



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio para la Validación de los Biomarcadores de Elección que Reflejen la Respuesta Individual de los Pacientes Trasplantados de Órganos Sólidos al Tratamiento Inmunosupresor

D. Francisco José Boix Giner

2017

A mi esposa e hija

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados presentados en esta memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- ✓ **Boix F**, Mrowiec A, Muro M. Cytokine expression profile as predictive surrogate biomarkers for clinical events in the field of solid organ transplantation. *Curr Protein Pept Sci.* 2017, 18, 240-249.
- ✓ **Boix F**, Bolarín JM, Eguía J, Gonzalez-Martinez G, De La Peña J, Galian JA, Hernández-Martínez AM, Moya-Quiles MR, Legaz I, Campillo JA, Ramirez P, Sanchez-Bueno F, García-Alonso AM, Pons JA, Minguela A, Llorente S, Muro M. Pretransplant CD28 Biomarker (Levels of Expression and Quantification of Molecules per Cell) in Peripheral CD4+ T Cells Predicts Acute Rejection Episodes in Liver and Kidney Recipients. *Transplant Proc.* 2016 Nov;48(9):2987-2989.
- ✓ **Boix F**, Millan O, San Segundo D, Mancebo E, Rimola A, Fabrega E, Fortuna V, Mrowiec A, Castro-Panete MJ, Peña Jde L, Llorente S, Minguela A, Bolarin JM, Paz-Artal E, Lopez-Hoyos M, Brunet M, Muro M. High expression of CD38, CD69, CD95 and CD154 biomarkers in cultured peripheral T lymphocytes correlates with an increased risk of acute rejection in liver allograft recipients. *Immunobiology.* 2016 May;221(5):595-603.
- ✓ **Boix F**, Millan O, San Segundo D, Muñoz-Cacho P, Mancebo E, Llorente S, Rafael-Valdivia L, Rimola A, Fábrega E, Mrowiec A, Allende L, Minguela A, Bolarín JM, Paz-Artal E, López-Hoyos M, Brunet M, Muro M. High frequency of central memory regulatory T cells allows detection of liver recipients at risk of early acute rejection within the first month after transplantation. *Int Immunol.* 2016 Feb;28(2):55-64.
- ✓ Mancebo E, Castro MJ, Allende LM, Talayero P, Brunet M, Millán O, Guirado L, López-Hoyos M, San Segundo D, Rodrigo E, Muñoz P, **Boix F**, Llorente Viñas S, Muro-Amador M, Paz-Artal E. High proportion of CD95(+) and CD38(+) in cultured CD8(+) T cells predicts acute rejection and infection, respectively, in kidney recipients. *Transpl Immunol.* 2016 Feb;34:33-41.
- ✓ **Boix F**, Millan O, San Segundo D, Mancebo E, Miras M, Rimola A, Fábrega E, Allende L, Minguela A, Paz-Artal E, López-Hoyos M, Brunet M, Muro M. Activated

Regulatory T Cells Expressing CD4⁽⁺⁾CD25^(high)CD45RO⁽⁺⁾CD62L⁽⁺⁾ Biomarkers Could Be a Risk Factor in Liver Allograft Rejection. *Transplant Proc.* 2015 Oct;47(8):2380-1.

- ✓ Millán O, Rafael-Valdivia L, San Segundo D, **Boix F**, Castro-Panete MJ, López-Hoyos M, Muro M, Valero-Hervás D, Rimola A, Navasa M, Muñoz P, Miras M, Andrés A, Guirado L, Pascual J, Brunet M. Should IFN- γ , IL-17 and IL-2 be considered predictive biomarkers of acute rejection in liver and kidney transplant? Results of a multicentric study. *Clin Immunol.* 2014 Oct;154(2):141-54.
- ✓ San Segundo D, Millán O, Muñoz-Cacho P, **Boix F**, Paz-Artal E, Talayero P, Morales JM, Muro M, De Cos MÁ, Guirado L, Llorente S, Pascual J, Arias M, Brunet M, López-Hoyos M. High proportion of pretransplantation activated regulatory T cells (CD4+CD25highCD62L+CD45RO+) predicts acute rejection in kidney transplantation: results of a multicenter study. *Transplantation.* 2014 Dec 15;98(11):1213-8.

Igualmente estos resultados han sido objeto de 13 comunicaciones en congresos nacionales y 8 comunicaciones en congresos internacionales:

Comunicaciones en congresos nacionales:

- ✓ **Boix F**, Bolarín JM, Eguía J, Gonzalez-Martinez G, De la Peña J, Salgado G, Mrowiec A, Gimeno L, Legaz I, Campillo JA, Moya-Quiles MR, Garcia-Alonso AM, Llorente S, Minguela A, Muro M. CD28 pre-trasplante (niveles de expresión y cuantificación de moléculas por célula) en células T CD4+ predice el desarrollo de rechazo agudo en receptores renales y hepáticos. Abstract sometido en el XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Alicante, 5-7 de Mayo 2016.
- ✓ **Boix F**, Eguía J, González-Martínez G, Galian JÁ, Salgado G, Mrowiec A, Gimeno L, Legaz I, Campillo JA, Moya-Quiles MR, Minguela A, Garcia-Alonso AM, Miras M, Llorente S, Muro M. Diferentes niveles de citoquinas intracelulares Th1, Th2 y Th17 podrían condicionar la aparición de infección oportunista en post-trasplante renal y hepático. Abstract sometido en el XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Alicante, 5-7 de Mayo 2016.

- ✓ **Boix F**, Llorente S, Eguía J, González-Martínez G, Campillo JA, Moya-Quiles MR, Minguela A, Miras M, Garcia-Alonso AM, Muro M. The imbalance between IL-17, IFN- γ and IL-10 producing-T-helper cells among kidney and liver recipients could be associated with opportunistic infection development after solid organ transplantation. Abstract sometido al IV Congreso de la Sociedad Española de Trasplante. Santander, 6-8 Mayo 2016.

- ✓ **Boix F**, Bolarín JM, Eguía J, Gonzalez-Martinez G, De La Peña J, Mrowiec A, Salgado G, Moya-Quiles MR, Ramirez P, García-Alonso A, Minguela A, Miras M, Llorente S, Muro M. Pre-transplant CD28 biomarker (levels of expression and quantification of molecules per cell) in peripheral CD4⁺T-cells predicts acute rejection episodes development in liver and kidney recipients. Abstract sometido al IV Congreso de la Sociedad Española de Trasplante. Santander, 6-8 Mayo 2016.

- ✓ **Boix F**, Millán O, San Segundo D, Muñoz-Cacho P, Mancebo E, Miras M, Rafael-Valdivia L, Rimola A, Fábrega E, Mrowiec A, Allende L, Minguela A, Bolarín JM, Paz-Artal E, López-Hoyos M, Brunet M, Muro M. Central memory regulatory T cells (CD4⁺CD25^{hi}CD45RO⁺CD62L⁺) predicts acute rejection in orthotopic liver transplant recipients along first month post-transplantation: a multi-center study. Abstract aceptado como presentación oral en la XIII Conferencia de la Sociedad Catalana de Trasplante. Barcelona, 18-20 Marzo 2015.

- ✓ San Segundo D, Millán O, **Boix F**, Talayero P, Ballesteros MA, Miñambres E, Muro M, Paz-Artal E, Brunet M, López-Hoyos M. Expresión elevada de CD38 en pacientes candidatos a trasplante pulmonar identifica a aquéllos en riesgo de sufrir un episodio de rechazo del injerto. Abstract aceptado como presentación oral en la XIII Conferencia de la Sociedad Catalana de Trasplante. Barcelona, 18-20 Marzo 2015.

- ✓ **Boix F**, Millan O, San Segundo D, Valero-Hervas D, Miras M, Muñoz P, Rafael-Valdivia L, Minguela A, Rimola A, Castro-Panete MJ, Lopez-Hoyos M, Brunet M, Muro M. Acute rejection risk predictive model based on allo-reactive T cells

biomarkers expression in Orthotopic Liver Transplantation. Abstract sometido al III Congreso de la Sociedad Española de Trasplante. Valencia, 8-10 Junio 2014.

- ✓ **Boix F**, Millan O, San Segundo D, Valero-Hervas D, Miras M, Muñoz P, Rafael-Valdivia L, Minguela A, Rimola A, Castro-Panete MJ, Lopez-Hoyos M, Brunet M, Muro M. Activated circulating T regulatory cells (Treg) (CD4+CD25^{high}CD45RO+CD62L+ and CD4+CD25^{high}CD27+CD127^{low}) but not natural Tregs (CD4+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3+) are able to discriminate acute rejection development after orthotopic liver transplantation. Abstract sometido al III Congreso de la Sociedad Española de Trasplante. Valencia, 8-10 Junio 2014.
- ✓ San Segundo D, Millán O, **Boix F**, Paz Artal E, Talayero P, Muro M, De Cos MM, Arias M, Brunet M, López-Hoyos M. High proportion of pre-transplant activated Tregs (CD4+CD25^{high}CD62L+CD45RO+) predicts acute rejection in kidney transplantation: Results of a multicenter study. Abstract sometido al III Congreso de la Sociedad Española de Trasplante. Valencia, 8-10 Junio 2014.
- ✓ San Segundo D, Millán O, **Boix F**, Paz Artal E, Talayero P, Muro M, Brunet M, López-Hoyos M. High proportion of pre-transplant activated Tregs (CD4⁺CD25^{high}CD62L⁺CD45RO⁺) predicts acute rejection in kidney transplantation: Results of a multicenter study. Abstract presentado en el XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Badajoz, 8-10 Mayo 2014.
- ✓ **Boix F**, Salgado G, Llorente S, Minguela A, Martínez H, Miras M, Álvarez-López MR, Muro M. Decreased expression of biomarkers of cell activation in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in patients with recurrence HCV after orthotopic liver transplantation. Abstract presentado en el XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Salamanca, 29-01 Mayo-Junio 2013.
- ✓ **Boix F**, Salgado G, Brunet M, Millan O, Martinez H, Lopez-Hoyos M, Castro MJ, Minguela A, Miras M, Alvarez R, Muro M. Role of T helper 17 (Th-17) cells in acute allograft rejection and hepatitis C virus recurrence in patients after Orthotopic Liver Transplantation. Abstract presentado en la XII Conferencia de la Sociedad Catalana de Trasplante. Barcelona, 13-15 Marzo 2013.

- ✓ **Boix F**, Salgado G, Brunet M, Millan O, Martinez H, Lopez-Hoyos M, Valero-Hervas D, Minguela A, Miras M, Alvarez R, Muto M. Post-transplant monitorization of CD25, CD38, CD154, CD69 CD95 in T cells and their use as biomarkers of the immunosuppressive therapy to predict HCV recurrence in Liver Graft Recipients. Abstract presentado en la XII Conferencia de la Sociedad Catalana de Trasplante. Barcelona, 13-15 Marzo 2013.

Comunicaciones en congresos internacionales:

- ✓ Millán O, **Boix F**, San Segundo D, Muñoz-Cacho P, Miras M, Rafael-Valdivia L, Rimola A, Fábrega E, Mrowiec A, Minguela A, Aliart I, Bolarín JM, Paz-Artal E, López-Hoyos M, Brunet M, Muro M. Central memory regulatory T cells (CD4+CD25hiCD45RO+CD62L+) predicts acute rejection in orthotopic liver transplant recipients along first month post-transplantation: a multicenter study. Abstract aceptado en el XIV Congreso Internacional de Monitorización Terapéutica y Toxicología Clínica. Rotterdam, 11-15 Octubre 2015.
- ✓ **Boix F**, Eguía J, Marlovick A, Bolarín JM, Salgado G, Martínez H, Minguela A, Miras M, Llorente S, Muro M. Pretransplant intracytoplasmatic cytokine expression of INF- γ and IL-10 on peripheral T lymphocytes predicts opportunistic infection in liver and renal transplantation. Abstract presentado en la XXIX Conferencia de la Sociedad Europea de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Switzerland, 26-29 Abril 2015.
- ✓ **Boix F**, Millan O, San Segundo D, Valero-Hervas D, Miras M, Muñoz P, Rafael-Valdivia L, Minguela A, Rimola A, Castro-Panete MJ, Lopez-Hoyos M, Brunet M, Muro M. Acute rejection risk predictive model based on allo-reactive T cells biomarkers expression in Orthotopic Liver Transplantation. Abstract presentado en la XXIX Conferencia de la Sociedad Europea de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Switzerland, 26-29 Abril 2015.
- ✓ Mancebo E, Paz-Artal E, Valero D, Brunet M, López-Hoyos M, **Boix F**, Mora S, Castro MJ. CD38⁺CD8⁺ T cell subset predicts viral and bacterial infection after kidney transplantation. Results from a multicenter study. Abstract presentado en la XXIX Conferencia de la Sociedad Europea de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Switzerland, 26-29 Abril 2015.

- ✓ **Boix F**, Salgado G, Brunet M, Millán O, Martínez H, López-Hoyos M, Castro MJ, Minguela A, Miras M, Álvarez MR, Muro M. Role of T helper 17 (Th17) cells in acute allograft rejection and Hepatitis C virus recurrence in patients after Orthotopic Liver Transplantation. Abstract presentado en la XXVII Conferencia de la Sociedad Europea de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Maastricht, 11-14 Mayo 2013.
- ✓ **Boix F**, Salgado G, Brunet M, Millán O, Martínez H, López-Hoyos M, Valero D, Minguela A, Miras M, Álvarez MR, Muro M. Post-transplant monitoring of CD25, CD38, CD154, CD69 and CD95 in T cells as biomarkers of immunosuppressive therapy to predict HCV recurrence in liver graft recipients. Abstract presentado en la XXVII Conferencia de la Sociedad Europea de Histocompatibilidad e Inmunogenética. Maastricht, 11-14 Mayo 2013.
- ✓ **Boix F**, Salgado G, Brunet M, Millán O, López-Hoyos M, Castro MJ, Minguela A, Miras M, Álvarez MR, Muro M. The role of T helper 17 cells in Acute Allograft Rejection Development in Liver Transplantation. Abstract presentado en el III Congreso de la Sociedad Europea de Inmunología. Glasgow, 5-8 Septiembre 2012.
- ✓ **Boix F**, Salgado G, Brunet M, Millán O, López-Hoyos M, Valero D, Minguela A, Miras M, Álvarez MR, Muro M. Significance of T Helper 17 Immunity in Hepatitis C Virus recurrence in Orthotopic Liver Transplantation. Abstract presentado en el III Congreso de la Sociedad Europea de Inmunología. Glasgow, 5-8 Septiembre 2012.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Igualmente, se hace constar que el trabajo de Francisco José Boix Giner y la parte experimental de esta memoria han sido financiados en parte por los proyectos de investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS) y la Fundación Séneca.

Proyecto FIS: Estudio multicéntrico para la validación de los biomarcadores de elección que reflejen la respuesta individual de los pacientes transplantados de órganos sólidos al tratamiento inmunosupresor”. FIS. PI080446.

Proyecto Fundación Séneca: Mecanismos de inducción y ruptura de tolerancia: Aplicación en inmunobiología de trasplantes y enfermedades con hipo ó hiperreactividad inmunitaria. 04487/GERM/06.

Proyecto FIS: Procesos biológicos implicados en el desarrollo del rechazo humoral o en fenómenos de acomodación en trasplante mediados por anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA)”. ISCIII. PI11/02686.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento

Al director de esta tesis, el Dr. Manuel Muro Amador, por su ayuda, esfuerzo, incansable y desinteresada dedicación en la dirección de esta tesis; por todo de lo que de él he aprendido ya que en él encontré una fuente de inspiración por su dedicación en el campo del trasplante.

A la codirectora de esta tesis, la Dra. M^a del Rocío Álvarez López, por su inestimable guía durante mi formación como especialista en Inmunología y por la confianza que puso en mí para la elaboración de esta tesis doctoral.

A los servicios de Nefrología y Digestología, en especial al Dr. Santiago Llorente y Dr. Manuel Miras, por su desinteresada colaboración en la aportación de muestras y datos clínicos de los pacientes incluidos en esta memoria.

Al Dr. Perdo Aparicio Alonso, por su ayuda como tutor de esta Tesis.

A mis compañeros de residencia, en especial a Helios y Gorca por todos los buenos momentos que pasamos juntos.

A los facultativos especialistas del servicio, en especial a los doctores José Antonio Campillo y Rosa Moyá Quiles por su generosa ayuda y aportación intelectual.

A los investigadores post-doctorales del servicio de Inmunología, en especial a las Dras. Victoria y Lourdes por su incondicional apoyo y aportación de grandes consejos tanto personales como profesionales.

Una especial mención a mi compañero José Miguel Bolarín por su generosa ayuda en el análisis estadístico.

A todos ellos mi más sincera gratitud por su incondicional apoyo durante mi estancia como facultativo residente y tras el paso de los años, de los que tanto he aprendido y que de una forma u otra han colaborado en que esta tesis doctoral haya sido posible.

Por último quiero agradecer a mi esposa, por su incondicional apoyo, sin el cual este trabajo no hubiera visto la luz.

“We can only see a short distance
ahead, but we can see plenty there that needs to be done”

Alan Turing

Abreviaturas

Acs: anticuerpos

AcMo: Anticuerpo monoclonal

Ags: antígenos

aloAgs: aloantígenos

APC: Aloficocianina

AUC: Area bajo curva

CD: Cluster de diferenciación

CF: Citometría de flujo

CMV: Citomegalovirus

Con-A: Concavalina A

CPAs: células presentadoras de antígeno

CsA: Ciclosporina

EICH: Enfermedad de injerto contra huésped

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

IFN: Interferon

IL: Interleuquina

IMF: Intensidad media de fluorescencia

Io: Ionomicina

LTC: Linfocito T citotóxico

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MMF: Micofenolato de mofetilo

NRA: Pacientes sin rechazo agudo

NoINF: Pacientes sin infección post-trasplante

NVHC: Pacientes sin recidiva de virus de hepatitis C

PCNA: Antígeno de proliferación nuclear

PE: Ficoeritrina

PerCP: Proteína clorofila peridrina

RA: Rechazo agudo

RLM: reacciones linfocitarias mixtas

SP: Sangre periférica

SRL: Sirolimus

TOH: Trasplante ortotópico hepático

T_H: Linfocito T colaborador

Treg: linfocitos T reguladores

nTreg: Linfocitos T reguladores naturales

aTreg: Linfocitos T reguladores activados

TRL: Tacrolimus

VEB: Virus Epstein-Bar

VHB: Virus de hepatitis B

VHC: Virus de hepatitis C

VHS: Virus herpes simple

VHZ: Virus herpes-zoster

xenoAgs: xenoantígenos

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades sobre el trasplante inmunológico	1
1.2. Generalidades sobre el trasplante hepático	3
1.3. Características histológicas y funcionales del hígado	5
1.4. Generalidades sobre el trasplante renal	7
1.5. Características histológicas y funcionales del riñón	9
1.6. Principios genéticos que gobiernan el trasplante de tejidos	11
1.6.1. Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)	12
1.6.1.1. Estructura de las moléculas HLA de clase I	13
1.6.1.2. Estructura de las moléculas HLA de clase II	14
1.7. La respuesta inmunitaria alogénica	15
1.7.1. Activación linfocitaria alogénica	16
1.7.2. Reconocimiento alogénico directo	19
1.7.3. Reconocimiento alogénico indirecto	21
1.8. Mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria alogénica	23
1.8.1. Linfocitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺	23
1.8.1.1. Diferenciación de los linfocitos T CD8 ⁺	23
1.8.1.2. Reconocimiento antigénico y activación de los LTCs	25
1.8.1.3. Mecanismos efectores de los linfocitos T citotóxicos	25
1.8.2. Linfocitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺	27
1.8.2.1. Diferenciación de los linfocitos T CD4 ⁺ en subpoblaciones de células efectoras	28
1.8.2.2. Linfocitos T CD4 ⁺ T _H 1	28
1.8.2.3. Linfocitos T CD4 ⁺ T _H 17	30
1.8.2.3.1. Diferenciación de los linfocitos T _H 17	32
1.8.2.3.2. Papel de los linfocitos T _H 17 en trasplante	33
1.8.2.3.3. Terapias contra los linfocitos T _H 17 aloinmunes	37
1.8.2.4. Linfocitos T CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ (Treg)	38
1.8.2.4.1. Diferenciación de los linfocitos Treg	39
1.8.2.4.2. Mecanismos efectores de linfocitos Treg	44
1.8.2.4.2.1. Citoquinas implicadas en la función de los linfocitos Treg	44
1.8.2.4.2.2. Adenosina pericelular	46
1.8.2.4.2.3. Apoptosis por privación de citoquinas	46

1.8.2.5. Paradigma Treg/T _H 17	47
1.9. Citoquinas implicadas en la respuesta inmunitaria	48
1.9.1. Interleucina 6 (IL-6)	48
1.9.2. Interleucina 2 (IL-2)	49
1.9.3. Factor transformante del crecimiento β (TGF β)	51
1.9.4. Interferon γ (IFN γ)	52
1.9.5. Interleucina 10 (IL-10)	54
1.9.6. Interleucina 17 (IL-17)	56
1.10. Mecanismo de rechazo del injerto	58
1.10.1. Mecanismos inmunológicos en el rechazo hiperagudo	58
1.10.2. Mecanismos inmunológicos en el rechazo agudo	59
1.10.3. Mecanismos inmunológicos en el rechazo crónico	64
1.11. Farmacodinamia: Biomarcadores del efecto inmunosupresor	67
1.11.1. Monitorización de la inmunosupresión	69
1.11.2. Inmunosupresión personalizada: Bases de la monitorización farmacocinética y farmacodinámica	70
1.11.3. Farmacocinética	74
1.11.4. Correlación de los cambios inducidos por la farmacocinética y farmacodinamia sobre los marcadores de evolución del injerto	75
1.11.5. Análisis de los biomarcadores del efecto inmunomodulador de los fármacos inmunosupresores en trasplantados	77
1.11.5.1. Biomarcadores específicos del efecto farmacodinámico	79
1.11.5.1.1. Dianas farmacológicas	80
1.11.5.2. Biomarcadores no específicos del efecto farmacodinámico	81
1.11.5.2.1. Citoquinas	81
1.11.5.2.2. Tinción intracitoplasmática de citoquinas	83
1.11.5.2.3. Medición de la producción de citoquinas en sobrenadanre de cultivo tras estimulación <i>in vitro</i> con Con-A	85
1.11.5.2.4. Monitorización de la expresión de CD28 sobre linfocitos T CD4 ⁺ periféricos en trasplantados hepáticos y renales	86
1.11.5.2.5. Expresión de CD25, CD38, CD69, CD95 y CD154 en trasplantados hepáticos y renales y su utilización como	

biomarcadores del efecto farmacodinámico de la inmunosupresión	87
1.11.5.2.6. Biomarcadores de tolerancia inmunológica	91
1.12. Consideraciones finales	96
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	98
2.1. Hipótesis	98
2.2. Objetivos	99
3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	100
3.1. Pacientes	100
3.1.1. Grupos de estudio: Pacientes y controles	100
3.1.2. Técnica quirúrgica del trasplante hepático	108
3.1.3. Técnica quirúrgica del trasplante renal	110
3.1.4. Terapias inmunosupresoras y anti-rechazo	113
3.1.4.1. Terapias inmunosupresoras en trasplante hepático	114
3.1.4.1.1. Terapia de inducción	114
3.1.4.1.2. Terapia inmunosupresora post-trasplante	115
3.1.4.1.3. Terapia inmunosupresora de mantenimiento	115
3.1.4.1.4. Terapia anti-rechazo agudo	115
3.1.4.2. Terapias inmunosupresoras en trasplante renal	116
3.1.4.2.1. Terapia de inducción	116
3.1.4.2.2. Terapia inmunosupresora post-trasplante	116
3.1.4.2.3. Terapia inmunosupresora de mantenimiento	117
3.1.5. Diagnóstico de rechazo agudo en trasplante hepático	117
3.1.6. Diagnóstico de rechazo agudo en trasplante renal	118
3.1.7. Diagnóstico y tratamiento de la recidiva de virus de hepatitis C	119
3.1.8. Control, diagnóstico y prevención de infecciones	120
3.2. Materiales y métodos	122
3.2.1. Parámetros farmacocinéticos	122
3.2.2. Parámetros farmacodinámicos	122
3.2.2.1. Determinación de la capacidad productora de citoquinas intracitoplasmáticas (IL-2, IFN γ , IL-10 e IL-17) por citometría tras estímulo policlonal en células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ <i>in vitro</i>	122

3.2.2.2.	Determinación de la expresión de CD25, CD38, CD69, CD95 y CD154 por citometría de flujo en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ tras estimulación <i>in vitro</i> con Con-A	132
3.2.2.3.	Cuantificación del porcentaje y cifras absolutas de linfocitos aTreg y nTreg en sangre periférica de trasplantados hepáticos y renales	139
3.2.2.4.	Monitorización de la expresión de CD28 en linfocitos T CD4 ⁺ de sangre periférica	147
3.2.2.5.	Determinación de la secreción de IL-17, IFN γ , IL-10 y TGF β en sobrenadante de cultivo de leucocitos estimulados <i>in vitro</i> con Con-A por ELISA en pacientes con trasplante hepático y renal	153
3.2.2.6.	Análisis estadístico de los datos	160
4.	RESULTADOS	162
4.1.	Datos demográficos, clínicos y farmacocinéticos en receptores de trasplante hepático y renal	162
4.1.1.	Características demográficas, clínicas y farmacocinéticas en receptores hepáticos y su relación con el desarrollo de rechazo agudo, infección oportunista y reinfección por virus de hepatitis C	162
4.1.1.1.	Infecciones oportunistas en el periodo post-trasplante	165
4.1.1.2.	Rechazo agudo y niveles de inmunosupresor en sangre periférica de trasplantados hepáticos	166
4.1.2.	Características demográficas, clínicas y farmacocinéticas en receptores renales y su relación con rechazo agudo e infección oportunista	168
4.1.2.1.	Infecciones oportunistas en el periodo post-trasplante	169
4.1.2.2.	Rechazo agudo y niveles de inmunosupresor en sangre periférica	171
4.2.	Poblaciones celulares en sangre periférica previos al trasplante de pacientes con enfermedad hepática y renal terminal	173
4.2.1.	Poblaciones leucocitarias y linfocitarias totales en sangre periférica de trasplantados hepáticos y renales	174
4.2.1.1.	Leucocitos totales en trasplante hepático y renal	174

4.2.1.1.1. Leucocitos totales ($\times 10^9/\text{ml}$) en trasplantados hepáticos	174
4.2.1.1.2. Leucocitos totales ($\times 10^9/\text{ml}$) en trasplantados renales	175
4.2.1.2. Linfocitos totales en trasplante hepático y renal	176
4.2.1.2.1. Frecuencia (%) y cifras absolutas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de linfocitos en trasplantados hepáticos	176
4.2.1.2.2. Frecuencia (%) y cifras absolutas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de linfocitos totales en trasplantados renales	177
4.2.2. Evaluación de la capacidad productora de citocinas intracitoplasmática en situación pre-trasplante de trasplantados hepáticos y renales	178
4.2.2.1. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ de trasplantados hepáticos y su relación con rechazo agudo	179
4.2.2.2. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$ y CD8 $^+$ CD69 $^+$ de trasplantados renales y su relación con rechazo agudo	185
4.2.2.3. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$ y CD8 $^+$ CD69 $^+$ de trasplantados hepáticos y su relación con infección oportunista	191
4.2.2.4. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ de trasplantados renales y su relación con infección oportunista	196
4.2.2.5. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$ y CD8 $^+$ CD69 $^+$ de trasplantados hepáticos y su relación con recidiva de virus de hepatitis C	201
4.2.2.6. Niveles pre-trasplante de IFN γ , IL-17, IL-10 y TGF β soluble de trasplantados hepáticos y su relación con rechazo agudo	206
4.2.2.7. Niveles pre-trasplante de IFN γ , IL-17, IL-10 y TGF β soluble de trasplantados hepáticos y su relación con infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C	210

4.2.2.8.	Niveles pre-trasplante de IFN γ , IL-17, IL-10 y TGF β soluble de trasplantados renales y su relación con rechazo agudo e infección oportunista	215
4.2.2.9.	Niveles pre-trasplante de linfocitos aTregs (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD45RO ⁺ CD62L ⁺) y linfocitos nTregs (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺) en trasplantados hepáticos y su relación con rechazo agudo e infección oportunista	217
4.2.2.10.	Niveles pre-trasplante de linfocitos nTregs (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺) en trasplantados renales y su relación con rechazo agudo e infección oportunista	224
4.2.2.11.	Niveles pre-trasplante de expresión <i>in vitro</i> de antígenos de superficie CD38, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ y análisis de la expresión (% y cifras absolutas) de CD28 sobre linfocitos T CD4 ⁺ de sangre periférica de trasplantados hepáticos y renales y su relación con rechazo agudo	232
4.2.2.12.	Niveles pre-trasplante de expresión <i>in vitro</i> de antígenos de superficie CD25, CD69 y CD154 en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ y análisis de la expresión (% y cifras absolutas) de CD28 sobre linfocitos T CD4 ⁺ de sangre periférica de trasplantados hepáticos y renales y su relación con infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C	243
4.2.3.	Expresión intracitoplasmática de citocinas IL-2, IL-17, IFN γ e IL-10 en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en el periodo post-trasplante hepático y renal	252
4.2.3.1.	Niveles post-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de trasplantados hepáticos y renales y su relación con rechazo agudo	253
4.2.3.2.	Niveles intracitoplasmáticos post-trasplante de IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ y CD8 ⁺ CD69 ⁺ de trasplantados hepáticos y renales y su relación con infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C	261
4.2.4.	Niveles post-trasplante de IL-17 y TGF β solubles de trasplantados hepáticos y renales y su relación con rechazo agudo, infección	

oportunista y recidiva de virus de hepatitis C durante el periodo post-trasplante	271
4.2.5. Niveles de linfocitos aTreg (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD45RO ⁺ CD62L ⁺) y nTreg (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺) de trasplantados hepáticos y renales y su relación con rechazo agudo, infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C durante el periodo post-trasplante	278
4.2.6. Niveles de expresión (%) <i>in vitro</i> de CD38, CD69, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ y expresión (% y cifras absolutas) de la proteína de superficie CD28 sobre linfocitos T CD4 ⁺ periféricos de trasplantados hepáticos y renales y su relación con rechazo agudo, infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C durante el periodo post-trasplante	289
5. DISCUSIÓN	306
5.1. Tasa de rechazo agudo e infección oportunista en trasplante hepático	307
5.2. Tasa de rechazo agudo e infección oportunista en trasplante renal	312
5.3. Estudio de biomarcadores farmacodinámicos de inmunosupresión en trasplante	316
5.3.1. Monitorización de la función inmunitaria pre-trasplante de pacientes con enfermedad terminal hepática y renal y papel en la predicción de RA	318
5.3.2. Monitorización de la función inmunitaria pre-trasplante de pacientes con enfermedad hepática y renal terminal y su papel en la predicción de INF	326
5.3.3. Monitorización de la función inmunitaria de receptores hepáticos que en situación basal que desarrollaron recurrencia de VHC	334
5.3.4. Monitorización de la función inmunitaria post-trasplante de receptores hepáticos y renales y su papel en la predicción de rechazo agudo temprano así como también en la monitorización de pacientes de alto riesgo	336
5.3.5. Monitorización post-trasplante de la función inmunitaria en receptores y su papel en la predicción de INF, y monitorización de pacientes de alto riesgo	351

5.3.6. Monitorización de la función inmunitaria en situación post-trasplante de receptores hepáticos con infección activa de VHC y su papel en la predicción de cirrosis hepática por VHC	362
CONCLUSIONES	369
BIBLIOGRAFÍA	373

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

El trasplante de órganos y células entre individuos es una medida terapéutica que salva o prolonga miles de vidas cada año. Esta opción terapéutica para determinadas patologías humanas ha experimentado un crecimiento sostenido durante la última mitad del siglo XX, y en la actualidad, los trasplantes de órganos sólidos y de células hematopoyéticas son procedimientos ampliamente utilizados en la práctica clínica. Una limitación importante para el éxito de los trasplantes es que la respuesta inmunitaria del receptor frente al tejido del donante, produce *rechazo*. Diversos estudios experimentales iniciales revelaron que el rechazo se debe a una fuerte respuesta inmunitaria adaptativa alogénica específica (Medawar *et al.*, 1958; Hildemann y Medawar, 1959).

Ya que en general, todos estos trasplantes se realizan entre individuos genéticamente relacionados, es decir, entre individuos diferentes de la misma especie, se les denomina *alotrasplantes*. Como consecuencia, un injerto entre dos individuos de la misma especie, pero genéticamente distintos, se conoce como *aloinjerto*, *injerto alogénico* o *alotrasplante*.

El éxito en todos los tipos de trasplante depende de que se consiga revertir dicha respuesta hasta adquirir un equilibrio que evite la aparición de episodios de rechazo frente al injerto. En el caso del trasplante de progenitores hematopoyéticos, ya que con el injerto, salvo en depleción, se introducen linfocitos T maduros del donante a un receptor inmunodeprimido; se puede producir una reacción que conduce a la denominada “Enfermedad de injerto contra huésped” (EICH), principal complicación en estos trasplantes.

Los injertos pueden fracasar también por otras anomalías distintas al rechazo. En la práctica clínica, es importante distinguir entre el rechazo, un fenómeno de naturaleza inmunitaria, y las demás causas de fracaso de los injertos.

Sin embargo, aún con todas las complicaciones generadas a partir de los episodios de rechazo y reconocimiento alogénico las mejoras en las terapias inmunosupresoras han incrementado notablemente el éxito del alotrasplante, hasta el punto de que en la actualidad la mayor limitación viene impuesta por la limitada disponibilidad de órganos humanos. Mientras esta limitación en trasplantes como el renal, hepático o pulmonar, puede ser suplida con trasplantes de donantes vivos, existen otros órganos como el corazón que, obviamente sólo puede realizarse a partir de donantes cadavéricos. El xenotrasplante también es visto por algunos clínicos como una solución prometedora a la

escasez de órganos humanos, pero hoy por hoy, presenta un mayor número de efectos inmunitarios que el alotrasplante, así como, una mayor incidencia de riesgo de rechazo o infecciones entre otras complicaciones. Es por todo ello que en el campo del trasplante, queda aún mucho camino por recorrer.

