	0,258 ^b
CMV	11 (44)	6 (18,75)	0,066 ^b
CMV (+) donante/ CMV (-) receptor	6 (23,07)	8 (27,58)	0,533 ^b

Media de días primer episodio de CMV después del trasplante en pacientes GGIV+: 29,37±23,78. Los datos se expresan en número y porcentaje. a= t de Student; b= Chi-cuadrado

3.2. EFECTO EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS

3.2.1. LINFOCITOS TOTALES

Se observó una disminución no significativa de linfocitos totales en TC que recibieron GGIV. No se observaron diferencias entre ambos grupos después de la infusión.

3.2.2. SUBPOBLACIONES T, B Y NK

Los linfocitos TCD3+, TCD8+ y TCD4+ tanto en porcentaje como en número absoluto permanecieron estables antes y después de la infusión en ambos grupos. En los TC que recibieron GGIV se observó una disminución significativa de TCD8+ tanto en porcentaje como en valor absoluto en comparación con aquellos que no recibieron tratamiento; (%TCD8+ GGIV+post= 16,65±8,99; %TCD8+ GGIV-post= 22,42±6,38 p=0,014 TCD8+ GGIV+ post= 221±142; TCD8 +GGIV- post= 355±189 p=0,011) (anexo 3 tabla 1).

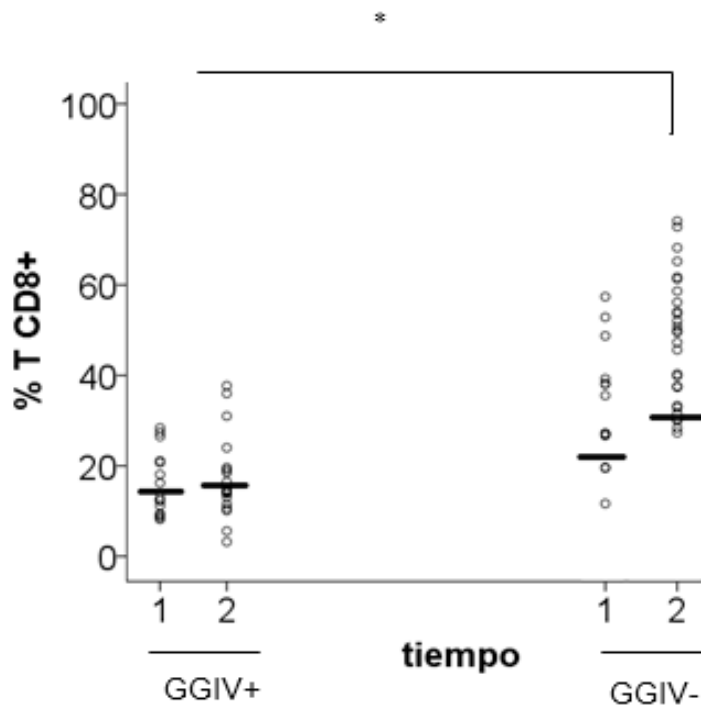


Figura 85. Porcentaje de linfocitos TCD8+ en TC que reciben (GGIV+ n=25) vs. no reciben (GGIV- n=32)

Las células NK en porcentaje y en número absoluto no sufrieron variaciones en ambos grupos, observándose diferencias significativas entre ambos antes de la infusión. Esta diferencia podría explicar el mayor riesgo de infección en aquellos pacientes que recibieron inmunoglobulinas.

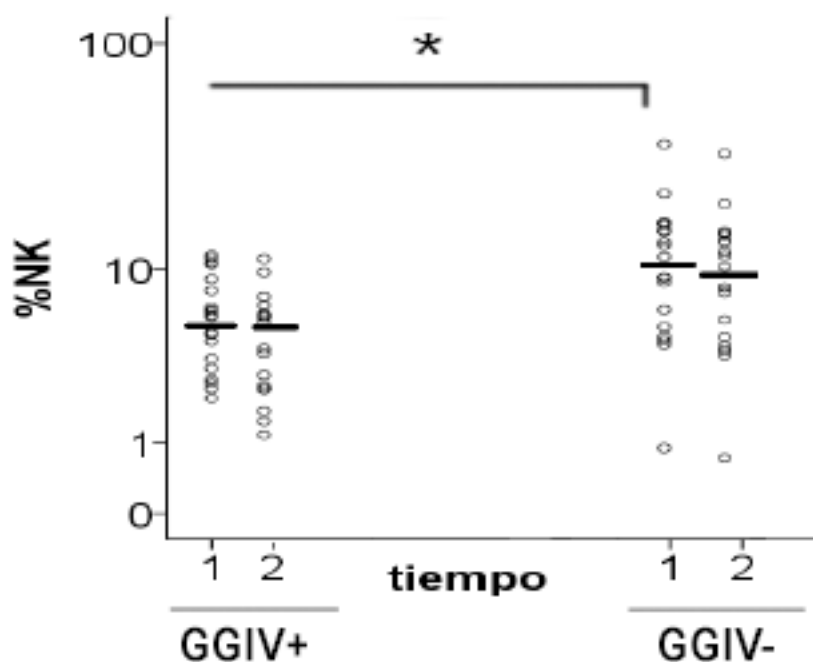


Figura 86. Porcentaje de células NK en TC que reciben (GGIV+ n=25) vs. no reciben (GGIV- n=32)

Las **células NKT y los LB** en porcentaje y en número absoluto permanecieron estables. Entre ambos grupos no se observaron diferencias después de la infusión (anexo 3 tabla 1).

3.2.3. ACTIVACIÓN EN LINFOCITOS TCD8+

Se observó una disminución no significativa de la coexpresión de marcadores de activación (HLA-DR+, CD38+ y ambos) en pacientes tratados con GGIV. En concreto, el porcentaje de expresión de HLA-DR+ disminuyó de manera no significativa (tendencia $p=0,141$) en pacientes tratados con inmunoglobulinas respecto a los no tratados.

3.2.4. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS TCD4+, TCD8+ Y CÉLULAS TREG

El porcentaje de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+ aumentó de manera no significativa en ambos grupos, sin observarse diferencias significativas entre ambos grupos antes y después de la infusión.

El porcentaje de expresión de CD25+ en los linfocitos TCD8+ permaneció estable en porcentaje y disminuyó de manera no significativa en número absoluto en ambos grupos, tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

El porcentaje de células Treg fue significativamente mayor para los pacientes tratados (figura 87) (%Treg+ GGIV+post= 5,98±2,77; %Treg+ GGIV-post= 4,79±1,92; p= 0,042).

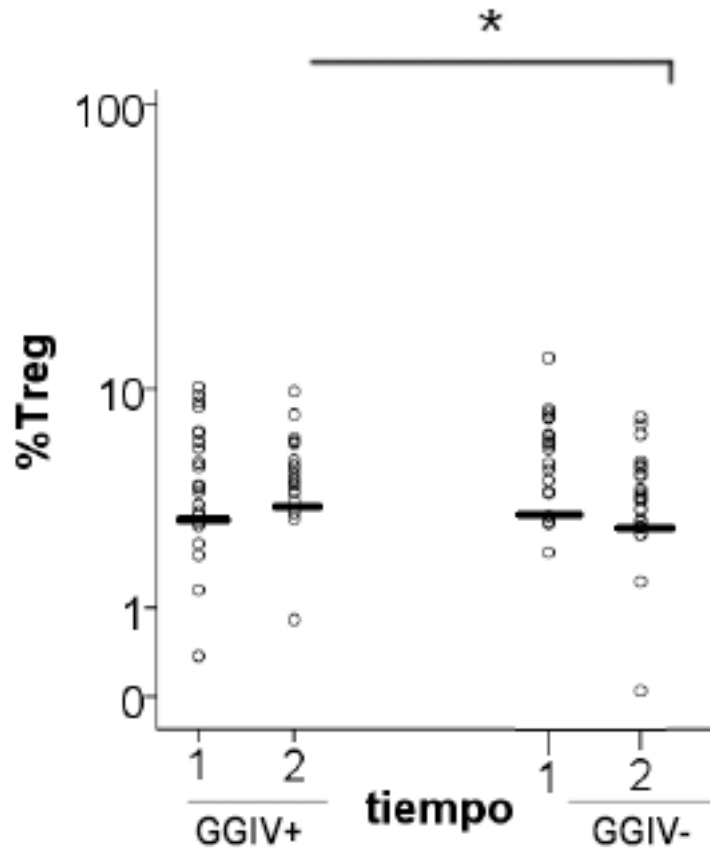


Figura 87. Porcentaje de Treg en TC que reciben (GGIV+ n= 25) vs. no reciben (GGIV- n=32)

3.2.5. PORCENTAJE DE MONOCITOS Y EXPRESIÓN DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN

En los pacientes que recibieron GGIV no se observaron variaciones en el porcentaje, número de monocitos totales y expresión de marcadores de activación respecto al basal. Se observó una tendencia a la disminución entre ambos grupos después de la infusión (%CD14+ GGIV+post= 3,47±1,62; %CD14+ GGIV-post= 4,88±2,11 tendencia p=0,058).

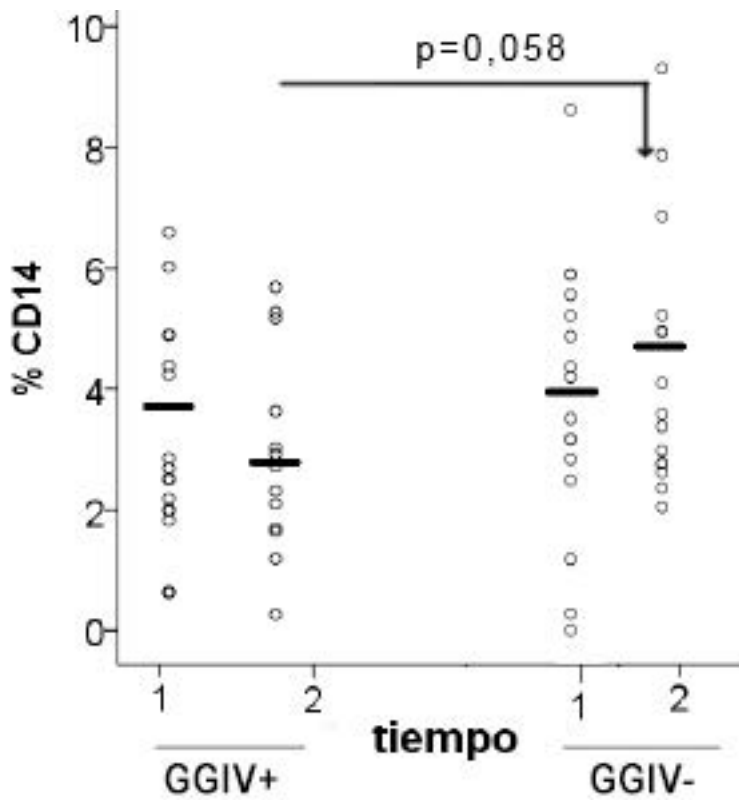


Figura 88. Porcentaje de monocitos en TC que reciben (GGIV+ n= 25) vs. no reciben (GGIV- n=32)

3.2.6. VARIABLES INMUNOLÓGICAS HUMORALES

No se observaron diferencias en las concentraciones de IgG entre ambos grupos. Los pacientes que recibieron GGIV tuvieron concentraciones mayores no significativas de IgG después de la infusión que aquellos que no recibieron tratamiento.

En ambos grupos los valores de C3 y C4 disminuyeron de manera no significativa. No existieron diferencias significativas entre ambos grupos.

V. DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

1. ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DIFERENTES FENOTIPOS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T, B, NK EN TC QUE RECIBEN DIFERENTE PAUTA DE ADMINISTRACIÓN DE BAS: 1 DOSIS (1D) O 2 DOSIS (2D)

En los últimos años son pocos los estudios realizados que expliquen el efecto de BAS en trasplantados cardíacos⁴⁶. Diferentes autores han analizado la supervivencia del receptor cardíaco con o sin el uso de diferentes agentes monoclonales y policlonales utilizados en la fase de inducción^{128,129,130}, sin embargo, hay escasos datos sobre el efecto diferencial o comparativo de la reducción del número de dosis de BAS sobre diferentes subpoblaciones linfo-monocitarias.

Verapras K⁵⁰ y Branco⁵¹ han evaluado la eficacia y seguridad de BAS en diferentes dosis mediante el análisis de variables clínicas sin la realización de poblaciones celulares en sangre periférica.

En este estudio prospectivo se evaluaron los efectos de BAS sobre diferentes subpoblaciones linfo-monocitarias y diferentes variables clínicas (supervivencia, rechazo e infecciones). La decisión de administrar 1D o 2D se llevó a cabo en base a criterios clínicos, de tal forma que 2D se utilizaría en aquellos pacientes con mayor compromiso renal, con el objetivo de retrasar el inicio de la administración del CNI debido a su nefrotoxicidad. Esto podría explicar algunas diferencias entre las características clínicas de los grupos comparados e introducir algún sesgo, ya que los pacientes del grupo 2D tienden a tener mayor edad.

A continuación, pasamos a explicar las diferencias encontradas entre los grupos.

1.1. REDUCCIÓN DE DOSIS DE BAS Y REPERCUSIÓN CLÍNICA

Los pacientes con 2D eran de mayor edad que los de 1D. En el estudio de Branco⁵¹ también los pacientes que recibieron 2D eran de mayor edad que los de 1D. A diferencia del estudio de Branco et al⁵¹ donde no se observaron diferencias respecto al sexo, en nuestro estudio observamos que la mayoría de los pacientes con 2D eran varones. En el estudio de Veraprapas K⁵⁰ la mayoría de sus pacientes también eran varones.

Los pacientes de 2D presentaron valores significativamente mayores de creatinina hasta los 15d. En este estudio en el grupo 1D los valores de creatinina en el pre-TC fueron inferiores a lo observado por Veraprapas K⁵⁰, a pesar de que sus pacientes eran más jóvenes.

Un 10,52% de los pacientes en ambos grupos presentaron rechazo tratado ($\geq 2R$) dentro de los primeros 365 días, sin diferencias en el tiempo libre de rechazo entre grupos. Sin embargo, Branco⁵¹ observó una tendencia a mayor incidencia de rechazo y menor supervivencia libre de rechazo en los pacientes que recibieron 1D. Estas diferencias respecto al estudio de Branco⁵¹ podrían deberse al escaso número de eventos 2R en las cohortes (4 vs. 2 rechazo) y un número limitado de pacientes en cada línea de estudio. Veraprapas K⁵⁰ observó un ratio de rechazo de un 12% en los pacientes que recibieron 2D de 10mg, similar a nuestra cohorte de 1D donde la ratio fue de un 10,52%.

Para intentar averiguar si la inducción con 1D o 2D influyó en la presencia de mayor infiltrado linfocitario en las biopsias estudiadas, se comparó el número de casos con los estudios de anatomía patológica de biopsias con resultado OR, 1R y 2R no observándose mayor infiltrado linfocitario en los pacientes que recibieron 1D.

El número de episodios de infección que requirieron tratamiento fue similar para ambos grupos. El número de infecciones bacterianas y víricas, incluyendo CMV, no presentó diferencia significativa, con una tasa de infección por CMV al año de 30% (1D 28% y 2D 32%). Estos resultados son comparables con los reportados por Veraprapas K⁵⁰ y Segovia¹³¹. Aunque no hubo diferencias en el tiempo libre de infección al año, los pacientes que recibieron 2D presentaron tendencia a menor supervivencia libre de infección ($p=0,083$ log Rank) en la etapa inicial postrasplante (en los primeros 30 días). El grupo de Branco⁵¹ no analizó esta etapa temprana post-TC, sino más tardíamente a los 90d, 180d y 365d, sin observarse diferencias en el número de infecciones entre ambos grupos.

En nuestro estudio, el desarrollo de anticuerpos anti-HLA previos (5,26%) y de *novo* (10,52%) en los pacientes que recibieron 1D fue similar al 12% (*novo*) indicado por Veraprapas K⁵⁰.

Además, sólo dos pacientes desarrollaron vasculopatía del injerto al año (CAV), uno en cada grupo. Por tanto, no hubo diferencias en el desarrollo de CAV de manera acelerada entre ambos grupos. Los estudios anteriores^{50,51} (Branco y veraprapas K) no estudiaron el efecto a largo plazo del desarrollo de CAV en los pacientes que recibieron BAS. Según el registro mundial del ISHLT¹³², el uso de BAS para la terapia de inducción tiene un efecto neutro en el desarrollo de CAV.

En cuanto a la supervivencia, el 80% de los pacientes trasplantados sobrevivieron a los 12 meses (figura 29) en ambos grupos. Branco tampoco encontró diferencias en la supervivencia entre ambos grupos. La tasa de supervivencia indicada por Veraprapas K en una población de bajo riesgo al año fue de un 94%.