Ya que el trasplante de órganos o tejidos entre donante y receptor, de la misma especie o de especies distintas, es un fenómeno ajeno a la fisiológica en la naturaleza, cuando se pone en práctica como terapéutica clínica, el sistema inmunitario ológico orquesta toda una respuesta inmunitaria específica contra el órgano trasplantado que, compromete la supervivencia del injerto en el receptor. A estos tipos de respuesta inmunitaria se la conoce respectivamente como *respuesta inmunitaria alogénica* o *xenogénica*. Una respuesta inmunitaria alogénica es aquella que se produce contra nuevos antígenos (Ags) de otros individuos de la misma especie, mientras que una respuesta inmunitaria xenogénica es la que se produce contra antígenos nuevos de una especie animal diferente.

Las moléculas reconocidas como extrañas sobre los aloinjertos se denominan *aloantígenos (aloAgs)*, mientras que las de los xenoinjertos son *xenoantígenos (xenoAgs)*. Los linfocitos y anticuerpos (Acs) que reaccionan contra ellos se describen como linfocitos o moléculas *alorreactivas* o *xenorreactivas*, respectivamente. Probablemente, tanto la respuesta alogénica como la xenogénica, no se desarrollan con el fin de producir un rechazo; hoy en día existen multitud de cuestiones del campo de la inmunología fundamental de ambos tipos de respuestas que no pueden ser explicadas. Las respuestas alogénica y xenogénica, difieren de otras respuestas inmunitarias, al menos, en dos aspectos fundamentales: Primero, ambas respuestas exhiben una fuerza extraordinaria y, probablemente, por esta razón, se incluyan respuestas que son inusuales y que no pueden ser detectadas con métodos inmunológicos clásicos y segundo, pueden ser estimuladas por dos tipos diferentes de células presentadoras de antígeno (CPAs), unas pertenecientes al donante y otras al receptor.

Estudios realizados en el campo del trasplante han contribuido significativamente al conocimiento de la inmunología fundamental. Un buen ejemplo fueron los estudios iniciales que llevaron al descubrimiento del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), o los ensayos de reacciones linfocitarias mixtas (RLM) para evaluar la activación de la célula T (Ivanyi *et al.*, 1967; Klein *et al.*, 1976). Pero hoy en día, esta inquietud ha cambiado de dirección en el sentido de valorar la importancia que en el ámbito del

trasplante clínico, tiene la aplicación de conocimientos en inmunología fundamental para evitar los problemas que causa el rechazo del injerto o la EICH.

En suma, la importancia de la inmunología del trasplante depende de dos factores principales:

- En primer lugar, la respuesta de rechazo inmunitario sigue siendo en la actualidad uno de los obstáculos más importantes para el trasplante.
- En segundo lugar, aunque es poco probable que durante la vida normal de un organismo se produzca un encuentro con *aloAgs*, salvo por transfusiones o embarazos, la respuesta inmunitaria frente a ellos es potente, por lo que constituye un modelo útil para el estudio de los mecanismos de activación de los linfocitos.

1.2. Generalidades sobre el trasplante hepático

El trasplante ortotópico de hígado (TOH), consiste en la extirpación del hígado enfermo del paciente y su sustitución, en la misma localización anatómica, por otro sano procedente de un donante cadáver o vivo. Se trata de un procedimiento médico-quirúrgico complejo y sofisticado que precisa de una amplia implicación multidisciplinar. El primer trasplante hepático se realizó en 1963 por el Dr. Thomas Starzl en el Veteran's Hospital de Denver y, pese a que el receptor falleció a las 5 horas, supuso el primer paso para lo que hoy constituye la mejor y, en algunos casos, la única alternativa terapéutica de los enfermos con hepatopatías crónicas graves e irreversibles (Ortega, 2012; Matesanz, 2008). En España fueron los Dres. Carles Margarit y Eduardo Jaurrieta quienes en el Hospital de Bellvitge, Barcelona, en 1984 realizaron con éxito la primera intervención. Hoy se efectúa en 24 hospitales de todo el estado y son más de mil los enfermos que anualmente reciben un trasplante hepático en nuestro país.

En el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) el primer TOH se realizó en 1988 y en la actualidad se han efectuado más de 1000 trasplantes. Los datos de supervivencia a un año han mejorado significativamente en las últimas décadas pasando del 30% al 70% y se espera que sigan mejorando en las siguientes décadas. En definitiva, se trata de un método terapéutico especialmente importante, máxime si se tiene en cuenta que estos enfermos de otra forma estarían condenados a muerte en días o a lo sumo en meses.

Las principales indicaciones para un TOH, son las enfermedades irreversibles del hígado, ya sean vasculares (síndrome de Budd-Chiari), hepatocelulares (hepatitis vírica, hepatitis producidas por fármacos o iatrogénica y cirrosis alcohólica) o colestásicas (cirrosis biliar, colangitis esclerosante primaria), fallos hepáticos fulminantes (inducidos por virus, fármacos, toxinas o la enfermedad de Wilson), tumores (hepatocarcinoma, colangiocarcinoma y adenocarcinoma) y enfermedades genéticas metabólicas.

A lo largo de los años, el hígado ha demostrado ser un órgano inmunológicamente privilegiado. A este respecto, existen numerosas evidencias que describen como algunos receptores hepáticos que han dejado el tratamiento inmunosupresor mantienen la función del injerto, lo que indica un fuerte mecanismo de tolerancia. Además, los receptores hepáticos requieren en general, regímenes de inmunosupresión más reducidos que con otros órganos y el propio trasplante de hígado puede conferir protección frente al injerto de otros órganos del mismo donante (Neuberger, 1999). Asimismo, la incidencia de rechazo es inferior a la de otros órganos. En los años 1990, el rechazo agudo ocurría aproximadamente en el 60% de los pacientes, si bien no comprometía la supervivencia del injerto y paciente. Desde el año 2000, la incidencia de rechazo agudo ha disminuido considerablemente, hasta alcanzar tasas que en algunas series representan el 15%. Este descenso se ha visto favorecido por el uso de nuevos agentes inmunosupresores y por la mejora en el manejo del tratamiento (Conti *et al.*, 2003), pero en contrapartida, el uso de estos agentes se ha asociado al desarrollo de toxicidad, elevado riesgo de infecciones y alta incidencia de ciertos tumores (Dantal *et al.*, 2005; Braet *et al.*, 2001).

En las últimas dos décadas, la supervivencia del trasplante hepático ha mejorado de forma concomitante con los avances en la preservación de los órganos, técnicas quirúrgicas, cuidados postoperatorios, regímenes inmunosupresores, diagnóstico de rechazo y, quizá por encima de todo, a unos criterios más fundamentados de selección de enfermos y de fijación del momento del trasplante (Hughes *et al.*, 1997; Jamieson, 1998). A pesar de la relativa alta mortalidad inicial, la supervivencia a un año es comparable ahora a la de los trasplantes de corazón y riñón. Aunque el rechazo agudo es, sin duda problemático, la tasa de mortalidad después de un año debido al rechazo crónico es comparativamente baja. El trasplante hepático también difiere al de otros órganos vascularizados en el marcado poder de recuperación del rechazo hiperagudo y una susceptibilidad reducida al rechazo crónico. El hígado es el órgano de mayor fuente de moléculas solubles HLA de clase I (sHLA-I) que podrían ejercer, según diversos estudios, potentes efectos inmunomoduladores. Además, al contrario que el corazón y el riñón, el

hígado tiene capacidad regenerativa y las células de Kupffer del donante son remplazadas por células retículo-endoteliales del receptor en 6 semanas.

En este tipo de trasplante también juega un papel importante las infecciones virales (CMV, HBV ó HCV), ya que se han descrito determinadas asociaciones. Por ejemplo, se ha descrito una relación entre la presencia de infección viral, compatibilidad parcial en HLA clase I y la aparición de rechazo agudo (Ontañón *et al.*, 1998). Otros grupos correlacionan la presencia de CMV activo junto con compatibilidad en HLA-DR y el desarrollo de rechazo crónico, mientras otros grupos no encuentran esta asociación.

También se ha informado de que el *status* genético HLA-DQ del receptor podría ser importante en rechazo agudo (Muro *et al.*, 1997b y 2001b). También determinadas moléculas costimuladoras y sHLA (Blanco-García *et al.*, 2011 y 2013) podrían jugar un papel en rechazo agudo, así como la compatibilidad en el locus HLA-C, recientemente informado su papel en este tipo de trasplante, abriendo una vía de estudio a este gen tan poco estudiado en el trasplante de órganos en general (López-Alvarez *et al.*, 2009).

A pesar de todas estas mejoras conseguidas, aún hoy en día, el rechazo es el principal escollo que se presenta en las primeras etapas de estos trasplantes. Por ello, es de gran importancia profundizar en el conocimiento de los mecanismos que participan en la respuesta inmunitaria que se desarrolla frente al injerto (respuesta alogénica) y de los factores que pueden modificarla. Controlar estos mecanismos permitiría una mayor previsión sobre la evolución del trasplante y, quizás la aplicación de una terapia preventiva ajustada a los factores de riesgo concurrentes en cada caso.

Para comprender los mecanismos implicados en la regulación local de la respuesta inmune del hígado es necesario conocer las funciones metabólicas y su micro-anatomía.

1.3. Características histológicas y funcionales del hígado

El hígado se considera la mayor glándula del organismo y funciona, como glándula exocrina, produciendo bilis y, como glándula endocrina, sintetizando gran variedad de productos que se vierten directamente al torrente circulatorio. Además, en él se sintetizan diversos componentes proteicos esenciales y, en virtud de su capacidad para almacenar y liberar carbohidratos, ejerce una importante acción reguladora sobre el metabolismo general. Por otro lado, metaboliza y transforma los productos de la digestión, a la vez que inactiva productos tóxicos procedentes del intestino o de la circulación general degradándolos por oxidación e hidroxilación.

La importancia del hígado radica en su localización estratégica en la circulación y en que se trata de un órgano altamente irrigado. El hígado recibe un gran volumen de sangre venosa procedente del tubo digestivo a través de la vena porta y un pequeño volumen de sangre arterial por la arteria hepática. La sangre sale del hígado por las venas hepáticas que van a desembocar a la vena cava inferior, de modo que el hígado queda interpuesto entre el tubo intestinal y la circulación general (Ham y Cormack, 1984). Las células hepáticas se disponen radialmente respecto a las ramas terminales de las venas hepáticas (venas centrales), situadas en el centro de los lobulillos hepáticos. A los lados de las láminas de células hepáticas, hay un sistema de conductos vasculares llenos de sangre denominados sinusoides hepáticos. En los ángulos de los lobulillos hepáticos, se encuentran los canalículos portales, estructuras que contienen una pequeña rama de la vena porta y otra de la arteria hepática, así como un canalículo biliar, rodeados de una envoltura común de tejido conjuntivo (Figura 1.1).

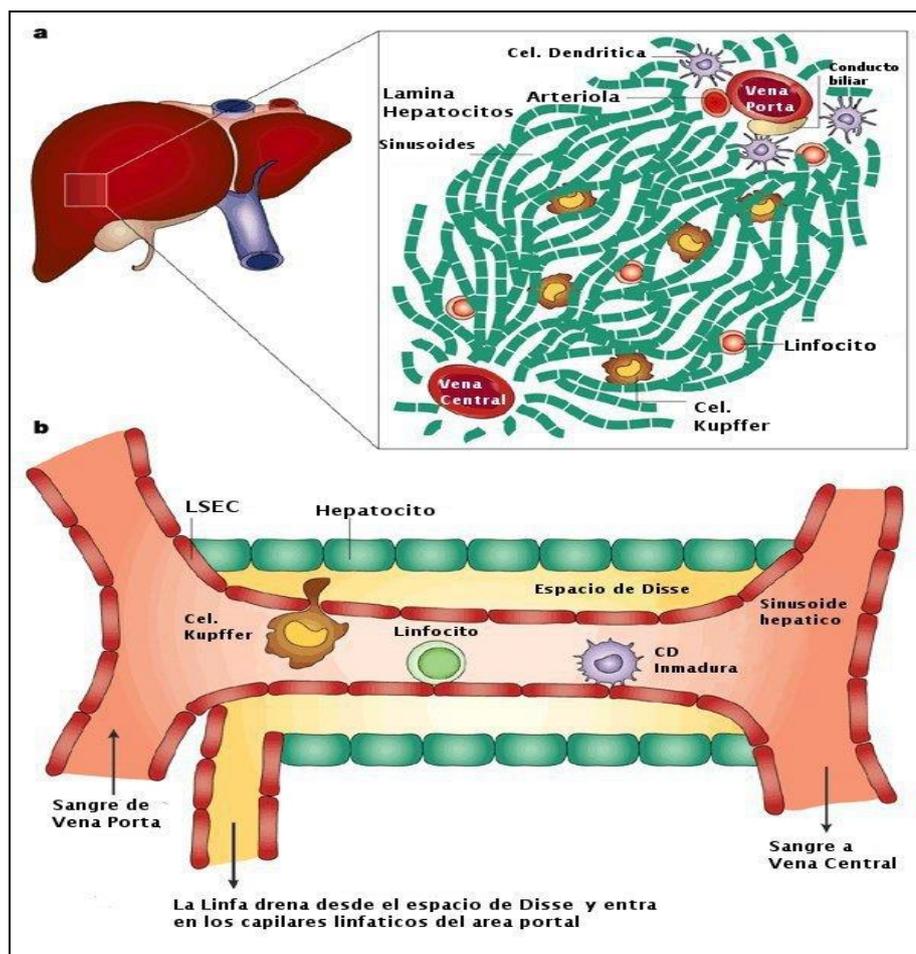


Figura 1.1. *Microambiente hepático.* (A) Estructura de un lobulillo hepático. El lobulillo está constituido por una rama de la vena porta, una arteriola y un conducto biliar. Desde la vena porta, la sangre fluye hacia la vena central a lo largo de los sinusoides hepáticos. Los sinusoides contienen una población de

macrófagos conocidos como células de Kupffer. **(B)** Organización de los sinusoides. Los sinusoides están delimitados por un endotelio fenestrado formado por células endoteliales del sinusoides hepático (LSEC). Las células de Kupffer, los linfocitos y las células Dendríticas (CDs) inmaduras se localizan en los sinusoides. El espacio sub-endotelial se conoce como espacio de Disse y es por donde los linfocitos salen a los vasos linfáticos. [*Modificado de Nat Rev Immunol. 2003. 3(1):51-62.*]

La sangre se introduce en los sinusoides hepáticos desde las pequeñas ramas de la arteria hepática y de la vena porta, circula en forma centrípeta por el lobulillo y lo abandona por la vena central. La bilis, por el contrario, es secretada por los hepatocitos a los finos canalículos biliares intercelulares, y de ellos drena por los conductos biliares para acumularse en la vesícula biliar, desde donde la bilis se vierte al duodeno a través del conducto colédoco (Bloom y Fawcett, 1975; Ham y Cormack, 1984).

1.4. Generalidades sobre el trasplante renal

Un trasplante de riñón es una cirugía que se realiza para reemplazar un riñón enfermo o dañado por el riñón de un donante. El donante puede ser un *familiar* o *donante vivo no emparentado*, o bien, puede ser una persona fallecida, en este caso hablamos de *donante cadavérico*. El urólogo hace una incisión en la parte inferior del abdomen para poder conectar el riñón donado a sus arterias, venas y uretra. En la mayoría de los casos, se dejarán los riñones dañados en su lugar. El nuevo riñón puede empezar a producir orina inmediatamente o al poco tiempo después de la cirugía. Más del 90% de los riñones trasplantados que provienen de donantes fallecidos siguen funcionando después de un año. El porcentaje de éxito suele aumentar cuando el riñón proviene de un donante vivo.

Los riñones han sido los órganos más frecuentemente trasplantados durante muchos años. El primer trasplante renal fue realizado por el Dr. Yury Voronoy en Rusia en el año 1933 a partir de un donante cadáver de 60 años y el receptor fue una mujer (Ortega *et al.*, 2012; Del Castillo-Olivares *et al.*, 1999). Dos días después del trasplante la paciente tuvo fallo del injerto. El primer trasplante renal entre humanos llevado a cabo con éxito tuvo lugar en Boston en 1947 (Terasaki, 1991). El riñón excretó la orina durante un solo día y luego dejó de funcionar. A pesar de esto, se reestableció la diuresis normal dos días más tarde y la paciente se recuperó. El primer trasplante renal en el cual se utilizó radiación como terapia inmunosupresora se llevó a cabo en la misma ciudad en 1958, realizado por el equipo del Dr. Murray, premio nobel de medicina (Terasaki, 1991; Starzl, 2000).

La supervivencia de los receptores renales en aquellos años era muy baja debido a que no había tratamiento que previniera la aparición de rechazo. A finales de la década de los 50 se realizaron los primeros intentos para tratar los episodios de rechazo. Los primeros tratamientos inmunosupresores consistían en la irradiación intensiva del receptor del aloinjerto (Del Castillo-Olivares *et al.*, 1999).

La probabilidad de que un aloinjerto renal tenga una alta supervivencia y con buena función renal durante al menos el primer año post-trasplante, poco a poco ha ido en aumento. La supervivencia del paciente después del primer año post-trasplante es aproximadamente del 90% (Sykes, 2003).

Sin embargo, incluso los receptores emparentados de trasplantes renales deben, en su mayor parte, tomar medicamentos inmunosupresores por el resto de sus vidas. Estos pacientes son susceptibles a las complicaciones de los tratamientos inmunosupresores, incluyendo un mayor riesgo de infección, cáncer, hipertensión, y enfermedades óseas metabólicas, ya que el éxito del trasplante clínico es una espada de doble filo.

Los tres obstáculos principales de un exitoso trasplante renal son ahora la escasez de órganos, el problema de la sensibilización, y el rechazo crónico de los riñones que pueden ocurrir tras muchos años. En parte, debido al creciente éxito del trasplante renal, el número de candidatos para el procedimiento ha ido creciendo y ahora supera con creces la oferta de órganos disponibles. A diferencia de los corazones e hígados, donde un inadecuado suministro de órganos conduce a la muerte de muchos candidatos, los que están esperando un trasplante renal en cambio se enfrentan a largos períodos en diálisis. Este tiempo de espera es a menudo largo, incluso para los candidatos no sensibilizados que esperan un riñón de donante cadáver. El segundo obstáculo importante en la obtención de un trasplante con éxito se deriva de la existencia de candidatos sensibilizados con presencia de Acs resultantes de exposición a aloAgs. Estos individuos altamente sensibilizados pueden esperar muchos años para obtener un riñón que resulte en una prueba cruzada negativa, y algunos nunca recibirán un trasplante en absoluto.

El fracaso tardío en los trasplantes de riñón muchos años después del procedimiento implica probablemente un componente de rechazo inmunológico, pero también puede ser debido a otros factores, incluyendo los efectos de la lesión isquémica temprana y los persistentes efectos de las drogas y las anormalidades metabólicas en el receptor. Aunque la tasa de supervivencia al año del trasplante renal ha mejorado de un 40% a casi el 90% en los últimos 40 años, la vida media condicional para los trasplantes de riñón apenas ha aumentado y es todavía menor de 10 años en algunas series.

El uso de fármacos inmunosupresores mejores ha reducido la importancia de las compatibilidades genéticas coincidentes y la creciente lista de espera para donantes cadavéricos ha puesto de manifiesto la importancia de encontrar donantes vivos.

Entre los factores de riesgo inmunológico que se han sugerido para la mala evolución del trasplante renal estarían, la incompatibilidad HLA, la subóptima inmunosupresión, Acs citotóxicos elevados, retrasplante y aparición de rechazo agudo. Entre los factores de riesgo no inmunológicos tendríamos, la raza, edad y sexo del donante, el status del donante (tiempo de isquemia), hipertrigliceridemia, hipertensión arterial e infección por CMV.

1.5. Características histológicas y funcionales del riñón

Los riñones son un órgano par de color pardo rojizo que se hallan en la parte posterior del peritoneo, a ambos lados de la columna vertebral. Tienen forma de alubia, con una superficie lisa que presenta una profunda depresión en su borde interno denominada *hilio renal*. El tamaño medio de un riñón adulto es de 10-12 cm de longitud, 5-7 cm de ancho y 3 cm de espesor, y su peso aproximado es de 115-155 gramos en las mujeres y de 125-170 gramos en los hombres. El riñón derecho se encuentra ligeramente más abajo que el izquierdo, ya que el hígado ocupa un gran espacio en el lado derecho. Los riñones están rodeados por un abundante tejido fibroso (Arévalo, 1997).

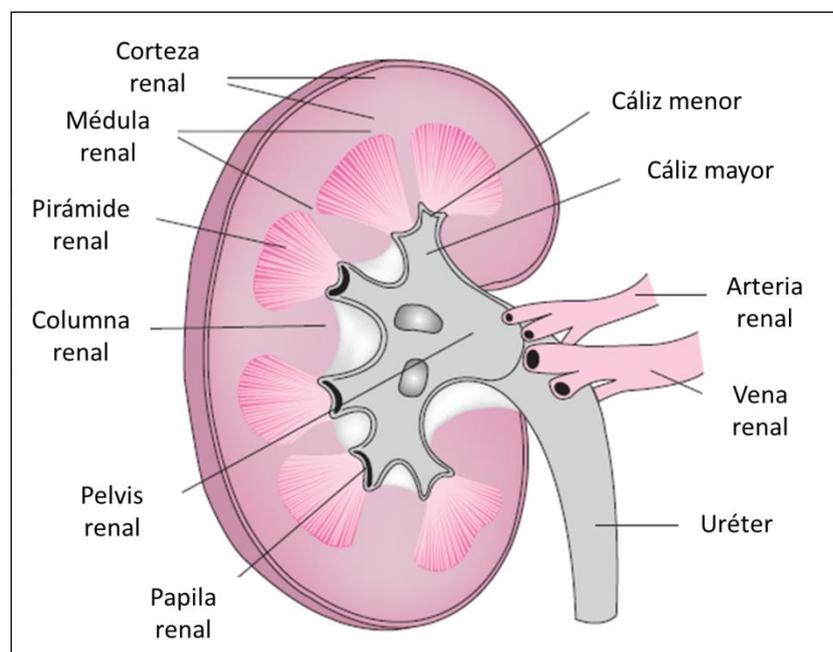


Figura 1.2. Sección longitudinal de un riñón. Estructura externa e interna. (Tomada y modificada Tresguerres, 2005).

En una sección sagital de un riñón se distinguen dos regiones: la más externa o *corteza*, de color rojizo parduzco y de aspecto granuloso, y la más interna o *médula* de color más pálido y de aspecto estriado. La médula, a su vez, se divide en *médula externa*, la más próxima a la corteza, y *médula interna*, la más alejada de la corteza.

La corteza renal se sitúa inmediatamente debajo de la cápsula y no forma una capa longitudinalmente separada de la médula, sino que surgen proyecciones hacia la médula que se denominan *columnas renales o de Bertín* (Figura 1.2). La médula renal está formada por unidades de aspecto cónico, con la base dirigida hacia la corteza y el vértice dirigido hacia el hilio, que son las *pirámides renales*; están separadas por las columnas renales y su número varía entre 12 y 18. Cada pirámide medular junto con la corteza renal asociada forma un *lóbulo renal*; por lo tanto, el riñón humano es multilobulado. El vértice de cada pirámide forma una *papila renal*, que se sitúa dentro de un *cáliz menor*. La unión de varios cálices menores forma un *cáliz mayor*, y los cálices mayores se reúnen para formar una estructura con forma de embudo, la *pelvis renal*, en donde se recoge la orina. La pelvis renal constituye la región superior del uréter que transporta la orina hasta la vejiga urinaria, donde se acumula hasta su vaciamiento (Cachofeiro *et al.*, 2005).

La unidad funcional del riñón es la *nefrona*, y es responsable de la formación de la orina. Cada riñón contiene alrededor de 1 millón de nefronas repartidas por la corteza renal. Este número se reduce con la edad, ya que el riñón no tiene capacidad de regenerar nefronas. La nefrona consiste en un grupo especializado de células que filtran la sangre y, posteriormente, modifican de manera selectiva el líquido filtrado mediante la reabsorción y secreción de diferentes sustancias. En cada nefrona se distinguen dos componentes principales: *el corpúsculo renal* y *el sistema tubular*. El corpúsculo renal, de forma esférica, está formado por una red de capilares interconectados que forman el glomérulo, *los capilares glomerulares*, que se encuentran englobados dentro de la *cápsula de Bowman*. Estos capilares se originan en la *arteriola aferente* y se reúnen para formar la *arteriola eferente*. La cápsula de Bowman constituye la parte inicial del sistema tubular de la nefrona. Se invagina para englobar el glomérulo, dejando en su interior *el espacio de Bowman o espacio urinario*, donde se recoge el líquido filtrado en los glomérulos. La capa interna (visceral) de la cápsula, que está en contacto con los capilares del glomérulo, está formada por unas células epiteliales modificadas, denominadas *podocitos*, los cuales presentan numerosas proyecciones citoplasmáticas que se dirigen a las paredes de los capilares glomerulares. La capa visceral de la cápsula de Bowman se continúa con una capa parietal constituida por un epitelio plano simple. Las células endoteliales de los

capilares glomerulares y los podocitos son dos de los componentes de la *barrera de filtración glomerular* (Tisher y Madsen, 1996; Verland, 1998).

La eliminación de los productos de desecho del metabolismo es necesaria para mantener un funcionamiento normal del organismo, y el riñón es el principal medio de que dispone el organismo para eliminarlos. Entre estos productos se encuentra: la urea, formada a partir del metabolismo de las proteínas, el ácido úrico, derivado de los ácidos nucleicos, la bilirrubina, procedente de la degradación de la hemoglobina, la creatinina, formada en el metabolismo muscular y los metabolitos de algunas hormonas. Además los riñones eliminan sustancias químicas extrañas que son ingeridas habitualmente, como son los fármacos, los pesticidas y los aditivos de los alimentos.

Una de las principales funciones que ejerce el riñón es la regulación del volumen y la osmolaridad del líquido extracelular y, por tanto, la regulación del intercambio entre el medio interno y el medio externo, ya que el riñón es el órgano primario responsable del control del equilibrio hidroelectrolítico. Gracias a esta función homeostática, los riñones proporcionan un medio relativamente constante para que los tejidos y las células puedan llevar a cabo sus funciones normales.

1.6. Principios genéticos que gobiernan el trasplante de tejidos

La respuesta inmunitaria es un proceso fisiológico en el que de forma secuencial se suceden una serie de eventos complejos encaminados a la erradicación de un agente extraño dentro del organismo. En este proceso intervienen de forma conjunta células especializadas, factores solubles y tejidos. El primer paso de la respuesta adaptativa frente a un Ag extraño es el reconocimiento por los linfocitos T del Ag presentado en el contexto de MHC y su posterior activación. Una vez activado, el linfocito T se diferencia a célula efectora, responsable de la respuesta inmunitaria hacia el Ag diana.

Los aloAgs desencadenan respuestas inmunitarias celulares y humorales. El reconocimiento de las células trasplantadas como propias o extrañas depende de la presencia de determinados grupos de genes polimórficos heredados y que se expresan de forma codominante. Los responsables del rechazo son moléculas polimórficas que se expresan en el injerto. El *polimorfismo* se refiere al hecho de que estos Ags del injerto difieren entre los distintos individuos de una especie o entre cepas endogámicas distintas de animales. A mediados del siglo XX, se utilizaron cepas congénitas de ratones endogámicos para identificar al HLA (del inglés *Human Leukocyte Antigen*) como los

genes polimórficos que codifican las dianas moleculares del rechazo (Counce *et al.*, 1956; Snell *et al.*, 1961; McKenzie *et al.*, 1973; Klein *et al.*, 1976). Dado que la expresión de las moléculas del HLA, es decir, las dianas del rechazo en los injertos, es muy amplia, muchos tipos distintos de tejidos desencadenan respuestas de linfocitos T alorreactivos.

Las moléculas HLA son importantes en las respuestas inmunitarias normales frente a los Ags extraños y, en especial, en la presentación de los péptidos derivados de los Ags proteicos en una forma tal que permita su reconocimiento por los linfocitos T.

1.6.1. Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

El MHC es uno de los principales complejos génicos que intervienen en la regulación y funcionamiento del sistema inmunitario. Se trata de una región con un alto contenido en genes sumamente polimórficos cuyos productos se expresan en la superficie de las células. El MHC en humanos se denomina *HLA* y está constituido por un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (región 6p21.3)(Fig 1.3), que abarca 4,000 kbs y codifican proteínas implicadas en procesamiento de Ags proteicos y en la presentación de péptidos a células T (Klein y Sato, 2000; Abbas y Lichtman, 2004). Este complejo está compuesto por 3 subregiones: *clase I*, *II* y *III*. La región de clase I, cercana al telómero, contiene los loci HLA-A, -B y -C que agrupan genes que codifican Ags llamados Ags *HLA clásicos de trasplante*. Hacia el centrómero, se encuentra la región de clase III con genes del *complemento* C4, C2 y Bf, y *factor de necrosis tumoral* (TNF α y β), entre otros. La región de clase II engloba los genes HLA-DR, -DQ y -DP.

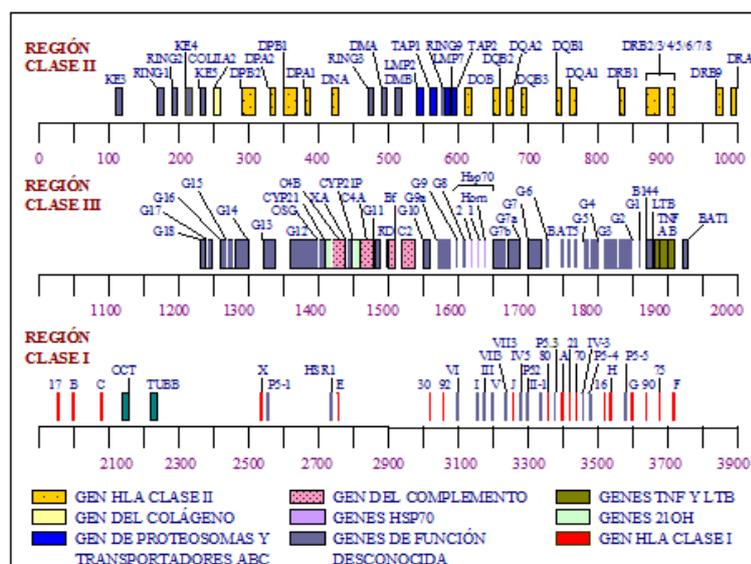


Figura 1.3. Mapa genético del complejo principal de histocompatibilidad (Tomado de Muro *et al.*, 1997).

1.6.1.1. Estructura de las moléculas HLA de clase I

Las moléculas de clase I constan de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente: una cadena α (cadena pesada) codificada por el locus HLA, de 44-47 kDa (340 aas) y una subunidad de 12 kDa codificada en el cromosoma 15, denominada β_2 -microglobulina. Ésta se une no covalentemente al dominio α_3 de la cadena pesada, y es necesaria para la expresión de la molécula HLA clase I en superficie celular. Su estructura se visualiza con detalle en la figura 1.4A.

Las cadenas α son *glicoproteínas de membrana tipo I*, con una región extracelular de 300 aas, porción transmembrana (TM) de 25 aas, y región citoplásmica con 30 aas. Los 3 dominios extracelulares se extienden desde la región α_3 , adyacente a membrana, a las regiones más distales α_2 y α_1 (Goodfellow *et al.*, 1975).

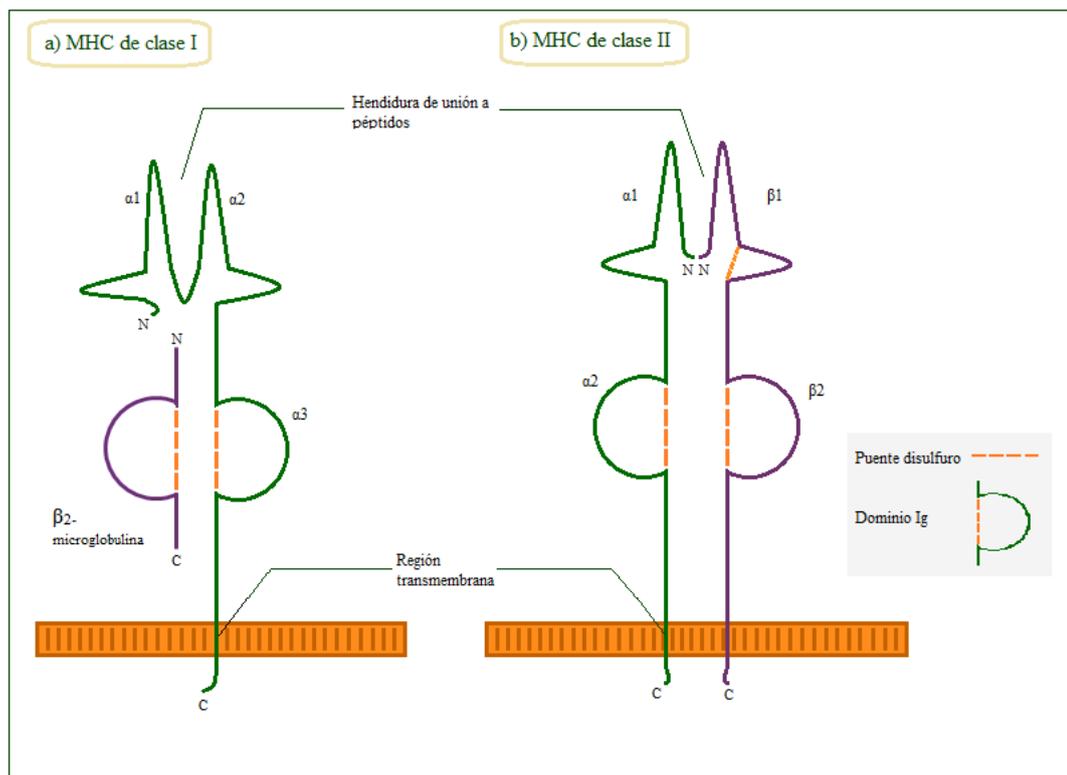


Figura 1.4. (A). Estructura de una molécula de clase I. (B) Estructura de una molécula de clase II. Abreviaciones: N, amino terminal; C, carboxilo terminal (Tomada y modificada de Abbas y Lichtman, 2004).

La mayor cantidad de polimorfismo en la secuencia de estas moléculas se localiza en unas *regiones hipervariables* (HVR) dentro de los dominios α_1 y α_2 (Arnett *et al.*, 1995). El dominio α_3 tiene un plegamiento del tipo de dominio de Igs, es menos polimórfico que los anteriores, y en su estructura se encuentra el sitio de unión a la

molécula CD8 del linfocito T. La cadena β 2-microglobulina es una proteína no polimórfica de 100 aas que presenta una estructura de dominio de Igs, a diferencia de la cadena α de HLA clase I, no posee región TM, por lo que se mantiene unida a través de su interacción con los dominios α 1, α 2 y α 3. Su principal función dentro del complejo es la de estabilizar el conjunto y ayudar a que las moléculas HLA adquieran la estructura terciaria adecuada.

La moléculas HLA de clase I totalmente ensamblada es un heterotrímero que consta de cadena alfa, β 2-microglobulina y un péptido antigénico unido y la expresión estable de las moléculas de clase I sobre la superficie celular requiere la presencia de los tres componentes del heterotrímero. Las moléculas MHC de clase I, expresadas en la mayoría de las células somáticas en el hombre, presentan niveles variables de tejido a tejido. Así, no se detecta expresión en la superficie expuesta del trofoblasto veloso, neuronas del sistema nervioso central, endotelio corneal y la porción exocrina del páncreas, y solamente se expresa a bajos niveles en el tejido endocrino, miocardio, músculo esquelético e hígado. La expresión de estas moléculas es influenciada por citoquinas y linfoquinas (Daar *et al.*, 1984; Khoury *et al.*, 1992; Rose 1993; Sollid 2000).

1.6.1.2. Estructura de las moléculas HLA de clase II

Las moléculas HLA de clase II son glicoproteínas de membrana de tipo I y están compuestas por dos cadenas polipeptídicas asociadas de forma no covalente, una cadena α de 31-34 kDa y una cadena β de 26-29 kDa. A diferencia de las moléculas de clase I, ambas moléculas de clase II están codificadas por genes polimorfos del MHC.

Los segmentos α 2 y β 2 de las moléculas de clase II, como α 3 y β 2-microglobulina de la clase I, están plegados en dominios Ig y no son polimorfos. El punto de unión para CD4 es un bucle presente en el segmento β 2, parecido al lugar de fijación para CD8 que existe en α 3 de las cadenas pesadas de clase I.

Cada una de ambas cadenas consta de una región citoplásmica de 12 a 15 aas, una región TM de 20-25 aas, y una región extracitoplásmica formada por 2 dominios de unos 90-100 aas. Los dominios próximos a la membrana de cada cadena, α 2 y β 2, poseen una estructura del tipo superfamilia de las Igs. Los segmentos amino terminales α 1 y β 1 de las cadenas de clase II interactúan para formar la hendidura de unión a péptidos, que es similar desde el punto de vista estructural a la de las moléculas de clase I (Brown *et al.*, 1988; Schwartz, 1991). Esta hendidura de unión a péptidos presenta extremos abiertos

que permiten la unión de péptidos de mayor tamaño que las moléculas de clase I (Chicz *et al.*, 1993; Hammer *et al.*, 1993; Benham *et al.*, 1995). Los residuos polimorfos están localizados en $\alpha 1$ y $\beta 1$, en la hendidura de unión a péptidos, como en las moléculas de clase I. La estructura de una molécula de clase II se expone en la figura 1.4B.

La cadena α de HLA-DR hasta ahora se ha considerado monomórfica. Las regiones hipervariables, para las moléculas HLA-DRB1, se sitúan entre las posiciones aas 25 a 40 y 65 a 80, y son las regiones diana de los métodos de tipaje (Jordan *et al.*, 1995). Las moléculas HLA-DQ y -DP son polimórficas en ambas cadenas α y β . En las moléculas de clase II, la mayor parte de los polimorfismos se encuentran en la cadena β . El péptido que ligan las moléculas HLA de clase II suele ser de origen exógeno, en contraste al carácter endógeno de que ligan los de HLA de clase I. Un polipéptido no polimorfo que se denomina *cadena invariante* (I_i) se asocia a moléculas de clase II sintetizadas *de novo*. La I_i tiene importantes funciones en el tráfico de moléculas de clase II y en la determinación del lugar de la célula en que se unen los péptidos a las moléculas de clase II.

La molécula de clase II totalmente ensamblada es un heterotrímero que consta de cadena alfa, cadena beta (Figura 1.4B) y un péptido antigénico unido y la expresión estable de las moléculas de clase II en la superficie celular requiere la presencia de todos.

En comparación con clase I, el rango de tejidos que expresan moléculas de clase II es limitado pero, por inducción por citocinas, el número de tejidos que pueden expresarlos aumenta. Constitutivamente, están presentes en la superficie celular de células B, monocitos, macrófagos y CDs, conocidas como *células presentadoras de antígeno* (CPA) (Janitz *et al.*, 1997). Además, las moléculas de clase II se encuentran también en determinados endotelios vasculares, epitelios ductales (senos, tracto gastrointestinal) y glomérulo del riñón (Daar *et al.*, 1984; Rose, 1993; Nepom *et al.*, 1995).

1.7. La respuesta inmunitaria alogénica

Los principios que rigen el reconocimiento alogénico constituyen uno de los principales campos de estudio de la inmunología. Dos son las características principales que permiten distinguir la respuesta alogénica de la respuesta inmunitaria normal. La primera es que, en comparación con el reconocimiento convencional de Ags, el reconocimiento alogénico es una de las respuestas inmunitarias más violentas que ocurren *in vivo*, de modo que de 1-10% de los linfocitos T del organismo responde frente a aloAgs, mientras que tan solo 1/10.000 linfocitos T responde frente a un determinado

patógeno. La segunda característica es que en el trasplante coexisten en el mismo organismo dos grupos de CPAs diferentes (donante y receptor), cada una de ellas facilitando la activación del sistema inmunitario.

1.7.1 Activación linfocitaria alogénica

La presencia de aloAgs y su reconocimiento por parte de las células T no es generalmente suficiente para que se produzca una respuesta frente al injerto; es necesario también que los linfocitos T reciban, de la CPA, una *señal coestimuladora* (CoS) (Lafferty *et al.*, 1983). Inicialmente, se consideró que la expresión de clase II era un marcador de las células con función CoS. Sin embargo, se ha demostrado que no todas las células que expresan dichos Ags son buenas activadoras de células T y que incluso, algunas de ellas, pueden ser tolerogénicas. Actualmente, se admite que la función CoS no viene determinada por la presencia de una única molécula de membrana sino por una combinación de factores como la densidad antigénica, la presencia de determinadas moléculas de adhesión y la capacidad de producir factores solubles (Kaye, 1995; Bluestone y Lechler, 1995). Además, debe de producirse lo que se conoce como *sinapsis inmunológica* entre las células T y CPAs, con una serie de interacciones entre receptores y sus ligandos, tales como TCR/CD3 con moléculas HLA, y moléculas de adhesión y CoS temprana y tardía (entre ellas, CD28/CTLA-4 - CD80 y CD86) (Allen *et al.*, 1997).

Las CDs son el arquetipo de CPA profesional (Stingl y Bergstresser, 1995) (con función CoS constitutiva), proceden de la médula ósea, y están en los tejidos trasplantados de forma pasajera por lo que, al cabo de un tiempo, son reemplazadas por células del receptor (Gouw *et al.*, 1987; Starzl *et al.*, 1996). Su presencia es uno de los factores clave para el inicio de la respuesta de rechazo celular o agudo (Steinman *et al.*, 1983), como demuestran los siguientes hechos: el rechazo agudo aparece casi exclusivamente durante los primeros 2 meses, periodo aproximado durante el cual persisten las células pasajeras del donante; la asociación entre compatibilidad HLA y supervivencia en el trasplante renal depende de lo que sucede en estos meses y, además, su eliminación (en trabajos experimentales) conduce a la aceptación del injerto.

Otras células como macrófagos y linfocitos B pueden actuar como CPAs para células T de memoria o primadas (Kaye, 1995); su efectividad en la activación de células T vírgenes es mucho menor que la de las CDs, pero pueden aumentarla.

En el hígado se ha señalado a las células de Kupffer como CPA y, por tanto, como principales desencadenantes de la activación de la respuesta inmunitaria alogénica y del

rechazo. Sin embargo, estudios experimentales muestran la incapacidad que tienen las células sinusoidales (células endoteliales y de Kupffer), para estimular linfocitos T alogénicos, a pesar de que expresan Ags HLA de clase II (Prickett *et al.*, 1988). La escasa presencia de CDs en el hígado y la falta de función CoS de las células sinusoidales, es uno de los hechos que se esgrimen para justificar que la respuesta inmunitaria hacia el este trasplante sea menor que frente al trasplante de riñón u otros (Gill *et al.*, 1993).

Se sabe que la respuesta inmunitaria hacia los Ags MHC es mucho mayor que contra cualquier otro Ag, fenómeno conocido como *alorreactividad*. Estos Ags son la principal diana del sistema inmunitario en la respuesta frente a trasplantes alogénicos y constituyen la principal barrera para su aceptación, ya que pueden provocar en el huésped una fuerte reacción inmunitaria que conduce a la destrucción del injerto. La alorreactividad puede considerarse un caso especial de reconocimiento antigénico, y puede ser directo o indirecto (Shoskes y Wood, 1994). El rechazo alogénico se produce como consecuencia de la activación incontrolada del sistema inmunitario innato y adquirido. Así, aparte de su implicación en la patogenia de las lesiones de base humoral, la activación de la cascada del complemento es también capaz de modular las respuestas T alorreactivas, probablemente cuando actúa a nivel de CDs. Asimismo, recientemente se ha demostrado la participación de los receptores tipo Toll (TLR) en la activación de las células de la respuesta inmunitaria innata durante el rechazo alogénico agudo. Por último, el papel de las células *natural killer* (NK) en el rechazo alogénico es todavía controvertido. Por un lado existen evidencias que indican que poblaciones de NKs están implicadas en la inducción de tolerancia a aloAgs tras el bloqueo de las señales CoS (López-Álvarez *et al.*, 2011 y 2009); por otro lado, las células NK constituyen una barrera considerable durante el trasplante de células hematopoyéticas (Farhan *et al.*, 2012).

Los linfocitos T del receptor reconocen de dos formas los aloAgs del donante. Un primer tipo de reconocimiento es el denominado *directo*, a saber, los linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ del receptor reconocen determinantes peptídicos directamente en la molécula MHC intacta del donante expresada en la superficie del injerto. La frecuencia de este tipo de linfocitos T alorreactivos que reconocen aloAgs por la vía directa es muy elevada, así como la diversidad de sus receptores antigénicos.

En paralelo con esta vía de reconocimiento existe una vía *indirecta*. Parte de las CPAs del receptor procesan y presentan como péptidos las moléculas del MHC del donante. Este tipo de respuesta inmunitaria es, por tanto, una respuesta restringida al MHC propio. A diferencia de los que ocurre en el reconocimiento directo, la frecuencia

de las células T alorreactivas de la vía indirecta es mucho menor; y el repertorio de TCR, mucho más restringido. La contribución de cada una de estas vías de reconocimiento a la regulación de la respuesta alogénica es en gran medida aun desconocida.

Además de la interacción entre el TCR del receptor y el aloAg, se requieren otras señales accesorias para la activación efectiva de los linfocitos alorreactivos. Estas *señales coactivadoras*, englobadas bajo el término de *segunda señal*, son mediadas por la interacción entre receptores expresados en la superficie de las células T alorreactivas y sus respectivos ligandos en la superficie de las CPAs del donante (vía directa) o del receptor (vía indirecta). La ausencia de estas señales CoS o coactivadoras pueden provocar la tolerancia en lugar de la activación de los linfocitos T alorreactivos. De las interacciones celulares que se pueden establecer entre ambas poblaciones celulares, destacan las interacciones entre los miembros de la familia CD28 (CD28, CTLA-4, *inducible co-stimulator ligand* [ICOS], PD-1) y sus ligandos de la familia B7 (B7-1 [CD80], B7-2 [CD86], B7-H1, ICOSL, entre otros), y entre las moléculas CD154 y CD40. La relevancia de estas interacciones moleculares en los fenómenos de rechazo queda de manifiesto por cuanto su bloqueo promueve la inducción de tolerancia de linfocitos T alorreactivos y la persistencia del injerto en diversos modelos experimentales.

La inducción de la *primera* (alorreconocimiento específico) y *segunda* señal (coactivación) activan 3 vías de transducción de señales intracelulares: calcio/calcineurina, Ras/MAP cinasa y NF- κ B. Éstas inducen la expresión de diversas moléculas, entre las que destacan IL-2 y su receptor (que incluye CD25 o la cadena α de dicho receptor). La señalización a través de la cadena γ común del receptor de IL-2 mediante JAK3 activa la PI3 cinasa y ésta, a su vez, mTOR; constituye la *tercera señal* y la entrada en el ciclo celular iniciando la proliferación de los linfocitos T alorreactivos, que precisan de nucleótidos para la síntesis de ADN (Figura 1.5). Las células B alorreactivas se activan habitualmente en los ganglios linfáticos cuando encuentran el aloAg y producen aloAcs DSA. De este modo, en pocos días se genera todo el arsenal preciso para rechazar el aloinjerto. Los fármacos inmunosupresores empleados en el trasplante actúan habitualmente en uno o más sitios de este modelo de las tres señales.

Una característica muy importante en las respuestas inmunitarias alorreactivas es que existe una elevada frecuencia de células T que son capaces de reconocer y responder contra aloAgs, principalmente proteínas obtenidas como el resultado de la expresión de los genes que codifican HLA (Auchincloss *et al.*, 1993; Suchin *et al.*, 2001).

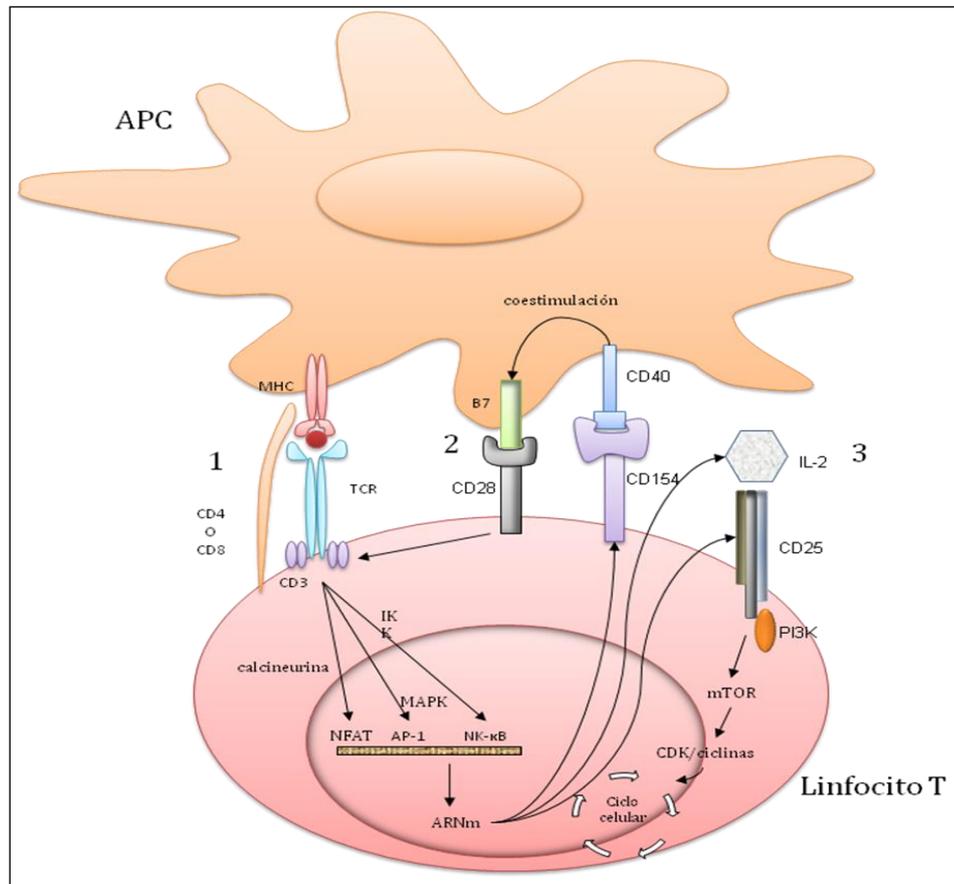


Figura 1.5. Pasos en la activación de los linfocitos T que median la respuesta inmunitaria responsable del rechazo del aloinjerto. Los antígenos del donante son presentados por la vía directa o indirecta a las APC en el contexto del MHC. Esto genera la *primera señal* (1) y la formación de la sinapsis inmunológica. CD80 y CD86 (B7) en la CPA interaccionan con CD28 en la célula T y se genera la *segunda señal* (2). Ambas señales activan tres rutas de transcripción, a saber, NFAT, AP-1 y NF- κ B, respectivamente. Como consecuencia, se induce la expresión de CD154 en la superficie de la célula T, el cual se unirá a CD40 en la superficie de la APC, así como también se induce la expresión de IL-2 y la expresión del receptor de la IL-2 de alta afinidad en la superficie de la célula T. La unión de diversas citocinas que comparten la unión a la cadena γ del receptor de la IL-2 induce la *tercera señal* (3) en la célula T, a través de la ruta de la PI3 cinasa y de mTOR, se inicia el ciclo celular responsable de la expansión clonal del linfocito T alorreactivo. (Tomada y modificada de Monitorización de la inmunosupresión vol.8, 2008).

1.7.2 Reconocimiento allogénico directo

El concepto de reconocimiento directo se basa en la observación de que los linfocitos T son capaces de reconocer de forma íntegra las moléculas de HLA alógenas presentes en las CPAs del donante, sin necesidad de que sean degradadas en péptidos y presentadas por las moléculas de HLA propias. Para comprender este mecanismo es necesario tener en cuenta que el TCR no reconoce únicamente el péptido, sino que

interacciona con el complejo HLA-péptido y que en el proceso de maduración de los linfocitos T CD4 y CD8 que tiene lugar en el timo, se seleccionan aquellos clones capaces de reconocer péptidos extraños presentados por las moléculas de MHC propia en lo que se conoce como *restricción por MHC* (Opelz, 1987 y 1992). Así, en condiciones normales, frente a un determinado Ag sólo se activarían un pequeño número de linfocitos capaces de reconocer los péptidos derivados del procesamiento de éste. Sin embargo, en el caso de la respuesta alogénica, la combinación de las moléculas de *MHC alogénicas+péptido alogénico* se reconocen por el sistema inmune como si se tratara de moléculas de *MHC propias+péptido extraño*. Esto provoca que un gran número de clones de linfocitos T que originalmente reconocerían Ags extraños presentados por moléculas de MHC propias, interaccionen de forma cruzada frente a moléculas de MHC alogénicas. Este mecanismo puede explicar porqué la respuesta alogénica es tan violenta e implica a un alto número de clones de linfocitos T.

El reconocimiento alogénico directo de aloAgs tiene lugar predominantemente desde la primera semana hasta meses después del trasplante y es generado como ya se ha comentado con anterioridad, por CPAs procedentes del donante, en conjunción con moléculas de HLA de clase II (Waanders *et al.*, 2008). Las células T CD4⁺ que presentan aloespecificidad por este reconocimiento directo, pueden mediar y ser responsables del desarrollo de rechazo del aloinjerto (Pietra *et al.*, 2000).

En el proceso de selección tímica, los linfocitos T reconocen péptidos antigénicos presentados sobre moléculas HLA propias (presentes en el epitelio tímico) (Kisielow *et al.*, 1988); así, frente a un determinado Ag, sólo se activa el pequeño número de linfocitos capaces de reconocer los *péptidos derivados del procesamiento* de éste. En cambio, en la respuesta alogénica los aloAgs pueden ser *directamente* reconocidos (sin necesidad de procesamiento) por los linfocitos T (Lechler *et al.*, 1990). Esta respuesta se dirige contra miles de nuevos determinantes antigénicos formados por alguna de las moléculas HLA alogénicas solas e incluso por un péptido alogénico cualquiera, de los numerosos que pueden derivarse del procesamiento de proteínas propias del injerto, lo cual supone la activación de un gran número de linfocitos T (Bach *et al.*, 1976) (Figura 1.6A).

Cuanto mayor sea el número de discordancias, mayor será la frecuencia de linfocitos T capaces de reaccionar frente al injerto y más probable la respuesta de rechazo. En el trasplante de riñón se ha demostrado una asociación entre el grado de compatibilidad, particularmente en HLA-DR y -B, con el rechazo agudo y la supervivencia (Opelz, 1987, 1992 y 1995) que, no es evidente en el trasplante de hígado.

Actualmente, en el trasplante de órganos se consideran las especificidades definidas serológicamente. Sin embargo, el grado de polimorfismo de los genes que codifican los antígenos HLA es más amplio e incluye variantes que difieren en pocos nucleótidos (Arnett y Parham, 1995; Marsh y Bodmer, 1995; Bodmer *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la diferencia entre la curva de supervivencia de pacientes con alto grado de compatibilidad y la de los de bajo grado se amplía si se utilizan métodos moleculares para el tipaje y selección de la pareja donante-receptor (Tong *et al.*, 1993; Opelz *et al.*, 1994).

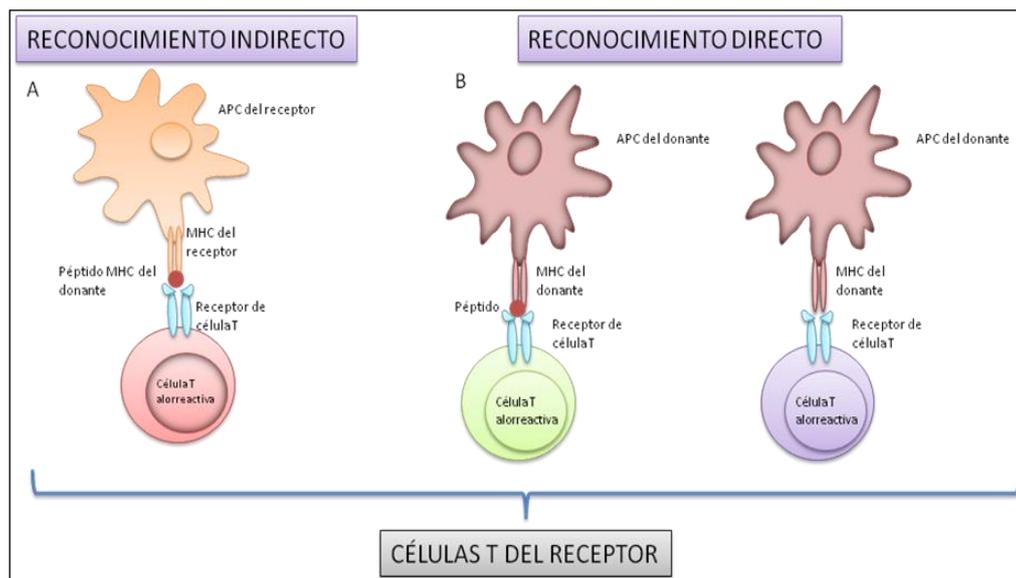


Figura 1.6. Esquema de las vías de reconocimiento directo (A) e indirecto (B), para la presentación de aloantígenos (Tomada y modificada de Abbas y Lichtman, 2004).

1.7.3. Reconocimiento alogénico indirecto

En la llamada *vía indirecta de reconocimiento*, los linfocitos T reconocen aloAgS procesados y presentados en moléculas MHC, por CPAs del receptor (Singer *et al.*, 1984; Lombardi *et al.*, 1989; Stock *et al.*, 1991) (Figura 1.6B). Si bien los linfocitos T $CD4^+$, así activados, no podrían reconocer directamente el injerto alogénico, es posible que sean capaces de promover la activación de células T $CD8^+$ citotóxicas aloespecíficas mediante la liberación de interleucinas (IL), o el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad retardada (Via *et al.*, 1990). La existencia de esta segunda ruta de alorreconocimiento se ha comprobado en numerosos estudios experimentales, aunque su importancia en la evolución del trasplante está en discusión (Colovai *et al.*, 1996; Molajoni *et al.*, 1997).

El alorreconocimiento indirecto puede darse a lo largo de toda la vida del injerto, puesto que las CPAs del receptor están continuamente migrando a través del injerto y

encontrando péptidos derivados del donante (Waanders *et al.*, 2008). El rechazo del injerto puede producirse tanto por el reconocimiento directo, como por el indirecto. Sin embargo, un papel protector de las células T en relación con el aloreconocimiento indirecto se ha visto asociado con la tolerancia en el trasplante. Los mecanismos de tolerancia inmunológica implican fenómenos de tolerancia central y tolerancia periférica (Auchincloss, 2001). Un ejemplo del papel del aloreconocimiento indirecto en la inducción de un estado de tolerancia central es la prolongación de la supervivencia del injerto después de la administración intratímica de péptidos MHC de donantes en roedores (Sayegh *et al.*, 1994; Oluwole *et al.*, 1999).

Se han obtenido evidencias que muestran que las moléculas MHC de clase II podrían presentar alopéptidos (De Koster *et al.*, 1989). La habilidad de las células T para reconocer péptidos alogénicos presentados por moléculas MHC clase II propias, se ha confirmado (Rosloniec *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1992). Por ejemplo, en esta línea, se han descrito líneas y clones de células T CD4⁺ humanas que reconocen péptidos derivados de moléculas HLA de clase I (Essaket *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1990) y, en experimentos *in vitro*, se ha demostrado el reconocimiento por la célula T de péptidos derivados de HLA clase I y II en el contexto de MHC clase I (Song *et al.*, 1988; Kievits e Ivanyi, 1991).

Actualmente hay importantes indicios que dan apoyo a que esta vía de presentación es importante en las alorrespuestas frente a injertos. Así, Wakabayashi *et al.* (1993), han publicado que la mayoría de CDs en biopsias de trasplante renal humano son en realidad del receptor. El análisis de la habilidad de las drogas inmunosupresoras para modular las vías de colaboración de las células Th *in vivo* e *in vitro* apunta a que la estimulación de las células T CD4⁺ restringidas por MHC propio se ve afectada, y que la inhibición de esta vía se correlaciona con el *status* del injerto en pacientes inmunosuprimidos con trasplante renal (Clerici y Shearer, 1990). Además, se ha reconocido durante años que esta vía es responsable del comienzo del rechazo de injertos de médula MHC compatibles, ya que Ags menores de histocompatibilidad son reconocidos como péptidos presentados en asociación con MHC del receptor (Theobald, 1995).

La existencia de un mayor grado de compatibilidad, que dificultaría el reconocimiento directo, podría favorecer la mayor evidencia del reconocimiento indirecto, que se posibilitaría mediante el reconocimiento de células alogénicas por linfocitos T activados frente a CPAs profesionales propias (Ontañón, 1997; 1998).

1.8 Mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria alogénica

La activación y rápida expansión de los linfocitos T en respuesta a los aloAgs es un proceso crucial para el desarrollo de los mecanismos de rechazo al injerto o la tolerancia. Este proceso está altamente regulado, implicando múltiples señales diferentes pero interrelacionadas. Los mecanismos que se ponen en marcha después de haber recibido un trasplante implican a todas las ramas del sistema inmunitario, tanto innato, como adaptativo, a saber, activación de linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ con la consiguiente liberación de citocinas que van modular las respuestas inmunitarias alorreactivas.

En el presente trabajo de tesis doctoral se ha medido la respuesta, tanto humoral como celular, inmunitaria alogénica que se produce en el receptor después de recibir un injerto y que implica a todo un arsenal de células T, citocinas, marcadores de activación, etc. Es por ello que, a continuación, creo conveniente hacer referencia a las principales líneas efectoras en las alorrespuestas inmunitarias frente al injerto, y que actualmente se encuentran bajo un proceso activo de investigación por tener efectos importantes tanto en los fenómenos de rechazo como en tolerancia.

1.8.1. Linfocitos T CD3⁺CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ son importantes mediadores en las reacciones inmunitarias adaptativas contra determinados patógenos, tales como, virus, protozoos y bacterias restringidos por las moléculas de HLA de clase I (John *et al.*, 2000; Gabrielle y Kallies, 2010). En estudios recientes se ha puesto de manifiesto el papel que desempeñan los linfocitos T CD8⁺ en los mecanismos de rechazo del injerto (Zhai *et al.*, 2002).

1.8.1.1 Diferenciación de los linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ vírgenes se diferencian en linfocitos T citotóxicos (LTC), que son los linfocitos T efectores que reconocen y destruyen las células diana que expresan Ags peptídicos extraños asociados a moléculas HLA de clase I. Estos linfocitos LTC CD8⁺ y de memoria tienen un papel importante en el control de las infecciones por virus y por otros patógenos intracelulares, y del control de células propias transformadas (Glimcher *et al.*, 2004; Harty *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2006). Los LTC CD8⁺ son activados por señales que provienen del TCR y de las moléculas CoS en respuesta al contacto con moléculas HLA de clase I: péptido presentado por células infectadas o transformadas (Bachmann *et al.*, 2007). La diferenciación de pre-LTC a LTC activos

implica la adquisición de los mecanismos para llevar a cabo la destrucción de la célula diana. El rasgo más específico de la diferenciación de los LTC es el desarrollo de gránulos citoplasmáticos rodeados de membrana que contienen perforina y granzimas, cuya función es destruir otras células. De forma similar a las células NK, los LTC median la destrucción de la célula diana vertiendo el contenido de sus gránulos citotóxicos en el interior de la célula infectada. Además, los LTC diferenciados, como los T_H1 , son capaces de secretar citocinas, fundamentalmente $IFN\gamma$, linfotóxina y TNF, que activan a los fagocitos e inducen inflamación. La inducción de la secreción de $IFN\gamma$ es debida a la activación de la célula vía TCR o en respuesta a IL-12 e IL-18 (Glimcher *et al.*, 2004). Las señales que estimulan la diferenciación de los linfocitos T $CD8^+$ vírgenes en LTC son Ags, moléculas coestimuladoras y linfocitos T $CD4^+$ cooperadores.

Mientras las células NK y NKT son capaces de secretar $IFN\gamma$ pocas horas después de su estimulación, ya que expresan de forma constitutiva grandes cantidades de ARNm de $IFN\gamma$ para una rápida producción y secreción del mismo; para la diferenciación de las células T vírgenes $CD4^+$ y $CD8^+$ en células secretoras eficientes de $IFN\gamma$ se requieren muchas rondas de proliferación. Mientras las células van proliferando, las señales del microambiente que las rodea influyen a su vez, en la expresión y en la activación de receptores específicos, moléculas “aguas abajo” que transmiten señales intracelulares y factores de transcripción, que harán que estas células T $CD4^+$ y $CD8^+$ expresen $IFN\gamma$, reorganicen el locus *IFNG* en humanos y consigan la diferenciación hacia un linaje de célula efectora $CD4^+$ T_H1 o $CD8^+$ CTL (Murphy y Reiner, 2002; Reiner, 2001; Reiner y Seder, 1999). Las células T $CD8^+$ vírgenes están programadas para diferenciarse en células efectoras citotóxicas productoras de $IFN\gamma$ por defecto, mientras que las células T vírgenes $CD4^+$ pueden diferenciarse en un número determinado de diferentes subpoblaciones efectoras, en donde solo la subpoblación de linfocitos $CD4^+$ T_H1 es capaz de producir grandes cantidades de $IFN\gamma$. En el caso concreto de las células T $CD8^+$ vírgenes, las señales provenientes del TCR y de moléculas CoS inducen la diferenciación plenamente comprometida hacia LTC, la cual es capaz de secretar $IFN\gamma$ y matar directamente células infectadas o transformadas que expresan complejos HLA-I:péptido. El compromiso directo que emprenden estas células T vírgenes $CD8^+$ hacia LTC efectoras capaces de producir $IFN\gamma$ se cree que resulta de la expresión constitutiva del factor T-bet por las células T $CD8^+$ vírgenes (Pearce *et al.*, 2003). En las células T $CD8^+$, las cuáles son menos dependientes para su diferenciación de IL-12, al contrario que las células T $CD4^+$ (Carter y Murphy, 1999), $IFN\alpha$ es suficiente para promover la

proliferación clonal necesaria para alcanzar las funciones efectoras como LTC, pero su efecto es considerablemente menor que el de IL-12 en la diferenciación hacia células productoras eficientes de IFN γ (Curtsinger *et al.*, 2005).

1.8.1.2 Reconocimiento antigénico y activación de los LTCs

El LTC se une a la célula diana usando su TCR y moléculas accesorias, como CD8 e integrina LFA-1. Para ser reconocidas eficazmente por los LTC, las células diana deben expresar moléculas HLA clase I unidas a un péptido de origen intracelular; complejo que sirve de ligando para TCR/correceptor CD8 e ICAM-1 (ligando principal de LFA-1).

En los conjugados LTC-célula diana, los receptores de antígeno del LTC reconocen los péptidos asociados a moléculas HLA-I existentes en la célula diana. Este reconocimiento induce el agrupamiento de los receptores del linfocito T en una sinapsis y genera señales bioquímicas que activan al LTC. Los CoS y las citocinas que se requieren para la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes en LTC activos no son necesarios para el desencadenamiento de la función efectora de los LTC, es decir, la muerte de la célula diana. Por tanto, una vez que los linfocitos T CD8⁺ específicos de un Ag se han diferenciado en LTC completamente funcionales, pueden destruir cualquier célula nucleada que muestre el Ag por el que éstas son específicas (Murphy y Reiner, 2002).