En conclusión, no hubo diferencias significativas en cuanto a rechazo y supervivencia cuando comparamos los grupos 1D y 2D de BAS. Solo hubo diferencia a menor supervivencia libre de infección a los 30d en los pacientes que recibieron 2D.

1.2. CAMBIOS SIGNIFICATIVOS PRODUCIDOS EN POBLACIONES CELULARES

El porcentaje de linfocitos TCD4+ fue menor en todos los puntos de estudio en el grupo que recibió 1D debido a una mayor exposición del CNI.

La recuperación de expresión de CD25 en linfocitos TCD4+ fue más rápida en los pacientes que recibieron 1D debido a que se alcanzaron valores basales antes en dicho grupo. Además, en el punto de estudio 15d (en porcentaje) se observaron valores significativamente inferiores para los pacientes que recibieron 2D.

Mandeep Mehra⁴⁶ en un estudio multicéntrico prospectivo, randomizado y doble ciego en trasplantados cardiacos que recibieron 2D de BAS estimó la duración del bloqueo del receptor CD25 en 38 ± 13 días (rango entre 24-72 días); indicando una duración similar a lo determinado por Kovarik^{133,134} y Amlot⁴⁹ en trasplantados renales. En nuestro estudio la duración fue menor, alrededor de $24,30 \pm 20,79$ días (ambas dosis). No se observaron diferencias significativas en la duración de la **supresión del receptor CD25**, aunque fue mayor para los pacientes que recibieron 2D. Kovarik¹³³ también observó una mayor duración a mayor dosis en trasplantados renales.

Aunque los tiempos de supresión completa en este estudio son menores a los indicados por otros autores, es importante destacar que coincide con el tiempo de vida media de las

V. DISCUSIÓN

inmunoglobulinas en general (21 días), lo cual puede corresponder a la vida media del anticuerpo monoclonal circulante sugiriendo que BAS se comportaría de manera similar a la IgG endógena, aunque al ser una inmunoglobulina quimérica¹³⁵ podría tener menor vida media que la IgG (García Merino, A. 2011).

La menor duración de supresión del receptor CD25 en este estudio puede ser debido a diferencias en la disponibilidad del fármaco. También puede ser debido a diferencias en la inmunogenicidad a aloantígenos del donante debido al tipo de trasplante realizado. Kovarik^{133, 136} determinó que el género, grupo étnico, y la presencia de proteinuria no influyen en la disponibilidad de BAS, los pacientes con grandes hemorragias o pérdida por el flujo ascítico podrían tener menos disponibilidad de fármaco, por tanto, menor duración del efecto. En los estudios descritos anteriormente se observaron correlaciones débiles y ampliamente dispersas entre el peso corporal y el volumen de distribución, lo que implica que no hay relevancia clínica para la dosificación ajustada al peso. Dado que el peso podría explicar solo el 6% de la variabilidad en el aclaramiento, administrar dosis de BAS en mg/kg, en función del peso, no produciría ningún beneficio aparente para el régimen de dosificación. En el caso de aquellos pacientes con un drenaje de líquido ascítico postoperatorio considerable (> 10 L) podría considerarse una dosis adicional durante la primera semana postrasplante.

Referente a cómo puede afectar la hemodiálisis el aclaramiento de BAS, Kovarik¹³⁴ indicó que, aunque estos pacientes puedan tener mayores volúmenes de distribución, es poco probable que estas diferencias farmacocinéticas tengan relevancia clínica para la dosificación. Nojima, M et al¹³⁷ observaron una disminución de la concentración de BAS en pacientes trasplantados renales que recibieron más de tres sesiones de plasmaféresis.

Es importante destacar la **alta variabilidad interindividual respecto al porcentaje de recuperación de CD25 de nuestros pacientes** (tabla 30). Estas diferencias respecto a la duración del efecto que produce el fármaco ya sea por diferencias en la disponibilidad o por otros factores a determinar, aunque no tengan repercusiones clínicas importantes a corto plazo (episodios de rechazo), desconocemos las que podría tener a largo plazo (estudio pendiente de realizar).

Debido a esta alta variabilidad podría resultar de gran utilidad la individualización en la administración de dosis mediante monitorización celular del paciente para valorar si requiere añadir una segunda dosis más si se considerase necesario, o aumentar la dosis del CNI.

En este estudio no se ha podido establecer si existe una relación entre la no supresión de la expresión de CD25 y la aparición del evento de rechazo debido al número limitado de dichos

eventos. Destacar que entre los seis pacientes que tuvieron un episodio de rechazo 2R tratado, solo en uno de ellos dicho episodio ocurrió cuando el receptor de IL-2 posiblemente estuviera saturado (21 días post-TC). Este paciente que recibió 1D no consiguió una supresión completa de CD25 y recuperó valores basales entre los 30-60 días. El resto de los pacientes tuvieron un episodio de rechazo a partir de los 74 días, posiblemente cuando el receptor ya no estaba saturado, tres de ellos recibieron 1D y no consiguieron una supresión completa de la expresión de CD25+ en los linfocitos TCD4+, recuperando rápidamente el valor basal (7-30 días). En el grupo 2D también hubo pacientes con rechazo habiendo conseguido supresión de CD25. Esto podría atribuirse a otros factores intervinientes como por ejemplo concentraciones indetectables de un tercer fármaco como MMF entre otras posibles causas (Anexo 1. Tabla 19).

Kovarik JM et al^{133,136} observaron que los pacientes que sufrieron rechazo no eliminaron BAS más rápidamente ni presentaron menor saturación del receptor CD25. Indicó que no hubo una relación concentración-efecto en los episodios de rechazo que ocurrieron durante el tiempo que el receptor CD25 estuvo saturado; sin embargo, no reflejó la infiltración linfocitaria que ocurre en el injerto para aquellos episodios que ocurrieron cuando ya no estuvo saturado el receptor. Nashan B¹³⁸ sugirió que aumentar la duración de la supresión más de seis semanas no ofrece mayores ventajas inmunoproliféricas debido a que el mecanismo de rechazo es capaz de eludir el bloqueo de CD25.

Guilles Thibault y cols et al¹³⁹ compararon 40 mg de BAS asociado a la triple terapia con dosis altas de BAS (80 mg) sin CNI. Este estudio indicó que duplicar la dosis acumulada de BAS a 80 mg no proporciona inmunosupresión adecuada durante los primeros tres meses después del trasplante en ausencia de terapia con CNI, observándose un incremento en el número de eventos de rechazo.

Kathryn J. Wood and Shimon Sakaguchi⁷⁸ postulan que la duración corta de supresión de CD25 no implica la aparición de mayor número de eventos de rechazo, pero podría comprometer la respuesta inmunoreguladora frente a antígenos del donante, debido a que las células TCD4+ helper naive (nTh) son una de las primeras en ser activadas tras el trasplante, lo que les da un papel clave en el proceso de rechazo.

La disminución en **número absoluto de linfocitos TCD8+** se alargó durante más tiempo en el grupo de 2D respecto al 1D siendo esta diferencia significativa a los 7d. En los pacientes que recibieron 2D el número absoluto de linfocitos TCD8+ disminuyó de forma paralela al número absoluto de linfocitos TCD4+, no observándose en los pacientes que recibieron 1D.

V. DISCUSIÓN

Ambos grupos presentaron una disminución significativa en la expresión de CD25 hasta los 15d. En los pacientes que recibieron 1D se observó una caída significativa mayor debido a que presentaron valores basales mayores. La recuperación del porcentaje y número absoluto basal fue similar en ambos grupos.

Según observaciones descritas anteriormente sugerimos al igual que N Lanio¹⁴⁰ que el efecto de BAS y otros anti-CD25 puede ser más pronunciado sobre los linfocitos TCD4 debido a que el IL-2R (alta afinidad, subunidad α) se expresa más en el CD4 que en el CD8.

Con el uso de este anticuerpo monoclonal específico (anti-CD25) se podría esperar que no solo afecte a las células T efectoras aloreactivas, incluso también al número de células Treg (alta e intermedia afinidad). Este hecho se debe a que la IL-2 es fundamental^{88, 141} en la homeostasis y supervivencia de las Treg.

En este trabajo se observó una disminución significativa de células Treg en porcentaje y número absoluto a los 7d post-TC. Entre ambos grupos se observaron diferencias significativas en porcentaje a los 7d y 15d. La recuperación en porcentaje fue más rápida para 1D que 2D, disminuyendo a partir de los 90d en ambos grupos. Según las figuras (42 y 43) se puede observar que dicha reducción es transitoria coincidiendo con la recuperación de la expresión de CD25 en los linfocitos TCD4+.

Vondran FW¹⁴² observó una disminución de la densidad de expresión de CD25 durante los primeros 90 días post-TC sin afectar a la supervivencia ni a la función supresora de las células Treg.

Wang Z et al¹⁴³ observaron un descenso temporal de la frecuencia relativa de células CD4+CD25+ pero no en la frecuencia de CD4+ FoxP3+ ni en su función. Game et al¹⁴⁴ indicaron una mayor resistencia de las Treg a la apoptosis respecto a las CD4+CD25+, sin afectar tampoco a su función supresora.

Es importante tener en cuenta que el número y función de estas células también puede ser modificado por otras terapias inmunosupresoras de mantenimiento. Se ha indicado¹⁴⁵ que los CNI tienen un efecto deletéreo en las células Treg, por el contrario, los inhibidores de mTOR parecen tener un efecto beneficioso. Esto puede afirmarse ya que se ha observado un aumento de Treg al realizar el cambio de CNI a inhibidores de mTOR²⁴.

Sakaguchi S et al⁷⁸ señala la necesidad de esclarecer si el uso de regímenes llamados calcineuring sparing implica mayor porcentaje de Treg al iniciar más tarde el CNI. En base a esta cuestión en este estudio se observó que los pacientes que recibieron 2D (alcanzaron concen-

traciones óptimas significativamente más tarde de CNI) presentaron una reducción porcentual de Treg más importante, aunque no se puede determinar si éstas han sido eliminadas o si su función se ha afectado, ya que no ha sido motivo de este estudio. Tampoco se observaron más casos de rechazo como indicador de menos tolerancia en estos pacientes.

En este estudio debido al número limitado de episodios de rechazo sólo es posible realizar un estudio exploratorio para establecer el efecto que produce la reducción de dosis en el porcentaje y número absoluto de Treg y su relación con rechazo. Según tabla 19 anexo 1 los pacientes de ambas dosificaciones presentaron porcentajes y número absoluto de Treg después del episodio de rechazo inferior al valor basal. Esta disminución en el porcentaje y número absoluto de Treg puede ser debido a los niveles de inmunosupresores usados para tratar el rechazo. Shan et al¹⁴⁶ en un metanálisis indicaron que el estudio del porcentaje y valores absolutos de las células Treg en el receptor son útiles para mantener una función estable del injerto, reducir la tasa de rechazo agudo/crónico. Además, indicó que el estudio de dichas células en el injerto es mejor biomarcador que el estudio en sangre periférica. David San Segundo¹⁴⁷ demostró que los trasplantados renales con mayores números absolutos de Treg a los doce meses tendrán una mejor supervivencia del injerto a largo plazo, aunque se debería confirmar en estudios multicéntricos.

En nuestro estudio se observó una elevación precoz en porcentaje y número absoluto de LB siendo este aumento mayor en el grupo de 1D que en 2D. El incremento porcentual podría explicarse por la disminución de la población T pero no el aumento numérico. Cabe resaltar que a partir del mes se observó una contracción de la población B progresiva hasta los 180 días. Esta diferencia entre ambos grupos puede ser debido a que, BAS previene la activación del linfocito TCD4+CD25+ y la producción de IL2, lo cual disminuiría la señalización para la activación de linfocitos B vírgenes y la colaboración T-B. No se observaron cambios en los porcentajes de distribución de las subpoblaciones de maduración B en ninguno de los dos grupos. Nuestros resultados son similares a los grupos de Svachova V et al¹⁴⁸ y Todeschini M et al¹⁴⁹ en trasplantados renales donde no se observaron diferencias en las cifras absolutas de linfocitos B naïve.

Las células NK disminuyeron de manera significativa en porcentaje y número absoluto a los 7d tanto con 1D como con 2D, persistiendo esta reducción hasta los 15d y 30d. Desde los 30d hasta el final del estudio se observó su reconstitución. En este trabajo no se estudió la expresión de la cadena alfa del receptor CD25 en las células NK. Se ha descrito¹⁵⁰ que las células NK^{bright} expresan en su superficie el receptor de alta afinidad ($\alpha\beta\gamma$), por tanto, estaría más afectada esta subpoblación minoritaria, mientras la mayor proporción de NK expresa el receptor intermedio

V. DISCUSIÓN

de CD25 (CD122, cadena β receptor CD25). Esta cadena β debido a la redundancia del sistema de citoquinas podría ser activada por la IL-15. Sin embargo, observamos un decremento mayor que la proporción habitual de estos linfocitos bright, lo cual puede ser debido a una labilidad de las NK en general frente a todos los fármacos y eventos que ocurren en el período inicial post trasplante¹⁵¹.

Referente a la activación linfocitaria, no se observaron diferencias en el porcentaje de expresión de HLA-DR, de CD38 ni de la coexpresión de ambos sobre los linfocitos TCD8+ entre 1D y 2D a lo largo del estudio. Únicamente en el grupo 2D se observó una reducción del número de células que coexpresan HLA-DR y CD38 a los 30d con respecto al valor basal. Cabe mencionar que el grupo 2D tuvieron valores pre-TC más altos que los pacientes que recibieron 1D posiblemente por alguna de las circunstancias clínicas que llevaron a los clínicos a usar 2D en esos casos. La disminución mayor en la activación en el grupo 2D en número absoluto respecto al basal se debe a que presentaron una activación basal mayor y menor número de linfocitos totales. No se observaron diferencias en la expresión de cada marcador de activación por separado y en su coexpresión entre ambos grupos; y puede estar relacionado con la redundancia del sistema IL-2/IL-2R. Peter L. Amlot⁴⁹ tampoco observó cambios en la expresión de antígenos de activación en los linfocitos T en trasplantados renales a los que se les administró un anticuerpo quimérico anti-CD25 (similar a BAS), indicando la existencia de otros caminos de activación, tales la fracción β de CD25 e IL15, o a través de citoquinas que aumentan de manera separada cada antígeno de activación. T van Gelder¹⁵² indicó también la redundancia de la red de citoquinas, y que la IL-15 puede ser un candidato para superar el papel de la IL-2. Los pacientes pueden desarrollar un rechazo agudo a pesar del bloqueo adecuado de la vía IL-2/IL-2R; y aquellos que iniciaron tratamiento inmediato con CNI después del trasplante cardiaco presentaron mayor tiempo libre de rechazo.

Diversos estudios^{153,154} observaron que BAS no afectaba el porcentaje de monocitos, aunque se observó una disminución en la expresión de CD25 cuando estaban activados. Otros fármacos como los corticoides y los CNI pueden bloquear su activación y la liberación de citoquinas¹⁵⁵. En nuestro estudio se observó una disminución significativa en porcentaje y no significativa (tendencia) en el número absoluto de monocitos a la semana en los pacientes que recibieron 1D, sin observarse diferencias en la expresión de marcadores de activación entre ambos grupos.

Respecto a la cinética de las inmunoglobulinas se observó una disminución de la concentración sérica de IgM para ambas pautas en el punto 30d, siendo más baja para el grupo 2D. También se observó una disminución significativa de IgG e IgA en todos los puntos de estudio respecto al basal, sin diferencias entre ambas dosificaciones.

La menor secreción de inmunoglobulinas puede ser debido a que se produce una menor activación T, y de manera indirecta una menor activación de la célula B. De hecho, al faltar receptores es posible que el proceso de maduración a cambio de isotipo no se produzca del mismo modo y no se generen anticuerpos.

Varios autores han indicado que la IL-2 estimula la producción de IgM *in vivo*¹⁵⁶ ; e *in vitro*¹⁵⁷ y que esta IgM puede ser bloqueada por la adición de un anti-IL2¹⁵⁸ lo cual puede explicar la menor concentración sérica de IgM que se observó en los pacientes que recibieron 2D a los 30 días, además del efecto de la medicación concomitante. Esta disminución de la concentración de IgM podría estar relacionado con una tendencia de mayor riesgo de infección a los 30 días (Kaplan Mayer) en estos pacientes.

1.3. CAMBIOS PRODUCIDOS EN PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Debido a que los pacientes con 2D presentaron peor función renal, se retrasó el uso del CNI, de ahí que presentaron valores más elevados de creatinina durante los primeros 15 días y más bajos de albúmina y proteínas totales hasta los 90 días.