1.8.1.3 Mecanismos efectores de los linfocitos T citotóxicos

Los microorganismos intracelulares que encuentran un refugio fuera de los fagosomas y en las células no fagocíticas no pueden eliminarse mediante la activación de fagocitos mediada por linfocitos T. La única forma de erradicar las infecciones establecidas causadas por tales microbios consiste en destruir las células infectadas y ésta es la función de los LTC. La muerte celular por LTC es específica de Ags y dependiente de contacto. Los LTC destruyen células diana que expresan el mismo Ag asociado a HLA clase I que desencadena la proliferación y diferenciación de los pre-LTC, pero no las células infectadas adyacentes que no expresan este mismo Ag (John *et al.*, 2000). De hecho, ni siquiera los propios LTC se dañan durante la muerte de las células diana que expresan el Ag. Esta especificidad de la función efectora de los LTC asegura que las células normales no sean destruidas por los LTC que reaccionan contra las células infectadas. Esta alta especificidad destructora se debe a que la actividad de los LTC está desencadenada por el contacto físico con sus dianas (Russell y Ley, 2002).

El proceso de destrucción de las células diana mediada por los LTC consta del reconocimiento antigénico, la activación de los LTC, la destrucción de la célula diana y la liberación de los LTC (Figura 1.7). Cada uno de estos pasos está controlado por proteínas e interacciones moleculares específicas. A los pocos minutos del reconocimiento por parte de un LTC de su diana, la célula diana sufre cambios que la inducen a morir por apoptosis. La muerte de la célula diana ocurre en un plazo de 2-6 horas y sigue adelante incluso aunque se separe el LTC. El mecanismo principal de la citolisis mediada por LTC es la liberación de las proteínas citotóxicas de los gránulos en la célula diana reconocida por los LTC (Boehm *et al.*, 1997; Russell y Ley, 2002). Las dos proteínas más claves para la función efectora LTC son perforina y granzima (Kaech & Ahmed, 2001).

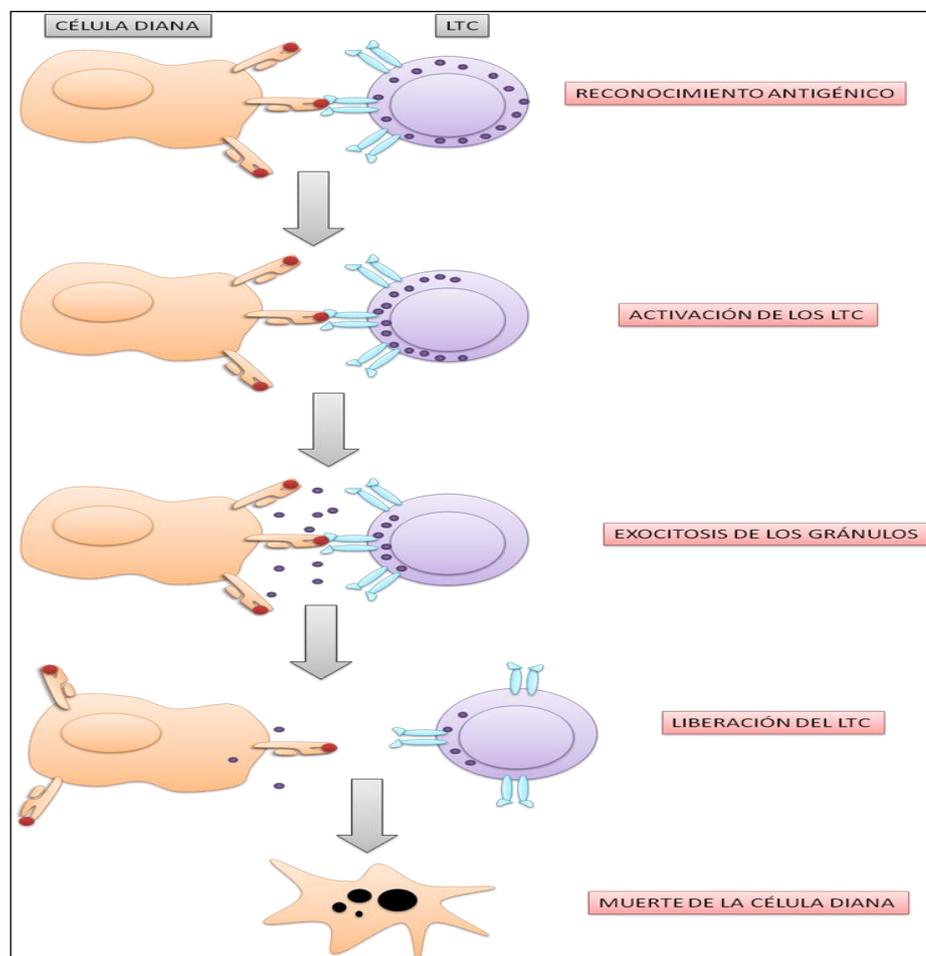


Figura 1.7. Pasos en la lisis de las células diana mediada por LTC. Un LTC reconoce una célula diana que expresa un Ag viral o transformado, y se activa. La activación da lugar a la liberación del contenido de los gránulos del LTC, actuando sobre la célula diana. El LTC puede entonces separarse y destruir otra célula diana mientras la primera se está destruyendo. Es de destacar que esta formación de conjugados entre el LTC y su célula diana, junto con la posterior activación del LTC requiere también interacciones entre moléculas accesorias que en el esquema no se muestran (LFA-1, CD8) sobre el LTC y sus ligandos específicos sobre la célula diana (Tomada y modificada de Abbas y Lichtman, 2004).

La perforina es una proteína que forma poros y que está presente en forma de monómero en los gránulos del LTC. Cuando se excita de los gránulos, los monómeros de perforina se ponen en contacto con altas concentraciones de calcio en el espacio extracelular, dando lugar a su polimerización, y formando un canal acuoso. Las granzimas son serín-proteasas que penetran en la célula diana a través de estos canales. La granzima B, la más importante de estas enzimas, rompe proteolíticamente y, por tanto, activa las enzimas responsables de la activación de la apoptosis, denominadas caspasas. Además, si se crea un número suficiente de poros de perforina en la membrana de la célula diana, ésta será incapaz de eliminar iones y agua. La célula diana muere porque la entrada de agua provoca su hinchazón osmótico y también porque la alta concentración de ión calcio que penetra en la célula puede también desencadenar la apoptosis.

Los LTC utilizan otro mecanismo de destrucción que está mediado por interacciones entre moléculas de membrana de los LTC y las células diana. En la activación, los LTC expresan una proteína de membrana denominada ligando de Fas, FasL (CD178), que se une a su proteína diana Fas (CD95), la cual se expresa en muchos tipos de células. Esta activación también da lugar a la activación de las caspasas y la apoptosis de la célula diana (Grewal y Flavell, 1998 y 1996). Los propios LTC no se dañan durante la muerte de la célula diana, debido a que la liberación de los gránulos citotóxicos ocurre sobre la membrana plasmática de la célula diana y lejos de los LTC.

1.8.2 Linfocitos T CD3⁺CD4⁺

En contraste con las células T CD8⁺, las cuales se diferencian únicamente en LTC productores de IFN γ , las células T CD4⁺ pueden adoptar una gran variedad de respuestas efectoras funcionales mediadas por subpoblaciones distintas, es decir, que pueden diferenciarse en subpoblaciones de células efectoras que sintetizan distintos grupos de citocinas y, por tanto, realizan distintas funciones efectoras. Hasta el momento, se han descrito varias subpoblaciones efectoras de células T CD4⁺ diferentes: T_H1, T_H2, T_H3, T_H9, T_H17, Tr1 y Treg (Dong, 2006; Harrington *et al.*, 2006; Murphy y Reiner, 2002; Weaver *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2012; Stassen *et al.*, 2012). La base de esta especialización es la heterogeneidad de los linfocitos CD4⁺, demostrada por la existencia de subpoblaciones que se diferencian en la forma de inducción, las citocinas que producen y los mecanismos efectoros que activan.

1.8.2.1. Diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en subpoblaciones de células efectoras

Los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en subpoblaciones de células efectoras que sintetizan distintos grupos de citocinas y, por tanto, realizan distintas funciones efectoras (Figura 1.8). Como ya se ha mencionado, las células T CD4⁺ vírgenes presentan una plasticidad enorme pudiéndose diferenciar en subpoblaciones celulares altamente especializadas. Cuando son estimuladas vía TCR y vía moléculas CoS, las células vírgenes T CD4⁺ transcriben y producen grandes cantidades de IL-2 y también producen pequeñas cantidades de IFN γ e IL-4 (Grogan y Locksley, 2002), pudiendo adoptar múltiples fenotipos de células efectoras.

La coactivación inicial de los genes de IFN γ , IL-4, e IL-2, en las células T vírgenes ocurre a través de la rápida activación de varios factores de transcripción que presentan una expresión constitutiva, incluyendo el factor nuclear de células T activadas (NFAT), factor nuclear κ B (NF κ B) y el activador de la proteína-1 (AP-1). Esta coactivación podría ser facilitada por la yuxtaposición de los genes que codifican estas citocinas en el núcleo de las células T vírgenes (Spilianakis *et al.*, 2005).

Con la diferenciación en cualquier subpoblación de células efectoras (T_H1, T_H2, T_H17, etc...) se va a determinar si la respuesta inmune resultante será la apropiada para los distintos tipos de patógenos. Para ello es necesario que se transcriba el factor dominante para cada subpoblación, y que gobierna la elección hacia un destino celular u otro. Es totalmente necesario un medio ambiente adecuado proporcionado por las citocinas secretadas por las CPAs, las cuáles utilizan todo un arsenal de señales que van a inducir en consecuencia el destino celular apropiado (Pulendran y Ahmed, 2006).

Otros factores implicados en la elección de linaje celular son la naturaleza de la CPA y la magnitud de la estimulación a través del TCR y moléculas CoS. Con una señalización fuerte y más duradera, generalmente se ve favorecido el desarrollo hacia T_H1. Sin embargo, el actual entorno de citocinas durante la diferenciación de células T CD4⁺ sigue necesitando de una mayor comprensión y caracterización en cuáles son los pasos que se dan en la diferenciación temprana de cada una de las subpoblaciones.

1.8.2.2. Linfocitos T CD4⁺ T_H1

Las citocinas tienen un papel importante en la inducción y mantenimiento de IFN γ , y en la diferenciación hacia el linaje T_H1 de las células T CD4⁺. El desarrollo de las

células T CD4⁺ T_H1 está fuertemente influenciado por el IFN γ producido por las células NK y por IL-12 e IL-18 producidas por las CDs y otras CPAs. La unión de IFN γ a su receptor en la superficie de las células T CD4⁺ conduce a la fosforilación de STAT1 y su translocación al núcleo, que junto con las señales proporcionadas por el TCR y la molécula CoS CD28, inducen la expresión de T-bet (Lighvani *et al.*, 2001) (Figura 1.8). La inducción de la transcripción de IFN γ y el compromiso hacia el linaje T_H1 por T-bet, es facilitado por la habilidad de éste de activar dos factores de transcripción adicionales, Hlx (Mullen *et al.*, 2002) y Runx3 (Djuretic *et al.*, 2007). Runx3 se une de forma cooperativa con T-bet en el promotor del gen *Ifng* para inducir su transcripción y en el promotor del gen *Il4* para silenciar su expresión (Djuretic *et al.*, 2007). De esta forma se asegura la célula un desarrollo hacia la dirección del linaje T_H1. Hlx facilita la transcripción del gen *Ifng* gracias a que favorece la accesibilidad del promotor de *Ifng* a la maquinaria necesaria para su transcripción (Mullen *et al.*, 2002); además ayuda a inducir la expresión de la cadena β 2 del receptor de IL-12 (IL-12R β 2) (Afkarian *et al.*, 2002). La unión de la citocina heterodimérica IL-12p35 e IL-12p40 a su receptor, formado por el heterodímero IL-12 β 1 e IL-12 β 2, produce la activación de la cascada Jak2/Tyk2 haciendo que STAT4 se fosforile y se transloque hacia el interior del núcleo (Trinchieri *et al.*, 2003), el cual uno de sus efectos es la inducción de la expresión del receptor para IL-18. IL-12 también activa a la proteína MAPK p38. La pérdida de la actividad de la subunidad p38 α en las células T, o bien por el uso de inhibidores farmacológicos o por tratarse de células deficientes en dicha subunidad, bloquea la producción de IFN γ en respuesta a la estimulación con citocinas pero no a la estimulación vía TCR (Berenson *et al.*, 2006). Las señales combinadas de IFN- γ , IL-12 e IL-18 maximizan la expansión y la óptima activación de las células Th1 (Grogan y Locksley, 2002; Ho y Glimcher, 2002; Murphy y Reiner, 2002), facilitando su permanente compromiso hacia el linaje T_H1. Por otro lado, los INF de tipo I, han sido implicados en la fosforilación de STAT4 y en la diferenciación hacia T_H1 en linfocitos T CD4⁺ humanos (Cho *et al.*, 1996; Rogge *et al.*, 1997; Tyler *et al.*, 2007). Cuando se combina con la estimulación por IL-18, IFN- α/β pueden conducir a una secreción aguda de IFN γ por las células T CD4⁺ (Athie-Morales *et al.*, 2004; Brinkmann *et al.*, 1993). Las células T_H1 son las encargadas de combatir infecciones de patógenos intracelulares, produciendo grandes cantidades de IFN γ e IL-2, las cuáles son responsables de estimular y mantener una respuesta inmunitaria celular efectiva. Aunque estas células han sido descritas con un papel protectoro contra patógenos intracelulares en

la defensa del huésped, las células T_H1 han sido implicadas en respuestas patológicas como reacciones de autoinmunidad órgano-específicas (Murphy y Reiner, 2002).

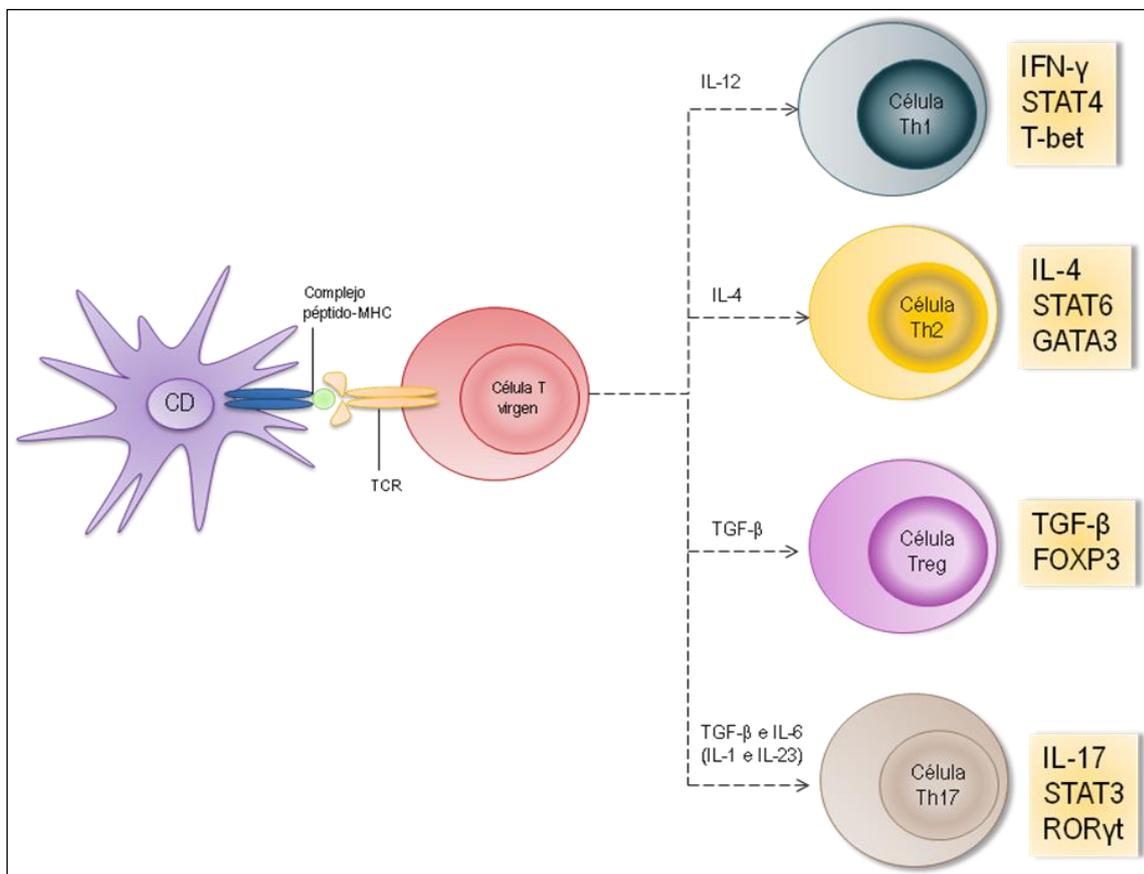


Figura 1.8. Después de la activación por una CPA, como la célula dendrítica, las células T $CD4^+$ vírgenes pueden diferenciarse de forma polarizada en diferentes subpoblaciones celulares efectoras – células T_H1 , T_H2 , T_H17 y células T reguladoras (Treg)- dependiendo de las citocinas que hayan en el medio que las rodea. La diferenciación de cada una de estas subpoblaciones celulares efectoras está controlada por un conjunto específico de factores de transcripción propios para cada subpoblación. En presencia de IL-6 y $TGF\beta$, las células T vírgenes pueden diferenciarse en células T_H17 , las cuales se caracterizan por expresar el factor de transcripción del ácido retinoico relacionado con el receptor $ROR\gamma t$ (del inglés, *RAR-related orphan receptor gamma*) y STAT3. Además, IL-1 e IL-23 pueden promover o estabilizar la diferenciación de las células T_H17 , así como su expansión clonal. (Tomada y modificada de Abbas y Lichtman, 2004).

1.8.2.3 Linfocitos T $CD4^+$ T_H17

Las células T $CD4^+$ colaboradoras son esenciales en las respuestas inmunitarias y en las enfermedades inflamatorias (Kimura y Kishimoto, 2010). Las células T $CD4^+$ pueden dividirse en distintas subpoblaciones celulares, tales como, T_H1 , T_H2 y Treg. El desarrollo de las células T_H1 , las cuáles activan a los macrófagos y son altamente efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares va a la par con las acciones secuenciales mediadas por IL-12 e $IFN\gamma$ (Hsieh *et al.*, 1993; Scharon *et al.*, 1993). Las

células T_H2, cuya diferenciación está dirigida por IL-4 (Figura 1.8), son importantes para la producción de IgE y en la eliminación de patógenos extracelulares como helmintos (Min *et al.*, 2004; Shinkal *et al.*, 2002).

Clásicamente, el paradigma T_H1/T_H2 proporcionaba información razonable en la exploración de los mecanismos inmunológicos implicados en infección y en el desarrollo de las enfermedades autoinmunitarias. Varias líneas de investigación han encontrado evidencias de que las células T_H1 no son las verdaderas culpables en la inducción y progresión de muchas enfermedades autoinmunes, como originariamente se había propuesto. Por ejemplo, en ratones (KO) deficientes en IFN γ no muestran resistencia a padecer procesos autoinmunes. Al contrario, parece ser que estos ratones deficientes (KO) en la producción de IFN γ presentan mayor susceptibilidad a padecer fenómenos autoinmunes (Tran *et al.*, 2000). Es por todo ello que debería existir probablemente una subpoblación adicional de linfocitos T CD4⁺ efectoras diferente a las células T_H1. Una nueva subpoblación de células T efectoras, las cuales producen IL-17, también descrita (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005) denominadas células T_H17. Dichas células parecen tener un papel crucial en la inducción de enfermedades autoinmunes, tales como Artritis Reumatoide (AR) y en encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), y en respuesta específica a determinados alérgenos (Kolls *et al.*, 2004; Langrish *et al.*, 2005; Nakae *et al.*, 2002). Sin embargo, las células T_H17 son también cruciales en la defensa contra hongos y bacterias extracelulares (Milner *et al.*, 2008).

Además de esta subpoblación de células efectoras, hay descrita también una 2^o subpoblación de células T CD4⁺ con capacidad reguladora, que incluye a las células Treg, las cuáles están caracterizadas por la expresión del factor de transcripción FoxP3 (del inglés *forkhead/winged helix forkhead box P3*). TGF β promueve la diferenciación de las células Treg, las cuáles se encargan de suprimir la respuesta adaptativa de células T y prevenir fenómenos autoinmunes (Chen *et al.*, 2003; Wing *et al.*, 2010).

Las células T_H17 secretan IL-17A (IL17), IL-17F, IL-22, IL-6 y TNF α (Langrish, 2005). La familia de IL-17 está compuesta por IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F (Kolls *et al.*, 2004). IL-17 es pleiotrópica, la cual media reacciones inflamatorias tisulares a través de la inducción de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-6 y TNF α , y distintas quimiocinas (Kolls *et al.*, 2004; Moseley *et al.*, 2003). IL-17 está también involucrada en la inmunidad frente a bacterias extracelulares a través del reclutamiento y activación de neutrófilos y macrófagos (Ye *et al.*, 2001). Recientemente se ha reconocido que son las células T_H17 y no las T_H1 las células efectoras que

realmente se encuentran involucradas en el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes tanto en humanos como en ratones (Fujino *et al.*, 2003; Komiyama *et al.*, 2006; Nakae *et al.*, 2003; Tzartos *et al.*, 2008). De hecho, se ha encontrado IL-17 en el suero y en tejidos diana de pacientes con varias enfermedades autoinmunes tales como AR, Esclerosis Múltiple (EM), y Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Tzartos *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2000). Se ha comprobado en varios estudios que el bloqueo de IL-17 previene el desarrollo de EAE (Komiyama *et al.*, 2006; Nakae *et al.*, 2003; Hofstetter *et al.*, 2005). Todas estas evidencias indican que la regulación de la diferenciación de células T_H17 y su función son una diana efectiva en el tratamiento de patologías autoinmunes, potencialmente.

1.8.2.3.1. Diferenciación de los linfocitos T_H17

Aunque estudios recientes indican que IL-23 es necesaria para la generación de las células T_H17 a partir de células T $CD4^+$ indiferenciadas (Harrington *et al.*, 2005; Langrish *et al.*, 2005), está más que demostrado que las células T vírgenes no expresan el receptor para IL-23. Sin embargo, tanto IL-23 como $TNF\alpha$ actúan como factores de supervivencia para las células T_H17 (Veldhoen *et al.*, 2006; Parham *et al.*, 2002). El consenso actual en cuanto a la diferenciación de las células T_H17 es que la IL-6 induce su diferenciación junto con $TGF\beta$ (Bettelli, *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006). También ha sido descrito que IL-21, similar a IL-6, puede iniciar la diferenciación de las células T_H17 junto con $TGF\beta$ (Korn *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha sugerido que son necesarias otras vías de señalización para la completa inducción de la función de las células T_H17 *in vivo* (Janke *et al.*, 2010). La acción combinada de IL-6 y $TGF\beta$ induce la expresión del receptor nuclear orphan relacionado con el ácido retinoico ($ROR\gamma_t$ y $ROR\alpha$, ambos factores de transcripción son claves en la diferenciación del linaje T_H17 (Ivanov *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008). IL-6 induce la activación de STAT3, la cual regula la actividad de $ROR\gamma_t$ y $ROR\alpha$ junto con la producción de IL-17 (Diveu *et al.*, 2009; Mathur *et al.*, 2007). En contraste con la función de STAT3, la activación de STAT1 inhibe el desarrollo de las células T_H17 . Aunque IL-6 active ambas proteínas STAT1 y STAT3, ha sido demostrado que la activación de STAT3 se mantiene mientras que la activación de STAT1 se suprime en las células T_H17 (Figura 1.8) (Kimura *et al.*, 2007).

El sistema de regulación negativa para la diferenciación de las células T_H17 implica a algunos miembros de la familia de proteínas STAT mediados a través de varias

citocinas. IL-27 e IFN γ son responsables de la inhibición del desarrollo de las células T_H17 a través de la activación de STAT1 (Batten *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2006; Stumhofer *et al.*, 2006). También ha sido descrito que la citocina IL-2 inhibe el desarrollo de las células T_H17, dependiente del efecto mediado por STAT5 (Laurence *et al.*, 2007). Así que los miembros de la familia STAT activados por varias citocinas promueven ambos tipos de señales, tanto activadoras como inhibitoras, que regulan el desarrollo de las células T_H17. Adicionalmente, se ha visto que la actividad de dos factores de transcripción, factor de regulación de IFN 4 y T-bet, promueve señales positivas y negativas respectivamente para el desarrollo de las células T_H17 (Brüstle *et al.*, 2007; Rangachari *et al.*, 2006). Sin embargo, mientras el ácido retinoico inhibe el desarrollo de las células T_H17, la dioxina, un ligando del receptor de aryl hidrocarbonado (Ahr) promueve la generación de células T_H17 (Kimura *et al.*, 2008; Mucida *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008). Ahr es uno de los factores importantes en el desarrollo de las células T_H17 y su expresión se induce bajo condiciones de polarización de T_H17, tales como, presencia de TGF β en el medio junto con IL-6, y también promueve el desarrollo de las células T_H17 inhibiendo la activación de STAT1 y STAT5 (Kimura *et al.*, 2008). En los últimos años se están caracterizando todos los elementos moleculares que intervienen en el desarrollo de las células T_H17; es por ello que podrían abordarse desde un punto de vista terapéutico y ser dianas de posibles tratamientos contra enfermedades autoinmunes ocasionadas por las células T_H17.

1.8.2.3.2. Papel de los linfocitos T_H17 en trasplante

Desde hace ya mucho tiempo que a las células T se las conoce por tener un papel central en el desarrollo y mediación del rechazo del alo-injerto (Sayegh *et al.*, 2004; Nankivell *et al.*, 2010); y en concreto linfocitos T CD4⁺ colaboradores tienen un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunitaria alogénica. En 2005, se describe un linaje distinto de células T CD4⁺ efectoras, las células T_H17, con un papel importante en procesos inflamatorios (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Sin embargo, está claro que en muchas patologías se muestra un tipo específico de respuesta inmune, en la cual el tipo celular predominante puede ser T_H1, T_H2 o T_H17. Las células T CD4⁺T_H17 producen IL17 (IL-17A), IL17F, IL-21 e IL-22. Estas citocinas inducen la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1B, IL-6, IL-8, TNFa, IL-23, G-CSF, GM-CSF) (Mucida *et al.*, 2010) junto con quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL20) (Koenders *et al.*, 2005) por parte de una gran variedad de tipos celulares y tejidos (Crome *et al.*, 2010). La

liberación de todos estos mediadores conduce al reclutamiento de otras células inflamatorias incluidas los neutrófilos y monocitos en el foco de la inflamación (Vanaudenaerde *et al.*, 2003; Kolls *et al.*, 2004; Weaver *et al.*, 2007). Además de las células $CD4^+T_H17$, las células T $CD8^+$, células $T\gamma\delta$, neutrófilos, macrófagos y una variedad de células epiteliales y parenquimatosas pueden producir IL-17.

➤ Immunología de células T_H17 en rechazo agudo del aloinjerto:

Mucho antes de que las células T_H17 fueran descritas, varios investigadores sugirieron un posible papel de IL-17 en el rechazo agudo. El infiltrado de células T producido por IL-17, rico en neutrófilos, fue detectado en el aloinjerto de trasplantados renales bajo condiciones de rechazo (Strehlau *et al.*, 1997). IL-17 induce a las células epiteliales del túbulo contorneado proximal humanas a secretar IL-6, IL-8 y CCL2 y a la producción de C3 *in vitro* (Van Kooten *et al.*, 1998). En este punto, la expresión del IL17RNAm precede a la producción de IL-6 e IL-8 en rechazo renal en rata, sugiriendo que la producción inicial de IL-17 después del trasplante podría tener un papel importante en la iniciación de la respuesta inmunitaria innata y en la lesión por isquemia-reperfusión (IRI). Además, se ha detectado en el sedimento urinario de receptores renales con biopsia + de rechazo agudo, la presencia de células mononucleares RNAmIL17+, comparadas con receptores con infección del tracto urinario o con biopsia normal (Loong *et al.*, 2002). Más recientemente, se ha observado el incremento de células $CD4^+T_H17^+$ en biopsias renales con rechazo agudo mediado por células T (Loverre *et al.*, 2011).

En estudios recientes también se ha observado que en rechazo agudo en trasplante hepático y renal existe un incremento en suero de los niveles de IL-6, IL-17 e IL-23 junto con un incremento en la expresión de IL-6, IL-8, IL-17, TGFB y mieloperoxidasa en los injertos (Crispim *et al.*, 2009; Fabrega *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2010).

En el rechazo agudo de trasplante cardiaco, IL-17 es producida por los neutrófilos, células T $CD4^+$ y $CD8^+$ y la frecuencia de células T_H17 aumenta en receptores con rechazo, mientras que el ratio $T_H17/Treg$ disminuye durante el periodo post-trasplante, sugiriendo que el desequilibrio del ratio $T_H17/Treg$ hacia una respuesta inflamatoria T_H17 podría ser responsable de la progresión del rechazo agudo (Min *et al.*, 2009).

El déficit de IL-17 en los receptores de injerto está asociado con una disminución de los marcadores CXCL1 y CCL2 conduciendo a una disminución en la infiltración de leucocitos en el injerto tras trasplante. La producción de $IFN\gamma$ fue también notablemente muy baja en aquellos receptores con deficiencia de producción de IL-17, sin embargo,

esta situación no se traduce en un aumento en la supervivencia del injerto, excepto en los casos en donde la población de LTC fue deplecionada y el rechazo fue mediado por linfocitos T CD4⁺. De acuerdo con esto, la deficiencia en la producción de IL-17, va asociada con una prolongada supervivencia del injerto junto con una reducción en el infiltración leucocitario del mismo, sin embargo, en la MLR no se muestran diferencias en la respuesta proliferativa Ag específica (Itoh *et al.*, 2011). De este modo, la presencia de IL-17 en las fases tempranas de la respuesta inmunitaria en el post-trasplante facilita el reclutamiento de leucocitos en el injerto contribuyendo al desarrollo de rechazo agudo.

➤ *Inmunología de células T_H17 en rechazo crónico del aloinjerto:*

La neutralización de la producción de IL-17 conduce a un aumento en la supervivencia del injerto. Estos datos fueron confirmados en receptores de un injerto que presentaban un déficit de IL-17 con inmunidad T_H1/T_H2 intacta. En contraposición a los receptores que si presentan niveles de IL-17 elevados que presentaron un desarrollo más acelerado de rechazo crónico, como se ha visto en un modelo murino con vasculopatía crónica del aloinjerto (CAV) en ausencia de inmunidad T_H1 (Itoh *et al.*, 2010).

En trasplante de pulmón, los niveles de ARNm de IL-17 aumentan en el bazo de receptores con bronquiolitis obliterativa, mientras que, los niveles del ARNm de IL-10 eran altos en los pacientes que no padecían bronquiolitis obliterante (Fan *et al.*, 2011).

En pacientes que presentan fallo del injerto renal, el aumento en el número de células T_H17 en el interior del explante renal se correlaciona con una rápida progresión del rechazo crónico. El incremento en la infiltración de células T_H17 es asociada con el incremento de IL-21 y con el aumento en la expresión de la deaminasa inducida por activación (del inglés *Activation-induced cytidine deaminase*, AID) (Deteix *et al.*, 2010). Esta enzima es clave en el control del cambio de clases de Ig y en el control de la hipermutación somática (Durandy, 2003), sugiriendo que el efecto deletéreo de las células T_H17 podría estar mediado por la producción de IL-21, que podría promover la neogénesis linfoide intra-injerto y mantener el desarrollo de la respuesta inmunitaria humoral contribuyendo al desarrollo de rechazo crónico. En otro estudio, el incremento total de células que producían IL-17 en biopsias de renales fue predictivo de una disfunción del injerto tardía, independientemente del tiempo de la biopsia después del trasplante y de la positividad para C4d. De este modo, la inmunotinción de células T_H17 sobre biopsias de riñón podría tener un papel importante y actuar como marcador predictivo de rechazo crónico y un peor desenlace del injerto renal (Yapici *et al.*, 2011).

➤ La respuesta aloinmunitaria específica induce un estado de autoinmunidad mediada por T_H17 y rechazo crónico del injerto:

En un estudio reciente se ha visto que el uso de Acs anti-IL-17 contribuye a una reducción en la producción de autoAcs y una menor lesión del injerto por rechazo crónico (Fukami *et al.*, 2009). De forma similar, en los receptores de un trasplante cardíaco con CAV, muestran un incremento de IL-17 y una disminución en el número de células T CD4⁺ que producen IL-10 específicas de miosina, vimentina, Col-V y K-a1T (Nath *et al.*, 2010 y 2011). Se ha descrito también la presencia de Acs anti-vimentina en receptores renales con rechazo crónico (Carter *et al.*, 2005). Interesantemente, el desarrollo de Acs específicos del donante (del inglés *donor specific antibodies*, DSA) precede al desarrollo de Acs contra auto-Ags, los cuales, a su vez, aparecen antes que el desarrollo de BOS y persisten cuando los DSA son indetectables (Saini *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que la presencia de epítomos reconocidos por el sistema inmune del receptor serían responsables de aparición de auto-Ags como dianas autoinmunes en post-trasplante.

➤ Inmunología de células T_H17 en el rechazo mediado por anticuerpos:

Los ratones con deficiencia en la producción de IL-17 muestran una producción de Ac T-dependiente dañada o insuficiente (Nakae *et al.*, 2002). Las células T_H17 pueden funcionar como células colaboradoras de linfocitos B; en este caso no solo inducen una fuerte respuesta proliferativa de células B *in vitro*, sino también inducen la formación de centros germinales y se dispara la producción de Acs con un cambio de clase (Hsu *et al.*, 2008). Además, IL-17 por sí sola o en combinación con el factor de activación de la célula B controla la supervivencia y proliferación de las células B y su diferenciación a células plasmáticas secretoras de Ig. Este efecto está mediado principalmente por NFκB (Doreau *et al.*, 2009). En línea con estos estudios, agregados nodulares de células B se encontraron en el intersticio de riñones con rechazo crónico y en el centro de estos agregados, se encuentra un núcleo de células B que expresan la enzima AID, sugiriendo que estos nódulos pueden actuar como centros germinales en el injerto (Deteix *et al.*, 2010). Así pues, la tinción inmunofluorescente del MAC (C5bC9), se ha visto principalmente en aquellos pacientes con fallo del injerto con presencia de altos niveles de infiltrados celulares de células T_H17 . Más recientemente, ha sido descrita la expresión de IL-17 por las células epiteliales tubulares en receptores renales con RMA (Loverre *et al.*, 2011). En cultivos de células del túbulo contorneado proximal, la presencia de C3a induce la expresión de IL-17 sugiriendo que las células tubulares representan una fuente

de IL-17 en RMA en respuesta a activación del complemento. Estos datos revelan una intrincada relación entre producción de IL-17 y respuestas mediadas por las células B.

1.8.2.3.3. Terapias contra los linfocitos T_H17 aloinmunes

Los estudios experimentales en donde se ha usado como diana las células T_H17 no solo han proporcionado un camino hacia la prevención de las respuestas inmunes mediadas por IL-17 que contribuyen al rechazo, sino también han incrementado la comprensión de los mecanismos por los cuales las células T_H17 contribuyen al rechazo. La terapia contra la inmunidad mediada por las células T_H17 se puede abordar desde tres puntos de vista distintos:

1. **Neutralización directa de IL-17:** Bloqueando la acción de IL-17 utilizando una proteína de fusión (R):Fc del receptor de IL-17 soluble (IL-17R-Ig) se consigue bloquear el aloAg responsable de la inducción de la proliferación de células T y previene la maduración de las CDs *in vitro* prolongando la supervivencia del injerto cardíaco en un modelo de rechazo agudo (Antonysamy *et al.*, 1999). También se ha visto que se inhibe la infiltración de células mononucleares en la capa íntima y media con preservación del endotelio en un modelo de injerto aórtico (Tang *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que IL-17R-Ig podría actuar modulando negativamente la fase temprana de secreción de citocinas tales como TNF α e IL-1 β inducidas por IRI. La neutralización de IL-17 con AcMo anti-IL17 regula positivamente la producción sistémica de IL-10, reduce el rechazo agudo y previene BOS en un modelo de trasplante pulmonar con incompatibilidad menor HLA (Fan *et al.*, 2011), e inhibe el rechazo del injerto de córnea (Chen *et al.*, 2011).
2. **Nuevas aproximaciones de los linfocitos T_H17 como diana:** La diana más estudiada ha sido IL-23. Esta citocina es importante porque interviene en la generación y diferenciación, así como en la estabilización de las células T_H17. En este sentido, se ha utilizado el tratamiento con Ac IL-12/23p40 para atenuar las reacciones de rechazo agudo del injerto cardíaco por la reducción de la infiltración de células inflamatorias en el injerto y por la inhibición de la producción aloespecífica de IFN γ e IL-17 por parte de los esplenocitos (Xie *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, Box-1 del grupo de alta movilidad (del inglés *high mobility group box-1*, HMGB1), liberado en el foco inflamatorio local después de IRI, fue inductor de células T_H17 aloreactivas por inducción de la liberación de IL-6 por parte de las CDs. La neutralización de HMGB1

hace disminuir el número de células T_H17 aloreactivas esplénicas y células $T CD8^+$ productoras de $IFN\gamma$ en los receptores cardíacos, conduciendo a una menor infiltración por parte de los neutrófilos con baja expresión de IL-6 e IL-17, prolongando así la supervivencia del injerto cardíaco (Duan *et al.*, 2011).

- 3. Regímenes convencionales de inmunosupresión:** Los corticoesteroides inhiben la producción de una gran variedad de citocinas como, $IFN\gamma$, IL-4 e IL-17 (Liu *et al.*, 2009). Considerando los inhibidores de la calcineurina (ciclosporina y tacrólimus; CsA y TRL respectivamente), no se ha observado en ningún caso, que el uso de CsA y TRL haya suprimido la producción de IL-17 por parte de PBMCs (Liu *et al.*, 2009; Abadja *et al.*, 2009; Haider *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). El micofenolato mofetil (MMF) inhibe la polarización de las células $T CD4^+$ hacia T_H17 *in vitro* (von Vietinghoff *et al.*, 2010), y aunque ambos, MMF y TRL inhiben la respuesta mediada por T_H1 y T_H17 después de la activación celular; MMF ejerce un efecto inhibitorio mayor y mas fuerte en la producción de IL-17 que TRL (Abadja *et al.*, 2011). En función a estos resultados, los receptores renales que han sido tratados con MMF en combinación con dosis mínimas de TRL tienden a tener niveles de IL-17 más bajos que los pacientes que han sido tratados con TRL a dosis convencional. En cuanto al uso de inhibidores de la mTOR, se ha visto que el sirolimus (SRL) interviene en la inhibición de la producción de IL-17 y en la inducción y generación de células Treg secretoras de TGF β (Kopf *et al.*, 2007). En función a estos resultados, receptores renales tratados con alemtuzumab y en monoterapia de inducción o de conversión a SRL 6 meses post-trasplante, seguido de la retirada de MMF a los 12 meses, tuvieron un alto número de células T_H17 y Treg a los tres años en comparación con aquellos que tuvieron que volver al tratamiento con MMF junto con SRL (Hester *et al.*, 2011).

1.8.2.4. Linfocitos $T CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ (Treg)

Los mecanismos de tolerancia incluyen la función activa y supresora por parte de las células Treg $CD4^+CD25^+$ (Sakaguchi *et al.*, 2001; Shevach, 2002; Maloy *et al.*, 2001).

De esta manera, ratones linfopénicos reconstituidos con células $T CD4^+CD25^-$ desarrollan fenómenos severos de autoinmunidad caracterizados por linfoproliferación e infiltración de células T autorreactivas en múltiples órganos, mientras que la cotransfección con células $T CD4^+CD25^+$ proporciona protección frente a estas reacciones autoinmunes (Sakaguchi *et al.*, 1995). Las células $T CD4^+CD25^+$ proliferan

después de su unión con el TCR, siendo estas células capaces de inducir su rápida expansión en animales linfopénicos (Gavin *et al.*, 2002). Esta proliferación homeostática mejora bastante en lugar de abolir la función supresora de las células T CD4⁺CD25⁺ *in vitro*. Estos hallazgos sugieren que las células Treg CD4⁺CD25⁺ mantienen un programa genético que las capacita para funcionar como células T supresoras. Dada su importancia en la prevención del desarrollo de fenómenos autoinmunes y su potencial terapéutico, los mecanismos moleculares que gobiernan el desarrollo y función de las células Treg son de gran interés actualmente. Fontenot *et al.*, en 2003, exploraron el papel de FoxP3 en el desarrollo y función de las células Treg, demostrando que es el único marcador de las células Treg CD4⁺CD25⁺, distinguiéndolas así de células T CD4⁺CD25⁻ activadas.

Las células Treg CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ representan aproximadamente entre el 5-10% del total de células T CD4⁺ de sangre periférica y juegan un papel vital en el perfeccionamiento del balance entre las respuestas inmunitarias efectoras y tolerogénicas; así como en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunitario y en la prevención del desarrollo de enfermedades autoinmunes (Wing *et al.*, 2010; Sakaguchi *et al.*, 2006). Un porcentaje o recuento disminuido, e incluso el defecto en la función de las células Treg puede conducir a procesos de inflamación y/o enfermedades autoinmunes (Roncarolo y Levings, 2000; Sakaguchi *et al.*, 2008).

En los últimos años, las células Treg, sobre todo las que muestran el fenotipo CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, han demostrado su capacidad de controlar las respuestas inmunitarias frente a los aloAgs del donante, por lo que poseen un gran potencial en el establecimiento de tolerancia del trasplante *in vivo*.

Un factor esencial a considerar es la presencia de inmunosupresión farmacológica en prácticamente el 100% de los pacientes. Existen fármacos que favorecen la inducción y/o el mantenimiento de las células Treg en trasplantados. De todos ellos, actualmente los inhibidores de mTOR se muestran como los que más favorecen el desarrollo de Tregs en el trasplante.

1.8.2.4.1. Diferenciación de los linfocitos Treg

A lo largo del paso de los años, han sido identificadas varios tipos de poblaciones de células Treg; tales como células colaboradoras tipo 3 secretoras de TGFβ (T_H3; Miller *et al.*, 1992), células T CD8⁺CD28⁻ (Mayer *et al.*, 2011) o células T CD8⁺ específicas para HLA-E (Jiang *et al.*, 2010). Pero hasta la fecha, las mejor caracterizadas han sido las

células Treg FoxP3⁺ (Hori *et al.*, 2003; O'Garra y Vieira, 2004; Curotto de Lafaille *et al.*, 2009) así como también las células CD4⁺ productoras de IL-10 conocidas como células Tr1 (Groux *et al.*, 1997; Barrat *et al.*, 2002; Gregori *et al.* 2012).

La presencia de distintos marcadores intracelulares y de membrana, así como un diferente patrón de expresión de citocinas, hace posible distinguir las células Treg FoxP3⁺ de las células Tr1. Las células Treg FoxP3⁺ se pueden identificar por técnicas estándares de citometría de flujo (CF) basadas en la expresión altamente constitutiva de CD25 y FoxP3 (Sakaguchi, 2005). Las células Treg FoxP3⁺ pueden subdividirse a su vez en varias subpoblaciones; linfocitos Treg FoxP3 naturales (nTreg, Yagi *et al.*, 2004, Gregori *et al.*, 2007) las cuáles se generan en el interior del timo, y las células Treg inducidas o adaptativas (iTreg, Tran *et al.*, 2007, Gregori *et al.*, 2007) las cuáles se inducen en la periferia. iTreg se pueden generar a partir de células T vírgenes *in vitro* después de ser estimuladas con Ags y en presencia de TGFβ (Chen y Konkel, 2010). Además, las células nTreg se identifican y distinguen de las células T CD4⁺ activadas por la expresión de bajos niveles del marcador CD127 (Liu *et al.*, 2006; Seddiki *et al.*, 2006), y por la expresión de CD49d (Kleynwiefeld *et al.*, 2009). Además, la expresión de CD45RA distingue entre las células Treg FoxP3⁺ vírgenes y las células T CD4⁺ activadas convencionales (Hoffmann *et al.*, 2006; Miyara *et al.*, 2009). La transferencia de células T con una baja expresión de CD45RB (CD45RB^{lo}) previene el desarrollo de colitis en modelos de inmunodeficiencia murina. Es bien sabido que la actividad supresora que presentan las células T CD45RB^{lo} se encuentra dentro de la fracción de células CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺; y la transferencia de estas células Tregs no solo previene la iniciación de colitis, sino que también puede revertir la enfermedad una vez establecida (Boden *et al.*, 2008).

➤ Células T reguladoras naturales (nTreg):

Las células nTreg se desarrollan en el timo. Estas células Treg constituyen aproximadamente entre el 5-10% de los timocitos CD4⁺CD8⁻ maduros y el 10% de las células T CD4⁺ de sangre periférica (Itoh *et al.*, 1999; Jordan *et al.*, 2001). Otros marcadores de superficie celular que las caracteriza son CD45RB, CTLA-4, receptor relacionado con la familia del receptor de TNF inducido por glucocorticoides (del inglés, *glucocorticoid-induced TNF receptor family related receptor*, GITR o TNFRSF18), CD122, CD103 (integrina α_Eβ7), CD134 (OX40) y CD62L (Selectina L), cuya expresión relativa de sus niveles puede utilizarse para definir y aislar células Treg CD4⁺CD25⁺

(Wood y Sakaguchi, 2003). Sin embargo, como con CD25, ninguna de estas moléculas por sí sola representa el marcador definitivo para las células nTreg, ya que también se expresan en otras subpoblaciones T CD4⁺, particularmente en células T activadas. Recientemente, se ha demostrado que FoxP3 era el único factor que se expresaba en células nTreg, y se cree que actúa como un interruptor maestro que controla la diferenciación de las células Treg (Hori *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003). Sin embargo, la localización intracelular de FoxP3 presenta una limitación en su uso para la identificación y estudio de las células Treg.

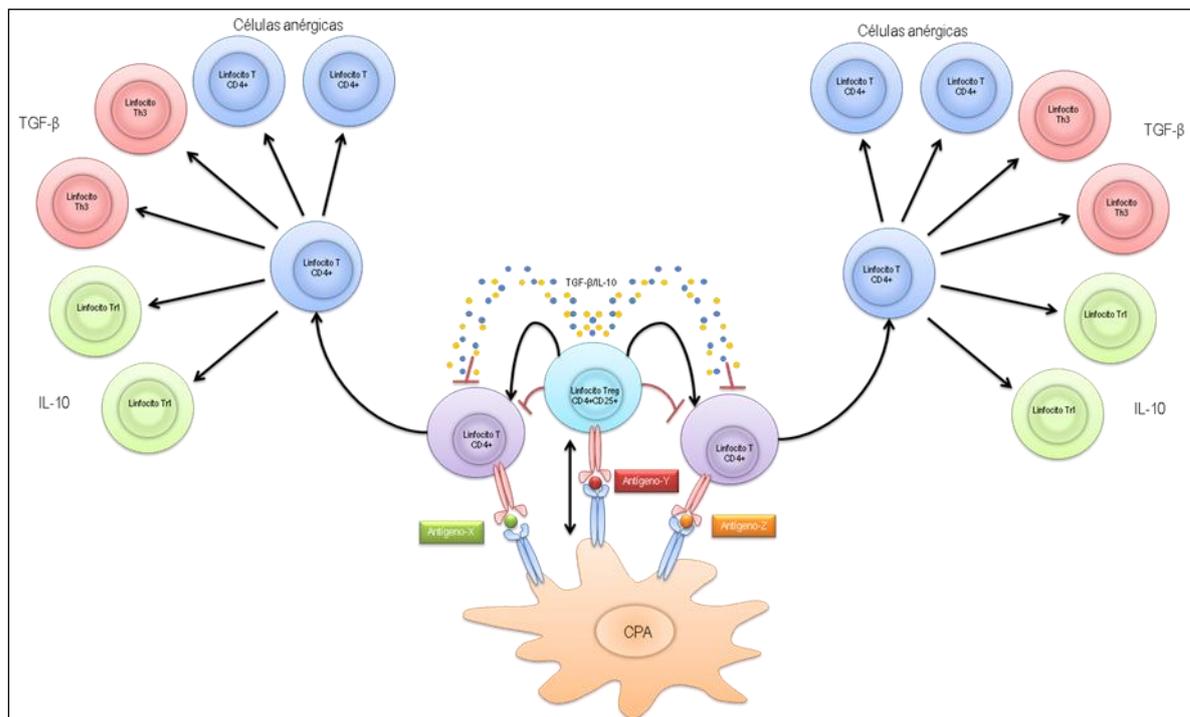


Figura 1.9. Tolerancia por citocinas y supresión vinculada por las células Treg CD4⁺CD25⁺. Las células T CD4⁺CD25⁺ pueden suprimir a células T CD4⁺ alorreactivas directamente por contacto celular directo o mediante la secreción de las citocinas IL-10 y TGFβ, o alternativamente por la influencia de la CPAs estimulante. La supresión por contacto surge cuando la tolerancia generada contra Ags específicos (Ag-Y) conduce hacia la tolerancia contra Ags no relacionados o terceros Ags (Ag-X y Ag-Z), siempre que estos Ags no relacionados se expresen sobre la superficie de la misma CPA. La secreción de IL-10 y TGFβ por parte de células Treg ha sido implicada en este proceso, el cuál se cree que refuerza el fenómeno de tolerancia al injerto (Tomada y modificada de Abbas y Lichtman, 2004).

En un interesante estudio se muestra que las células nTreg en el desarrollo de tolerancia en receptores es primeramente identificado por su habilidad de suprimir las reacciones de EICH en modelos murinos de un trasplante de médula ósea. Mientras la transfección de células vírgenes alogénicas con fenotipo CD4⁺CD25⁻ o células T efectoras conducían normalmente a desarrollar EICH, la transfección conjunta de células

Treg CD4⁺CD25⁺ purificadas junto con células T CD4⁺CD25⁻ significativamente retrasó la aparición de la enfermedad (Taylor *et al.*, 2001). Otros grupos han confirmado estos mismos resultados, si bien no está muy claro que la función de las células Treg cotransfectadas se encuentra amplificada o depende de la función de otras células, tales como CPAs u otras células T *in vivo*, o si las células Treg por sí mismas son suficientes para suprimir a las células T alorreactivas (Hoffmann *et al.*, 2002). La cotransfección con células T CD4⁺CD25⁺ en ratones deficientes en células T, junto con células T vírgenes CD4⁺CD25⁻ puede bloquear la habilidad de este último grupo de células efectoras para rechazar injertos de piel en ratones con incompatibilidades MHC (Hara *et al.*, 2001; Graca *et al.*, 2002).

➤ Células T reguladoras inducibles (iTreg):

Las células nTreg anteriormente descritas tienen una capacidad supresora inherente. Sin embargo, han sido también indentificadas determinadas poblaciones de células T cuya actividad inmunosupresora es inducida o adquirida en la periferia. Hay, ante todo, dos poblaciones de este tipo de células iTreg que son importantes en la inducción de tolerancia en el trasplante. Las células Tr1 y las células T_{H3}, descritas a continuación:

- Células T reguladoras tipo 1 (Tr1): Son similares a las células T_{H3}, pero éstas secretan grandes cantidades de IL-10 y fueron primeramente identificadas por su papel básico en la prevención de colitis autoinmune (Groux *et al.*, 1997). Las células Tr1 no expresan FoxP3, aunque se sabe que al igual que muchas otras células T efectoras, expresan de forma transitoria FoxP3 (Levings *et al.*, 2005). Esta subpoblación de células T con función supresora se caracterizan porque se puede inducir tanto *in vitro*, tras la exposición con IL-10 o con CDs inmaduras, como *in vivo*, por la administración oral de determinados Ags (Battaglia *et al.*, 2004).
- Células T colaboradoras 3 (T_{H3}): Las células T_{H3} fueron descritas en primer lugar por su papel en la secreción de TGFβ, en el desarrollo de tolerancia inmunológica seguida de la ingesta de determinados antígenos orales, denominada *tolerancia oral* (Chen *et al.*, 1994). Presentan función supresora dependiente de TGFβ y se ha descrito que son capaces de inducir la expresión de Foxp3 vía TGFβ.

Existen diferencias entre ambas poblaciones de células Treg, a saber, entre las células nTreg y estas poblaciones inducidas en la periferia. En primer lugar, las células

nTreg se desarrollan en el timo, mientras que no hay evidencias que sugieran que las células Tr1 o T_H3 tengan su desarrollo en el timo. En lugar de ello, las células iTreg dependen de factores periféricos tales como la maduración o el tipo de CPA que las estimule, así como la disponibilidad de ciertas citocinas como TGFβ (Steinman *et al.*, 2003). En segundo lugar, en contraste con las células nTreg, las cuáles ejercen su función supresora a través del contacto dependiente de célula y por mecanismos independientes de contacto como la secreción de citocinas, ambas células iTreg, Tr1 y T_H3, se ejerce de forma independiente al contacto célula-célula y suprimen las respuestas inmunitarias a través de la secreción de citocinas inmunosupresoras, como IL-10 y TGFβ (Stassen *et al.*, 2004). Finalmente, la capacidad de las células Tr1 para migrar hacia los diferentes tejidos difiere sustancialmente de las nTreg. Las células Tr1 tienden a migrar hacia los tejidos o focos de inflamación, mientras que las células nTreg se encuentran predominantemente en los órganos linfoides secundarios, tales como los ganglios linfáticos (Cottrez y Groux, 2004). Actualmente, las subpoblaciones de células iTreg se identifican ampliamente en función del patrón de secreción de citocinas inmunosupresoras. Como con las células nTreg, no existen marcadores de superficie específicos que distingan a las células iTreg del resto de subpoblaciones de células T. Mientras que FoxP3 se expresa en las células nTreg, no está todavía muy claro si también interviene en la regulación del desarrollo de las subpoblaciones de células T supresoras Tr1 y Th3 (Sakaguchi, 2003). Sin embargo, TGFβ, una citocina que media las funciones efectoras de las células T_H3, presenta la capacidad de convertir células T no reguladoras CD4⁺CD25⁻ en células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, en conjunción con la expresión de FoxP3 *de novo* (Chen *et al.*, 2003). En cuanto al papel que tienen las células iTreg en el contexto del alotrasplante, la inducción de células con fenotipo Treg en contraposición con la presencia de células T aloreactivas ha sido propuesto como uno de los factores que más contribuyen con el mantenimiento de la tolerancia (Waldmann y Cobbold, 2001). En este sentido, se ha informado que la estimulación repetitiva de células T vírgenes con CD alogénicas inmaduras conduce al desarrollo de fenotipo supresor por parte de las células T efectoras (Jonuleit *et al.*, 2000).

El estado de maduración y el tipo de estimulación que llevan a cabo las CDs en el injerto es indudablemente un factor crítico en la determinación del éxito de la respuesta inmunitaria. Fenotípicamente, las CDs inmaduras no son capaces de inducir respuestas óptimas de células T efectoras porque presentan una baja expresión de factores Cos de células T y ausencia de secreción de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, mas allá de su estado intrínseco de maduración, es también importante considerar la existencia de

múltiples subpoblaciones de CD₄⁺; así, subpoblaciones de CD₄⁺ particulares pueden inducir un fenotipo de Treg, como por ejemplo Tr1 o T_H3, independientemente a su estado de maduración (Wakkach *et al.*, 2003). Como ya se ha mencionado anteriormente, TGFβ parece ser que está implicada en la conversión de células CD₄⁺CD₂₅⁻ en células Treg; en este sentido, se ha observado que TGFβ está presente en injertos tolerados, lo cual sugiere que las células iTreg pueden desarrollar y ejercer su función directamente en el injerto (Josien *et al.*, 1998). Estos datos sugieren que las células iTreg pueden prolongar la supervivencia sin presencia de nuevas células nTreg.

1.8.2.4.2. Mecanismos efectores de los linfocitos Treg

Los mecanismos por los cuales las células Treg realizan su función inmunosupresora no están del todo dilucidados, y los datos sugieren que existen múltiples mecanismos, los cuáles podrían ser operativos bajo distintas circunstancias. Recientes estudios han demostrado un grupo diverso de mecanismos responsables en la mediación de la supresión mediada por las células Treg, los cuales incluyen la formación de Adenosín Monofosfato cíclico (AMPc) *vía* gap junctions por las células T efectoras (Teff), muerte directa de células Teff *vía* granzima B y perforina y depleción de citocinas inductoras de apoptosis por las Teff. Además la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), IL-35, galectinas y la generación de adenosin pericelular han sido implicadas también en la mediación de la función de las células Treg.

1.8.2.4.2.1. Citoquinas implicadas en la función de los linfocitos Treg*Interleucina 10 (IL-10):*

Modelos murinos con enfermedad inflamatoria intestinal demostraron el importante papel que presenta IL-10 en el control mediado por las células Treg en la inflamación de la mucosa intestinal. En modelos murinos con colitis, la transfección de células Treg CD₄⁺CD₂₅⁺ deficientes en IL-10 fue capaz de prevenir y curar la colitis establecida, aunque las células Treg deficientes en IL-10 curan la colitis con menor eficacia que células Treg normales (Asseman *et al.*, 1999; Uhlig *et al.*, 2006). La supresión mediada por las células Treg en colitis es eliminada tras la adición de anticuerpos anti-IL10, y las células Treg deficientes en IL-10 son suficientes para proteger a los animales de la colitis (Maloy *et al.*, 2003). Todos los datos obtenidos recientemente demuestran que la IL-10 secretada por las células Treg es crítica en el control de la inflamación intestinal, pero las

células Treg no productoras de IL-10 también tienen un papel importante en la limitación de la colitis.

➤ Factor transformante del crecimiento β (TGF β):

Datos obtenidos recientemente apoyan un importante papel del TGF β en la supresión mediada por las células Treg en colitis. TGF β es una potente citocina reguladora que inhibe la proliferación, diferenciación y activación de las células T. Los ratones deficientes en TGF β desarrollan enfermedad autoinmune multiorgánica que resulta en muerte prematura (Wan y Flavell, 2007). En el modelo de colitis mediada por la transfección de células T, se ha descrito que los anticuerpos anti-TGF β inducen la abolición de la función supresora mediada por las Tregs (Wan y Flavell, 2007)¹. Las células Treg deficientes en TGF β son incapaces de suprimir la colitis en presencia de células CD45RB^{hi}.

TGF β también ha sido descrito como promotor de la generación *de novo* de Tregs FoxP3⁺. TGF β puede inducir la expresión de FoxP3 en células T CD4⁺ murinas, las cuales presentan una ganancia de actividad supresora en ensayos funcionales (Chen *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004), siendo dependiente de CTLA-4.

Datos obtenidos recientemente *in-vitro* sugieren que tanto IL-10 como TGF β pueden ser producidas por distintas subpoblaciones de células Treg, distinguidas por la expresión de coestimuladores inducibles (ICOS), y que estas citoquinas pueden proporcionar cierto nivel de redundancia en la supresión mediada por las células Treg. Las células Treg ICOS⁺FoxP3⁺ han sido descritas como productoras de altos niveles de IL-10; en contraste, las células Treg ICOS⁻FoxP3⁺ expresan altos niveles de TGF β , y el uso de anticuerpos anti-TGF β elimina por completo la actividad supresora de estas células. Estos datos sugieren que hay múltiples poblaciones de células Treg que utilizan distintos mecanismos de supresión los cuales podrían ser redundantes en determinadas circunstancias.

➤ Interleucina-35 (IL-35):

IL-35 es una citocina heterodimérica formada por la proteína inducible del gen 3 del virus de Epstein-Barr (Ebi3) y la cadena alfa de IL-12 (IL-12 α). Esta es una nueva citocina candidata para ser expresada de forma selectiva por las células Treg Foxp3⁺ y parece ser que contribuye con su función. La introducción de IL-35 de forma exógena

suprime la proliferación de células T, y la transducción mediante un vector que codifique la IL-35 en células Teff les confiere actividad reguladora *in vitro*. (Colison *et al.*, 2007).

1.8.2.4.2. Adenosina pericelular

La acumulación pericelular de adenosina, un nucleótido que presenta potentes propiedades anti-inflamatorias, ha sido recientemente implicada con la función de las Tregs en el contexto de enfermedad inflamatoria intestinal. La generación de adenosina a partir del ATP es llevada a cabo por la ectoenzima CD39 y por la ecto-5'-nucleosidasa unida a membrana que incluye a CD73. CD39 y CD73 están coexpresadas en células FoxP3⁺ murinas y humanas, y les confiere la habilidad para la producción de adenosina. Esta adenosina puede entonces unirse a sus receptores correspondientes, expresados en la superficie de las células Teff y mediar su supresión. Además, en apoyo a esta teoría, FoxP3 ha sido descrito como un estabilizador de los transcritos primarios de ambos, CD39 y CD73. (Borsellino *et al.*, 2007).

1.8.2.4.3. Apoptosis por privación de citoquinas

Otro posible mecanismo que interviene en la supresión mediada por las Tregs en modelos murinos con colitis es la inducción de apoptosis por la privación de citoquinas. Las células CD4⁺ Treg FoxP3⁺ inducen la apoptosis de las células Teff *in vitro* a través de todo el consumo de IL-2, así como otras citoquinas (Pandiyani *et al.*, 2007). En el modelo murino de colitis con células T transfectadas, las Tregs incrementan la apoptosis de las células cotransfectadas con fenotipo CD45RB^{hi} en los nódulos linfáticos mesentéricos y en el colon. En ambas situaciones, *in vitro* y *in vivo*, la supresión mediada por las Tregs fue eliminada cuando las células Teff fueron deficientes en Bim, una proteína que media la apoptosis inducida por privación de citoquinas (Fu *et al.*, 2004).

En resumen, existen numerosas evidencias que implican a distintas citoquinas, tales como IL-10, TGFβ e IL-35; así como la adenosina pericelular y la depleción de citoquinas como mecanismos efectores de las células Treg protectores contra la inflamación de la mucosa intestinal. IL-23, una citocina inflamatoria implicada en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal en ratones y humanos (Hue *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2006), recientemente se la ha relacionado también con la capacidad de inhibir la generación de células Treg FoxP3⁺ en el colon (Izcue *et al.*, 2008).

1.8.2.5. Paradigma Treg/T_H17

Recientemente se han estudiado las interconexiones que existen entre la diferenciación de ambos tipos celulares, Treg y T_H17. En concreto, se ha visto que las células Treg pueden desdiferenciarse hacia célula T CD4⁺ vírgenes bajo un ambiente de citocinas proinflamatorias en ratones y humanos, con la consecuente disminución en la actividad supresora. Las citocinas proinflamatorias directamente inducen la diferenciación de las células Treg en células pertenecientes al linaje T_H17 capaces de secretar IL-17 (Afzali *et al.*, 2010). Esta conversión no es el resultado de una sobreexpresión de células T_H17, ya que se ha demostrado la presencia de células dobles positivas para los marcadores FoxP3 y ROR γ t, lo cual sugiere la existencia de un precursor celular común intermedio y transitorio. La conversión de las células Treg en células T_H17 ha sido descrita por varios grupos de investigación en ratones y humanos (Xu *et al.*, 2007; Beriou *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2008; Koenen *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Voo *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2009), aunque con algunas diferencias muy interesantes. Mientras que las células Treg murinas se convierten predominantemente en células T_H17 bajo la influencia de IL-6 (Xu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008), las células Treg humanas son, en gran parte, resistentes al efecto de IL-6 y se diferencian hacia el linaje de célula T_H17 de un modo que es también dependiente de IL-1 (Koenen *et al.*, 2008; Deknuydt *et al.*, 2009; Voo *et al.*, 2009). En un reciente estudio, se ha visto que las señalizaciones producidas por IL-1 son esenciales para la diferenciación hacia el linaje T_H17 en ratones, y que IL-6 induce la expresión del receptor de IL-1 (IL-1R) en la célula T (Chung *et al.*, 2009). Tanto las células T_H17 como las Treg comparten una vía de diferenciación común en donde se ven involucradas TGF β e IL-6. Cuando ambas citocinas se encuentran presentes en el medio actúan favoreciendo el cambio hacia la diferenciación T_H17; sin embargo, si sólo se encuentra en el medio TGF β la célula T virgen se diferenciará hacia Treg. El balance entre las células Treg y T_H17 es crucial para el mantenimiento de la homeostasia del sistema inmunitario. TGF β es necesaria para la diferenciación de ambos tipos celulares (Treg y T_H17) y es capaz de inducir la expresión de ambos factores, Foxp3 y ROR γ t, necesarios para el desarrollo de ambas, respectivamente (Zhou *et al.*, 2008); sin embargo, la presencia de TGF β en ausencia de IL-6, induce la diferenciación de las células Treg y Foxp3 siendo capaz de unirse a ROR γ t e inhibir la activación del mismo (Zhou *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha observado que la deficiencia de células T_H17 en trasplantados se asocia con niveles

reducidos de IL-6 en el aloinjerto junto con una reducción de la producción de IL-6 *in vitro* por células noT/noB en respuesta a IL-17, IL-1B y TNF α . Consecuentemente, la proporción de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ aumentó en el injerto de receptores que presentaban déficit de IL-17 con una supervivencia prolongada (Itoh *et al.*, 2011). De este modo, las señales proinflamatorias antes o incluso en la fecha del trasplante pueden cambiar el tipo de respuesta inmunitaria efectora. La identificación y caracterización de las Treg que controlan la respuesta específica aloinmunitaria representa una oportunidad para la inducción de tolerancia suministrando inmunosupresores que induzcan la expansión de Treg (Wood *et al.*, 2011). No obstante, la inquietante posibilidad de que células Treg se conviertan en células T_H17 tiene hoy en día un papel importante en el campo de la investigación de la tolerancia en trasplante (Abadja *et al.*, 2012). Evidencias directas que apoyan esta teoría han sido descritas en un estudio en el cual las células iTreg cotransfectadas con una menor aloantigenicidad específica se convirtieron en células T_H17 *in vivo* promoviendo la respuesta mediada por neutrófilos en aloinjerto de piel (Vokaer *et al.*, 2010). De forma opuesta, hay evidencias que sugieren que la presencia de IL-17 producida por las células Treg humanas promueve la función supresora (Beriou *et al.*, 2009), aunque las células T_H17, en el marco de los fenómenos autoinmunes, podrían conducir a una menor susceptibilidad en la función supresora o incluso la supresión de las células Treg (Huter *et al.*, 2008; Stummvoll *et al.*, 2008). En otros estudios se ha visto que el rechazo agudo mediado por células T_H17 después del trasplante de pulmón podría estar controlada por la población de células Treg CD4⁺ específicas de Col-V (Braun *et al.*, 2009). Sin embargo, en un modelo de trasplante de córnea, paradójicamente, IL-17A es esencial para las células Treg en la mediación de la supresión dependiente de contacto y en la supervivencia del aloinjerto corneal (Cunnusamy *et al.*, 2011).

Si se confirman todos los datos, se establecerá un nuevo paradigma en la interrelación entre Treg y T_H17 necesaria para la inducción de tolerancia.

1.9. Citoquinas implicadas en la modulación de la respuesta inmunitaria

1.9.1. Interleucina 6 (IL-6)

IL-6 es una citocina pleiotrópica con varias actividades biológicas implicadas en la regulación del sistema inmunitario, hematopoyesis, inflamación y oncogénesis. Induce la diferenciación de las células T_H17, a partir de células T CD4⁺ vírgenes en colaboración con TGF β e inhibe la diferenciación dependiente de TGF β de iTreg (Bettelli *et al.*, 2006;

Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). Estas observaciones apoyan la idea de que el bloqueo de IL-6 podría ser una estrategia de tratamiento innovador para las enfermedades autoinmunes. De hecho, ha sido demostrado que las dianas de la IL-6 podrían ser una aproximación efectiva en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes (Nishimoto *et al.*, 2008; Yokota *et al.*, 2008).