Los pacientes que recibieron 1D presentaron concentraciones plasmáticas de FK significativamente mayores a los 7d que los pacientes que recibieron 2D. La explicación de la cinética de FK en los pacientes que recibieron 2D se debe a que su administración se inició más tarde en estos pacientes.

El tiempo de inicio y en alcanzar niveles terapéuticos de FK después del trasplante fue semejante al indicado por Veraprapas K⁵⁰.

Veraprapas K⁵⁰ sugiere que el retraso del inicio de los CNI en una población de bajo riesgo podría realizarse utilizando esta estrategia de bajas dosis de BAS. Esta estrategia también parece permitir el cese temprano de corticosteroides, aunque con el mantenimiento concomitante de niveles de CNI y de micofenolato más altos. En este estudio el tiempo necesario para alcanzar concentraciones óptimas de CNI (FK \geq 10 ng/ml) fue menor para los pacientes que recibieron 1D posiblemente debido a la administración temprana de mayores dosis de anticalcineurínico.

En algunos de los pacientes que recibieron 2D de BAS, el tiempo en alcanzar niveles terapéuticos de FK fue mayor que el tiempo del efecto del anti-CD25. Es importante resaltar

V. DISCUSIÓN

que estos pacientes podrían presentar concentraciones infra-óptimas de FK, sobre todo en aquellos con una supresión parcial de la expresión de CD25+. Aunque no se evidencia mayor número de rechazos, el retraso de usar dosis terapéuticas de FK, requeriría una monitorización cercana de los niveles de anticalcineurínicos.

En relación al estudio de biopsias no se observó correlación entre la infiltración linfocitaria y activación linfocitaria TCD8+ en sangre periférica. Tampoco se observó correlación con los niveles de linfocitos T que expresan CD25+. Beik¹⁵⁹ et al reportaron que los porcentaje de CD4+CD25+ y CD8+HLA-DR+ fueron significativamente mayores en trasplantados renales que desarrollaban rechazo. N Lanio et al¹⁶⁰ reportó una correlación entre porcentajes elevados de linfocitos T CD8+ de memoria (TemRA) y su relación con rechazo durante el post-TC.

En este estudio, se puede concluir que los pacientes que recibieron 2D, BAS bloquearía de manera selectiva la activación y proliferación de las células TCD4+CD25+ durante más tiempo. Las células TCD4+ activadas son las principales células que responden frente a aloantígenos del donante y por lo tanto las responsables de la respuesta indirecta efectora asociada a rechazo. No obstante, no se puede excluir la participación de las células TCD8 citotóxicas mediante el fenómeno de sensibilidad cruzada. Consideramos adecuada la monitorización de las células TCD4CD25+ entre los primeros cuatro a siete días post-TC para verificar el efecto supresor de CD25+. Si no se considera añadir una 2D (a partir del 4 día) recomendamos repetir la monitorización de la expresión de CD25+ entre los 15 a 30 días. Se indica este punto porque es cuando observamos mayores diferencias porcentuales de expresión de CD25+ sobre linfocitos TCD4+ y recuperación de Treg. En los pacientes que reciben 1D que no supriman completamente la expresión de CD25+ o durante poco tiempo consideramos necesario una monitorización estrecha de la concentración del CNI.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la administración de una sola dosis de basiliximab en trasplantados cardíacos no supone mayor riesgo de rechazo e infecciones, lo cual coincide con los resultados observados en trasplante renal ^{49,50}.

La relevancia de estos resultados radica en la posibilidad de utilizar este ajuste de dosis de basiliximab y aumentar el tiempo libre de infecciones. Por lo tanto, esta estrategia de reducción de dosis podría ser útil en pacientes con bajo riesgo inmunológico con una funcionalidad renal adecuada y con mayor riesgo de desarrollar episodios de infección.

2. COMPARACIÓN DE VARIABLES CLÍNICAS Y DURACIÓN DEL BLOQUEO DEL RECEPTOR CD25. DIFERENCIAS ENTRE BAS Y DAC

Respecto a las diferencias clínicas de ambos monoclonales no hubo diferencias en supervivencia, desarrollo de infecciones ni episodios de CMV.

Según la cinética de recuperación de CD25 en los linfocitos TCD4+ y linfocitos TCD8+ se puede observar que la recuperación es más lenta para DAC que BAS. Debido a que presentan el mismo mecanismo de acción, están diseñados para bloquear el receptor CD25 durante 4-6 semanas; la explicación puede ser debida a la pauta de administración de DAC (se administra una segunda dosis entre 10-14 días post-TC), y a la propia naturaleza del AcMo. Nuestros datos confirman otros estudios donde se ha evaluado cada AcMo por separado. En el caso de 2D de BAS la saturación del receptor⁴⁶ es de aproximadamente entre 28-42 días frente a los 42 días de 2D de DAC¹⁶¹. Garcia Merino A et al¹³³ indicaron que los anticuerpos humanizados permanecen más tiempo en la circulación que los quiméricos.

Se observó una diferencia significativa en el periodo de supresión (media en días) de la expresión de CD25 en los linfocitos TCD4+ y en la recuperación del porcentaje de expresión de CD25 basal, siendo mayor para el grupo que recibió DAC.

Lin et al¹⁶² comparó 2D de BAS con 2D de DAC en trasplantados renales. No se observaron diferencias en el número de episodios de infección. En su cohorte indicaron que el tiempo de saturación de ambos monoclonales estaba entre las 4-6 semanas, siendo la recuperación a partir de las 6 semanas más rápida para DAC. Estos resultados son contrarios a los observados en este estudio, donde observamos una recuperación más rápida de BAS. Las diferencias encontradas pueden ser debidas a diferencias en la inmunogenicidad a aloantígenos del donante debido al tipo de trasplante realizado, al tipo de AcMo utilizado y a la dosis administrada (en el estudio de Lin et al se utilizaron DAC en una pauta de 2mg/Kg y en este estudio 1mg/Kg).

Respecto al rechazo, no existieron diferencias significativas ni en el número de eventos ni en el tiempo de aparición. Kandus, Aljoša et al¹⁶³ en un estudio prospectivo en trasplantados renales tampoco observaron diferente incidencia de episodios de rechazo entre ambos. Aunque el número de pacientes en este estudio es reducido para alcanzar un poder estadístico suficiente, concluye que si se inscribiera un mayor número de pacientes difícilmente podría

esperarse alguna diferencia teniendo en cuenta el mecanismo de acción de ambos anticuerpos monoclonales. Lin et al¹⁶² observaron mayor número de episodios de rechazo en el grupo que recibió DAC, los cuales ocurrieron cuando la proporción de linfocitos T que expresan CD25+ fue mayor para este grupo.

Cabe destacar que esta diferencia en la recuperación de la expresión de CD25 es importante, ya que una recuperación más rápida puede implicar una activación de las células T efectoras y comprometer la respuesta inmunoreguladora del donante, aunque actualmente se desconoce si ocurre dicho efecto. Dichas diferencias observadas podrían estar sesgadas por la diferencia de administración de la segunda dosis de DAC y por la propia naturaleza de ambos fármacos (quimérico y humanizado). Debido a estas diferencias en la recuperación de CD25 consideramos que DAC presentaría un mejor perfil profiláctico de rechazo que BAS, aunque sería necesario una comparación con mayor número de pacientes y realizar un seguimiento a largo plazo para esclarecer si esta mayor duración en la recuperación de CD25 confiere una mayor ventaja en la supervivencia del aloinjerto y en el desarrollo de CAV.

3 ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL EFECTO DE DIFERENTES GGIV COMERCIALES EN DIFERENTES POBLACIONES LINFOCITARIAS EN DIFERENTES CONTEXTOS CLÍNICOS

Existen pocos estudios que describen las alteraciones que produce la administración de diferentes preparados de GGIV en diversas poblaciones leucocitarias. Es necesario estudiar el efecto inmunomodulador de dichos preparados desde que Hans ochs HD y col¹⁶⁴ observaron en pacientes con inmunodeficiencias primarias que la administración de altas dosis (400 mg/Kg) la IgG alcanza un nivel máximo mayor (Cmax) que la administración de dosis sustitutivas (100mg/Kg) y un aumento sustancial en suero durante el período post-infusión, lo que sugiere la persistencia de anticuerpos específicos durante el intervalo entre las infusiones. Además, hay que tener en cuenta que la farmacocinética de las GGIV presenta una elevada variabilidad inter e intraindividual que junto con la composición (IgG monomérica o dimérica) hacen necesario una dosificación personalizada.

En este estudio se observó tendencia en la disminución de los linfocitos TCD3+ en porcentaje y en número absoluto después de la infusión de ambos tipos de preparados de GGIV (altas dosis y específica anti CMV), recuperando valores basales antes del siguiente ciclo de infusión. Los linfocitos TCD8+ disminuyeron de manera significativa en número absoluto en el grupo de alta dosis, recuperando valores basales antes de la siguiente infusión. En el caso de la inmunoglobulina hiperinmune anti-CMV el porcentaje y número absoluto de linfocitos TCD8+ fue estable. Los linfocitos TCD4+ permanecieron sin cambios significativos en todas las pautas. Estos resultados son similares a otros autores descritos posteriormente. Por ejemplo, Dominic Paqui-Proulx¹⁶⁵ et al observaron en pacientes con inmunodeficiencia variable común un aumento de los linfocitos TCD4+ con valores estables de linfocitos TCD8+ a los 6-12 meses tras la administración de inmunoglobulinas intravenosas. Diversos autores Macey M G et al¹⁶⁶ y Hui Qing Hou et al¹⁶⁷ asociaron un aumento de linfocitos TCD4+ naive con valores estables o disminuidos de linfocitos TCD8+ en diferentes entidades que cursan con autoinmunidad (PTI y polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda). K Hoetzenecker et al¹⁶⁸ observaron en estudios *in vitro* en pacientes TC tratados con inmunoglobulina hiperinmune anti-CMV un aumento de la apoptosis de los linfocitos TCD8+.

Respecto a la expresión de marcadores de activación en los linfocitos TCD8+ se observó tendencia a disminuir su expresión en porcentaje y en número absoluto en ambos preparados. En el caso de la expresión de DR fue estadísticamente significativamente en valores absolutos en la pauta de alta dosis. Además, se observó que dichos marcadores de activación disminuyen su expresión de manera sostenida sin recuperar el valor basal previo (es decir, esta disminución en la activación no es transitoria). Esta disminución sostenida de marcadores de activación en los linfocitos CD8+ después de la GGIV también fue observado por Dominic Paqui-Proulx^{165,169} et al en pacientes con CVID. Wakiguchi H et al¹⁷⁰ observaron que la no disminución en la expresión de HLA-DR en el linfocito TCD8+ podría estar relacionado con la resistencia al tratamiento.

Referente al linfocito B, se observaron valores estables en todas las pautas de administración. La maduración del linfocito B presentó tendencia al aumento de linfocitos B naive y disminución de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (altas dosis). En el caso de la inmunoglobulina hiperinmune anti-CMV no se observaron diferencias en el porcentaje y número absoluto de linfocitos B naive ni linfocitos B memoria. Nuestros resultados no son comparables al de otros autores debido a que la mayoría están realizados en modelos *in vitro* en humanos o en modelos animales, por lo tanto, no reflejan el efecto *in vivo*. Heidt et al¹⁷¹ observaron en pacientes sanos en un modelo *in vitro* que estos preparados no son capaces de inhibir directamente la respuesta de los linfocitos B y su capacidad proliferativa, sino que

V. DISCUSIÓN

dicha inhibición se debe a un efecto indirecto en los linfocitos T y/o interacciones con anticuerpos circulantes y complemento.

En nuestro estudio se observaron valores estables de Treg circulantes después e inmediatamente después de la administración de ambos tipos de preparados. Diversos autores^{172,173} observaron un aumento inmediato de células Treg circulantes tras la administración de GGIV. Tjon AS et al¹⁷⁴ no observaron un aumento de células Treg circulantes, pero sí un aumento de su activación (expresión de DR) y su actividad supresora (expresión de FoxP3) en pacientes tratados con altas dosis de GGIV pero no a bajas dosis. K Hoetzenecker et al¹⁶⁸ no observaron *in vitro* un aumento de Treg en el caso de la GGIV hiperinmune anti-CMV. La no observación de un aumento en nuestro estudio podría ser debido al tamaño muestral y que tampoco se analizó FoxP3.

Se observó una disminución significativa en el número de monocitos circulantes previo a la infusión (t2 postinfusional) en la pauta de altas dosis. En la preparación de inmunoglobulina hiperinmune específica anti-CMV no se observó dicha disminución. En el caso de la coexpresión de marcadores de activación se observó una disminución significativa después de la infusión en número absoluto en el grupo de altas dosis.

Varios autores^{175,59,165} observaron una reducción inmediata transitoria en el número de monocitos circulantes y proinflamatorios. Siedlar et al⁵⁹ observaron una reducción transitoria del 50% en concreto de los monocitos proinflamatorios definidos por el fenotipo CD14+CD16++DR++¹⁷⁶ a las 4 horas después de la infusión, y demostraron que en dicho efecto estaba implicado el receptor FcγRIIb (CD32B), mientras que los monocitos clásicos definidos por el fenotipo CD14+CD16-DR+ permanecieron estables o disminuyeron moderadamente en unos pocos pacientes. Tjon AS et al¹⁷⁷ no observaron una disminución de monocitos proinflamatorios circulantes en una pauta de administración de altas dosis, sugiriendo que esa disminución sólo se observaba en la pauta de administración a bajas dosis. Por tanto, nuestros resultados son similares al estudio de Siedlar et al, observándose una disminución significativa en la activación de los monocitos totales (clásicos y proinflamatorios) en el preparado administrado a altas dosis GGIV.

En este estudio se observó una disminución de células NKT circulantes en el preparado de alta dosis. Varios autores^{178,179} han observado una disminución de células NKT circulantes tras la administración de GGIV en mujeres con fracaso reproductivo de repetición. Nuestros resultados no son comparables al de los anteriores autores debido a que este estudio se realizó en diferentes modelos en concreto en pacientes con autoinmunidad y pacientes trasplantados con enfermedad CMV.

Referente al efecto de la GGIV en trasplantados cardíacos no se observaron cambios en la proporción de células T, B, NKT, Treg, monocitos y neutrófilos totales circulantes en sangre periférica. Se observaron valores menores de TCD8+ y mayores de Treg después de la infusión en el grupo que recibió GGIV (casos) en comparación con aquellos que no recibieron (controles). No se observó un aumento en la activación del linfocito TCD8+ ni en el monocito que junto con el aumento del porcentaje de Treg, podría ser la responsable del efecto beneficioso de la GGIV en la prevención del rechazo tanto agudo como crónico.

Según estos estudios se podría concluir que la GGIV podría ser una opción en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y rechazo debido a su capacidad para suprimir la activación en los linfocitos TCD8+ sin afectar el porcentaje de células Treg. Respecto a su uso en infecciones, podría ser útil en controlar la inflamación debido a la activación inmune crónica.

En los estudios presentados se observó un descenso de inmunoglobulinas tras el trasplante cardíaco, confirmando estudios anteriores previos en los cuales se ha sugerido que la IgG hipogammaglobulinemia es un factor de riesgo de infección^{127,180}. En estos pacientes que desarrollan hipogammaglobulinemia estaría indicado el tratamiento con GGIV. Este tratamiento además de la reconstitución humoral, tiene un efecto en la inmunidad celular el cual ha sido descrito en los resultados de esta tesis que podrían explicar su potencial efecto inmunomodulador (ver aumento de células T reguladoras tras uso de GGIV en esta tesis). Con la finalidad de ver el efecto de las GGIV sobre la activación linfocitaria en esta tesis se utilizó un modelo de uso de alta dosis de GGIV en enfermedad autoinmunes, observando una disminución de la activación de células T CD8. Se sabe que las GGIV a altas dosis se usan en trasplante en varias indicaciones.

VI. CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

SOBRE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI CD25 BASILIXIMAB (BAS) EN DOS DOSIFICACIONES (1D Y 2D) Y SU EFECTO SOBRE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN TRASPLANTE CARDIACO.

- Los pacientes que recibieron una dosis única de basiliximab inmediatamente tras el trasplante, presentaron una recuperación más precoz de los porcentajes de expresión de CD25 sobre las células TCD4, y también de las células reguladoras en los estudios de los días 15 y 30 post trasplante, en relación al grupo 2D.
- Las diferencias observadas en las poblaciones no se correlacionaron con diferencias significativas en el tiempo libre de rechazo, ni en el grado de infiltración linfocitaria en las biopsias endomiocárdicas ni en el número de episodios de infección ni en el tiempo libre de infección a los 30 días entre pacientes tratados con 1D y 2D de basiliximab.
- La monitorización inmunológica mediante citometría de flujo permite identificar la intensidad de supresión de expresión del receptor de IL2 inducida por diferentes dosis de basiliximab, en cada paciente de manera individual durante el período inicial post trasplante.

SOBRE LA CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE CD25 SOBRE LOS LINFOCITOS Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA TRAS LA INDUCCIÓN CON 2 ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD25 DACLIZUMAB (DAC) HUMANIZADO Y BAS QUIMÉRICO EN TRASPLANTE CARDIACO

- La evaluación de la duración de la expresión de CD25+ en TCD4+ y TCD8+ de manera individualizada fue menor en el grupo BAS.
- La reconstitución más precoz de la expresión de CD25+ observada tras BAS en comparación con DAC no implicó mayor número de episodios de rechazo.
- No se observaron diferencias significativas en el número de episodios de infección entre pacientes tratados con BAS o con DAC.

VI. CONCLUSIONES

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON GAMMAGLOBULINAS IV SOBRE LOS LINFOCITOS EN DIFERENTES CONTEXTOS CLÍNICOS Y EN TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO.

- El porcentaje de células reguladoras CD4+ es mayor tras la terapia con gammaglobulinas IV en trasplantados cardiacos en comparación con aquellos que no recibieron dicho tratamiento.
- La expresión de CD38 y de HLA-DR disminuye en los linfocitos TCD8+ de los pacientes con enfermedades autoinmunes tras el tratamiento con GGIV en altas dosis.

VII. BIBLIOGRAFÍA



VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. Datos del registro mundial de trasplantes, 2017.
2. Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. Memoria actividad donación y trasplante cardiaco. España 2020
3. Gonzales-Vilchez F; Almenar-Bonet L, Crespo-Leiro MG, Alonso-Pulpón L, Gonzalez-Costelo J, Sobrino-Márquez JM, Arizón del Prado JM, Sousa-Casasnovas I, Delgado Jiménez J, Pérez Villa F, en representación de los Equipos Españoles de Trasplante Cardiaco. Registro Español de Trasplante Cardiaco. XXXI Informa Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2018). Revista Española de Cardiología. Volume 73, Issue 11, November 2020, Pages 952-960
4. Stepkowski SM. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. Expert Rev Mol Med. 2000; 2(4):1-23. PMID: 14585137
5. Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. New England Journal of Medicine, 351(26), 2715–2729. PMID: 15616206
6. Alonso-Pulpón L, Segovia, J, Gómez-Bueno M, García-Pavía P. Heart transplantation: organisational aspects and current trends in immunosuppression—a view from Spain. Heart 2012 Jun;98 (11):878-89
7. Martínez-Martínez S, Redondo JM. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. Curr Med Chem. 2004 Apr; 11(8):997-1007.
8. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. J Biochem. 2002 Jan; 131(1):1-15.

VII. BIBLIOGRAFÍA

9. Liberman AC, Druker J, Refojo D, Arzt E. Molecular mechanisms of action of some immunosuppressive drugs. *Medicina (B Aires)*. 2008; 68(6):455-64.
10. Kim TJ, Kim N, Kang HJ, Kim EO, Kim ST, Ahn HS, Bluestone JA, Lee KM. FK506 causes cellular and functional defects in human natural killer cells. *J Leukoc Biol*. 2010 Dec;88(6):1089-97.
11. Taylor DO, Barr ML, Radovancevic B, Renlund DG, Mentzer RM Jr, Smart FW, Tolman DE, Frazier OH, Young JB, VanVeldhuisen P. A randomized, multicenter comparison of tacrolimus and cyclosporine immunosuppressive regimens in cardiac transplantation: decreased hyperlipidemia and hypertension with tacrolimus. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Apr;18(4):336-45.
12. Reichart B, Meiser B, Viganò M, Rinaldi M, Martinelli L, Yacoub M, Banner NR, Gandjbakhch I, Dorent R, Hetzer R, Hummel M. European Multicenter Tacrolimus (FK506) Heart Pilot Study: one-year results--European Tacrolimus Multicenter Heart Study Group. *J Heart Lung Transplant*. 1998 Aug;17(8):775-81.
13. Miroux C, Morales O, Ghazal K, Othman SB, de Launoit Y, Pancré V, Conti F, Delhem N. In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation*. 2012 Jul 27;94(2):123-31.
14. Li Q, Shakya A, Guo X, Zhang H, Tantin D, Jensen PE, Chen X. Constitutive nuclear localization of NFAT in FoxP3+ regulatory T cells independent of calcineurin activity. *J Immunol*. 2012 May 1;188(9):4268-77.
15. Satake A, Schmidt AM, Archambault A, Leichner TM, Wu GF, Kambayashi T. Differential targeting of IL-2 and T cell receptor signaling pathways selectively expands regulatory T cells while inhibiting conventional T cells. *J Autoimmun*. 2013; 44:13–20.
16. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 309-45.
17. Bereshchenko O, Coppo M, Bruscoli S, Biagioli M, Cimino M, Frammartino T, Sorcini D, Venanzi A, Di Sante M, Riccardi C. GILZ promotes production of peripherally induced Treg cells and mediates the crosstalk between glucocorticoids and TGF- β signaling. *Cell Rep*. 2014 Apr 24;7(2):464-475.
18. Chen L, Jondal M, Yakimchuk K. Regulatory effects of dexamethasone on NK and T cell immunity. *Inflammopharmacology*. 2018 Oct;26(5):1331-1338.

19. Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol.* 2002 Jan; 71(1):9-15.
20. Buttgerit F, Saag KG, Cutolo M, da Silva JA, Bijlsma JW. The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2005;34(1):14-21.
21. Van der Goes MC, Jacobs JW, Bijlsma JW. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases--positive and adverse effects. *Arthritis Res Ther.* 2014;16 Suppl 2(Suppl 2): S2.
22. Vilella-Bach M, Nuzzi P, Fang Y, Chen J. The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *J Biol Chem.* 1999 Feb 12;274(7):4266-72
23. Chapman TM, Perry CM. Everolimus. *Drugs.* 2004;64(8):861-72; discussion 873-4.
24. Ruggenenti P, Perico N, Gotti E, Cravedi P, D'Agati V, Gagliardini E, Abbate M, Gaspari F, Cattaneo D, Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cugini D, Conti S, Remuzzi G. Sirolimus versus cyclosporine therapy increases circulating regulatory T cells, but does not protect renal transplant patients given alemtuzumab induction from chronic allograft injury. *Transplantation.* 2007 Oct 27;84(8):956-64.
25. Valmori D, Tosello V, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Wang Y, Ayyoub M. Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells. *J Immunol.* 2006 Jul 15;177(2):944-9.
26. Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One.* 2009 Jun 22;4(6): e5994
27. Zeng H, Yang K, Cloer C, Neale G, Vogel P, Chi H. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature.* 2013 Jul 25;499(7459):485-90
28. Eissens DN, Van Der Meer A, Van Cranenbroek B, Preijers FW, Joosten I. Rapamycin and MPA, but not CsA, impair human NK cell cytotoxicity due to differential effects on NK cell phenotype. *Am J Transplant.* 2010 Sep;10(9):1981-90.

VII. BIBLIOGRAFÍA

29. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Oct;56(1):23-46.
30. Alberú J, Urrea EM. Inmunosupresión para receptores de trasplante renal: estrategias actuales [Immunosuppression for kidney transplant recipients: current strategies]. *Rev Invest Clin*. 2005 Mar-Apr;57(2):213-24.
31. Fourtounas C, Dousdampanis P, Sakellaraki P, Rodi M, Tassos Georgakopoulos T, Vlachojannis JC, Mouzaki A. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. *Am J Nephrol* 2010; 32 (1):1–9.
32. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol*. 2001 Aug 15;167(4):1945-53.
33. Brehm C, Huenecke S, Esser R, Kloess S, Quaiser A, Betz S, Zimmermann O, Soerensen J, Passweg JR, Klingebiel T, et al. Interleukin-2-stimulated natural killer cells are less susceptible to mycophenolate mofetil than non-activated NK cells: possible consequences for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2014; 63:821–833.
34. Nagy SE, Andersson JP, Andersson UG. Effect of mycophenolate mofetil (RS-61443) on cytokine production: inhibition of superantigen-induced cytokines. *Immunopharmacology*. 1993 Jul-Aug;26(1):11-20.
35. Grafals M, Smith B, Murakami N, Trabucco A, Hamill K, Marangos E, Gilligan H, Pomfret EA, Pomposelli JJ, Simpson MA, Azzi J, Najafian N, Riella LV. Immunophenotyping and efficacy of low dose ATG in non-sensitized kidney recipients undergoing early steroid withdrawal: a randomized pilot study. *PLoS One*. 2014 Aug 11;9(8):e104408
36. Mourad G, Morelon E, Noël C, Glotz D, Lebranchu Y. The role of Thymoglobulin induction in kidney transplantation: an update. *Clin Transplant*. 2012 Sep-Oct;26(5):E450-64.
37. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, Ames S, Lerner S, Ebcioğlu Z, Nair V, Dinavahi R, Sehgal V, Heeger P, Schroppel B, Murphy B. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant*. 2010 Sep;10(9):2132-2141.
38. Xia CQ, Chernatynskaya AV, Wasserfall CH, Wan S, Looney BM, Eisenbeis S, Williams J, Clare-Salzler MJ, Atkinson MA. Anti-thymocyte globulin (ATG) differentially depletes naïve and memory T cells and permits memory-type regulatory T cells in nonobese diabetic mice. *BMC Immunol*. 2012 Dec 14; 13:70.

39. Pankewycz O, Leca N, Kohli R, Wallace PK, Said M, Feng L, Alnimri M, Patel S, Laftavi MR. Low-dose rabbit antithymocyte globulin induction therapy results in prolonged selective lymphocyte depletion irrespective of maintenance immunosuppression. *Transplant Proc.* 2011 Mar;43(2):462-5.
40. Clemente Bautista S, Mendarte Barrenechea L. Daclizumab en la prevención del rechazo agudo en el trasplante de riñón y en otros órganos sólidos. *Farmacia Hospitalaria.* 2001; 25 (3):129-134.
41. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol.* 1993; 11:245-68
42. Tkaczuk J, Yu CL, Baksh S, Milford EL, Carpenter CB, Burakoff SJ, McKay DB. Effect of anti-IL-2R alpha antibody on IL-2-induced Jak/STAT signaling. *Am J Transplant.* 2002 Jan; 2(1):31-40.
43. Baan CC, Balk AH, van Riemsdijk IC, Vantrimpont PJ, Maat AP, Niesters HG, Zondervan PE, van Gelder T, Weimar W. Anti-CD25 monoclonal antibody therapy affects the death signals of graft-infiltrating cells after clinical heart transplantation. *Transplantation.* 2003 May 27;75(10):1704-10.
44. McDyer JF, Li Z, John S, Yu X, Wu CY, Ragheb JA. 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 Sep 1; 169(5):2736-46.
45. Martin JF, Perry JS, Jakhete NR, Wang X, Bielekova B. An IL-2 paradox: blocking CD25 on T cells induces IL-2-driven activation of CD56(bright) NK cells. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):1311-20.
46. Mehra MR, Zucker MJ, Wagoner L, Michler R, Boehmer J, Kovarik J, Vasquez A. A multi-center, prospective, randomized, double-blind trial of basiliximab in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Sep; 24(9):1297-304.
47. Mattei MF, Redonnet M, Gandjbakhch I, Bandini AM, Billes A, Epailly E, Guillemain R, Lelong B, Pol A, Treilhaud M, Vermes E, Dorent R, Lemay D, Blanc AS, Boissonnat P. Lower risk of infectious deaths in cardiac transplant patients receiving basiliximab versus anti-thymocyte globulin as induction therapy. *J Heart Lung Transplant.* 2007 Jul; 26(7):693-9.

VII. BIBLIOGRAFÍA

48. Carrier M, Leblanc MH, Perrault LP, White M, Doyle D, Beaudoin D, Guertin MC. Basiliximab and rabbit anti-thymocyte globulin for prophylaxis of acute rejection after heart transplantation: a non-inferiority trial. *J Heart Lung Transplant*. 2007 Mar;26(3):258-63.
49. Amlot PL, Rawlings E, Fernando ON, Griffin PJ, Heinrich G, Schreier MH, Castaigne JP, Moore R, Sweny P. Prolonged action of a chimeric interleukin-2 receptor (CD25) monoclonal antibody used in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. 1995 Oct 15;60(7):748-56.
50. Kittipibul V, Tantrachoti P, Ongcharit P, Ariyachaipanich A, Siwamogsatham S, Sritang-sirikul S, Thammanatsakul K, Puwanant S. Low-dose basiliximab induction therapy in heart transplantation. *Clin Transplant*. 2017 Dec;31(12).
51. Branco C, Prieto D, Antunes A, Batista M, J Antunes M. Heart transplantation: Early Results of Two Different Regimes of Immunosuppression. *Rev Port Cir Cardiorac Vasc*. 2017 Jul-Dec;24(3-4):119.
52. Du J, Yang H, Zhang D, Wang J, Guo H, Peng B, Guo Y, Ding J. Structural basis for the blockage of IL-2 signaling by therapeutic antibody basiliximab. *J Immunol*. 2010 feb 1;184(3):1361-8.
53. Mitrevski M, Marrapodi R, Camponeschi A, Cavaliere FM, Lazzeri C, Todi L, Visentini M. Intravenous Immunoglobulin and Immunomodulation of B-Cell - in vitro and in vivo Effects. *Front Immunol*. 2015 Jan 22; 6:4.
54. Durandy A, Kaveri SV, Kuijpers TW, Basta M, Miescher S, Ravetch JV and Rieben R. Intravenous immunoglobulins – understanding properties and mechanisms. *Clin Exp Immunol*. 2009 Dec; 158 Suppl 1:2-13.
55. Basta M, Dalakas MC. High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest*. 1994 Nov;94(5):1729-35.
56. Ballow M. The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Feb;127(2):315-23
57. Kessel A, Ammuri H, Peri R, Pavlotzky ER, Blank M, Shoenfeld Y, Toubi E. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J Immunol*. 2007 Oct 15;179(8):5571-5.

58. De Groot AS, Moise L, McMurry JA, Wambre E, Van Overtvelt L, Moingeon P, Scott DW, Martin W. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3303-11.
59. Siedlar M, Strach M, Bukowska-Strakova K, Lenart M, Szaflarska A, Węglarczyk K, Rutkowska M, Baj-Krzyworzeka M, Pituch-Noworolska A, Kowalczyk D, Grodzicki T, Ziegler-Heitbrock L, Zembala M. Preparations of intravenous immunoglobulins diminish the number and proinflammatory response of CD14+CD16++ monocytes in common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Immunol* 139 (2):122-32.
60. Vani J, Elluru S, Negi VS, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Bayry J, Kaveri SV. Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective. *Autoimmun Rev*. 2008 Jun;7(6):440-4.
61. Altnauer F, von Gunten S, Späth P, Simon HU. Concurrent presence of agonistic and antagonistic anti-CD95 autoantibodies in intravenous Ig preparations. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec;112(6):1185-90
62. Von Gunten S, Simon HU. Cell death modulation by intravenous immunoglobulin. *J Clin Immunol*. 2010 May; 30 Suppl 1: S24–30.
63. Paquin Proulx D, Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Inhibition of B cell-mediated antigen presentation by intravenous immunoglobulins (IVIg). *Clin Immunol*. 2010 Jun;135(3):422-9.
64. De Grandmont MJ, Racine C, Roy A, Lemieux R, Néron S. Intravenous immunoglobulins induce the in vitro differentiation of human B lymphocytes and the secretion of IgG. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3065-73.
65. MacMillan HF, Lee T, Issekutz AC. Intravenous immunoglobulin G-mediated inhibition of T-cell proliferation reflects an endogenous mechanism by which IgG modulates T-cell activation. *Clin Immunol*. 2009 Aug;132(2):222-33
66. Aubin E, Lemieux R, Bazin R. Indirect inhibition of in vivo and in vitro T-cell responses by intravenous immunoglobulins due to impaired antigen presentation *Blood*. 2010 Mar 4; 115(9):1727-34.
67. Trépanier P, Chabot D, Bazin R. Intravenous immunoglobulin modulates the expansion and cytotoxicity of CD8+ T cells. *Immunology*. 2014 Feb;141(2):233-41.
68. Abe Y, Horiuchi A, Miyake M, Kimura S. Anti-cytokine nature of natural human immunoglobulin: one possible mechanism of the clinical effect of intravenous immunoglobulin therapy. *Immunol Rev*. 1994 Jun; 139:5-19.