IL-6 fue clonada y descrita como factor 2 de estimulación de células B en el año 1986 (Hirano *et al.*, 1986). Presenta varias actividades biológicas descritas, tales como, presentar efecto estimulador en el crecimiento del plasmocitoma murino y mieloma humano junto con la inducción de reactantes de fase aguda en las respuestas inflamatorias (Kawano *et al.*, 1988; Suematsu *et al.*, 1992; Andus *et al.*, 1987; Gauldie *et al.*, 1987). IL-6 activa a su receptor IL-6R, formado por un complejo de subunidades, incluida la subunidad de transducción de señales llamada gp130 (Hibi *et al.*, 1990; Kishimoto *et al.*, 1992). Existen dos isoformas diferentes de IL-6R; una isoforma soluble y otra transmembrana. IL-6 tiene la capacidad de poder unirse a ambas isoformas, la cuál puede entonces interactuar con la subunidad gp130 y disparar la cascada de transducción de señales intracelulares conduciendo finalmente a la expresión de genes específicos. Como gp130 no tiene un dominio intrínseco de tipo kinasa, determinados miembros de la familia de kinasas Janus (Jak), tales como, Jak1, Jak2 y la proteína tirosín kinasa 2 (Tyk2), se encuentran constitutivamente asociadas a la subunidad gp130 (Stahl *et al.*, 1994). El complejo formado por IL-6, su receptor IL-6R y la subunidad gp130, fosforilan a las distintas kinasas intracelulares y éstas entonces activarán a los factores STAT1 y STAT3 (Ihle *et al.*, 1995). De este modo, IL-6 activa a las kinasas Jak1 y Jak2, y a los factores STAT1 y STAT3, a través del complejo IL-6R/gp130.

1.9.2. Interleucina 2 (IL-2)

IL-2 humana, también llamada factor de crecimiento de la célula T (del inglés *T cell growth factor*, TCGF), es un polipéptido con una estructura en α -hélice de 15-18 KDa y con una glicosilación variable, perteneciente a la familia de citocinas que comparten la cadena γ común (Malek y Castro, 2010; Waldmann, 2006; Malek, 2008). Es el principal factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por Ags y es responsable de la expansión clonal de los linfocitos T tras el reconocimiento antigénico. Actúa principalmente sobre las mismas células que lo sintetizan, es decir, actúa como un factor de crecimiento autocrino. IL-2 se produce en los linfocitos T CD4⁺, y en menor grado, en los linfocitos T CD8⁺. La activación de los linfocitos T por los Ags y CoS estimula la

transcripción del gen de IL-2 y la secreción de la proteína (Bachmann y Oxenius, 2007). La producción de IL-2 es transitoria, con una secreción máxima alrededor de 8-12 horas después de la activación linfocitaria. IL-2 existe como monómero, y presenta una vida media notablemente corta, menos de 30 minutos (Malek y Castro, 2010). IL-2 se sintetiza como un precursor de 153 aas que contiene una secuencia señal de 20 aas, además de la región madura de 133 aas (Taniguchi *et al.*, 1983; Rosenberg *et al.*, 1984). La región madura presenta un plegamiento nativo globular en cuatro hélices α , y contiene un sitio de unión glicosilado ligado a treonina 3 (Thr3) más tres residuos de cisteína, los cuales forman un puente disulfuro intracatenario que es esencial para la actividad (Smith, 1984). Aunque IL-2 humana comparta aproximadamente el 66% de identidad en su secuencia de aas con IL-2 de ratón altamente polimórfica, se sabe que la IL-2 humana es activa en células sensible a IL-2 de ratón. Las células capaces de sintetizar IL-2 son células $T\gamma\delta$ (Tsukaguchi *et al.*, 1995), células T $CD4^+/CD8^+$ activadas (Malek y Castro, 2010; Conlon *et al.*, 1995), neuronas (Hwang *et al.*, 2006; de Araujo *et al.*, 2009), microglía (Kowalski *et al.*, 2004) y células madre hematopoyéticas (Eguizabal *et al.*, 2007). El receptor de IL-2 (IL-2R) se compone de tres subunidades, la cadena CD25/IL-2R α de 55 kDa, la cadena de 70 kDa CD122/IL-2R β y la cadena de 65 kDa CD132/ γ_c (Malek y Castro, 2010; Malek, 2008). IL-2 inicialmente se une a CD25. El complejo binario formado por IL-2:CD25 recluta a CD122 y CD132 para formar el complejo de señalización cuaternario (Malek y Castro, 2010; Stauber *et al.*, 2006). La unión de IL-2 a su receptor activa múltiples vías de transducción de señales, como la vía JAK/STAT, en especial, JAK1 y JAK3, que a su vez activan a STAT5 que es única para las citocinas, y las vías PI3 cinasa y Ras-MAP cinasa, que se activan a través de múltiples tipos de receptores. IL-2 es esencial para el desarrollo, mantenimiento y función de las células T; también de las Treg que proporcionan protección contra enfermedades autoinmunes. Además, tras la activación del linfocito T por el TCR, se expresa rápidamente IL-2 α y se forman los complejos IL-2 $\alpha\beta\gamma_c$; entonces los linfocitos T pueden unirse a IL-2 con mucha mayor fuerza lo que reduce la concentración necesaria de IL-2 para la estimulación del crecimiento. Por otra parte, IL-2 también puede promover la inflamación autoinmune en los órganos diana a través de su papel en la regulación de genes de células T, y la producción de citocinas T_H2 . Dentro de la subpoblación de células T $CD8^+$, IL-2 es esencial para las respuestas primarias y de diferenciación en células efectoras terminales. IL-2 también promueve el desarrollo y activación de células T $CD8^+$ en células de memoria (Malek y Castro, 2010).

1.9.3. Factor transformante del crecimiento β (TGF β)

TGF β es un factor que promueve la transformación de los fibroblastos en cultivo en células con un fenotipo similar al de las células tumorales; fue descrito por tener una mayor actividad supresora de tumores, más que por promover la transformación de las células hacia células tumorales. TGF β está formada por dos subunidades TGF α y TGF β (Lawrence, 1996; Cox y Maurer, 1997; Alevizopoulos y Mermoud, 1997). Estas moléculas forman parte de la superfamilia que incluye las isoformas TGF β 1 a β 5, proteínas morfogénicas del hueso, activinas e inhibinas (Kingsley, 1994). TGF β 1 humano es una proteína homodimérica de 25 kDa, unida por puentes disulfuro y que está implicada en procesos de desarrollo, inmunológicos y homeostáticos (Derynck *et al.*, 1986; Padgett y Patterson, 2001; Cox y Maurer, 1997; Ruscetti y Bartelmez, 2001). La molécula es sintetizada como una proteína precursora de 390 aas que contiene una secuencia señal de 23 aas, una pro-región de 255 aas y un segmento maduro de 112 aas. El procesamiento de la molécula es compleja, y en general se secreta en forma latente (Gleizes *et al.*, 1997). Antes de la liberación, el pre-pro-péptido se escinde de su secuencia señal, seguido de la glicosilación de su pro-región. El proceso de glicosilación incluye la fijación inusual de residuos manosa-6-fosfato. A continuación se produciría la división de la pro-hormona mediada por la *furina convertasa* junto con la creación de una pro-región unida por puentes disulfuro de 80 kDa denominada *proteína asociada a la latencia* (del inglés *latency-associated protein*, LAP), además de un segmento maduro de 25 kDa unido por puentes disulfuros (denominado TGF β 1) (Dubois *et al.*, 1995; Khalil, 1999; Clark y Coker, 1998). Estos dos polipéptidos independientes unidos por puentes disulfuro se asocian a través de una interacción no covalente que hace que TGF β 1 sea inactivo. Aunque pueda ocurrir la secreción directa de este complejo 80K:25K, es ineficiente. Para facilitar la secreción extracelular además del almacenamiento, un tercer componente denominado LTBP (del inglés *latent TGF β binding protein*) de 200 kDa está unido covalentemente al extremo N-terminal de una de las cadenas polipeptídicas. Esto promueve la secreción y el posterior almacenamiento dentro de la matriz extracelular (Koli *et al.*, 2001; Mangasser-Stephan y Gressner, 1999). Después de la secreción, TGF β 1 se encuentra enlazado covalentemente a la matriz extracelular a través de LTBP. Este complejo se escinde posteriormente por proteasas y es liberado dejando al descubierto residuos de manosa en la proteína LAP. Se postula que los residuos de manosa expuestos en LAP son capaces de unirse a la superficie celular de IGF-IIR (del

inglés *insulin-like growth factor type II receptor*), en donde los eventos disociativos interrumpen la unión del complejo LAP-TGF β 1. Esto resulta en la liberación de la forma homodimérica activa, el TGF β 1 (Khalil, 1999; Mangasser-Stephan y Gressner, 1999). El receptor de alta afinidad para TGF β 1 es un complejo heteromérico que consiste en una quinasa TM. Dos tipos de receptor están involucrados; una glicoproteína denominada T β RII fosforilada, de unión a ligando de 80 kDa con expresión constitutiva y una glicoproteína que actúa como transductor de señales, de no unión al ligando de 55 kDa denominada T β RI/ALK-5 (Derynck y Feng, 1997; Ten Dijke *et al.*, 1996; Lawler *et al.*, 1994). Se ha sugerido que primero el TGF β 1 se une a T β RII, y entonces se inicia una fosforilación cruzada de T β RI, culminando en la transducción de la señal. Hay también un tercer receptor para TGF β que se denomina T β RIII, que puede ser denominado, o bien como un proteoglicano tipo betaglicano de 250 kDa, o como la glicoproteína de 180 kDa denominada endoglina/CD105 (Lopez-Casillas *et al.*, 1994; St. Jacques *et al.*, 1994). Se ha propuesto que T β RIII captura TGF β y se lo transfiere a T β RII (Ten Dijke *et al.*, 1996). Esto, es tal vez cierto para betaglicano pero no para la endoglina. Endoglina o CD105 no se une a TGF β por sí misma; sólo en el contexto de la unión al ligando T β RII. Las evidencias sugieren que en lugar de unirse al ligando, endoglina puede realmente entrar en el complejo receptor y modular la señalización de TGF β aguas abajo (Barbara *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2000). Aunque ALK-5 se supone que ha sido tradicionalmente el único receptor tipo I para la señalización del receptor TGF β 1, también es posible que ALK-1 pueda servir como una condición dependiente del receptor de TGF β tipo I (Lux *et al.*, 1999). TGF β 1 tiene una amplia gama de actividades. Durante una respuesta inmunitaria, TGF β 1 induce la producción de Acs preferentemente de isotipo IgA en ambas especies, ratón y humanos (Stavnezer, 1995). También regula la quimiotaxis de CD mediante la alteración de la expresión de receptores de quimioquinas (Sato *et al.*, 2000). Finalmente, puede modular negativamente una respuesta inflamatoria por amortiguar la actividad de macrófagos y por disminuir las citocinas proinflamatorias (Wahl *et al.*, 2000).

1.9.4. Interferon γ (IFN γ)

IFN γ , también conocido como IFN de tipo II, es una importante citocina inmunorreguladora que fue originalmente identificada a través de su actividad anti-viral (Billiau y Matthys, 2009). Desempeña un papel importante en la defensa del huésped, al presentar actividad anti-viral, anti-proliferativa e inmunorreguladora (Schoenborn y Wilson, 2007; Pestka *et al.*, 2004). IFN γ es la principal citocina activadora de los

macrófagos y realiza funciones críticas en la inmunidad innata y en la inmunidad celular adaptativa. En muchos tipos celulares, IFN γ induce la producción de citocinas y regula la expresión de varias proteínas de membrana, así como también modula la presentación antigénica asociada a moléculas HLA debido a que aumenta la expresión de los Ags HLA, TAP1/2, cadena invariante y expresión y actividad del proteosoma, así como receptores Fc, moléculas de adhesión leucocitaria y Ags de la familia B7 (Schoenborn y Wilson, 2007). IFN γ es un potente activador de las funciones efectoras de los macrófagos, incrementando la función fagocítica y potenciando la síntesis de sustancias microbicidas, tales como radicales superóxido, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno (Boehm *et al.*, 1997). Dirige la síntesis, cambio de clase (“*switching*”) y secreción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B. IFN γ también influye en el desarrollo de células Th inhibiendo la diferenciación de los T_{H2} y estimula el desarrollo del T_{H1} (Schoenborn y Wilson, 2007; Pestka *et al.*, 2004). Esta proteína homodimérica es producida por los linfocitos NK, CD4⁺ T_{H1} y T CD8⁺; es la citocina característica de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ T_{H1}. Los linfocitos NK secretan IFN γ en respuesta al reconocimiento de componentes desconocidos de los microorganismos o en respuesta a IL-12; en este marco, IFN γ actúa como un mediador de la inmunidad innata. En la inmunidad adaptativa, los linfocitos T producen IFN γ en respuesta al reconocimiento antigénico, y la síntesis se ve favorecida por IL-12 e IL-18. IFN γ también juega un papel central en la progresión de enfermedades inflamatorias, tales como procesos de autoinmunidad o en aterosclerosis (Kelchtermans *et al.*, 2008; McLaren y Ramji, 2009). La forma biológicamente activa del IFN γ consiste en un homodímero unido de forma no covalente de 20-25 KDa con una glicosilación variable de sus subunidades (Gray y Goeddel, 1982). El receptor de IFN γ está compuesto de dos polipéptidos con una estructura homóloga que pertenecen a la familia de receptores de citocinas de tipo II; uno de los dos polipéptidos se une a la citocina y el otro es el encargado de transmitir la señal al interior de la célula (Schoenborn y Wilson, 2007). Los dímeros de IFN γ se unen a la proteína receptora transmembrana IFN- γ RI (subunidad α) interaccionando con la subunidad IFN- γ RII o subunidad β , para formar el complejo de receptor funcional, constituido por las dos subunidades, α y β (Bach *et al.*, 1997; Marsters *et al.*, 1995). La unión de la subunidad β o IFN- γ RII al complejo de receptor incrementa la afinidad de unión al ligando y la eficiencia en la transducción de la señal (Marsters *et al.*, 1995; Krause *et al.*, 2000). Mientras que la subunidad α o INF- γ RI presenta una expresión constitutiva en muchos tipos celulares, la regulación biológica de la subunidad β o IFN- γ RII se correlaciona con

el estado de respuesta del IFN γ y se encuentra estrechamente regulado (Bach *et al.*, 1997). La unión de la citocina a su receptor activa a la proteína STAT1, que estimula la transcripción de genes sensibles a IFN γ (incluidos HLA y CoS B7), enzimas que sintetizan sustancias microbidas, como óxido nítrico, y citocinas, como la subunidad p40 de IL-12. Diferentes genes sensibles a IFN γ se activan por la acción de STAT1 en solitario o actuando junto con otros dos factores de transcripción, el factor de respuesta a IFN-1 y el transactivador de clase II, que a su vez se ven inducidos por STAT1. IFN γ es producido por un elevado número de tipos celulares bajo condiciones inflamatorias, incluidas las CD epidermicas y células T $\gamma\delta$ (Sugaya *et al.*, 1999), queratinocitos (Howie *et al.*, 1996), células T $\gamma\delta$ de sangre periférica (Battistini *et al.*, 1997), mastocitos (Gupta *et al.*, 1996), neuronas (Neumann *et al.*, 1997), células T CD8⁺ (Hoiden y Moller, 1996), macrófagos (Puddu *et al.*, 1997), células B (Yoshimoto *et al.*, 1997), neutrófilos (Yeaman *et al.*, 1998), células NK (Asea *et al.*, 1996), células T CD4⁺ (Briscoe *et al.*, 1997) y espermatozoides testiculares de rata (Dejuco *et al.* 1995).

1.9.5. Interleucina 10 (IL-10)

IL-10, inicialmente fue designada como factor inhibidor de la síntesis de citocinas (del inglés *cytokine synthesis inhibitory factor*, CSIF) y fue originalmente identificada como un producto sintetizado por clones de linfocitos T_H2 murinos que suprimían la producción de citocinas por parte de clones de linfocitos T_H1 en respuesta a la estimulación antigénica y en presencia de CPAs, tales como, monocitos/macrófagos (Fiorentino *et al.*, 1989; Powrie *et al.*, 1993). En humanos, IL-10 es producida por células T CD4⁺ T_H0, T_H1 y T_H2, líneas de células B derivadas de pacientes con SIDA y linfoma de Burkitt, monocitos activados, células T de sangre periférica y células T CD8⁺ similares a las T_H2 (Le Gros y Erard, 1994), células vírgenes CD4⁺CD45RA⁺, células T de memoria CD4⁺CD45RA⁻ y células carcinógenas broncogénicas (Smith *et al.*, 1994). El ADNc de IL-10 de ratón, rata y humanos codifica un polipéptido precursor de 178 aas unido a un péptido señal hidrófobo que se escinde para generar una proteína madura de 160 aas (Feng *et al.*, 1993).

El receptor de IL-10 (IL-10R) se ha aislado de ratón y humano (Ho *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994). Ambos receptores son glicoproteínas de membrana de unos 110 KDa de tamaño. Se ha visto que tanto IL-10 de ratón como IL-10 humana, se unen a sus receptores expresados con alta afinidad (Kd=70 pM y 200 pM, respectivamente). IL-10 es una citocina pleiotrópica que puede ejercer efectos, ya sea como inmunosupresor o

inmunoestimulador en una gran variedad de tipos celulares. Los efectos inhibidores de IL-10 en la síntesis de citocinas T_H1 en ratón se observó que eran indirectos y debidos a los efectos inhibidores de la función y capacidad de presentación de antígenos de los monocitos/macrófagos (Fiorentino *et al.*, 1991). De manera similar, IL-10 humana también puede inhibir los monocitos/macrófagos y la síntesis de citocinas estimulada por antígeno a partir de las células mononucleares de sangre periférica y de las células NK (Yssel *et al.*, 1991). Los mecanismos por los cuales IL-10 inhibe las funciones accesorias y presentadora de Ag de los macrófagos no se conocen. Si bien se ha demostrado que IL-10 puede regular negativamente la expresión de MHC de clase II en macrófagos (Rennick *et al.*, 1992; de Waal *et al.*, 1991a), también se ha sugerido que IL-10 puede inhibir la función coestimuladora de los macrófagos necesaria para la activación de las células T y NK (Howard *et al.*, 1992). IL-10 es un potente modulador de la función de monocitos/macrófagos. Como regulador negativo de la respuesta inmunitaria mediada por estas células; IL-10 puede suprimir la producción de prostaglandina E₂ y de numerosas citocinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8 producidas por monocitos después de la activación (Fiorentino *et al.*, 1991; de Waal *et al.*, 1991b; Niiro *et al.*, 1994). IL-10 también aumenta la liberación de receptores solubles de TNF e inhibe la expresión en superficie de ICAM-1 y B7 (Leeuwenberg *et al.*, 1994; Willems *et al.*, 1994). Finalmente, se ha visto que IL-10 puede suprimir la síntesis del anión superóxido (Niiro *et al.*, 1992) además de intermediarios reactivos de oxígeno (IROs) y, o bien inhibir o facilitar la síntesis de óxido nítrico (NO), en función del tiempo de exposición a macrófagos activados (Corradin *et al.*, 1993). Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que IL-10 pueda servir tanto como un activador o inhibidor de macrófagos, exhibiendo además potentes actividades anti-inflamatorias. *In vivo*, la inducción de la síntesis de IL-10 durante ciertas infecciones parasitarias se ha sugerido que es una estrategia importante por el que los parásitos evadirían las respuestas dependientes de IFN γ (Gazzinelli *et al.*, 1992). IL-10 también tiene efectos marcados sobre las células B. En particular, IL-10 induce la síntesis de IgA en células activadas CD40⁺ (Briere *et al.*, 1994) induciendo la secreción de IgG1 e IgG3, en células B vírgenes activadas CD40⁺. IL-10 ha sido la única citocina identificada para inducir tales subclases hasta la fecha (Briere *et al.*, 1994). IL-10 también aumenta la supervivencia de las células B esplénicas a través de la inducción de la síntesis de bcl-2 (Levy y Brouet 1994) y estimula la proliferación de células B a través de la regulación positiva del receptor de alta afinidad para IL-2 (Fluckiger *et al.*, 1993). Además de sus actividades en los linfocitos B, se ha

visto también que IL-10 modula la actividad de las células endoteliales, las cuáles imitan las funciones de IL-4 (Sironi *et al.*, 1993), de los timocitos (Suda *et al.*, 1990) y de los mastocitos, donde actúa como un coestimulador del crecimiento (Rennick *et al.*, 1994; Thompson-Snipes *et al.*, 1991). En eosinófilos estimulados por LPS, IL-10 inhibe la síntesis de TNF α e IL-8 y reduce el tiempo de supervivencia esperado tras la exposición al LPS (Takanashi *et al.*, 1994). Finalmente, en los neutrófilos se ha visto que IL-10 disminuye la secreción de TNF β , IL-1 β , IL-8, MIP-1 α , y MIP-1 β después de exposición a LPS (Cassatella *et al.*, 1993; Kasama *et al.*, 1994). Además, IL-10 regula positivamente la expresión IL-1ra a partir de neutrófilos estimulados por LPS, lo que sugiere un papel de IL-10 como molécula anti-inflamatoria (Cassatella *et al.*, 1994).

1.9.6. Interleucina 17 (IL-17)

IL-17 humana, también conocida como IL-17A y CTLA-8, es un polipéptido de 15-20 KDa con un grado de glicosilación variable, la cual pertenece a la familia de citocinas IL-17 (Gaffen 2009; Iwakura *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 1995; Fossiez *et al.*, 1996). IL-17/IL-17A es sintetizada como una proteína precursora de 155 aas que contiene una secuencia señal de 23 aas. Después de escindir el péptido señal, queda una proteína madura de 133 aas que contiene puentes disulfuro para estabilizar la estructura (Yao *et al.*, 1995; Fossiez *et al.*, 1996; Hymowitz *et al.*, 2001). IL-17A puede formar homodímeros unidos por puentes disulfuros de 32-38 KDa o formar heterodímeros con IL-17F unidos por uniones covalentes de 40-45 KDa (Chang y Dong, 2007; Wright *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2007). La mayoría de IL-17 secretada es bajo la forma de heterodímero IL-17A:F, sin embargo, el homodímero IL-17A:A es la isoforma que presenta mayor actividad biológica (Wright *et al.*, 2007). Las células mamíferas que se sabe son las responsables de sintetizar IL-17 son los linfocitos T CD4⁺T_H17⁺, células de Paneth, células supresoras mieloides GR1⁺CD11b⁺, células T $\gamma\delta$ CD27⁺, células CD1⁺NK1.1-iNKT y células CD3⁻CD4⁺ LTi-like (Liang *et al.*, 2007; Romagnani *et al.*, 2009; Kolls y Linden, 2004; Cua y Tato, 2010; Shin *et al.*, 1998). Se ha descrito la existencia de un receptor de alta afinidad para la IL-17 humana que aparece como un heteromultímero formado por IL-17RA y IL-17RC, con una proporción de 2:1 (Gaffen 2009; Yao *et al.*, 1997). IL-17RA es una glicoproteína TM de tipo I de 130 KDa (Iwakura *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2005; Witowski *et al.*, 2004). IL-17RC es también una glicoproteína TM tipo I, aproximadamente de 90-95 KDa de tamaño, que comparte menos de un 30% en la secuencia de aas con IL-17RA (Haudenschild *et al.*, 2002; Toy *et*

al., 2006). Ambos receptores son necesarios para la función de IL-17A e IL-17A:F. Los dos receptores parecen formar una asociación funcional seguida de la unión de su ligando a IL-17RA (Gaffen, 2009; Hu *et al.*, 2010; Ely *et al.*, 2009). A IL-17 se la conoce bien por su participación en el reclutamiento y en la supervivencia de los neutrófilos (Kolls y Linden, 2004; Witowski *et al.*, 2004; Schwarzenberger *et al.*, 2000; Yu y Gaffen, 2008; Khader y Gopal, 2010). Su inducción fue descrita inicialmente por ser el resultado de la estimulación antigénica a través de las CDs, dando como resultado la secreción de IL-23. IL-23 induce la producción de IL-17 por parte de las células T (Kolls y Linden, 2004). Una vez secretada en la médula ósea, IL-17 parece ser que induciría la expresión del G-CSF por parte de los fibroblastos estromales, con un incremento en producción y diferenciación de neutrófilos polimorfonucleares. IL-17 podría complementar esta función bloqueando directamente la apoptosis en los neutrófilos, promoviendo un mayor número de neutrófilos circulantes (Schwarzenberger *et al.*, 2000). IL-17A secretada por las células T_H17 estimula a las células epiteliales del colon a que liberen citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF, IL-6 e IL-8 y quimiocinas como MCP-1 y MIP-2, junto con metaloproteasas de la matriz extracelular, las cuales median la infiltración y destrucción del tejido inflamado. Se han observado niveles elevados de IL-17 producida por las células T_H17 en pacientes que presentan enfermedades autoinmunes que cursan con inflamación crónica del tejido, como es el caso de artritis reumatoidea, diabetes y psoriasis. La familia de citocinas secretadas por las células T_H17 (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-25, IL-17F) son un grupo de citocinas que presentan una potente actividad pro-inflamatoria *in vitro*. IL-17 es capaz también de coestimular a las células T y favorecer la maduración de CDs. En los tejidos, IL-17 también está implicada en la proliferación y reclutamiento de los neutrófilos promoviendo su extravasación, principalmente a través de su acción sobre las células endoteliales y sobre los macrófagos tisulares. En los macrófagos, IL-17 induce la producción de TNF α , IL-1 β e IL-6 (Jovanovic *et al.*, 1998). TNF α e IL-1 β actúan localmente a nivel de las células endoteliales induciéndolas a que produzcan G-CSF, un efecto que es potenciado por la presencia en el medio de IL-17 (Numasaki *et al.*, 2004). IL-17 contribuye aún más en la extravasación de neutrófilos induciendo la producción de quimiocinas y óxido nítrico aumentando la permeabilidad vascular (Kolls y Linden, 2004; Miljkovic *et al.*, 2003). Finalmente, en combinación con IL-4 y CD40L, IL-17A también promueve la generación de células secretoras de IgE (Milovanovic *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos datos se

puede decir que IL-17 presenta una función pleiotrópica que implican tanto la inmunidad innata como adaptativa jugando un papel clave en las respuestas inmunitarias.

1.10. Mecanismos de rechazo del injerto

La clasificación de los distintos tipos de rechazo de órganos se basa en criterios histopatológicos e implican un orden de aparición; el rechazo hiperagudo se produce en presencia de Acs preformados en el receptor y, en su caso, inmediatamente después del trasplante; el rechazo agudo ocurre habitualmente durante las primeras semanas aunque puede ser muy posterior a éstas; y el rechazo crónico en un plazo de meses o años. Los términos rechazo agudo y crónico se relacionan con el curso clínico del episodio de rechazo, pero frecuentemente se basan en hechos histológicos, incluyendo infiltrados inflamatorios, colangitis y endotelitis, que indican rechazo agudo y, arteriopatía y ductopenia que indican rechazo crónico.

Sólo en los últimos años, una vez que han disminuido muchas de las complicaciones técnicas e infecciosas, se ha empezado a conceder importancia al estudio del rechazo en el trasplante de hígado y de riñón. Al conocimiento de los mecanismos implicados en el mismo, ha contribuido el conocimiento que se tenía del proceso en el trasplante renal y en el estudio del trasplante de órganos experimental, aunque el hígado posee peculiaridades propias.

Actualmente, las características clínicas e histológicas del rechazo en el trasplante hepático y renal empiezan a estar bien definidas y permiten un diagnóstico fiable y una mejor estimación de la frecuencia con que se presenta. El rechazo agudo se da en, al menos, el 30% de los trasplantes y el crónico en aproximadamente el 5-10%, siendo con frecuencia irreversible y que requiere retrasplante (Saliba *et al.*, 1987; Klintmalm *et al.*, 1989; Mor *et al.*, 1992).

1.10.1 Mecanismos inmunológicos en el rechazo hiperagudo

El rechazo hiperagudo consiste en una lesión isquémica irreversible, que se produce como consecuencia de una obstrucción trombotica de los vasos del injerto. La trombosis comienza poco después de la revascularización del injerto y es desencadenada por la unión al endotelio vascular de Acs pre-existentes en el receptor que provocan la fijación y activación del complemento (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1966). De este modo, se inducen cambios en el endotelio que conducen a la liberación de formas de alto peso molecular

del factor de Von Willebrand que promueven la adhesión y agregación de las plaquetas (Starzl *et al.*, 1968). Éstas y las células endoteliales sufren un proceso de vesiculación de la membrana que ocasiona el desprendimiento de partículas lipídicas promotoras de la coagulación. A la vez, el daño ocasionado en las células endoteliales por la activación del complemento permite el acceso de las plaquetas a las proteínas de la membrana basal, provocando su activación. Estos procesos contribuyen a la trombosis y obstrucción vascular, cuya consecuencia es el rechazo hiperagudo (Demetris *et al.*, 1989).

Actualmente, este tipo de rechazo es muy infrecuente debido, en primer lugar, a la selección de receptores del mismo grupo ABO que el órgano disponible, evitando así la acción de los Ac de clase IgM existentes de forma natural (isoaglutininas) (Gordon *et al.*, 1986a). Posteriormente, se observó que el rechazo hiperagudo podía ser también mediado por Acs, generalmente IgG, dirigidos contra aloAgs HLA. La presencia de estos Acs se debe a una sensibilización previa debida transfusiones, trasplantes previos o embarazos. Mediante la realización de pruebas cruzadas, para comprobar la presencia en los receptores de Acs reactivos con las células del donante potencial, se ha conseguido evitar también este problema (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1966).

En el trasplante de hígado, la mayor parte de los casos descritos corresponden a situaciones de incompatibilidad de grupo sanguíneo, ya que este órgano es muy resistente al rechazo hiperagudo mediado por aloAcs (Gordon *et al.*, 1986b y 1987; Kynectle *et al.*, 1987; Demetris *et al.*, 1989).

1.10.2 Mecanismos inmunológicos en el rechazo agudo

El rechazo agudo del injerto puede ser mediado por Acs (rechazo humoral) o por células (rechazo celular). Hoy en día el rechazo agudo del injerto sigue siendo una de las principales causas de mortalidad/morbilidad durante las primeras semanas post-trasplante y es por ello que durante la última década la investigación inmunológica en el campo del trasplante se ha centrado en el estudio de los mecanismos humorales y celulares para la mejor comprensión de éstos, no solo para la aplicación de terapias inmunosupresoras más eficaces y específicas, sino y más importante para la validación de biomarcadores capaces de predecir la aparición de fenómenos de rechazo agudo.

➤ Rechazo agudo mediado por anticuerpos en trasplante hepático y renal:

El rechazo agudo mediado por Acs (RMA) en el trasplante puede ser definido como un rápido incremento en los niveles de parámetros serológicos específicos después del trasplante, presencia de DSAs dirigidos contra moléculas HLA, Acs del grupo ABO y/o Acs de las células endoteliales (por ejemplo, MICA, ECA, Vimentina o ETAR) [Muro *et al.*, 2005(a) y 2010]. El diagnóstico y el tratamiento del RMA es una de las principales discusiones en el ámbito del trasplante renal. Halloran *et al.*, 1990 describieron la tríada 1) disfunción del injerto, 2) neutrófilos en capilares peritubulares y 3) presencia de DSA HLA clase I, que definía una entidad nueva distinta al rechazo celular agudo clásico y al hiperagudo. Posteriormente se describieron una serie de marcadores histológicos, entre los que destacan la vasculitis severa, que incluye necrosis fibrinoide, glomerulitis, trombos en capilares, infartos y presencia de neutrófilos en capilares peritubulares que, junto con la presencia de Acs anti-HLA clase I, definen como específicos de RMA (Trpkov *et al.*, 1996).

En el caso del trasplante renal, el diagnóstico del RMA se realiza por técnicas de inmunofluorescencia para la detección de acs anti-HLA fijadores de complemento. Feucht, *et al.*, 1993 fueron los primeros investigadores que utilizaron como prueba diagnóstica el Ac anti-C4d. Éste es un producto de degradación del C4, que se activa normalmente en la vía clásica y que forma una unión covalente con los elementos tisulares en el lugar de activación. Estos autores asociaron una peor supervivencia del injerto a un año en presencia de depósitos de C4d. Hoy en día existen diversos mecanismos para combatir la presencia de DSA en trasplantados renales. El tratamiento para la eliminación del componente humoral en las reacciones de rechazo agudo incluyen tres pasos secuenciales: a) la aplicación de bolos de esteroides, eliminación de Acs plasmáticos mediante plasmaféresis y administración de altas dosis de Ig intravenosa, b) administración de Rituximab (anti-CD20) o Bortezomib (anti-proteosoma) y finalmente c) administración de Eculizumab (anti-C5) o extirpación del bazo [Muro *et al.*, 2016(a)].

El RMA es particularmente importante en el caso del trasplante hepático ya que el aloinjerto hepático ha sido considerado clásicamente más resistente a este tipo de rechazo. En este sentido, la presencia de DSA ha sido ampliamente aceptada como la causa patognómica de la aparición de RMA en muchos tipos de trasplantes de órganos a excepción del hepático (Musat *et al.*, 2011). Sin embargo, en los últimos años un interés creciente y renovado ha tenido lugar en cuanto a la mejor caracterización de la presencia

de Acs anti-HLA y no-HLA en trasplantados hepáticos. En este sentido, recientes estudios han correlacionado la presencia de DSA con un incremento en el riesgo de rechazo crónico o la aparición de rechazo agudo con ductopenia, fibrosis del injerto, complicaciones biliares e incluso con *de novo* hepatitis autoinmune (Musat *et al.*, 2011; Miyagawa-Hayashino *et al.*, 2012; O’Leary *et al.*, 2014). De igual modo, la presencia de rechazo humoral ha sido asociado con un peor pronóstico del injerto (Paterno *et al.*, 2012). Hasta la fecha, los datos publicados en cuanto a la incidencia de RMA debido a la presencia de DSA preexistentes en el trasplante hepático es relativamente baja (Suh *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2012). Sin embargo, la incidencia real es desconocida ya que la mayoría de los estudios son retrospectivos y la presencia de DSA es estudiada en solo determinadas ocasiones en trasplantados hepáticos (Abu-Elmagd *et al.*, 2012). Frecuentemente, la mayoría de los DSA observados en situación pre-trasplante desaparecen durante los primeros meses posteriores al trasplante, sin alterar aparentemente la supervivencia del injerto, como informado por Taner *et al.*, 2012. Diferentes mecanismos que expliquen esta situación de “privilegio inmunológico” han sido propuestos en el ámbito del trasplante hepático: 1) el injerto hepático secreta moléculas HLA de clase I solubles que formaría inmuno complejos con los aloAcs y que posteriormente serían eliminados por las células de Kupffer en el bazo; 2) las células de kupffer fagocitan inmunocomplejos y agregados de plaquetas limitando la activación del complemento; 3) la limitada expresión de Acs HLA de clase II en la microvasculatura del hígado; 4) la alta capacidad regenerativa del hígado incluso después de una respuesta aloinmunitaria; 5) una gran superficie del endotelio que es capaz de absorber gran cantidad de Acs circulantes (Piazza *et al.*, 1997; O’Leary *et al.*, 2014).