VII. BIBLIOGRAFÍA

69. Xu C, Poirier B, Van Huyen JPD, Lucchiari N, Michel O, Chevalier J, et al. Modulation of endothelial cell function by normal polyspecific human intravenous immunoglobulins. *Am J Pathol* 1998 Oct;153(4):1257-66.
70. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Delignat S, Mouthon L, Weill B, Kazatchkine MD, et al. Intravenous immunoglobulin abrogates dendritic cell differentiation induced by interferon-alpha present in serum from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003 Dec;48(12):3497–502.
71. Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, Groothuisink ZM, Kuipers EJ, de Man RA, Kwekkeboom J. Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells. *Blood.* 2007 Nov 1;110(9):3253-62.
72. Gershon, R.K. and K. Kondo, Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 1970 May;18(5):723-37.
73. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology.* 1971 Dec;21(6):903-14.
74. Hall BM, Pearce NW, Gurley KE, Dorsch SE. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action. *J Exp Med.* 1990 Jan 1;171(1):141-57
75. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995 Aug 1;155 (3):1151–1164.
76. Kim J, Rasmussen J, Rudensky A. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007 Feb;8 (2): 191–197.
77. Akl A, Luo S, Wood KJ. Induction of transplantation tolerance—the potential of regulatory T cells. *Transpl Immunol.* 2005 Aug; 14 (3-4): 225–230.
78. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; Mar 3 (3): 199–210.
79. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Benoit Salomon L, Cohen JL. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution

- and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*. 2003 Dec; 112(11):1688-96.
80. Kang SM, Tang Q, Bluestone JA. CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Transplantation: progress, challenges and prospects. *American Journal of Transplantation* 2007 Jun; 7 (6):1457–1463. PMID: 17511675
 81. Baecher-Allan C, Brown JA., Gordon JF, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 2001 Aug 1;167(3):1245-53.
 82. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor FOXP3. *Immunity* 2005 Mar;22 (3): 329–341.
 83. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1701-11.
 84. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006 Aug; 212:28-50.
 85. MacDonald TT. T cell immunity to oral allergens. *Curr Opin Immunol* 1998 Dec; 10 (6): 620-627.
 86. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of FOXP3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *J Immunol* 2007 Jan 1;178 (1): 179-185.
 87. Vlad G, Cortesini R, and Suci-Foca N. License to Heal: Bidirectional Interaction of Antigen-Specific Regulatory T Cells and Tolerogenic APC. *J Immunol*, 2005 May 15. 174(10): 5907-14.
 88. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87.
 89. Shalev I, Schmelzle M, Robson SC, Levy G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin Immunol*. 2011 Aug;23(4):282-92. doi: 10.1016/j.smim.2011.04.003. Epub 2011 May 17.
 90. Shevach EM. Mechanisms of FoxP3 T regulatory cell mediated suppression. *Immunity* 2009 May; 30 (5):636-645.

VII. BIBLIOGRAFÍA

91. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008 Jul; 8 (7):523-532.
92. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:929-79
93. Strobl H, Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect*. 1999 Dec;1(15):1283-90
94. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004 Oct; 21 (4):589–601.
95. Stockinger B, Kassiotis G, Bourgeois C. Homeostasis and T cell regulation. *Curr Opin Immunol*. 2004 Dec; 16 (6):775–779.
96. Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M, Atkins CJ, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol*. 2005 Mar;17(3):279-88.
97. Mellor, A.L. and D.H. Munn, IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*, 2004 Oct 4(10): 762-74.
98. Cobbold, S.P, Adams E, Farquhar CA, Nolan KF, Howie D, Kathy O Lui, Fairchild PJ, Mellor AL, Ron D, Waldmann H. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009 Jul 21;106(29):12055- 60.
99. Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea JJ, Shevach EM. CD4+ FOXP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *J Exp Med*. 2008 Sep 1;205(9):1975- 81.
100. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med*. 2005 Oct 17;202(8):1075-85
101. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953 Oct 3;172(4379):603-6
102. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet*. 1992 Jun 27;339(8809):1579-82

- 103.** Niimi M, Shirasugi N, Ikeda Y, Wood KJ. Oral antigen induces allograft survival by linked suppression via the indirect pathway. *Transplant Proc* 2001 Feb-Mar; 33 (1-2): 81.
- 104.** Lagaaij, E, Hennemann IP, Ruigrok M, Haan de MW, Persijn GG, Termijtelen A, Hendricks GF, Weimar W, F, Claas FH, van Rood JJ . Effect of one HLA-DR antigen-matched and completely HLA-DR-mismatched blood transfusions on survival of heart and kidney allografts. *N. Engl.J. Med.* 1989 Sep 14;321 (11) 701-5.
- 105.** Sakaguchi, S. Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumour immunity and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 2001 Ago; 182:18–32.
- 106.** Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001 Mar 15;166(6):3789-96.
- 107.** Zheng XX, Sánchez-Fueyo A, Sho M, Domenig C, Sayegh MH, Strom TB. Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity.* 2003 Oct;19(4):503-14
- 108.** Karim M, Steger U., Bushell AR, Wood KJ. The role of the graft in establishing tolerance. *Frontiers Biosci.* 2002 May 1;7: e129–154
- 109.** Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4+CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2002 Aug 5;196(3):389-99.
- 110.** Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 2002 Aug 5;196(3):401-6.
- 111.** Gallego-Valle J, Gil-Manso S , Pita A, Bernaldo-de-Quirós E, López-Esteban R, Marta Martínez-Bonet M, Astrid Pérez-Fernández V, Pérez-Caballero R , Pardo C, Miguel Gil-Jaurena J, Correa-Rocha R, Pion M. Ectopic FoxP3 Expression in Combination with TGF- β 1 and IL-2 Stimulation Generates Limited Suppressive Function in Human Primary Activated Thymocytes Ex Vivo. *Biomedicines* 2021 Apr 23;9(5): 461.
- 112.** Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005 Apr;6 (4):353-60.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 113.** Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J* 2003, *Immunol* April 15;170 (8) 3939-43.
- 114.** Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A; The Transplantation Society International CMV Consensus Group. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation*. 2018 Jun; 102(6):900-931.
- 115.** González de Buitrago, J.M. "Técnicas y métodos de laboratorio clínico". 2 ed. Masson, Barcelona, 2005.
- 116.** Abadja F, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C, Genin C, Lambert C. Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation*. 2010 Feb 15;89(3):366-8.
- 117.** Eda S, Kaufmann J, Roos W, Pohl S. Development of a New Microparticle-Enhanced Turbidimetric Assay for C-reactive Protein with Superior Features in Analytical Sensitivity and Dynamic Range. *J Clin Lab Anal*. 1998; 12(3):137-144
- 118.** WEICHELBAUM TE. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am J Clin Pathol*. 1946 Mar; 10:40-9.
- 119.** Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1971 Jan; 31 (1):87-96.
- 120.** Fabiny DL, Ertinghausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clin Chem*. 1971 Aug; 17 (8):696-700.
- 121.** Sampson EJ, Baird MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem*. 1980 Jun;26(7):816-26.
- 122.** Wild D. *The Immunoassay handbook*. 4 ed. Elsevier, Amsterdam, 2013.
- 123.** Kovarik JM, Rawlings E, Sweny P, Fernando O, Moore R, Griffin PJ, Fauchald P, Albrechtsen D, Sodal G, Nordal K, Amlot PL. Pharmacokinetics and immunodynamics of chimeric IL-2 receptor monoclonal antibody SDZ CHI 621 in renal allograft recipients. *Transpl Int* 1996;9 Suppl 1: S32-3. doi: 10.1007/978-3-662-00818-8_9. PMID: 8959785
- 124.** Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC,

- McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suciú-Focia N, Zeevi A, Billingham ME. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Nov;24(11):1710-20.
- 125.** Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, Leffell MS. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. *Am J Transplant* 2011 Apr; 11(4):719-724.
- 126.** Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdworth R, Bennett G, Jose M. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology* 2009 Apr; 14(2): 247-254.
- 127.** Sarmiento E, Navarro J, Fernandez-Yañez J, Palomo J, Muñoz P, Carbone J. Evaluation of an Immunological Score to Assess the Risk of Severe Infection in Heart Recipients . *Transpl Infect Dis* 2014 Oct;16(5):802-12.
- 128.** Whitson BA, Kilic A, Lehman A, Wehr A, Hasan A, Haas G, Hayes D Jr, Sai-Sudhakar CB, Higgins RS. Impact of induction immunosuppression on survival in heart transplant recipients: a contemporary analysis of agents. *Clin Transplant*. 2015 Jan;29(1):9-17.
- 129.** Ensor CR, Cahoon WD Jr, Hess ML, Kasirajan V, Cooke RH. Induction immunosuppression for orthotopic heart transplantation: a review. *Prog Transplant*. 2009 Dec;19(4):333-41.
- 130.** Møller CH, Gustafsson F, Gluud C, Steinbrüchel DA. Interleukin-2 receptor antagonists as induction therapy after heart transplantation: systematic review with meta-analysis of randomized trials. *J Heart Lung Transplant*. 2008 Aug;27(8):835-42.
- 131.** Segovia J, Rodríguez-Lambert JL, Crespo-Leiro MG, Almenar L, Roig E, Gómez-Sánchez MA, Lage E, Manito N, Alonso-Pulpón L. A randomized multicenter comparison of basiliximab and muromonab (OKT3) in heart transplantation: SIMCOR study. *Transplantation*. 2006 Jun 15;81(11):1542-8.
- 132.** Wang R, Moura LA, Lopes SV, Costa FD, Souza Filho NF, Fernandes TL, Salvatti NB, Faria-Neto JR. Reduced progression of cardiac allograft vasculopathy with routine use of induction therapy with basiliximab. *Arq Bras Cardiol*. 2015 Aug; 105(2): 176–183.
- 133.** Kovarik JM, Kahan BD, Rajagopalan PR, Bennett W, Mulloy LL, Gerbeau C, Hall ML. Population pharmacokinetics and exposure-response relationships for basiliximab in kidney transplantation. The U.S. Simulect Renal Transplant Study Group. *Transplantation*. 1999 Nov 15;68(9):1288-94.

VII. BIBLIOGRAFÍA

134. Kovarik JM, Moore R, Wolf P, Abendroth D, Landsberg D, Souillou JP, Gerbeau C, Schmidt AG. Screening for basiliximab exposure-response relationships in renal allotransplantation. *Clin Transplant*. 1999 Feb;13(1 Pt 1):32-8.
135. García Merino A. Monoclonal antibodies. Basic features. *Neurologia*. 2011 Jun;26(5):301-6.
136. Kovarik JM, Nashan B, Neuhaus P, Clavien PA, Gerbeau C, Hall ML, Korn A. A population pharmacokinetic screen to identify demographic-clinical covariates of basiliximab in liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Apr;69(4):201-9
137. Nojima M, Yoshimoto T, Nakao A, Itahana R, Kyo M, Hashimoto M, Shima H. Sequential blood level monitoring of basiliximab during multisession plasmapheresis in a kidney transplant recipient. *Transplant Proc*. 2005 Mar;37(2):875-8
138. Nashan B, Moore R, Amlot P, Schmidt AG, Abeywickrama K, Souillou JP. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. *Lancet* 1997 Oct 25; 350 (9086): 1193–1198.
139. Thibault G, Paintaud G, Legendre C, Merville P, Coulon M, Chasseuil E, Ternant D, Rostaing L, Durrbach A, Di Giambattista F, Büchler M, Lebranchu Y. CD25 blockade in kidney transplant patients randomized to standard-dose or high-dose basiliximab with cyclosporine, or high-dose basiliximab in a calcineurin inhibitor-free regimen. *Transpl Int*. 2016 Feb;29(2):184-95.
140. Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, Navarro J, Palomo J, Fernandez-Yañez J, Ruiz M, Fernandez-Cruz E, Carbone J. Kinetics of functionally distinct T-lymphocyte subsets in heart transplant recipients after induction therapy with anti-CD25 monoclonal antibodies. *Transpl Immunol*. 2013 Jun;28(4):176-82.
141. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in FOXP3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1142-51.
142. Vondran FW, Timrott K, Tross J, Schwarz A, Lehner F, Klempnauer J, Becker T, Schwitzer R. Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation. *Transpl Int*. 2010 May 1;23(5): 514–523.
143. Wang Z, Shi BY, Qian YY, Cai M, Wang Q. Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Mar*;155(3):496-503.
144. Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro. *Am J Transplant*. 2005 Mar;5(3):454-64.

- 145.** Furukawa A, Wisel SA, Tang Q. Impact of Immune-Modulatory Drugs on Regulatory T Cell. *Transplantation*. 2016 Nov;100(11):2288-2300.
- 146.** Shan J, Guo Y, Luo L, Lu J, Li C, Zhang C, Huang Y, Feng L, Wu W, Long D, Li S, Li Y. Do CD4+ FOXP3+ Treg cells correlate with transplant outcomes: a systematic review on recipients of solid organ transplantation. *Cell Immunol*. 2011;270(1):5-12.
- 147.** San Segundo D, Galván-Espinoza LH, Rodrigo E, Irure J, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, Riesco L, Bada J, Belmar L, López-Hoyos M. Regulatory T-cell Number in Peripheral Blood at 1 Year Posttransplant as Predictor of Long-term Kidney Graft Survival. *Transplant Direct*. 2019 Feb 8;5(3)
- 148.** Svachova V, Sekerkova A, Hrubá P, Tycova I, Rodova M, Cecrdlova E, Slatinska J, Honsova E, Striz I, Viklicky O. Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection. *Transpl Int*. 2016 May;29(5):540-8.
- 149.** Todeschini M, Cortinovis M, Perico N, Poli F, Innocente A, Cavinato RA, Gotti E, Ruggenenti P, Gaspari F, Noris M, Remuzzi G, Casiraghi F. In kidney transplant patients, alemtuzumab but not basiliximab/low-dose rabbit anti-thymocyte globulin induces B cell depletion and regeneration, which associates with a high incidence of de novo donor-specific anti-HLA antibody development. *J Immunol*. 2013 Sep 1;191(5):2818-28.
- 150.** Amlot P.L. (1995) The Clinical and Experimental Use of Monoclonal Antibodies to the IL-2 Receptor. In: *Monoclonal Antibodies in Transplantation*. Medical Intelligence Unit. Springer, Berlin, Heidelberg.
- 151.** Neudoerfl C, Mueller BJ, Blume C, Daemen K, Stevanovic-Meyer M, Keil J, Lehner F, Haller H, Falk CS. The Peripheral NK Cell Repertoire after Kidney Transplantation is Modulated by Different Immunosuppressive Drugs. *Front Immunol*. 2013 Feb 28; 4:46.
- 152.** Van Gelder T, Baan CC, Balk AH, Knoop CJ, Holweg CT, van der Meer P, Mochtar B, Zondervan PE, Niesters HG, Weimar W. Blockade of the interleukin (IL)-2/IL-2 receptor pathway with a monoclonal anti-IL-2 receptor antibody (BT563) does not prevent the development of acute heart allograft rejection in humans. *Transplantation*. 1998 Feb 15;65(3):405-10.
- 153.** Van den Bosch TP, Kannegieter NM, Hesselink DA, Baan CC, Rowshani AT. Targeting the Monocyte-Macrophage Lineage in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2017 Feb 16;8:153.

VII. BIBLIOGRAFÍA

154. Zaza G, Leventhal J, Signorini L, Gambaro G, Cravedi P. Effects of Antirejection Drugs on Innate Immune Cells After Kidney Transplantation. *Front Immunol.* 2019 Dec 19; 10:2978.
155. Valitutti S, Carbone A, Castellino F, Maggiano N, Ricci R, Larocca LM, Musiani P. The expression of functional IL-2 receptor on activated macrophages depends on the stimulus applied. *Immunology.* 1989 May;67(1):44-50.
156. Miyawaki T, Suzuki T, Butler JL, Cooper MD. Interleukin-2 effects on human B cells activated in vivo. *J Clin Immunol.* 1987 Jul;7(4):277-87.
157. Lê thi Bich-Thuy, Fauci AS. Direct effect of interleukin 2 on the differentiation of human B cells which have not been preactivated in vitro. *Eur J Immunol.* 1985 Nov;15(11):1075-9.
158. Waldmann TA, Goldman CK, Robb RJ, Depper JM, Leonard WJ, Sharrow SO, Bongiovanni KF, Korsmeyer SJ, Greene WC. Expression of the interleukin 2 receptors on activated human B cells. *J Exp Med.* 1984 Nov 1;160(5):1450-66.
159. Beik AI, Bateman WJ, Morris AG, Higgins RM, Lam FT. Monitoring of T-lymphocyte subsets in acute renal allograft rejection. *Transplant Proc.* 1998 Feb;30(1):168-71.
160. Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, Fernández-Yáñez J, Palomo J, Pérez-Rojas J, Carbone J. The potential role of T-cell memory distribution as predisposing factor for rejection in heart transplant recipients. *Transplant Proc.* 2009 Jul-Aug;41(6):2480-4.
161. Van Gelder T, Warlé M, Ter Meulen RG. Anti-interleukin-2 receptor antibodies in transplantation: ¿what is the basis for choice? *Drugs.* 2004;64(16):1737-41.
162. Lin M, Ming A, Zhao M. Two-dose basiliximab compared with two doses daclizumab in renal transplantation: a clinical study. *Clin Transplant* 2006 May-Jun: 20(3): 325–29.
163. Kandus A, Arnol M, Omahen K, Oblak M, Vidan-Jeras B, Kmetec A, Bren AF. Basiliximab versus daclizumab combined with triple immunosuppression in deceased donor renal transplantation: a prospective, randomized study. *Transplantation.* 2010 Apr 27;89(8):1022-7.
164. Ochs HD, Fischer SH, Wedgwood RJ, Wara DW, Cowan MJ, Ammann AJ, Saxon A, Budson MD, Allred RU, Rousell RH. Comparison of high-dose and low-dose intravenous immunoglobulin therapy in patients with primary immunodeficiency diseases. *Am J Med.* 1984 Mar 30;76(3A):78-82.

- 165.** Paquin-Proulx D, Santos BA, Carvalho KI, Toledo-Barros M, Barreto de Oliveira AK, Kokron CM, Kalil J, Moll M, Kallas EG, Sandberg JK. IVIg immune reconstitution treatment alleviates the state of persistent immune activation and suppressed CD4 T cell counts in COVID. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10): e75199.
- 166.** Macey, M. G, Newland, A. C. CD4 and CD8 subpopulation changes during high dose intravenous immunoglobulin treatment. *Br J Haematol* 1990 Dec;76(4):513-20.
- 167.** Hou HQ, Miao J, Feng XD, Han M, Song XJ, Guo L. Changes in lymphocyte subsets in patients with Guillain-Barré syndrome treated with immunoglobulin. *BMC Neurol* 2014 Oct 15; 14:202-3.
- 168.** Hoetzenecker K , Hacker S, Hoetzenecker W, Sadeghi K, Sacht M, Pollreisz A, Mangold A, Wlisczak T, Bielek E, Muehlbacher F, Klepetko W, Ankersmit HJ. Cytomegalovirus hyperimmunoglobulin: mechanisms in allo-immune response in vitro. *Eur J Clin Invest*. 2007 Dec;37(12):978-86.
- 169.** Paquin-Proulx D, Sandberg JK. Persistent Immune Activation in COVID and the Role of IVIg in Its Suppression. *Front Immunol*. 2014 Dec 16;5: 637.doi: 10.3389/fimmu.2014.00637.
- 170.** Wakiguchi H, Hasegawa S, Suzuki Y, Kudo K, Ichiyama T. Relationship between T-cell HLA-DR expression and intravenous immunoglobulin treatment response in Kawasaki disease. *Pediatr Res*. 2015 Apr;77(4):536-40.
- 171.** Heidt S, Roelen DL, Eijsink C, Eikmans M, Claas FH, Mulder A. Intravenous immunoglobulin preparations have no direct effect on B cell proliferation and immunoglobulin production. *Clin Exp Immunol*. 2009 Oct;158(1):99-105.
- 172.** Quinti I, Mitrevski M. Modulatory Effects of Antibody Replacement Therapy to Innate and Adaptive Immune Cells. *Front Immunol*. 2017 Jun 16;8:697.
- 173.** Bayry J, Mouthon L, Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin expands regulatory T cells in autoimmune rheumatic disease. *J Rheumatol*. 2012 Feb;39(2):450-1.
- 174.** Tjon AS, Tha-In T, Metselaar HJ, van Gent R, van der Laan LJ, Groothuisink ZM, te Boekhorst PA, van Hagen PM, Kwekkeboom J. Patients treated with high-dose intravenous immunoglobulin show selective activation of regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2013 Aug;173(2):259-67.
- 175.** Cavaliere FM, Prezzo A, Conti V, Bilotta C, Pulvirenti F, Iacobini M, Quinti I. Intravenous immunoglobulin replacement induces an in vivo reduction of inflammatory monocytes

VII. BIBLIOGRAFÍA

and retains the monocyte ability to respond to bacterial stimulation in patients with common variable immunodeficiencies. *Int Immunopharmacol.* 2015 Sep;28(1):596-603.

176. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3536-42.
177. Tjon AS, Metselaar HJ, te Boekhorst PA, van Hagen PM, Kwekkeboom J. High-dose intravenous immunoglobulin does not reduce the numbers of circulating CD14(+) CD16(++) monocytes in patients with inflammatory disorders. *Clin Immunol.* 2012 Oct;145(1):11-2.
178. Van den Heuvel MJ, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2007 Nov;58(5):447-59.
179. Moraru M, Carbone J, Alecsandru D, Castillo-Rama M, García-Segovia A, Gil J, Alonso B, Aguarón A, Ramos-Medina R, Martínez de María J, Oliver-Miñarro D, Rodríguez-Mahou M, Ortega V, Caballero P, Meliá E, Vidal J, Cianchetta-Sivori M, Esteban C, Vargas-Henny L, Dale J, Ortiz-Quintana L, Fernández-Cruz E, Sánchez-Ramón S. Intravenous immunoglobulin treatment increased live birth rate in a Spanish cohort of women with recurrent reproductive failure and expanded CD56(+) cells. *Am J Reprod Immunol.* 2012 Jul;68(1):75-84.
180. Sarmiento E, Jaramillo M, Calahorra L, Fernandez-Yañez J, Gomez-Sanchez M, Crespo-Leiro MG, Paniagua M, Almenar L, Cebrian M, Rabago G, Levy B, Segovia J, Gomez-Bueno M, Lopez J, Mirabet S, Navarro J, Rodriguez-Molina JJ, Fernandez-Cruz E, Carbone J. Evaluation of humoral immunity profiles to identify heart recipients at risk for development of severe infections: A multicenter prospective study. *J Heart Lung Transplant.* 2017 May;36(5):529-539

VIII. ANEXOS



ANEXO 1

ESTUDIO OBSERVACIONAL DE DIFERENTES FENOTIPOS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T, B, NK EN PACIENTES TRASPLANTADOS QUE RECIBEN DIFERENTE PAUTA DE ADMINISTRACIÓN DE BAS: 1 DOSIS (1D) O 2 DOSIS (2D)

Tabla 1. Recuento leucocitario en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
Linfocitos pre	1464±636	-	1338±659	
Linfocitos 7d	775±588	0,001	532±359	0,002
Linfocitos 15d	861±795	0,002	600±403	0,003
Linfocitos 30d	1070±808	0,023	829±477	0,006
Linfocitos 60d	1345±730	0,738	1117±559	0,309
Linfocitos 90d	1506±818	0,726	1369±498	0,719
Linfocitos 180d	1568±704	0,242	1441±800	0,501
Neutrófilos pre	6877±5315	-	5618±2360	
Neutrófilos 7d	14133±9025	0,005	11155±5702	0,003
Neutrófilos 15d	11194±4695	0,018	9583±4868	0,020
Neutrófilos 30d	6369±3928	0,827	5376±2452	0,731
Neutrófilos 90d	5529±4049	0,185	4087±1921	0,045
Neutrófilos 180d	3726±1775	0,018	3906±1503	0,015
Monocitos pre	650±238	-	620±244	
Monocitos 7d	531±263	0,088	550±151	0,890
Monocitos 30d	695±237	0,618	630±375	0,220
Monocitos 90d	696±341	0,818	575±260	0,554

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** p<0,05 y *en cursiva* si existe tendencia

VIII. ANEXOS

Tabla 2. Valores TCD3+ en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%CD3 pre	67,39±13,06	-	71,63±11,69	-
%CD3 7d	56,49±20,32	0,005	61,40±10,80	<i>0,074</i>
%CD3 15d	56,79±16,34	0,002	62,99±8,76	<i>0,092</i>
%CD3 30d	64,16±15,59	0,436	65,35±14,35	0,163
%CD3 60d	70,54±12,88	0,555	70,47±6,48	0,886
%CD3 90d	71,22±11,95	0,239	74,88±10,71	0,492
%CD3 180d	73,51±11,11	0,042	71,36±15,69	0,753
CD3 pre	996±515	-	828±287	-
CD3 7d	494±373	0,000	290±183	0,000
CD3 15d	535±460	0,000	363±178	0,000
CD3 30d	703±581	0,126	559±339	0,016
CD3 60d	955±583	0,674	770±381	0,718
CD3 90d	1129±619	<i>0,068</i>	1026±455	<i>0,097</i>
CD3 180d	1164±637	0,042	1115±677	0,326

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y en *cursiva* si existe tendencia

Tabla 3. Valores LB en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	P 1D	2D	P 2D
%LB pre	9,83±5,94	-	6,34±4,89	-
%LB 7d	18,91±9,30	0,000	12,36±7,11	0,000
%LB 15d	16,30±8,88	0,000	16,23±13,15	0,025
%LB 30d	13,30±7,92	0,003	13,15±10,96	0,005
%LB 60d	10,48±5,66	0,194	9,51±9,77	0,160
%LB 90d	8,72±5,97	0,057	8,18±7,41	0,152
%LB 180d	5,83±4,16	0,001	5,09±5,85	0,145
LB pre	139±110	-	66,92±68,96	-
LB 7d	186±230	0,748	66,92±68,96	0,999
LB 15d	175±191	0,338	88,10±86,87	0,703
LB 30d	163±191	0,738	98,54±71,95	<i>0,076</i>
LB 60d	152±155	0,209	88,65±81,25	0,983
LB 90d	138±134	0,599	81,92±76,56	0,117
LB 180d	103±107	0,136	64,47±51,14	0,162

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y en *cursiva* si existe tendencia

VIII. ANEXOS

Tabla 4. Células NK en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%NK pre	8,74±5,43	-	9,19±8,00	-
%NK 7d	4,60±3,72	0,019	6,58±4,10	0,123
%NK 15d	5,55±4,63	0,134	7,58±5,02	0,169
%NK 30d	6,03±6,36	<i>0,067</i>	8,18±5,21	0,147
%NK 60d	7,04±4,74	0,281	7,85±4,98	0,531
%NK 90d	7,80±7,15	0,507	9,29±5,12	0,769
%NK 180d	9,04±5,33	<i>0,900</i>	12,24±5,46	0,392
NK pre	133±120	-	125±168	-
NK 7d	38,08±39,20	0,001	36,23±34,68	<i>0,066</i>
NK 15d	42,16±39,75	0,003	45,85±38,22	0,113
NK 30d	47,05±35,66	0,001	56,62±30,47	0,124
NK 60d	82,65±63,81	0,163	112±106,25	0,849
NK 90d	104,12±95,9	0,686	111±70,10	0,851
NK 180d	131,61±81,5	0,687	228,47±163	0,479

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y *en cursiva* si existe tendencia

Tabla 5. Valores TCD4+ tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%CD4 pre	45,84±11,40	-	48,00±11,98	-
%CD4 7d	39,40±14,59	0,008	41,31±12,69	0,105
%CD4 15d	39,88±12,25	0,002	44,16±11,86	0,111
%CD4 30d	44,10±14,01	0,471	45,86±10,41	0,502
%CD4 60d	43,52±15,12	0,262	50,69±8,95	0,316
%CD4 90d	46,20±12,35	0,215	51,73±9,19	0,140
%CD4 180d	43,73±10,53	0,356	47,17±11,85	0,275
CD4 pre	686±359	-	585±232	-
CD4 7d	322±267	0,000	199±130	0,000
CD4 15d	321±169	0,000	266±169	0,000
CD4 30d	494±413	0,024	423±272	0,042
CD4 60d	654±412	0,960	562±337	0,930
CD4 90d	708±455	0,701	707±312	0,016
CD4 180d	686±386	0,888	634±337	0,449

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y *en cursiva* si existe tendencia

VIII. ANEXOS

Tabla 6. Expresión de CD25+ en TCD4+ en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%CD4CD25 pre	53,59±18,65	-	52,75±17,04	-
%CD4CD25 7d	20,86±21,74	0,000	16,92±23,88	0,001
%CD4CD25 15d	31,55±25,03	0,000	13,28±16,08	0,000
%CD4CD25 30d	50,73±25,62	0,236	37,05±29,10	0,948
%CD4CD25 60d	58,34±21,21	0,683	48,21±27,24	0,790
%CD4CD25 90d	59,30±20,05	0,372	50,79±22,97	0,173
%CD4CD25 180d	58,90±18,55	0,522	57,16±19,34	<i>0,070</i>
CD4CD25 pre	362±228	-	297±211	-
CD4CD25 7d	64±138	0,001	28±49	0,000
CD4CD25 15d	109±149	0,001	41±64	0,000
CD4CD25 30d	236±261	<i>0,085</i>	140±152	0,014
CD4CD25 60d	362±228	0,710	276±252	0,628
CD4CD25 90d	406±297	0,179	335±264	0,352
CD4CD25 180d	411±267	0,793	395±291	0,011

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: negrita $p < 0,05$ y en cursiva si existe tendencia

Tabla 7. Cuantificación de Treg en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%Treg pre	5,55±2,38	-	5,21±3,04	-
%Treg 7d	4,47±3,46	0,495	2,84±2,73	0,133
%Treg 15d	5,38±5,19	0,791	3,06±2,75	0,042
%Treg 30d	5,90±3,73	0,234	3,03±2,59	0,013
%Treg 60d	5,36±3,20	0,506	3,95±1,58	<i>0,066</i>
%Treg 90d	5,23±2,01	0,758	4,73±1,90	0,637
%Treg 180d	4,50±2,05	<i>0,071</i>	4,72±2,11	0,933
Treg pre	35,01±28,16	-	31,56±26,02	-
Treg 7d	11,05±13,79	0,000	6,19±6,39	0,033
Treg 15d	15,99±24,13	0,001	7,86±9,55	0,003
Treg 30d	24,33±29,45	0,123	13,74±16,62	0,020
Treg 60d	28,99±23,39	0,506	20,97±16,27	<i>0,066</i>
Treg 90d	35,16±30,66	0,758	31,06±14,83	0,637
Treg 180d	31,29±20,98	0,157	27,95±16,53	0,933

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y *en cursiva* si existe tendencia

VIII. ANEXOS

Tabla 8. Valores TCD8+ en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
% CD8 pre	18,62±9,60	-	17,02±4,17	-
%CD8 7d	16,13±8,08	0,046	13,02±7,35	0,167
%CD8 15d	16,35±8,57	0,253	17,03±8,22	0,956
%CD8 30d	18,07±8,62	0,740	16,29±6,71	0,485
%CD8 60d	19,70±6,89	0,953	20,14±7,58	<i>0,067</i>
%CD8 90d	22,73±7,75	0,041	20,14±7,12	0,031
%CD8180d	25,04±9,60	0,006	25,40±10,02	0,002
CD8 pre	279±179	-	208±89	-
CD8 7d	139±109	0,000	70±64	0,000
CD8 15d	138±135	0,002	124±118	0,004
CD8 30d	200±184	0,164	133±79	0,015
CD8 60d	269±152	0,646	219±144	0,522
CD8 90d	364±218	0,034	274±147	0,520
CD8 180d	411±252	0,013	463±421	0,007

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y *en cursiva* si existe tendencia

Tabla 9. Expresión de CD25+ en TCD8+ en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%CD8CD25 pre	30,75±27,11	-	23,30±25,93	-
%CD8CD25 7d	11,81±17,59	0,016	5,28±9,87	0,023
%CD8CD25 15d	9,70±9,81	0,002	5,42±6,98	0,049
%CD8CD25 30d	21,45±22,45	0,306	18,97±20,03	0,530
%CD8CD25 60d	24,07±24,44	0,544	29,28±31,09	0,513
%CD8CD25 90d	25,91±25,44	0,876	25,57±28,55	0,887
%CD8CD25 180d	23,54±22,64	0,172	20,24±23,89	0,864
CD8CD25 pre	368±380	-	267±279	-
CD8CD25 7d	55,20±76,52	0,007	16,10±17,34	0,004
CD8CD25 15d	104±185	0,008	36,66±46,00	<i>0,065</i>
CD8CD25 30d	286±420	0,373	158±170	0,143
CD8CD25 60d	346±412	0,785	373±545	0,283
CD8CD25 90d	385±371	0,172	385±493	0,435
CD8CD25 180d	331±352	<i>0,056</i>	305±546	0,335

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y *en cursiva* si existe tendencia