Otros grupos han informado una peor supervivencia del injerto y mayor incidencia de rechazo cuando las pruebas cruzadas pre-trasplante son positivas o cuando DSA preformados son detectados (Muro *et al.*, 2012; Malheiro *et al.*, 2016). La determinación de Acs anti-HLA previa al trasplante, es altamente recomendable ya que la presencia o ausencia de DSA podría determinar el régimen inmunosupresor o indicar un incremento en el riesgo de complicaciones post-trasplante en el trasplantado hepático [Muro *et al.*, 2016(b)].

La presencia de DSA en el periodo post-trasplante puede deberse a la existencia de Acs pre-existentes o a la formación *de novo* post-trasplante. Particularmente, la presencia de Acs *de novo* se asocia con una peor supervivencia en la mayoría de trasplantes. En concreto, se ha observado que el desarrollo de hepatitis inmune *de novo* en trasplantados

hepáticos se asocia con la presencia de Acs anti-GSTT1. Esta asociación está relacionada con la incompatibilidad en el gen de GSTT1 en el receptor hepático (Kozłowski *et al.*, 2011; Ohe *et al.*, 2014). Recientemente, se ha descrito otra molécula que presenta un papel importante en respuesta inmunitaria contra el injerto hepático. Se trataría del receptor de la angiotensina de tipo 1 (ATR1 de inglés, *angiotensin receptor type 1*). La presencia de Acs anti-ATR1 y DSAs anti-DRB1 podrían ser biomarcadores candidatos de fibrosis hepática post-trasplante (Kozłowski *et al.*, 2012). De hecho, la presencia de DSA de clase II ha sido recientemente relacionada con la presencia de depósitos de C4d en las células endoteliales del aloinjerto, junto con un incremento en la fibrosis y peor supervivencia del injerto (Abu-Elmagd *et al.*, 2012; Iacob *et al.*, 2015).

En definitiva, el estudio de la presencia de Acs responsables del RMA en trasplante hepático presenta actualmente un creciente interés.

➤ Rechazo agudo mediado por células en trasplante hepático y renal:

El rechazo agudo celular se caracteriza por la presencia de un infiltrado inflamatorio mixto formado por linfocitos y macrófagos (Ascher *et al.*, 1984; Hayry *et al.*, 1984; Adams y Neuberger, 1990). El principal mecanismo efector es la lisis celular mediada por linfocitos T CD8⁺ reactivos con las moléculas HLA clase I del injerto, pero también juega un papel importante la lisis mediada por macrófagos activados, al igual que en la hipersensibilidad retardada, y la lisis medida por células NK (Fung *et al.*, 1986; Muro *et al.*, 1996).

El rechazo agudo celular en el trasplante hepático, aparece generalmente en las primeras 2 semanas post-trasplante, y es habitualmente reversible con un aumento de la inmunosupresión y su diagnóstico histológico depende de la presencia de, al menos, dos de los siguientes hallazgos: 1) presencia de un infiltrado celular mixto en los tractos portales, 2) la infiltración y daño del epitelio biliar de los conductos biliares intrahepáticos y 3) la inflamación del endotelio venoso en los tractos portales (Adams *et al.*, 1990; Mor *et al.*, 1992; Ayres *et al.*, 1993).

En el hígado humano, la expresión de Acs HLA esta básicamente confinada a las células sinusoidales (células de Kupffer y endoteliales) que expresan moléculas clase I y II (Prickett *et al.*, 1988). El epitelio biliar expresa clase I y los hepatocitos son normalmente negativos para clase I y II (Barbatis *et al.*, 1981; Lautenschlager *et al.*, 1981; Minguela, 1998). La expresión de HLA aumenta durante los episodios de rechazo y

puede verse afectada por las infecciones virales, probablemente en respuesta a la liberación local de citocinas, particularmente de $\text{INF}\gamma$, isquemia u obstrucción biliar (Spengler *et al.*, 1988; Gouw *et al.*, 1990).

El mecanismo, comúnmente aceptado, que lleva a la aparición del rechazo agudo comienza con la activación de linfocitos T, CD4^+ y posiblemente también CD8^+ , frente a los aloAgs. Para que el reconocimiento tenga lugar, es necesario el contacto previo del linfocito T con la célula alogénica implicando al TCR y, a moléculas y factores coestimuladores, como IL-1 (Simpson *et al.*, 1989). También participan las moléculas de adhesión, como ICAM-1, que se expresa en células del endotelio biliar aumentando notablemente durante el rechazo y manteniéndose en los pacientes que no responden a la inmunosupresión (Adams *et al.*, 1989). La activación de los linfocitos T se traduce en una liberación de IL-2 y otras citocinas, lo que da lugar al reclutamiento, proliferación, diferenciación y activación de otros linfocitos, entre ellos linfocitos T CD8^+ citotóxicos (Heidecket *et al.*, 1984). Se produce así, una reacción en cascada que lleva a una intensa respuesta inflamatoria durante la cual se liberan $\text{INF}\gamma$ y otros factores que provocan un aumento de la expresión de moléculas HLA (So *et al.*, 1987) y moléculas de adhesión, lo que facilita el reconocimiento de las células diana y la atracción hacia el lugar de la inflamación de monocitos, neutrófilos y eosinófilos, donde estas células funcionan también como células efectoras (Adams *et al.*, 1989; Steinhoff *et al.*, 1990).

La presencia de determinadas citocinas puede facilitar la activación de los linfocitos T o motivar su inhibición. Se ha observado que, en determinados pacientes sometidos a trasplante hepático, se produce una elevación de los niveles de IL-10 en sangre durante las primeras horas subsiguientes al trasplante (Le Moine *et al.*, 1994; Minguela *et al.*, 1999) probablemente secretada por parte del injerto, cuya elevación se ha asociado a una frecuencia de rechazo menor que la observada en pacientes donde la IL-10 se mantiene en niveles equivalentes al pretrasplante (Bromberg, 1995; Minguela *et al.*, 1999).

Los linfocitos T son las células más características que componen el infiltrado durante el rechazo, tanto los CD4^+ como los CD8^+ , se acumulan en los tractos portales e infiltran el epitelio biliar y el endotelio, principales dianas del proceso de rechazo (Fung *et al.*, 1986; Perkins *et al.*, 1987). El predominio de linfocitos T CD4^+ ha sido asociado con una mayor reversibilidad, mientras que la persistencia de linfocitos T CD8^+ se asocia con un rechazo más severo y con la progresión a rechazo crónico (Perkins *et al.*, 1988). La mayoría de las células infiltrantes son de fenotipo de memoria (CD45RO^+), que expresan marcadores de activación como HLA-DR y CD25 (Lautenschlager *et al.*, 1988).

Se ha observado también que el nivel de expresión de CD28 en los linfocitos T de sangre periférica aumenta significativamente en los días previos al rechazo agudo, a la vez que lo hacen sus ligandos, las moléculas correceptoras CD80 y CD86 en linfocitos B, posibilitando con ello la activación de una de las vías de coestimulación de las señales Ag-específicas conducidas por TCR (García-Alonso *et al.*, 1997; Minguela *et al.*, 2000, Blanco *et al.*, 2011).

Otros leucocitos, atraídos por quimiotaxis, actúan también como células efectoras de modo que la presencia de neutrófilos y eosinófilos en las biopsias hepáticas ha sido uno de los indicadores utilizados para definir el rechazo (Sankary *et al.*, 1989). Los neutrófilos liberan radicales superóxido y enzimas proteolíticas (Adams *et al.*, 1990) que contribuyen al daño tisular y los eosinófilos sufren también degranulación en el interior del hígado (Sankary *et al.*, 1989).

1.10.3 Mecanismos inmunológicos en el rechazo crónico

El rechazo crónico se caracteriza por la aparición de fibrosis y la pérdida de las estructuras normales del órgano injertado. Su patogenia es menos conocida que la del rechazo agudo. En algunos casos la fibrosis puede deberse a la cicatrización de la herida producida tras la necrosis celular de uno o más episodios de rechazo agudo, pero es frecuente que el rechazo crónico se produzca sin antecedentes de rechazo agudo. La existencia de una isquemia (Snover *et al.*, 1984) o de una reacción de hipersensibilidad retardada crónica son otras de las posibles causas de este tipo de rechazo.

➤ Rechazo crónico mediado por anticuerpos en trasplante hepático y renal:

Ya desde finales del siglo XX, el grupo de investigación de Demetris *et al.*, en 1987, observaron que injertos de pacientes trasplantados hepáticos con evidencias patológicas de rechazo crónico, presentaban depósitos de Acs en las arteriolas del injerto. Un estudio clínico llevado a cabo posteriormente puso de manifiesto que la incidencia de rechazo crónico era más frecuente en pacientes presensibilizados en comparación con pacientes libres de Acs (Takaya *et al.*, 1999). Sin embargo, un estudio retrospectivo llevado a cabo, por nuestro grupo de investigación, en 268 trasplantados hepáticos demostró que la incidencia de rechazo crónico no difería de pacientes con prueba cruzada pre-trasplante positiva de pacientes con prueba cruzada negativa [Muro *et al.*, 2005(b)]; sin embargo, la supervivencia del injerto al año post-trasplante en el grupo de pacientes

con prueba cruzada positiva fue marcadamente reducida (28.6%). Recientemente, O'Leary *et al.*, 2011 publicaron que DSAs fueron mas frecuentemente encontrados en el grupo de estudio de rechazo crónico en donde el 60% de éstos fueron Acs preexistentes. En el mismo estudio, trasplantados hepáticos con rechazo crónico presentaron mayor frecuencia de DSA anti-HLA clase I. En un posterior estudio llevado a cabo por el mismo grupo en donde recogieron los datos de 2,723 trasplantes tras 20 años de experiencia, pusieron de manifiesto que pacientes con prueba cruzada pre-trasplante + no presentaron mayor incidencia de rechazo crónico (Ruiz *et al.*, 2012).

De forma similar a la controversia que existe en los datos publicados hasta la fecha en cuanto a la incidencia del rechazo crónico en pacientes con Acs preexistentes, los estudios llevados a cabo sobre el daño tisular crónico y la supervivencia del injerto a largo plazo también presentan resultados controvertidos. Ya existían datos publicados sobre la correlación entre la presencia de pruebas cruzadas positivas para linfocitos T y el daño del injerto hepático (Takaya *et al.*, 1999). De acuerdo con estudios mas recientes, la presencia de DSA circulantes fue asociada con la aparición de ductopenia en trasplantados hepáticos (Musat *et al.*, 2011). El desarrollo de DSA *de novo* (con una IMF>5,000) en trasplantados hepáticos ha sido asociado con una peor supervivencia a 5 años post-trasplante, publicado en un reciente estudio retrospectivo en 749 trasplantados hepáticos (Kaneku *et al.*, 2013). En otro estudio en una serie de 809 trasplantados hepáticos, se observó que muestras de biopsias de injerto hepático de pacientes con prueba cruzada positiva y presencia persistente de DSA circulantes presentaron mayor evidencias de inflamación del conducto biliar, así como del subendotelio portal y venoso (Lunz *et al.*, 2012). En un meta-análisis retrospectivo llevado a cabo recientemente en los Estados Unidos (Ruiz *et al.*, 2012), Asia (Shin *et al.*, 2013) y Europa (Goh *et al.*, 2010) se ha puesto de manifiesto que la presencia de anticuerpos preformados previos al trasplante hepático no presenta ningún impacto en la supervivencia del pacientes o injerto.

El rechazo crónico mediado por Acs, en el caso del trasplante renal, supone actualmente la causa mas frecuente de pérdida del injerto (Joosten *et al.*, 2005; Hassan y Gheith, 2014). El rechazo crónico mediado por Acs difiere del agudo en que no hay presencia de un componente inflamatorio agudo (edema, necrosis y trombosis) mediado por neutrófilos. El rechazo crónico mediado por Acs está actualmente incluido en la última clasificación de la patología del injerto renal de Banff 07 bajo los siguientes criterios diagnósticos: 1) cambios en la morfología del glomérulo compatibles con glomerulopatía del injerto e inflamación severa de los capilares peritubulares junto con

fibrosis intersticial y atrofia tubular con o sin pérdida de capilares peritubulares; 2) deposición difusa de C4d en los capilares peritubulares y 3) presencia de DSA (Terasaki *et al.*, 2007). Se ha postulado que el mayor factor de riesgo para el desarrollo de rechazo crónico del injerto renal es la presencia previa de episodios de rechazo agudo. En este sentido, la supervivencia media de trasplantados renales sin rechazo agudo es de 12.5 años frente a los 6.6 años de trasplantados renales con rechazo agudo previo (Lindholm *et al.*, 1993).

➤ Rechazo crónico mediado por células en trasplante hepático y renal:

En el trasplante de hígado, el rechazo crónico es considerado generalmente como una situación irreversible, caracterizada por la destrucción de los conductos biliares a cargo del sistema inmunitario y vasculopatía obliterativa de la arterias, que desemboca en un síndrome de colestasis progresiva, que normalmente no responde a la inmunosupresión (Hubscher y Neuberger, 1993). Los términos *rechazo ductopénico* (del inglés, DR, *ductopenic rejection*) o *síndrome de pérdida de los conductos biliares* (del inglés, VBDS, *vanishing bile duct syndrome*) son equivalentes (Ludwing *et al.*, 1987). Su incidencia varía entre un 2.4% y un 16.8 %, según las series analizadas y es la principal causa de pérdida del injerto después de la primera etapa postrasplante (Wiesner *et al.*, 1991). Con la introducción del inmunosupresor TRL se abrió una vía de esperanza mediante su empleo en la terapia de rescate. La pérdida de los conductos biliares ocurre progresivamente durante las etapas tempranas, en que aparece infiltrado inflamatorio portal asociado al daño de los conductos biliares, pero cuando todavía no hay pérdida de conductos biliares es difícil distinguirlo del daño que ocurre en el rechazo agudo. En estadios terminales, los conductos biliares pueden haber desaparecido en más del 80% de los tractos portales menores. El infiltrado inflamatorio con presencia de histiocitos puede aparecer mezclado con tejido fibroso desestructurado (Hubscher y Neuberger, 1993).

Se sabe relativamente poco del papel de la inmunidad en el rechazo crónico, aunque se ha aceptado generalmente que la pérdida de conductos biliares es causada fundamentalmente por mecanismos inmunológicos. Entre ellos, se cree que tiene un papel importante la acción de linfocitos Tc, dado que el predominio de células CD8⁺ en el infiltrado del rechazo agudo se asocia con un mayor riesgo de progresión hacia el rechazo crónico (Perkins *et al.*, 1988; MacCaugan *et al.*, 1990). También es posible que participen

mecanismos humorales, ya que se ha demostrado una mayor incidencia de VBDS en los trasplantes realizados con pruebas cruzadas + (Donaldson *et al.*, 1987).

Varios estudios han mostrado un aumento de la expresión de Ags de clase I en hepatocitos y, de clase I y II en los conductos biliares y el endotelio, posterior al trasplante, lo que podría convertir a estas estructuras en más susceptibles al ataque inmunológico. Estos cambios, que probablemente ocurren en respuesta a la liberación de citocinas por parte de linfocitos T activados, también se asocian al rechazo agudo y se observan en menor grado durante otras complicaciones del trasplante como la isquemia, la obstrucción biliar y las infecciones virales (O'Grady *et al.*, 1988; Oguma *et al.*, 1989). En el caso de rechazo agudo, el aumento de la inmunosupresión reduce los niveles de expresión de Ags HLA y también de ICAM-1, que vuelven a sus valores basales, mientras que su persistencia se asocia a la progresión hacia rechazo crónico, sugiriendo la participación de los mecanismos celulares del sistema inmunitario en la patogénesis del rechazo crónico. No obstante, no está completamente descartado que esto sea un epifenómeno (Adams *et al.*, 1989; Steinhoff, 1990).

El papel del rechazo crónico celular en el trasplante renal parece ser que no juega un papel tan importante como el mediado por Acs. Se ha postulado que la vía indirecta es el factor que juega un principal papel en el rechazo crónico del injerto (Ciubotariu *et al.*, 1998; Vella *et al.*, 1997). El papel que las células T tienen en el desarrollo de rechazo crónico es secretando citocinas de tipo T_H2 . Numerosos estudios han descrito que las citocinas secretadas por los linfocitos T_H2 , tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 son responsables de la fibrosis tisular y del rechazo crónico (Shirwan *et al.*, 1998; Holzknicht y Platt, 2000). Este hecho fue validado en un estudio en donde la infiltración de linfocitos T_H2 en ratones inmunodeficientes trasplantados con injerto cardiaco condujo al desarrollo de rechazo crónico (VanBuskirk *et al.*, 1996).

1.11. Farmacodinamia: Biomarcadores del efecto inmunosupresor

La farmacodinamia se centra en el efecto biológico del inmunosupresor en su diana, esto es, en la respuesta inmunitaria (Dambrin *et al.*, 2000; Böhler *et al.*, 2007). Es decir, al contrario que la farmacocinética, la farmacodinamia estudia cómo afecta el fármaco al organismo. Más relevante aún, la farmacodinamia determina la variabilidad individual, puesto que la misma dosis de un fármaco y la misma exposición pueden

producir diferentes resultados biológicos y clínicos, posiblemente como consecuencia de la heterogeneidad genética.

Cada día adquieren mayor importancia los biomarcadores como parámetros que pueden medirse objetivamente y utilizarse como indicadores en diversos procesos que, para este caso, sería la respuesta a un tratamiento inmunosupresor (San-Segundo *et al.*, 2012). Sin embargo, los marcadores de la respuesta farmacodinámica a estos tratamientos, aunque pueden emplear la misma metodología, deben diferenciarse de los biomarcadores utilizados en el trasplante para detectar precozmente un rechazo o nefrotoxicidad (proteómica y metabolómica). En la última década se han desarrollado una serie de métodos destinados a estudiar la farmacodinamia de los inmunosupresores.

Los biomarcadores farmacodinámicos se dividen en *específicos* y *no específicos* del fármaco. Habitualmente, los primeros analizan la función de la diana concreta para cada fármaco inmunosupresor cuando existe un método para ello (calcineurina o IMPDH), si bien no es así en otros casos (mTOR). En cambio, los ensayos no específicos, evalúan el efecto inmunomodulador de los fármacos en distintas vías de la respuesta inmunitaria frente al injerto. Estos ensayos que estudian el efecto sobre la función de la célula frente a la que actúan, pueden ser, a su vez, en *específicos* y *no específicos del donante*, en función de que la prueba de función inmunitaria se realice empleando como estímulo antigénico células del donante o no, es decir, estímulo mitogénico policlonal.

Además, el efecto farmacodinámico puede ser evaluado sobre otro tipo de marcadores, como la ocupación del receptor (por ejemplo, CD25 o CD3 en el caso de tratamiento con *baxilimab* u *OKT3*, respectivamente) o el número de células diana (por ejemplo, linfocitos T en los pacientes tratados con *Timoglobulina* o linfocitos B en los tratados con *rituximab*). A pesar de los recientes trabajos que muestran la utilidad de estos marcadores de respuesta farmacodinámica para monitorizar la inmunosupresión, los resultados obtenidos en estudios previos sobre la evaluación del impacto clínico de la medición de biomarcadores del efecto inmunosupresor en los pacientes trasplantados son prometedores, pero nada concluyentes, debido a una serie de factores:

- Las series de pacientes analizadas son pequeñas.
- La falta de protocolos analíticos estandarizados y validados para medir estos biomarcadores, dificultando la comparación, así como el análisis conjunto de los resultados obtenidos en diferentes centros.

- La complejidad de las metodologías y la infraestructura de trabajo requerida (para la mayoría de los biomarcadores que se analizan en las muestras deben ser procesadas en menos de 12 horas tras su extracción).
- Una gran parte de los estudios previos se basan en análisis puntuales que no permiten evaluar la evolución de estos biomarcadores a lo largo del tratamiento (monitorización farmacodinámica secuencial).
- Emplean un número de parámetros limitados.
- No se realizan estudios de correlación entre el efecto que los cambios farmacodinámicos y farmacocinéticos y las dosis empleadas ejercen sobre estos parámetros.

No obstante, es lógico pensar que los biomarcadores, como los que se incluyen en esta memoria de tesis, pueden permitir evitar una inmunosupresión defectuosa o excesiva en trasplantados y mejorar el pronóstico del trasplante a largo plazo.

Dado que el rechazo es producido por células T activadas por Ags del injerto, bien por vía directa, o por vía indirecta, la alternativa más lógica es analizar *in vitro* cómo el fármaco inmunosupresor empleado puede interferir en la activación y en la función linfocitaria y en definitiva modular el rechazo.

1.11.1. Monitorización de la inmunosupresión

Los receptores deben recibir tratamiento inmunosupresor de por vida, lo que conlleva un riesgo aumentado de infecciones y de desarrollar tumores. Pero si esta inmunosupresión es insuficiente o se interrumpe, corren el riesgo de sufrir rechazo (Halloran, 2004). El desarrollo y aplicación clínica de pruebas de laboratorio que informen de la respuesta inmunitaria alogénica representa un desafío en el campo del trasplante. De manera ideal, estas pruebas deberían ser capaces de diagnosticar el rechazo sin tener que recurrir a técnicas invasivas, así como de proporcionar índices válidos de respuesta inmunitaria del huésped para individualizar la terapia inmunosupresora.

En la actualidad, la mayoría de las estrategias inmunosupresoras se basan en la reducción de la dosis farmacológica junto con la combinación de fármacos que favorezcan, o al menos no dañen tanto, el establecimiento de una verdadera tolerancia inmunológica frente al injerto. Para conseguirlo se hace imprescindible contar con herramientas capaces de monitorizar la respuesta a la inmunosupresión. En este sentido,

el trasplante ha empleado la monitorización farmacocinética, que se ha ido desarrollando a medida que han aparecido nuevos fármacos inmunosupresores.

Más importante ha sido el conocimiento de las enzimas implicadas en la metabolización de los inmunosupresores y cómo los polimorfismos en los genes que codifican para esas enzimas de biotransformación pueden contribuir a la respuesta del receptor a una determinada dosis de fármaco. Se puede considerar aún más relevante el avance en el conocimiento y en el desarrollo de metodologías de laboratorio capaces de determinar en el sujeto la respuesta inmunitaria que, en definitiva, es el objetivo final de la inmunosupresión.

Estas nuevas herramientas de monitorización se han ideado para conocer de primera mano la situación individual sin tener que basarse únicamente en datos indirectos como los niveles sanguíneos del fármaco. Con toda probabilidad, son las que permitirán en un futuro cercano optimizar el manejo de la inmunosupresión, lo que se conoce como *inmunosupresión individualizada*. El avance hacia este tipo de inmunosupresión se fundamenta también en la irrupción de los nuevos métodos para medir la expresión génica (PCR cuantitativa, *microarray*) de todas las moléculas implicadas en las rutas de señalización de la respuesta aloinmune y en los procesos de biotransformación de los fármacos inmunosupresores (Martínez-Llordella *et al.*, 2007). El objetivo de la inmunosupresión farmacológica es inhibir la activación de los linfocitos T, sin la cual el rechazo del órgano no es posible. En los últimos años han proliferado los agentes denominados biológicos (Daclizumab, Basiliximab, LEA29Y), que en su mayoría son AcMo dirigidos contra moléculas esenciales en la respuesta inmunitaria y que han abierto un espectro muy amplio de actuación. Con estos agentes se consigue una inmunosupresión más selectiva y que origina menos efectos adversos.

1.11.2. Inmunosupresión personalizada: Bases de la monitorización farmacocinética y farmacodinámica

El éxito y la implantación del trasplante han estado ligados al desarrollo y al empleo de los fármacos inmunosupresores. De hecho, fue la introducción de la CsA a principios de los años 80 la que dio el espaldarazo definitivo a la implantación del trasplante como práctica clínica generalizada, ya que consiguió aumentar de manera considerable la supervivencia en el primer año, cuando el riesgo de rechazo agudo era tan importante (Kahan, 2003).

Posteriormente, en la década de los 90, comenzaron a aparecer otros agentes inmunosupresores, como el TRL o Fujimycin (un nuevo inhibidor de la CNI) y el MMF, que permitieron mejorar significativamente no solo la eficacia del tratamiento (ayudaron a incrementar la supervivencia del injerto al año del trasplante), sino también el perfil de seguridad (menor incidencia de efectos adversos). En los últimos años, los inhibidores de mTOR, el SRL (o rapamicina) y el everolimus, han despertado un gran interés como alternativa a la terapia inmunosupresora convencional, dado que se trata de fármacos que no producen nefrotoxicidad y no poseen actividad antiproliferativa (Burkhart *et al.*, 2004; Kahan, 2003). Las nuevas estrategias basadas en terapias de inducción con AcMo, dirigidos frente a moléculas específicas que intervienen en la respuesta inmunitaria responsable del rechazo del injerto, tienen un futuro prometedor, aún por demostrar en la mayoría de los casos (Tabla 1.1).

Administrados durante el primer mes postrasplante conjuntamente con prednisolona y/o MMF, estos Acs (Timoglobulina[®], daclizumab, basiliximab, entre otros) permiten una introducción más tardía de los CNI o, en su caso, de los mTOR, una vez recuperada la función renal y cerrada la herida quirúrgica (Halloran, 2004). La aparición de estos nuevos agentes tiene mucho que ver con el enorme avance en el conocimiento de la respuesta inmunitaria, en general, y del aloinjerto, en particular. Ante este amplio espectro de posibilidades para establecer diferentes combinaciones de fármacos, no resulta nada fácil elegir de forma racional (con la ayuda de la evidencia científica) cuál es el mejor tratamiento personalizado para cada paciente que se trata. Es decir, actualmente, en la práctica clínica la cantidad de inmunosupresión necesaria para cada paciente se decide en función de los datos clínicos (antecedentes, función del órgano, comorbilidades), histológicos y farmacocinéticos (concentraciones plasmáticas del fármaco).

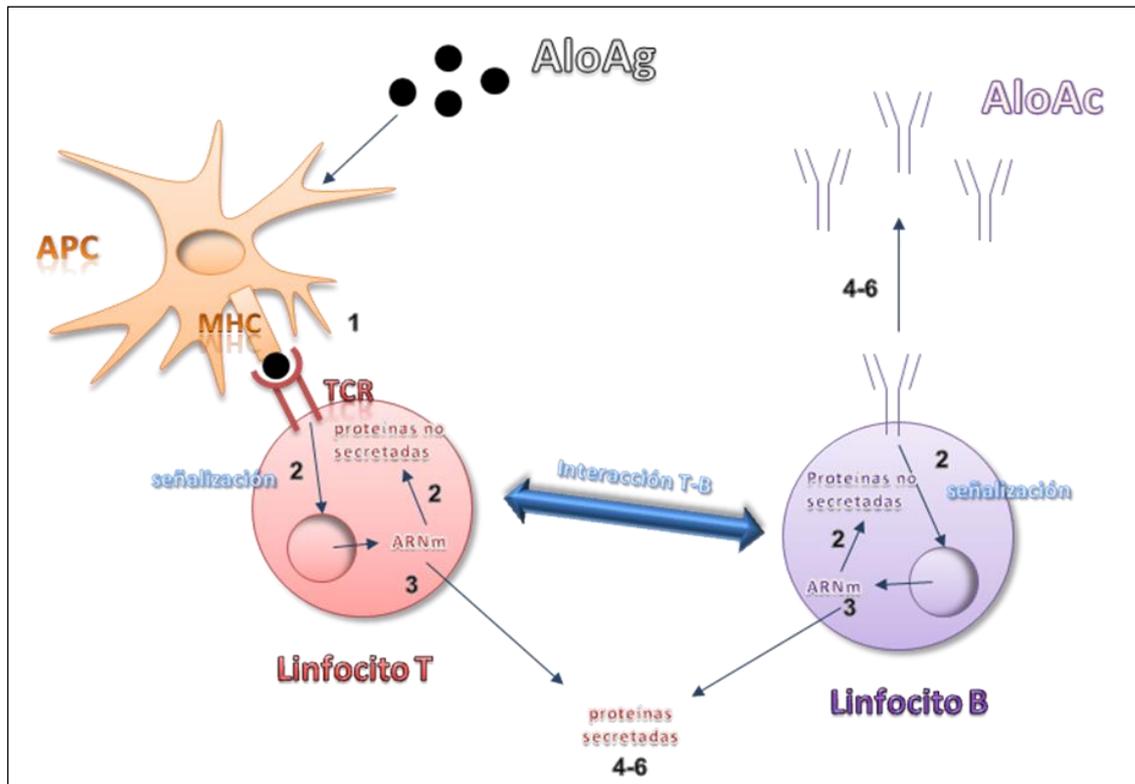
Tabla 1.1. Inmunosupresión empleada en el trasplante

Fármacos/Anticuerpos	Mecanismo de acción
Glucocorticoides	Suprimen las señales coestimuladoras y la actividad de células presentadoras de antígeno
Ciclosporina, tacrolimus	Inhiben la actividad de la calcineurina linfocitaria al unirse a ciclofilina o a FKBP12, respectivamente. Inhiben la transcripción de genes como NFAT
Sirolimus, everolimus	Inhiben mTOR, bloqueando la coestimulación inducidas por

Micofenolato mofetil, leflunomida, FK778	citocinas e interrumpiendo la progresión en el ciclo celular Funcionan como agentes antiproliferativos al inhibir la síntesis de nucleótidos (purinas, pirimidinas)
Azatioprina	Antimetabolito que bloquea la síntesis de purinas mediante una inhibición competitiva
FTY720	Antagonista del receptor del fosfato de esfingosina 1 que secuestra los linfocitos en los órganos linfoides secundarios
Timoglobulina[®], muromonab (anti-CD3), alemtuzumab (anti-CD52), rituximab (anti-CD20)	Elminan células T o células B
Basiliximab, daclizumab (anti-CD25), Belatacept[®] (CTLA Ig)	Bloquean las señales coestimuladoras en los linfocitos
Inmunoglobulinas intravenosas	Interfieren en múltiples niveles de la respuesta inmunitaria

La experiencia previa de que se dispone con las diversas combinaciones que ofrece todo este arsenal terapéutico demuestra que es posible obtener buenos resultados a corto plazo respecto a la prevención del rechazo del injerto (en algunos trasplantes la incidencia de rechazo agudo es inferior al 10%). A pesar de ello, el perfil de seguridad de este tratamiento a corto y largo plazo presenta un notable margen de mejora. La inmunosupresión es un tratamiento crónico administrado para prevenir el rechazo del órgano trasplantado, y no está exenta de complicaciones que pueden afectar a la supervivencia (Cattaneo *et al.*, 2004; Mahalati *et al.*, 2000). La mayoría de estos fármacos pueden producir importantes efectos adversos, entre los que destacan el riesgo cardiovascular, nefrotoxicidad, diabetes, tumoraciones y/o infecciones virales, por ejemplo, la del papiloma BK o el citomegalovirus (CMV). La enorme redundancia del sistema inmunitario y la complejidad de los circuitos que regulan la respuesta inmunitaria hacen “imposible” predecir el pronóstico del injerto, así como el efecto inmunomodulador de la inmunosupresión en cada paciente tratado. Todo ello ha conducido a buscar nuevas pautas de inmunosupresión y nuevas estrategias para monitorizar esta terapia con la finalidad de disminuir la incidencia de estas complicaciones sin aumentar el riesgo de rechazo. La complejidad de la respuesta, junto con el desconocimiento de los mecanismos, hizo que la única manera de controlar la terapia inmunosupresora fuese indirecta, mediante el control de los niveles sanguíneos del fármaco, es decir, mediante una monitorización farmacocinética. No cabe ninguna duda de la utilidad de este enfoque

en todo este tiempo, pero el avance en el conocimiento de la inmunología y del mecanismo de acción de los nuevos inmunosupresores ha facilitado una terapia inmunosupresora, individualizada para cada paciente, sobre la base de nuevos parámetros farmacodinámicos (Dambrin *et al.*, 2000) y farmacogenómicos (Cattaneo *et al.*, 2004; Sawitzki *et al.*, 2007). El fármaco inmunosupresor actúa en distintos brazos de la



respuesta inmunitaria y en los últimos años se han desarrollado, a partir de los modelos animales fundamentalmente, técnicas capaces de detectar la respuesta inmunitaria y la respuesta a un determinado fármaco (figura 1.5).

Figura 1.10. Esquema representativo de los mecanismos implicados en la respuesta aloinmunitaria del paciente trasplantado. La presentación de AloAg del injerto, por la vía directa o indirecta, induce una activación de las células T y B del receptor. Esta activación linfocitaria induce una serie de señales intracelulares que, finalmente, se traducen en la secreción de diversas proteínas al espacio extracelular (citocinas, moléculas citotóxicas, Acs). (Tomada y modificada de Monitorización de la inmunosupresión vol.8, 2008).

Actualmente, existen diversas estrategias de laboratorio que permiten detectar la expresión de moléculas y la concentración de proteínas a nivel intracelular y/o extracelular, tal como se esquematiza en la figura 1.10. En primer lugar, (1) la CF se ha desarrollado hasta el punto de poder detectarse la especificidad de la célula T alorreactiva mediante la tinción con tetrámeros de MHC conjugadas a fluorocromos. Una vez activada la célula T o B alorreactiva, se inducen una serie de vías de transducción intracelular que

aumentan la expresión y/o el estado de ciertas moléculas que se pueden detectar también mediante CF; (2) esas señales activan diversos factores de transcripción que inducen un aumento de expresión de ARNm y que se puede medir por las técnicas actuales de PCR cuantitativa y *microarrays*; (3) la traducción de ARNm genera proteínas que también se pueden detectar antes de su secreción al espacio extracelular mediante CF intracelular. Finalmente todos los productos secretados por los linfocitos T y/o B al espacio extracelular se pueden detectar mediante técnicas de reciente implantación que suelen medir los niveles de estos factores solubles en sangre.