VIII. ANEXOS

Tabla 10. Coexpresión de activación (HLA-DR, CD38) en TCD8+ en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%CD8DR38 pre	17,76±13,85	-	22,71±21,55	-
%CD8DR38 7d	16,33±13,58	0,630	19,82±16,12	0,889
%CD8DR38 30d	21,15±19,13	0,488	26,83±17,82	0,664
%CD8DR38 90d	19,39±17,34	0,659	23,17±13,24	0,202
CD8CD38 pre	51,29±51,52	-	28,82±21,55	-
CD8DR38 7d	23,86±24,21	0,013	16,70±20,32	0,015
CD8DR38 30d	32,62±33,59	0,152	44,46±36,73	0,046
CD8DR38 90d	87,75±128,71	0,156	62,66±46,61	0,735

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: negrita $p < 0,05$ y en cursiva si existe tendencia

Tabla 11. Expresión de activación (HLA-DR, CD38) en TCD8+ en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%CD8DR pre	34,09±18,18	-	38,35±24,42	-
%CD8DR 7d	32,18±22,35	0,396	35,56±26,59	0,639
%CD8DR 30d	42,61±27,12	0,213	42,50±20,88	0,894
%CD8DR 90d	41,46±19,82	0,201	40,19±22,21	0,884
CD8DR pre	92,01±78,11	-	102,56±86,05	-
CD8DR 7d	43,24±44,39	0,003	26,87±26,86	0,015
CD8DR 30d	68,13±67,88	0,695	53,54±36,48	0,046
CD8DR 90d	151,58±126,7	0,124	100,06±64,73	0,735
%CD8CD38 pre	35,76±26,07	-	44,23±24,60	-
%CD8CD38 7d	33,54±26,57	0,756	39,57±26,57	0,879
%CD8CD38 30d	37,62±26,31	0,882	49,05±26,31	0,761
%CD8CD38 90d	31,53±16,69	0,333	34,77±16,69	0,154
CD8CD38 7d	54,06±59,59	0,085	28,46±31,27	0,066
CD8CD38 30d	54,64±71,11	0,388	60,80±43,20	0,173
CD8CD38 90d	102,84±104,2	0,311	91,77±54,85	0,398

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: negrita $p < 0,05$ y en cursiva si existe tendencia

Tabla 12. Expresión madurativa de LB en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
% CD19 naive pre	49,28±27,03	-	53,74±23,64	-
% CD19 naive 7d	56,41±25,29	0,120	55,57±18,07	0,389
%CD19 mem pre	37,98±24,96	-	38,67±19,91	-
%CD19 mem 7d	33,88±20,74	0,144	36,64±16,44	0,305
%CD19 mem SCI pre	40,78±23,78	-	34,64±20,90	-
%CD19 mem SCI 7d	56,18±22,82	0,262	43,52±18,67	0,192
%CD19 mem CCI pre	40,34±19,12	-	50,49±14,69	-
%CD19 mem CCI 7d	35,95±11,73	0,110	44,59±13,30	0,563
CD19 naive pre	58,00±55,03	-	52,29±70,60	-
CD19 naive 7d	57,00±82,38	0,532	54,18±52,48	0,249
CD19 mem pre	48,86±44,61	-	22,32±18,23	-
CD19 mem 7d	52,73±62,51	0,172	33,87±29,02	0,156
CD19 mem SCI pre	23,70±41,97	-	4,83±4,96	-
CD19 mem SCI 7d	13,73±15,79	0,607	9,07±11,29	0,315
CD19 mem CCI pre	21,00±23,55	-	8,40±7,14	-
CD19 mem CCI 7d	19,84±24,45	0,240	16,73±16,34	0,270

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y en *cursiva* si existe tendencia

VIII. ANEXOS

Tabla 13. Expresión de activación (HLA-DR; CD38) en monocitos en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
%CD14DR38 pre	96,55±5,05	-	93,16±9,47	-
%CD14DR38 7d	93,68±7,12	0,344	90,80±14,42	0,646
%CD14DR38 30d	92,80±8,49	0,211	85,83±16,32	0,345
%CD14DR38 90d	90,52±19,61	0,485	87,75±18,08	0,893
CD14DR38 pre	587± 160	-	536±183	-
CD14DR38 7d	556± 246	0,172	529±133	0,717
CD14DR38 30d	549±254	0,622	411±230	0,550
CD14DR38 90d	685±383	0,628	547±309	0,475
%CD14DR pre	98,49±1,55	-	93,86±9,40	-
%CD14DR 7d	95,39±5,75	0,332	92,45±12,37	0,123
%CD14DR 30d	94,22±8,40	0,078	86,77±16,37	0,207
%CD14DR 90d	95,60±5,09	0,109	95,35±5,90	0,684
CD14 pre	629±123	-	546±188	-
CD14DR 7d	565±172	0,908	514±108	0,502
CD14DR 30d	589±182	0,216	451±256	0,112
CD14DR 90d	694±547	0,634	547±257	0,478

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y *en cursiva* si existe tendencia

Tabla 14. Niveles de inmunoglobulinas en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
IgG pre	1193±490	-	1078±450	-
IgG 7d	633±203	0,000	568±219	0,000
IgG 15d	638±231	0,000	601±206	0,000
IgG 30d	700±236	0,000	607±226	0,000
IgG 90d	808±416	0,000	819±332	0,037
IgG 180d	779±363	0,002	735±245	0,014
Ig A pre	293±138	-	324±146	-
IgA 7d	152±55	0,000	183±85	0,000
IgA 15d	171±98	0,000	201±80	0,000
IgA 30d	172±82	0,000	208±98	0,000
IgA 90d	162±81	0,002	136±74	0,000
IgA 180d	160±90	0,000	159±74	0,002
IgM pre	121±55	-	324±146	-
IgM 7d	90±50	0,004	71±62	0,115
IgM 15d	94±55	0,042	93±50	0,187
IgM 30d	88±47	0,000	61±36	0,023
IgM 90d	85±56	0,028	64±40	0,445
IgM 180d	79±37	0,000	65±39	0,047

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: negrita $p < 0,05$ y en cursiva si existe tendencia

VIII. ANEXOS

Tabla 15. Niveles séricos de componentes del complemento y PCR en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
C3 pre	109±21	-	115±34	-
C3 7d	84±28	0,000	72±25	0,001
C3 15d	87±24	0,000	85±39	<i>0,055</i>
C3 30d	102±28	0,231	94±31	<i>0,068</i>
C3 90d	94±24	0,022	94±23	0,235
C3 180d	99±21	<i>0,082</i>	87±17	0,007
C4 pre	21±7	-	22±7	-
C4 7d	19±9	0,031	15±4	0,008
C4 15d	20±7	0,102	19±7	0,251
C4 30d	24±8	0,187	21±5	0,667
C4 90d	21±6	0,817	20±8	0,634
C4 180d	20±6	0,468	19±5	0,048
PCR pre	3,08±3,17	-	2,70±4,08	-
PCR 7d	4,07±5,92	0,879	5,01±8,33	0,387
PCR 15d	4,07±5,92	0,107	5,01±8,33	0,459
PCR 30d	4,07±5,92	0,926	5,01±8,33	0,343
PCR 90d	4,07±5,92	<i>0,091</i>	5,01±8,33	0,121
PCR 180d	4,07±5,92	<i>0,094</i>	5,01±8,33	<i>0,093</i>

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y en *cursiva* si existe tendencia

Tabla 16. Monitorización bioquímica en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
Proteínas pre	6,6±0,9	-	6,8±0,8	-
Proteínas 7d	5,4±0,7	0,000	5,2±0,7	0,000
Proteínas 15d	5,5±0,6	0,000	5,3±0,4	0,000
Proteínas 30d	5,8±0,7	0,002	5,3±0,7	0,000
Proteínas 90d	6,3±0,6	0,012	6,0±0,4	0,001
Proteínas 180d	6,4±0,5	0,346	6,4±0,5	0,208
Albúmina pre	3,5±0,8	-	3,7±0,8	-
Albúmina 7d	6,6±0,9	0,083	2,9±0,6	0,157
Albúmina 15d	3,2±0,4	0,022	2,9±0,4	0,042
Albúmina 30d	3,4±0,6	0,197	3,0±0,4	0,130
Albúmina 90d	4,0±0,5	0,647	3,7±0,2	0,617
Albúmina 180d	4,1±0,2	0,299	4,3±0,0	0,410
Urea pre	51±21	-	69±38	-
Urea 7d	88±46	0,001	136±116	0,028
Urea 15d	93±63	0,004	98±56	0,089
Urea 30d	83±59	0,018	63±30	0,907
Urea 90d	66±40	0,099	62±29	0,173
Urea 180d	59±33	0,141	66±19	0,056
Creatinina pre	0,9±0,4	-	1,21±0,41	-
Creatinina 7d	1±0,5	0,327	1,6±1,2	0,243
Creatinina 15d	0,9±0,4	0,364	1,4±1,0	0,963
Creatinina 30d	0,9±0,5	0,540	0,9±0,4	0,024
Creatinina 90d	1±0,4	0,035	1,1±0,4	0,339
Creatinina 180d	1±0,5	0,004	1,3±0,39	0,300

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas: negrita $p < 0,05$ y en cursiva si existe tendencia

VIII. ANEXOS

Tabla 17. Monitorización del nivel de inmunosupresión en TC tras inducción (1D; 2D) con BAS

Variable	1D	p 1D	2D	p 2D
Tacrolimus 7d	6,0±4,2	-	3,5±3,4	-
Tacrolimus 15d	7,8±3,4	0,143	8,3±3,4	0,009
Tacrolimus 30d	10,1±2,9	0,000	9,1±4,1	0,002
Tacrolimus 90d	9,6±2,5	0,002	9,6±2,6	0,000
Tacrolimus 180d	9,2±3,4	0,003	9,2±3,4	0,000
Micofenolato 7d	1,23±0,87	-	1,09±0,44	-
Micofenolato 15d	1,51±0,93	0,279	1,26±1,04	0,425
Micofenolato 30d	1,64±1,24	0,084	1,19±0,67	0,498
Micofenolato 90d	2,28±1,21	0,149	1,92±1,21	0,082
Micofenolato 180d	2,42±1,23	0,015	2,39±1,23	0,013

Los datos se expresan como media ±desviación típica. Diferencia de media en relación al valor basal (punto de estudio 7d), utilizando t para muestras relacionadas: **negrita** $p < 0,05$ y en *cursiva* si existe tendencia

Tabla 18. Tiempo de supresión completa y recuperación del valor basal (días) en TC que desarrollaron rechazo 2R

Paciente	Inducción	Días supresión <3%CD25+	Días reconstitución CD25+
1	2D	30 días	60 días
2	1D	No supresión	7 días
3	1D	No supresión	60 días
4	1D	No supresión	7 días
5	2D	7 días	15 días
6	1D	No supresión	30 días

Tabla 19. Cuantificación del nivel de fármacos inmunosupresores, células Treg y anticuerpos citotóxicos en TC que desarrollaron rechazo 2R

Paciente	Células Treg	Niveles Fármacos Previos al rechazo	Citotóxicos	Fecha rechazo	GGIV
1	-Pre: 5% 36,52 cel/ul -6m: 4,07% 27,69 cel/ul	-Fecha: 04/02/15 Tacrolimus: 7,7 Micofenolato: <0,20	Pre: negativos De Novo: negativos	6m 04/02/15	No
2	-Pre: 5,2% 34,54 cel/ul -4m: 5,79% 30,98 cel/ul	-Fecha: 25/09/15 Everolimus: 4,10 Micofenolato: 2,40 Mutación Tacrolimus CYP 3A5	Pre: negativos De Novo negativos	4m 25/09/15	SI
3	-Pre: 5% 31,19 cel/ul -15 días: 4,08% 6,31 cel/ul	-Fecha: 21/08/15 Tacrolimus: 12,70 Micofenolato: 0,70	Pre: negativos De Novo: negativos	25 días 24/08/15	No
4	-Pre: 4,19% 28,81 cel/ul -1m: 6,84% 46,24 cel/ul -2m (no datos)	-Fecha: 25/01/16 Tacrolimus: 11,70 Micofenolato: 1,90	Pre: negativos De Novo: negativos	2 meses y medio 08/02/2016	SI
5	-Pre: 10,14% 53,78 cel/ul -5m: 6,35% 44,27 cel/ul	-Fecha: 2/11/16 Tacrolimus: 10,40 Micofenolato: 1,80	Pre: negativos De Novo: positivos	5m 21/11/2016	SI
6	-Pre: 7,69% 102,49 cel/ul -3m: 5,42% 44,23 cel/ul	-Fecha: 09/09/2015 Tacrolimus: 7,40 Micofenolato: 1,20	Pre: negativos De Novo negativos	240 días (6m y medio)	No

La administración de GGIV fue previa al episodio de rechazo en todos los pacientes que recibieron dicho tratamiento

ANEXO 2.

EFFECTO DE LA INFUSIÓN DE GGIV COMERCIALES EN DIFERENTES SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

Tabla 1. Efecto GGIV en linfocitos TCD3+

	Tiempo			Tiempo		
	%CD3_t1	%CD3_t2	%CD3_t3	CD3_t1	CD3_t2	CD3_t3
Alta dosis	71,33 (52-81)	57,53 (51-69)	65,95 (58-79)	872 (667-2559)	621 (563- 2035)	943 (578-2170)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,080	0,893	0,225	0,300	0,225	0,500
Anti-CMV	70,91 (66-76)	64,70 (49-79)	66,38 (56-87)	882 (622-1253)	647 (472-1185)	1341 (463-2287)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,225	0,893	0,345	0,415	0,397	0,260

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 2. Efecto GGIV en linfocitos TCD4+

	Tiempo			Tiempo		
	%CD4_t1	%CD4_t2	%CD4_t3	CD4_t1	CD4_t2	CD4_t3
Alta dosis	42,64 (32-61)	44,29 (31-58)	50,11 (30-68)	471 (250-1805)	460 (245-1271)	398 (279-1989)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,225	0,500	0,225	0,225	0,345	0,225
Anti-CMV	53,50 (37-54)	37,94 (31-56)	43,03 (36-50)	544 (356-968)	385 (299-860)	735 (270-1386)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,261	0,681	0,148	0,225	0,453	0,223

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

VIII. ANEXOS

Tabla 3. Efecto GGIV en linfocitos TCD8+

	Tiempo			Tiempo		
	%CD8_t1	%CD8_t2	%CD8_t3	CD8_t1	CD8_t2	CD8_t3
Alta dosis	22,99 (19-31)	20,62 (14-22)	25,85 (16-37)	264 (225-719)	211 (154-472)	310 (196-664)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,043	0,686	0,225	0,080	0,686	0,080
Anti-CMV	14,10 (7-25)	7,70 (6-26)	12,52 (8-31)	225 (83-257)	77 (73-276)	195 (120-246)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,500	0,715	0,716	0,893	0,465	0,999

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 4. Efecto GGIV en células NK

	Tiempo			Tiempo		
	%NK_t1	%NK_t2	%NK_t3	NK_t1	NK_t2	NK_t3
Alta dosis	11,87 (9-17)	12,31 (6-16)	9,81 (9-17)	136 (69-328)	157 (66-273)	117 (81-143)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,686	0,893	0,897	0,357	0,223	0,258
Anti-CMV	9,37 (3-15)	7,30 (6-16)	6,37 (6-15)	108 (30-131)	102 (64-110)	101 (36-296)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,593	0,999	0,593	0,593	0,593	0,999

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 5. Efecto GGIV en LB

	Tiempo			Tiempo		
	%LB_t1	%LB_t2	%LB_t3	LB_t1	LB_t2	LB_t3
Alta dosis	2,70 (1-6)	2,03 (1-6)	1,97 (1-6)	36,45 (9-66)	34,51 (12-54)	25,61 (12-48)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,686	0,569	0,897	0,357	0,223	0,258
Anti-CMV	8,13 (3-19)	5,48 (3-17)	2,53 (2-13)	127 (25-278)	87 (23-247)	64 (20-323)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,144	0,068	0,145	0,144	0,999	0,715

Los pacientes presentaron % y absolutos bajos debido a que fueron tratados previamente con rituximab. Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 6. Efecto GGIV en células NKT

	Tiempo			Tiempo		
	%NKT_t1	%NKT_t2	%NKT_t3	NKT_t1	NKT_t2	NKT_t3
Alta dosis	3,34 (1-7)	3,17 (1-6)	3,16 (1-8)	37,30 (10-126)	28,48 (9-88)	20,33 (7-96)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,042	0,893	0,345	0,080	0,715	0,465
Anti-CMV	1,01 (0,5-6)	2,51 (1-8)	1,20 (1-6)	14,14 (4-35)	35,14 (7-36)	28,14 (6-30)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,109	0,593	0,109	0,109	0,676	0,182

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 7. Efecto GGIV en la activación de linfocitos TCD8+

CD8	Tiempo			Tiempo		
	%DR38_t1	%DR38_t2	%DR38_t3	DR38_t1	DR38_t2	DR38_t3
Alta dosis	26,31 (11-27)	21,83 (12-24)	13,06 (9-19)	73,83 (29-87)	36,21 (17-69)	46,41 (16-71)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,221	0,080	0,068	0,345	0,138	0,893
Anti-CMV	18,90 (8-23)	17,90 (2-18)	10,05 (3-13)	41,15 (8-53)	13 (6-43)	25 (2-25)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,285	0,090	0,180	0,285	0,345	0,593

Los valores se expresan en % y valores absolutos mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 8. Efecto GGIV en monocitos CD14+

	Tiempo			Tiempo		
	%CD14_t1	%CD14_t2	%CD14_t3	CD14_t1	CD14_t2	CD14_t3
Alta dosis	5,60 (3-10)	2,75 (2-5)	3,73 (3-8)	700 (400-900)	500 (300-700)	600 (350-850)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,043	0,043	0,043	0,102	0,414	0,102
Anti-CMV	3 (2-9)	5 (3-6)	6 (1-9)	400 (300-600)	300 (250-450)	400 (300-600)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,102	0,496	0,221	0,893	0,786	0,786

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 9. Efecto GGIV en la activación de CD14+

CD14	Tiempo			Tiempo		
	%DR38_t1	%DR38_t2	%DR38_t3	DR38_t1	DR38_t2	DR38_t3
Alta dosis	98,44 (96-99)	95,70 (94-98)	97,19 (95-99)	695 (395-868)	492 (284-669)	570 (344-826)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,225	0,500	0,345	0,043	0,345	0,043
Anti-CMV	98,90 (97-99)	97,70 (95-99)	93,60 (89-97)	399 (294-593)	298 (294-593)	346,52 (235-759)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,345	0,043	0,043	0,138	0,686	0,225

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 10. Expresión de CD25 en linfocitos TCD4+ tras tratamiento con GGIV

CD4	Tiempo			Tiempo		
	%CD25_t1	%CD25_t2	%CD25_t3	CD25_t1	CD25_t2	CD25_t3
Alta dosis	45,16 (31-55)	42,94 (31-51)	42,13 (36-59)	202 (119-912)	165 (93-674)	168 (121-1053)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,500	0,080	0,080	0,225	0,345	0,375
Anti-CMV	44,10 (19-74)	43,60 (17-73)	59,01 (35-64)	229 (100-590)	182 (56-589)	359 (125-629)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,345	0,893	0,650	0,345	0,465	0,359

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 11. Expresión de CD25+ en linfocitos TCD8+ tras tratamiento con GGIV

CD8	Tiempo			Tiempo		
	%CD25_t1	%CD25_t2	%CD25_t3	CD25_t1	CD25_t2	CD25_t3
Alta dosis	5,25 (3-15)	6,47 (3-17)	7,00 (3-17)	45 (7-51)	23 (5-45)	31 (12-49)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,225	0,138	0,345	0,138	0,500	0,345
Anti-CMV	5,77 (3-52)	5,69 (2-37)	7,89 (2-52)	13,59 (2-136)	14,75 (1-84)	14,28 (2-130)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,138	0,465	0,350	0,138	0,465	0,350

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 12. Efecto GGIV en células Treg

	Tiempo			Tiempo		
	%Treg_t1	%Treg_t2	%Treg_t3	Treg_t1	Treg_t2	Treg_t3
Alta dosis	9,80 (7-13)	9,13 (7-15)	9,66 (7-15)	46 (23-148)	62 (29-122)	39 (22-181)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,715	0,686	0,273	0,144	0,893	0,465
Anti-CMV	2,90 (1-8)	3,60 (1-7)	6,80 (3-7)	27,47 (6-45)	19,12 (3-39)	32 (18-66)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,893	0,465	0,893	0,345	0,715	0,273

Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 13. Efecto de GGIV en linfocitos B naive

	Tiempo			Tiempo		
	%Naive_t1	%Naive_t2	%Naive_t3	Naive_t1	Naive_t2	Naive_t3
Alta dosis	65,98 (59-85)	67,25 (61-89)	57,12 (39-89)	24,09 (11-67)	21,11 (10-57)	13,95 (8-53)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,114	0,465	0,315	0,100	0,144	0,273
Anti-CMV	82,72 (78-90)	86,40 (86-89)	91,87 (88-92)	38,19 (13-145)	79,51(16- 159)	62,75 (10-209)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,593	0,285	0,109	0,598	0,285	0,550

El porcentaje de la correspondiente población esta referido a CD19+. Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 14. Efecto GGIV en linfocitos B de memoria

	Tiempo			Tiempo		
	%Mem_t1	%Mem_t2	%Mem_t3	Mem_t1	Mem_t2	Mem_t3
Alta dosis	22,85 (7-33)	21,43 (6-32)	36,67 (10-51)	7,50 (2-12)	5,38 (1-11)	7,98 (3-13)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,068	0,465	0,312	0,068	0,715	0,465
Anti-CMV	10,30 (7-14)	12,11 (10-14)	11,11 (5-11)	3,32 (1-41)	5,11 (1-25)	3,49 (1-45)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,655	0,285	0,658	0,984	0,286	0,648

El porcentaje de la correspondiente población está referido a CD19+. Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

VIII. ANEXOS

Tabla 15. Efecto GGIV en linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo

	Tiempo			Tiempo		
	%mSCI_t1	%mSCI_t2	%mSCI_t3	mSCI_t1	mSCI_t2	mSCI_t3
Alta dosis	27,41 (15-37)	31,71 (19-41)	38,10 (19-59)	1,91 (1-4)	1,34 (1-3)	1,87 (1-5)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,854	0,385	0,109	0,144	0,923	0,285
Anti-CMV	24,39 (17-35)	32,69 (29-36)	32,14 (30-32)	0,81 (1-7)	2,04 (1-8)	1,27 (1-15)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,198	0,168	0,917	0,220	0,489	0,547

El porcentaje de la correspondiente población esta referido a CD19+CD27+. Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

Tabla 16. Efecto GGIV en linfocitos B memoria con cambio de isotipo

	Tiempo			Tiempo		
	%mCCI_1	%mCCI_2	%mCCI_3	mCCI_1	mCCI_2	mCCI_3
Alta dosis	47,45 (18-56)	38,04 (22-64)	49,31 (14-60)	3,27 (1-6)	2,62 (1-6)	1,36 (0,5-5)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,068	0,715	0,465	0,068	0,273	0,715
Anti-CMV	46,22 (25-54)	36,35 (31-60)	43,53 (31-46)	1,78 (0,5-19)	3,54 (1-11)	1,52 (0,5-22)
P ^x ; P ^{xx} ; P ^{xxx}	0,593	0,285	1,00	0,655	0,180	0,655

El porcentaje de la correspondiente población esta referido a CD19+CD27+. Los valores se expresan en % y valores absolutos como mediana (IQR). P^x: prueba T de Wilcoxon t1_t2; P^{xx}: prueba T de Wilcoxon t1_t3; P^{xxx}: prueba T de Wilcoxon t2_t3

ANEXO 3.

EFFECTO GGIV EN PACIENTES TRASPLANTADOS CARDIACOS

Tabla 1. Alteraciones recuento leucocitario tras administración de GGIV en TC

	GGIV+ (Caso)			GGIV- (Control)			p 1_1	p 2_2
	Pre (1)	Post (2)	p	Pre (1)	Post (2)	p		
Linfocitos (cel/ μ l)	1292 \pm 558	1140 \pm 522	0,338	1355 \pm 649	1455 \pm 731	0,918	0,714	0,089
Neutrófilos (cel/ μ l)	7409 \pm 6200	6419 \pm 1360	0,584	5621 \pm 652	4792 \pm 500	0,086	0,228	0,196
% monocitos	4,18 \pm 2,28	3,47 \pm 1,62	0,405	4,00 \pm 2,14	4,88 \pm 2,11	0,914	0,814	0,058
Monocitos (cel/ μ l)	666 \pm 179	589 \pm 279	0,375	650 \pm 285	616 \pm 309	0,816	0,848	0,785
% TCD3+	69 \pm 12	68 \pm 17	0,909	68,42 \pm 12,08	73 \pm 10	0,283	0,929	0,202
TCD3+	907 \pm 398	806 \pm 481	0,489	957 \pm 510	1103 \pm 602	0,122	0,723	0,070
% TCD4+	46 \pm 11	46 \pm 16	0,405	47 \pm 12	45 \pm 10	0,254	0,958	0,946
TCD4+	618 \pm 305	564 \pm 321	0,810	666 \pm 360	677 \pm 436	0,929	0,617	0,336
% TCD8+	16,26 \pm 7,48	16,65 \pm 8,99	0,991	18,23 \pm 8,59	22,42 \pm 6,38	0,005	0,499	0,014
TCD8	206 \pm 127	221 \pm 142	0,180	282 \pm 186	355 \pm 189	0,030	0,133	0,011
% LB	9,28 \pm 5,95	9,86 \pm 10,97	0,991	8,10 \pm 5,88	9,58 \pm 7,24	0,766	0,644	0,919
LB	130 \pm 114	116 \pm 130	0,424	132 \pm 134	165 \pm 237	0,396	0,965	0,421
% NK	6,13 \pm 3,48	4,61 \pm 2,84	0,353	10,92 \pm 7,43	8,28 \pm 6,40	0,243	0,053	0,979
NK	76 \pm 57	69 \pm 70	0,963	179 \pm 175	120 \pm 103	0,868	0,017	0,067
% NKT	2,31 \pm 2,61	2,58 \pm 2,39	0,152	3,93 \pm 4,32	6,46 \pm 7,56	0,099	0,209	0,059
NKT	34 \pm 54	35 \pm 40	0,747	58 \pm 71	74 \pm 103	0,917	0,293	0,148

Se indica la diferencia de media en el punto de estudio post (2) en relación al valor basal (1), utilizando la prueba t para muestras relacionadas (p) y muestras no relacionadas (p 1_1 y p 2_2)

VIII. ANEXOS

Tabla 2. Cambios en la activación en linfocitos TCD8+ y monocitos CD14+ en TC tras administración de GGIV

	GGIV+=caso			GGIV-=control			p 1_1	p 2_2
	Pre (1)	Post (2)	p	Pre (1)	Post (2)	p		
%CD8DR38	24,93±16,84	20,31±15,62	0,169	20,90±18,42	15,55±11,21	0,447	0,503	0,358
CD8DR38	59,50±54,17	51,95±55,43	0,314	69,75±81,74	41,61±23,95	0,237	0,675	0,532
%CD8DR	41,84±23,05	29,06±14,73	0,489	35,38±23,82	39,10±19,56	0,723	0,420	0,141
CD8DR	93,15±87,85	70,30±66,53	0,401	118±97	97,14±48,25	0,899	0,463	0,265
%CD8CD38	40,25±22,82	29,90±14,73	0,375	36,76±27,01	23,84±13,98	0,865	0,682	0,285
CD8CD38	89,40±65,19	71,57±70,68	0,161	109±108	67,75±38,86	0,866	0,523	0,877
%CD14DR	94,95±7,85	94,89±5,97	0,424	97,14±3,75	94,76±5,31	0,477	0,315	0,955
CD14DR	641±186	536±226	0,463	535±174	654±443	0,465	0,216	0,458
%CD14DR38	91,68±13,43	94,02±6,03	0,814	97,69±3,96	97,27±4,53	0,314	0,094	0,120
CD14DR38	603±204	529±226	0,917	532±174	631±438	0,715	0,432	0,518

Se indica la diferencia de media en el punto de estudio post en relación al valor basal, utilizando la prueba t para muestras relacionadas (p) y muestras no relacionadas (p 1_1 y p 2_2)

Tabla 3. Modificación de la expresión CD25+ en los linfocitos TCD4, CD8 y células Treg en TC tras administración de GGIV

	GGIV+=caso			GGIV-=control			p1_1	p2_2
	Pre (1)	Post (2)	p	Pre (1)	Post (2)	p		
%CD4CD25	55±24	59±21	0,062	47±19	54±19	0,070	0,259	0,461
CD4CD25	346±236	323±244	0,598	310±215	404±321	0,123	0,610	0,391
%CD8CD25	28±24	27±22	0,663	23±26	22±26	0,286	0,929	0,457
CD8CD25	392±409	258±376	0,881	327±371	211±340	0,739	0,391	0,653
%Treg	4,85±2,72	5,98±2,77	0,136	4,79±1,92	4,33±2,07	0,448	0,525	0,029
Treg	30±21	31±19	0,467	31±25	35±31	0,415	0,917	0,553

Se indica la diferencia de media en el punto de estudio post en relación al valor basal, utilizando la prueba t para muestras relacionadas (p) y muestras no relacionadas (p 1_1 y p 2_2)

Tabla 4. Cambios en los parámetros inmunológicos humorales en TC tras administración de GGIV

Poblaciones	GGIV+= caso			GGIV-=control			p1_1	p2_2
	Pre (1)	Post (2)	p	Pre (1)	Post (2)	p		
IgG	1040±365	768±236	0,012	1254±556	751±259	0,003	0,106	0,820
IgA	270±119	153±57	0,298	325±158	150±64	0,001	0,164	0,850
IgM	99±53	66±51	0,717	122±71	85±48	0,009	0,203	0,075
C3	107±26	92±28	0,053	113±29	93±19	0,053	0,471	0,588
C4	26±23	22±6	0,711	20±9	20±6	0,479	0,370	0,275

Se indica la diferencia de media en el punto de estudio post infusional en relación al valor basal, utilizando t para muestras relacionadas (p) y muestras no relacionadas (p 1_1 y p 2_2)

ANEXO 4

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES RELACIONADOS A ESTA TESIS

El trabajo presentado en esta tesis ha sido divulgado en estas comunicaciones a congresos:

- 1- Sarmiento, E; Sousa-Casasnovas, I; Diez-Villanueva, P; **García-Jimenez, S**; Gallego, A; Vicario, JL; Bermejo, A; Castro, Y; Fernandez-Yañez, J; Palomo, J Calahorra, L; Carbone, J ONE-SINGLE DOSE COMPARED TO TWO-DOSE BASILIXIMAB INDUCTION THERAPY IN HEART TRANSPLANTATION: IMMUNE MONITORING AND CLINICAL OUTCOME. 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Brussels 2015
- 2- **García S**; Sarmiento E; Calahorra L; Gallego A; Zatarain E; Navas P; Sousa-Casasnovas I; Lerma, Raquel; Carbone, Javier. IMMUNEMONITORING OF REGULATORY CD4 CELLS IN HEART RECIPIENTS UNDER IMMUNOTHERAPEUTIC INDUCTION: ONE-SINGLE DOSE VERSUS TWO-DOSE BASILIXIMAB. 18 th Congress of the European Society for Organ Trasplantation
- 3- **García S**, Carbone J, Sousa I, Sá AK, Zatarain E, Navas P, Gallego A, Calahorra L, Lerma, R, Sarmiento E. KINETICS OF REGULATORY CD4 T CELLS IN HEART RECIPIENTS UNDER INDUCTION THERAPY WITH ONE-SINGLE DOSE VERSUS TWO-DOSE BASILIXIMAB. ISHLT 38th Annual Meeting and Scientific Sessions. Niza, Francia. 2018
- 4- **García S**, Sarmiento E, Carbone J, Sousa I, Sá AK, Zatarain E, Navas P, Gallego A, Calahorra L, Lerma, R, Carbone J. IMMUNEMONITORING OF REGULATORY CD4 CELLS IN HEART RECIPIENTS USING ONE-SINGLE DOSE VERSUS TWO-DOSE BASILIXIMAB INDUCTION. 27th International Congress of the Transplantation Society. Madrid, Spain 2018
- 5- **García S**; Sarmiento E, Gallego A, Navarro J, Díaz L; Carbone J. THE POTENTIAL IMMUNOMODULATORY ROLE OF HIGH DOSE INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN IN SEVERE CASES OF DERMATOMYOSITIS. 41 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Sevilla. Mayo 2019

VIII. ANEXOS

- 6- García S;** Sarmiento E, Calahorra L, Gallego A, Zatarain E, Díaz L; Navas P, Sousa-Casasnovas I, Lerma R, Carbone J. IMMUNEMONITORING OF REGULATORY CD4 CELLS IN HEART RECIPIENTS UNDER IMMUNOTHERAPEUTIC INDUCTION: ONE-SINGLE DOSE VERSUS TWO-DOSE BASILIXIMAB. III edición Phday. Madrid; 12 septiembre 2019
- 7- Carbone J, García S,** Sarmiento E, Gallego A. THE POTENCIAL ROLE OF INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN PRODUCTS FOR THE MODULATION OF NK CELLS SUBSETS. 42 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Madrid. Marzo 2021