1.11.3. Farmacocinética

La monitorización farmacocinética estudia como el organismo modifica el fármaco mediante los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción, lo que se refleja en la clínica en forma de concentración sanguínea (exposición del fármaco) (Dambrin *et al.*, 2000). La razón de monitorizar las concentraciones de los fármacos inmunosupresores reside en que se trata de agentes con un estrecho margen terapéutico, esto es, hay una pequeña diferencia entre las concentraciones que ejercen el beneficio inmunosupresor buscado y el efecto adverso no deseado. En la población trasplantada hay que considerar que ese margen varía según un amplio rango de factores: edad del receptor, tipo de injerto, indicación para el trasplante, tiempo postrasplante, episodios de rechazo, etc. Por ello, la monitorización frecuente de los niveles ha permitido y permitirá, a pesar de las nuevas estrategias de monitorización, identificar todos los factores de confusión mencionados.

De manera usual, la monitorización de la terapia inmunosupresora que reciben los receptores se basa en el análisis de las concentraciones del fármaco en sangre, con el objetivo de garantizar que éstos alcancen concentraciones dentro del margen terapéutico establecido. Con esta estrategia se consigue evitar situaciones de sobreinmunosupresión (favorece la aparición de infecciones oportunistas y tumoraciones) y estados de inmunosupresión insuficiente (mayor incidencia de rechazo) en la mayoría de los pacientes.

En este sentido, en los últimos años se han llevado a cabo estudios preliminares sobre la utilidad clínica del análisis de biomarcadores específicos del efecto inmunomodulador que ejercen los fármacos inmunosupresores sobre la respuesta de la célula T frente al injerto (monitorización farmacodinámica). Estos trabajos han

demostrado que existe una asociación entre estos parámetros farmacodinámicos y el grado de inmunosupresión alcanzado en cada paciente (Millán *et al.*, 2009). La combinación de una monitorización farmacocinética y una monitorización farmacodinámica basada en el análisis de biomarcadores específicos del efecto de estos fármacos sobre la respuesta inmune, parece lo más adecuado para realizar un ajuste de dosis a la medida de cada paciente (Yatscoff *et al.*, 1998). El uso de estos biomarcadores puede reflejar y predecir la susceptibilidad de cada paciente de recibir un fármaco inmunosupresor concreto; asimismo, puede ofrecer una forma más racional de elegir los componentes de la terapia y ajustar posteriormente la dosis.

La farmacocinética presenta varios problemas aún, a saber, la asociación débil y variable de las concentraciones sanguíneas con el grado de inmunosupresión alcanzado, la elección del ensayo más adecuado para medir los niveles sanguíneos y la dudosa utilidad de los rangos terapéuticos poblacionales (Benet, 1999). Por ello, no se puede enmarcar todas las fuentes de variabilidad farmacocinética, farmacodinámica y farmacogenética dentro de unos rangos terapéuticos de niveles sanguíneos definidos para una población general, puesto que es demasiado simplista. Además, los rangos terapéuticos se han establecido habitualmente en términos de eficacia y tolerancia, pero en general no han evolucionado con los métodos de monitorización. En efecto, en la mayoría de los fármacos se dispone de márgenes terapéuticos para la concentración predosis matinal (en el periodo postrasplante inmediato y en la etapa de mantenimiento), pero se sabe muy poco respecto a los rangos terapéuticos para las áreas bajo la curva (AUC, completas o simplificadas).

1.11.4. Correlación de los cambios inducidos por la farmacocinética y farmacodinamia sobre los marcadores de evolución del injerto

La incorporación de la genómica, la proteómica y la metabolómica permitirá obtener información acerca de todos los procesos biológicos interrelacionados que favorecen la aparición de una enfermedad o una respuesta individual a un determinado tratamiento. Si se valora la necesidad de establecer tratamientos personalizados, el papel que puede desempeñar la farmacogenómica es considerable. En el ámbito de los trasplantes, los análisis de proteómica y metabolómica (de más reciente incorporación) realizados en diversas matrices biológicas (sangre u orina) pueden ser de gran utilidad para identificar biomarcadores de daño tisular sin necesidad de realizar biopsias.

Recientemente, se han evaluado diversos marcadores biológicos del efecto inmunosupresor de estos fármacos y se está realizando un esfuerzo para correlacionar la farmacocinética con la farmacodinamia a fin de identificar los biomarcadores óptimos que permitan predecir un evento clínico, rechazo y/o efectos adversos (Burkhart *et al.*, 2004; Mahalati *et al.*, 2000). Entre los biomarcadores evaluados destacan: el análisis de la actividad de las enzimas diana para cada inmunosupresor (actividad de la calcineurina para CsA y TRL, actividad de IMPDH para el MMF) (Böhler *et al.*, 2007; Millán *et al.*, 2003); el análisis mediante CF de la síntesis de citocinas soluble e intracelulares (entre ellas: IL-2, IL-10, IFN γ , TNF α) (Rostaing *et al.*, 1999a; Rostaing *et al.*, 1999b) y el análisis de la expresión de los Ags de superficie linfocitaria (CD25, CD71, CD95, CD134, CD154) y la proliferación linfocitaria (Stalder *et al.*, 2003).

En definitiva, los estudios previos que han evaluado los diferentes biomarcadores demuestran que concentraciones similares de un fármaco inmunosupresor, inclusive dentro del margen terapéutico, producen grados de inmunosupresión muy diferentes en función de la susceptibilidad que el paciente presente al tratamiento. Por ello, la terapia inmunosupresora personalizada debe basarse tanto en el conocimiento de las concentraciones de fármaco alcanzadas como en el grado de inmunosupresión producido (que puede repercutir en los resultados del análisis de los biomarcadores del efecto inmunomodulador) para realizar un ajuste de dosis más racional. Pero, para que este acto terapéutico alcance el grado de “personalizado”, se debe considerar el estado de tolerancia que el paciente ha desarrollado frente al órgano, ya que es el que establece la necesidad de inmunosuprimir en mayor o menor grado al paciente. En otras palabras, los biomarcadores de tolerancia también son indicativos del grado de inmunosupresión (alto, moderado o bajo) que es preciso alcanzar en cada trasplantado para prevenir el rechazo. En este sentido, cabe destacar los resultados obtenidos en trasplantados renales (Millán *et al.*, 2009 y 2010; Segundo *et al.*, 2006) y hepáticos (López-Hoyos *et al.*, 2012; Martínez-Llordella *et al.*, 2007). En primer lugar, estos autores ponen de manifiesto que la inmunosupresión puede afectar el desarrollo de tolerancia natural frente al injerto; y en segundo lugar, que el estado de tolerancia difiere significativamente de unos pacientes a otros, con lo que se crea la necesidad de alcanzar diferentes grados personalizados de inmunosupresión.

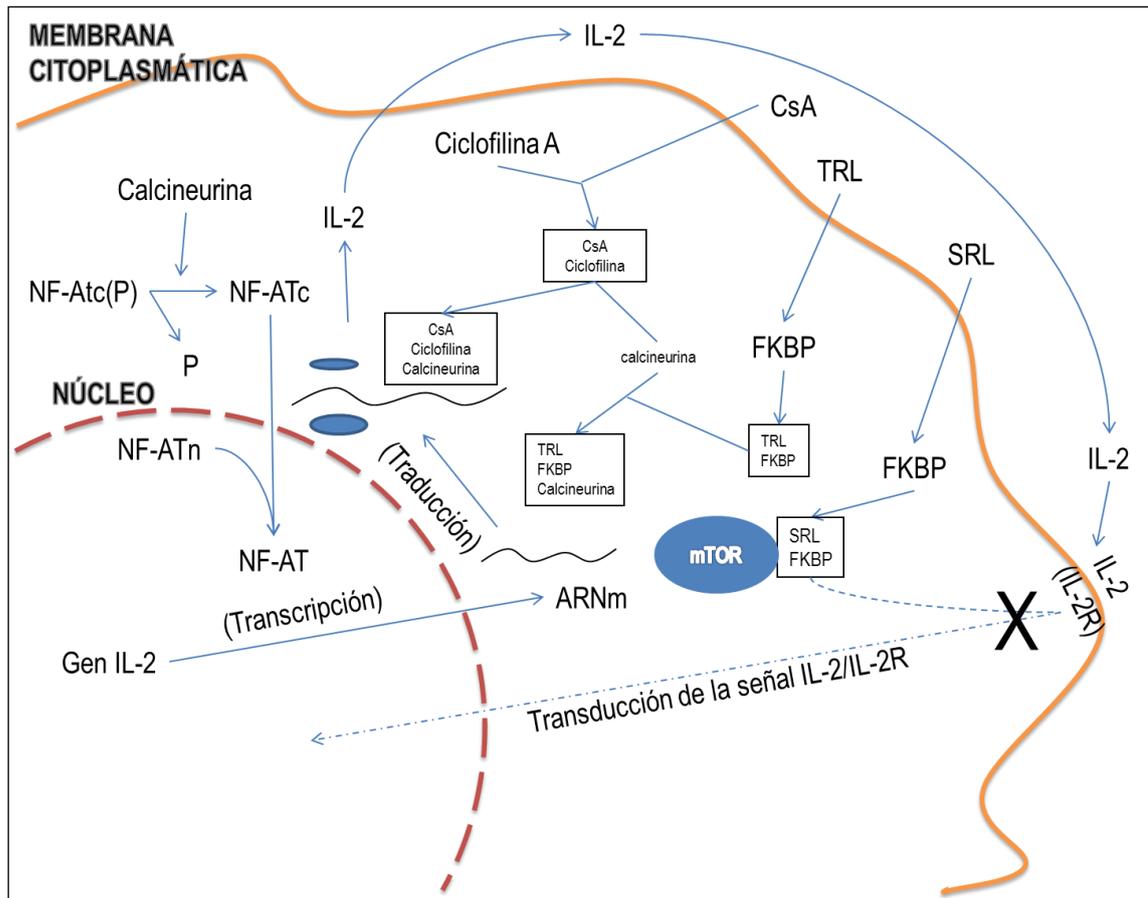


Figura 1.11. Mecanismos de acción de los fármacos inmunosupresores. Tomada y modificada de Monitorización de la inmunosupresión vol.8, 2008).

1.11.5. Análisis de los biomarcadores del efecto inmunomodulador de los fármacos inmunosupresores en trasplantados

La combinación de una monitorización farmacocinética y una monitorización farmacodinámica basada en el análisis específico de los biomarcadores del efecto de los fármacos sobre la respuesta de la célula T es la idea para realizar un ajuste de dosis a la medida a cada paciente. Existen diferentes estrategias de abordaje para evaluar el impacto biológico de los fármacos inmunosupresores sobre el sistema inmunitario en función del mecanismo de acción que presentan (Figura 1.11). Una primera aproximación, y posiblemente la más específica, se centra en evaluar la actividad de las enzimas diana de cada inmunosupresor. Otra aproximación consiste en evaluar algún mediador implicado en el mecanismo de acción del fármaco (síntesis de citocinas, proliferación linfocitaria, actividad de la célula T, etc...). Finalmente, se puede optar por evaluar los marcadores

colaterales inducidos por inmunosupresión, pero que no son específicos de su mecanismo de acción (expresión de antígenos de superficie linfocitaria, etc...) (Tabla 1.2).

Respecto a qué matriz biológica es la más óptima en cuanto a determinar los biomarcadores, lógicamente en ocasiones ésta viene condicionada por la metodología desarrollada para un determinado biomarcador (por ejemplo, la técnica ELISPOT obliga a trabajar con linfocitos de sangre periférica y no con sangre total), pero sí que existe cada vez más la tendencia a utilizar sangre total en vez de aislar PBMCs, sobre todo a raíz de la introducción de técnicas basadas en la CF.

Fundamentalmente existen tres razones por las que es preferible usar sangre total. En primer lugar, una vez administrados, el reservorio natural de la mayoría de los fármacos inmunosupresores se encuentran en el eritrocito. Cuando se aíslan células mononucleares de sangre periférica mediante métodos tradicionales, como el gradiente de Ficoll, se produce una pérdida selectiva de diferentes poblaciones celulares (por ejemplo, eritrocitos), lo cual puede afectar a las interacciones célula-célula que se producen habitualmente a nivel fisiológico y romper el equilibrio entre las uniones de los fármacos a las proteínas presentes en el plasma y su distribución dentro de las diferentes poblaciones celulares. En segundo lugar, estudiar los efectos que los fármacos inmunosupresores producen con esta matriz se ajusta más a lo que ocurre *in vivo*. Finalmente, no se debe desestimar que los ensayos con sangre total son más rápidos, conllevan una menor manipulación de la muestra y requieren un volumen de muestra inferior en comparación con los métodos en los que se purifican los linfocitos (Bloemena *et al.*, 1989; De Groote *et al.*, 1992; Klupp *et al.*, 2001). Además, hay que tener en cuenta que actualmente la monitorización de los niveles de los fármacos inmunosupresores, excepto en el caso del ácido micofenólico que se realiza en el plasma, se realiza en sangre total, situación óptima para establecer correlaciones entre la concentración del fármaco y su efecto.

Tabla 1.2. Biomarcadores y su aplicación en monitorización de terapia inmunosupresora

	Parámetro	Fármaco
Efecto de la enzima diana	Actividad de la calcineurina	Ciclosporina A, tacrolimus
	IMPDH	Micofenolato mofetil
	Cinasa P70S6	Sirolimus
Efecto sobre la función celular	Proliferación (PCNA, ³ H-Tdr...)	Todos los fármacos
	Expresión de marcadores de superficie	Ciclosporina A, tacrolimus,

(CD25, CD71, CD95...)	micofenolato mofetil y otros
Producción de citocinas (IL-2, INF- γ , TNF- α ...)	Todos los fármacos
Expresión de ARNm (CD25, citocinas)	Basiliximab/daclizumab
Activación de células T (ATP)	Todos los fármacos

La mayoría de los biomarcadores requieren un estímulo *ex vivo* para obtener respuestas valorables. En teoría, hay dos maneras de estimular a las células T: mediante un estímulo inespecífico (tipo PHA, Con-A, PMA, Io, etc...) o un estímulo donante específico (esplenocitos o linfocitos B del donante). Obviamente, es preferible un estímulo específico a la hora de determinar la respuesta específica contra el donante. Ahora bien, en ocasiones obtener esta fuente de células del donante no siempre es posible y hay que tener en cuenta que, utilizando este tipo de activación, solo algunos clones de células T tendrán capacidad de expandirse, lo cual es una desventaja cuando se quiere testar, por ejemplo, la diferente sensibilidad de los pacientes a diversos fármacos (en situación pretrasplante). Además, se ha de contemplar que en pacientes anérgicos la respuesta a los aloAgs es muy débil.

El uso de un estímulo no específico para activar a las células T dependerá de qué vía de transducción de señal bloquea el fármaco inmunosupresor que se estudia. Es posible utilizar diferentes estímulos activando diferentes vías. Así PMA/Io es un estímulo apropiado para activar a las células T y la Con-A es adecuada para evaluar la proliferación linfocitaria (Barten *et al.*, 2001).

1.11.5.1 Biomarcadores específicos del efecto farmacodinámico

Los biomarcadores específicos del efecto farmacodinámico, como se ha mencionado antes, primeros analizan la función de la diana del fármaco inmunosupresor. El principal inconveniente es que detectan la actividad enzimática u otra *per se*, pero no los efectos secundarios que su inhibición tiene sobre la función inmunitaria. Además, estos métodos no son capaces de determinar el efecto neto sobre la respuesta inmunitaria causada por la combinación de diversos fármacos inmunosupresores.

1.11.5.1.1 Dianas farmacológicas

La actividad de determinadas enzimas ha sido evaluada como biomarcador del efecto inmunomodulador de los fármacos inmunosupresores. Halloran *et al.*, desarrollaron en 1999 la medición de la actividad de la calcineurina para CsA y TRL, y encontraron una correlación entre la concentración de CsA y la inhibición de dicha enzima.

En un estudio realizado sobre una población estable de trasplantados renales tratados con CsA o TRL y combinaciones de éstos con MMF, se obtuvieron resultados similares a los mencionados anteriormente (Millán *et al.*, 2003). La actividad de la calcineurina en los grupos tratados con inhibidores de dicha enzima fue significativamente menor respecto a la registrada en el grupo control de individuos sanos no tratados y respecto a la del grupo que solo recibía MMF. Se observó una correlación inversa entre la actividad de la calcineurina a las dos horas postdosis y el AUC en todos los grupos estudiados, así como también entre la actividad de la calcineurina a las dos horas y la actividad de la CsA a las dos horas postdosis (C2h), especialmente en los grupos tratados con CsA.

En otro estudio realizado también sobre una población trasplantada renal en etapa de mantenimiento tratada con CsA, se evidenció una inhibición significativa tanto de la actividad de la calcineurina como de la producción de citocinas (IL-2, IFN γ) respecto a los individuos sanos (Brunet *et al.*, 2003). Estos estudios demostraron de nuevo que la medición de la actividad de la calcineurina puede ser un parámetro con capacidad predictiva del grado biológico de inmunosupresión causado por la CsA o el TRL en monoterapia.

Sin embargo, no está tan clara la asociación entre la actividad de la calcineurina y la evolución clínica en el periodo postrasplante inmediato. En un estudio realizado sobre 21 trasplantados de hígado y tratados con CsA o TRL, en los que se evaluó, entre otros, la actividad de la calcineurina como biomarcador del efecto de estos fármacos; se observó una inhibición de dicha actividad por parte de los anticalcineurínicos en predosis. Osciló entre un 40% y un 80%, produciéndose importantes variaciones interindividuales. Cuando evaluaron si existía una correlación entre este biomarcador con la evolución clínica de estos pacientes, no se estableció ninguna correlación entre la actividad de la calcineurina y la incidencia de rechazo agudo, que en esta población fue de un 24% (Boleslawski *et al.*, 2004).

En el caso de MMF se ha propuesto como biomarcador la determinación de la actividad de su enzima diana, IMPDH, en células mononucleares de sangre periférica (Weimert *et al.*, 2007). En los primeros trabajos publicados se sugirió que se podía determinar la actividad IMPDH en sangre total (Langman *et al.*, 1996; Sanquer *et al.*, 1999). No obstante, la actividad de dicha enzima es extremadamente baja en los eritrocitos, a pesar de que algunos estudios demuestran que el tratamiento crónico con MMF la aumenta (Weigel *et al.*, 2001). En este sentido, se ha observado que el efecto biológico que este fármaco ejerce sobre la actividad IMPDH disminuye drásticamente a partir del duodécimo mes de tratamiento en trasplantados renales estables tratados con MMF (1g/12h) durante más de un año (Sanquer *et al.*, 1999). Todos estos estudios sugieren el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de los pacientes, por lo que los autores propusieron que se incluyera la monitorización del MMF en la rutina de los receptores.

1.11.5.2. Biomarcadores no específicos del efecto farmacodinámico

Diferentes pruebas de laboratorio tratan de correlacionar el fenotipo o el estado funcional global del sistema inmunitario con una situación clínica concreta en el receptor de un trasplante. Hasta la fecha se había evaluado la alteración que los inmunosupresores inducían en estos biomarcadores *in vitro*. A continuación, se indicará cómo se pueden emplear estos marcadores para estudiar el efecto o farmacodinamia de los inmunosupresores *in vivo*. Me centraré en los métodos que se han empleado en el trabajo realizado para esta tesis doctoral, puesto considero que estos ensayos, son los que pueden tener una mayor aplicación clínica potencial para monitorizar a trasplantados hepáticos y renales.

1.11.5.2.1. Citoquinas

La síntesis de citocinas ha sido evaluada como biomarcador por diferentes grupos, a pesar de que monitorizar su producción resulta problemática, sobre todo cuando se evalúan las circulantes, debido a las diferentes semividas que presentan y los cambios que se producen en la regulación de la expresión de sus genes, en función de las diferentes fases del ciclo celular.

También se ha investigado los efectos farmacodinámicos de los fármacos inmunosupresores sobre la síntesis de citocinas intracelulares mediante CF. Así, se ha

encontrado un patrón de expresión de citocinas T_H1/T_H2 diferentes en los pacientes estables tratados con CsA o TRL respecto a los individuos sanos no tratados (Rostaing *et al.*, 1999b).

En 2006 Barten *et al.*, hallaron diferencias significativas en los trasplantados cardíacos tratados con CsA y MMF en cuanto a los niveles de citocinas T_H1/T_H2 , en comparación con los niveles pretrasplante, medidas por CBA (del inglés, *cytometric bead array*), que permite evaluar seis citocinas simultáneamente: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α e IFN γ . Además, los niveles de citocina disminuían significativamente a las dos horas de haber administrado el fármaco inmunosupresor. IL-2 e IL-4, dos citocinas altamente sintetizadas en las fases iniciales de la activación de las células T y durante el rechazo agudo, se encontraban significativamente disminuidas. En el postrasplante cardíaco observaron un aumento significativo de citocinas inflamatorias, como TNF α e IL-6, respecto a los niveles pretrasplante. En cuanto a IFN γ e IL-10 no encontraron diferencias antes y después del trasplante.

En un estudio realizado sobre pacientes trasplantados renales tratados con una combinación de TRL + MMF o CsA + MMF, la monitorización farmacodinámica demostró el sinergismo de acción inmunosupresora del MMF respecto a los inhibidores de la calcineurina al incrementar de forma significativa la disminución de IL-2 en los pacientes que recibían ambos fármacos respecto a los tratados con monoterapias (Millán *et al.*, 2003).

Posteriormente, otros investigadores han evaluado la expresión de citocinas en biopsias de trasplantados renales por PCR, o bien la síntesis de citocinas en suero, en sobrenadante de cultivo o orina por ELISA.

Más recientemente se ha publicado un estudio llevado a cabo sobre trasplantados renales en etapa de mantenimiento y tratados con SRL en monoterapia. Los datos evidencian que, en aquellos pacientes que presentaban un mayor riesgo de incidencia de infección, los niveles de IL-10 en sobrenadante de cultivo tras la activación *ex vivo* mediante ConA, eran significativamente inferiores a los pacientes libres de infección y respecto a un grupo de individuos sanos no tratados (Brunet *et al.*, 2007). Algunos autores han asociado la inhibición de IL-10 en los pacientes tratados con SRL a un mayor riesgo de incidencia de infección bacteriana, inflamación y sepsis, así como a una disminución de la actividad citolítica y, en consecuencia, a una menor incidencia de rechazo (Jorgensen *et al.*, 2001).

La introducción de las técnicas basadas en la CF está permitiendo evaluar diversos biomarcadores simultáneamente. Barten *et al.*, han desarrollado ensayos farmacodinámicos en los que han utilizado sangre total y en los que han determinado síntesis de citocinas, marcadores de activación y proliferación linfocitaria. En un reciente estudio publicado por este grupo (Barten *et al.*, 2007) en el que se evalúan estos biomarcadores en una población trasplantada cardíaca tratada con CsA, TRL (conversión desde CsA) o SRL (conversión desde CsA), los resultados demostraron una elevada correlación entre las concentraciones de CsA tanto en predosis como en C2 con la expresión de IL-2 e IFN γ . En el caso del TRL, el aumento de sus concentraciones en sangre se ha correlacionado con una disminución de la expresión de IL-2, IFN γ y TNF α . La expresión de las citocinas no varió cuando se realizó la conversión a SRL.

Existe cada vez más, un interés creciente por conocer qué tipo de subpoblaciones celulares son las que sintetizan una determinada citocina, ya que las implicaciones en la respuesta inmunitaria son muy diferentes en función del tipo celular involucrado. Por ello, se están realizando ensayos en los que se evalúa, como biomarcador, la síntesis por parte de los linfocitos T tras la activación *ex vivo* con PMA e Io de citocinas intralinfocitarias, la cual permite diferenciar las subpoblaciones linfocitarias (CD3⁺/CD4⁺T_H1, CD3⁺/CD4⁺T_H2, CD3⁺/CD4⁺T_H17, CD3⁺/CD8⁺).

El grupo de trabajo de Boleslawski *et al.*, evaluaron en 2004 a 21 trasplantados hepáticos tratados con CsA o TRL. Evidenciaron que el biomarcador que reflejaba el porcentaje de células T CD3⁺CD8⁺ que sintetizaban IL-2, a diferencia de la concentración sanguínea del TRL, estaba estrechamente relacionado con la aparición de rechazo agudo, en especial en los pacientes tratados con TRL y prednisona. Además, la determinación de este biomarcador antes del trasplante demostró que aquellos pacientes que tenían un %CD8⁺IL-2⁺ mayor desarrollaron posteriormente rechazo agudo.

1.11.5.2.2. Tinción intracitoplasmática de citoquinas

La CF no sólo es útil determinando el fenotipo de las diferentes subpoblaciones celulares sanguíneas. En los últimos años se ha extendido el método de tinción intracelular de citocinas. Es un ensayo funcional, puesto que precisa de la activación celular para poder detectar las citocinas y, además, del bloqueo del transporte intracelular (normalmente mediante brefeldina), lo cual puede perjudicar la viabilidad celular. Ese bloqueo del transporte intracelular permite que se acumulen las citocinas recién

sintetizadas tras la activación en el interior celular, lo que aumenta considerablemente la sensibilidad del método.

Mediante el empleo de múltiples AcMo se puede determinar la coexpresión de diversas citocinas en las células a nivel individual (figura 2 en marcaje intracitoplasmático de citocinas en material y métodos). Así, dentro de la población de células T CD4⁺, por ejemplo, se pueden identificar las citocinas definidas como T_H1 (tinción de IL-2 e IFN γ conjunta). Su principal limitación es su escasa sensibilidad. Por ello, el estímulo funcional que se suele emplear es el de la activación con PMA e Io para inducir una respuesta potente. Por otro lado, es posible que este método permita identificar subpoblaciones celulares implicadas recientemente en la regulación de las respuestas inmunitarias. Y así ha sido, en este trabajo de tesis doctoral además de medir el perfil de citocinas T_H1 mencionado anteriormente, también se ha procedido a medir los niveles intracelulares de distintas citocinas que recientemente se les ha atribuido funciones reguladoras de las respuestas inmunitarias que median los eventos clínicos que en este trabajo se abordan; a saber, citocinas proinflamatorias tales como IL-17 atribuida a la subpoblación de linfocitos T CD4⁺T_H17 e IL-10 atribuida a las subpoblaciones celulares conocidas como linfocitos Tr1 y T_H3.

La aplicación de esta metodología ha sido recientemente muy utilizada en el campo del trasplante para la monitorización de la función inmunitaria. En este sentido, Benítez y Najafian, 2008 describieron que la capacidad productiva de citocinas estaba alterada tanto por el fármaco inmunosupresor suministrado, así como también durante los procesos de rechazo agudo. Determinadas citocinas, tales como IFN γ e IL-2 han sido correlacionadas con la superviviencia del injerto y por tanto son buenos candidatos para su utilización como biomarcadores farmacodinámicos. El uso de la CF para la monitorización del porcentaje de células T efectoras CD4⁺ y CD8⁺ y la caracterización del grado de intervención durante las respuestas inflamatorias mediadas por IFN γ e IL-2 podrían servir de gran ayuda para determinar el grado de respuesta al injerto en receptores de trasplante.

Boleslawski *et al.*, 2004 propusieron la evaluación del porcentaje de expresión de CD3⁺CD8⁺IL-2⁺ como potencial biomarcador para la identificación de trasplantados como alto riesgo de rechazo agudo. En este estudio, 21 trasplantados hepáticos tratados con inhibidores de la calcineurina mostraron que el porcentaje de IL-2 intracelular en linfocitos T CD8⁺ en situación pre-trasplante se relacionó con la aparición de rechazo agudo temprano. Estos mismos resultados fueron posteriormente confirmados por el

grupo de Akoglu *et al.*, 2009 en donde la expresión de IL-2 en linfocitos T CD8⁺ se correlaciona con el grado de severidad de rechazo agudo (de acuerdo con la clasificación Banff).

De todos modos, parece existir una gran variación en cuanto a la correlación entre los cambios de expresión de citocinas intracelulares y la concentración sanguínea de los fármacos inmunosupresores, lo que confirma que este tipo de fármacos producen una gran variedad de respuestas en los pacientes incluso cuando la dosis administrada y los niveles sanguíneos son semejantes. En general, la monitorización de la producción de citocinas es problemática, dado que se restringe a ciertas fases del ciclo celular, depende de las diferentes semividas de las citocinas y de los cambios de expresión de los genes que codifican para las citocinas. En definitiva, depende en gran medida del método, momento y modo de recogida de la muestra, lo cual es una gran fuente de variación clínica.

En el presente trabajo de tesis doctoral se ha realizado la tinción intracelular de las citocinas IL-2, IFN γ , IL-10 e IL-17 en trasplantados hepáticos y renales incluidos en esta memoria de tesis doctoral.

1.11.5.2.3. Medición de la producción de citoquinas en sobrenadante de cultivo tras estimulación *in vitro* con Con-A

Las citocinas se sintetizan en respuesta a los aloAgs presentes en los órganos trasplantados durante las respuestas inmunitarias alogénicas que tienen lugar en el receptor. Debido a que las citocinas se secretan al medio extracelular durante las respuestas inmunitarias alogénicas que ocurren en el receptor, debido por ejemplo a procesos de rechazo, infecciones virales, bacterianas y/o fúngicas oportunistas o en recidivas de virus de hepatitis C en pacientes trasplantados hepáticos, se ha utilizado este análisis de citocinas en sobrenadante de cultivo como biomarcador del efecto inmunomodulador de la terapia inmunosupresora, para así poder validar la capacidad productiva y secretora de éstas en el contexto de la terapia inmunosupresora. Es por eso que la matriz biológica escogida fuese sangre periférica total y que se mida dicha producción tras estimulación *in vitro* en el sobrenadante de los cultivos, en lugar de medirlas directamente en suero u orina, para poder valorar verdaderamente cual es el efecto del fármaco inmunosupresor sobre la producción y secreción de citocinas en el medio extracelular. El efecto que el fármaco inmunosupresor tiene sobre los linfocitos T a

nivel de producción de citocinas se ve mantenido exactamente igual en este análisis *in vitro* con respecto a lo que ocurre *in vivo*.

En este trabajo de tesis doctoral se ha utilizado este ensayo para valorar la capacidad productiva y secretora de las citocinas IL-10, IL-17, IFN γ y TGF β en trasplantados hepáticos y renales de nuestra serie de estudio.

1.11.5.2.4. Monitorización de la expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ en trasplantados hepáticos y renales

A pesar de su buena aceptación, el rechazo agudo del injerto hepático continúa siendo un serio problema que afecta, según las series, entre el 10 y el 30% de los receptores durante las primeras semanas post-trasplante (Wiesner *et al.*, 1998b). Diversos mecanismos celulares y moleculares parecen estar implicados en la ruptura de la tolerancia que se induce en este tipo de injertos. Particularmente, se ha propuesto que la modulación en la expresión de moléculas CoS en células T efectoras, tales como CD28 y CTLA-4, y en CPAs, concretamente CD80 y CD86, una de las principales vías de ruptura de la tolerancia. Nuestro grupo de trabajo ha monitorizado la expresión de CD28, CTLA-4, CD80 y CD86 durante el periodo post-trasplante durante años. En concreto nuestros trabajos han puesto de manifiesto que la expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica se regula positivamente antes y durante los procesos de rechazo agudo en trasplantados hepáticos (García-Alonso *et al.*, 1997; Minguela *et al.*, 2000 y 2006) y cardíacos (Blanco-García *et al.*, 2011). Es por ello que la monitorización de la expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ podría ser de utilidad en la predicción de la ruptura o continuidad de la tolerancia no solo en trasplante hepático, sino también en trasplante renal. Por ello, se propone confirmar la utilidad de la monitorización de la expresión de las moléculas CD28 (tanto el porcentaje de expresión de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ como el número absoluto de moléculas CD28 en membrana de linfocitos T CD4⁺) en trasplantados hepáticos y renales.

Para ello, se ha puesto a punto un método de análisis citométrico que permitirá comparar los resultados obtenidos a lo largo del seguimiento.

1.11.5.2.5. Expresión de CD25, CD38, CD69, CD95 y CD154 en trasplantados hepáticos y renales y su utilización como biomarcadores del efecto farmacodinámico de la inmunosupresión

Dado que todos los fármacos inmunosupresores que se administran en la actualidad son capaces de inhibir la proliferación linfocitaria, los ensayos farmacodinámicos en los que se evalúa este parámetro se utilizan frecuentemente como biomarcador general del grado de inmunosupresión alcanzado. Se han descrito numerosos métodos para evaluar la proliferación linfocitaria. Incluyen la detección de la síntesis de ADN, la incorporación del radioisótopo timidina triada o de 5'-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU), la detección de células en diferentes fases del ciclo celular mediante CF como expresión del Ag nuclear de proliferación celular (del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, PCNA), o bien la tinción de células con fluorocromos que se distribuyen por igual entre las células hijas, permitiendo la detección de 7-10 divisiones, como marcaje con 5- y 6-carboxifluoresceín diacetato succinimidil éster (CFSE).

Los Ags de superficie linfocitaria que se están evaluando como posibles biomarcadores participan activamente en las diferentes señales que se producen en la activación y expansión clonal de los linfocitos T, en especial en la coestimulación, la adhesión y la apoptosis (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Antígenos de superficie linfocitaria evaluados habitualmente como biomarcadores. Abreviaturas: LFA, antígeno asociado a la función del linfocito.

Antígenos de superficie linfocitaria	Función
CD11a (cadena α LFA)	Adhesión
CD25 (cadena α IL2R)	Proliferación de células T
CD71 (receptor transferrina)	Proliferación celular, metabolismo del hierro
CD95 (Fas)	Inducción de apoptosis
CD134	Puede actuar como molécula coestimuladora de adhesión
CD154 (CD40L)	Induce la proliferación de células B y la activación de células T por contacto

Uno de los marcadores más evaluados es la cadena α del receptor para la IL-2 o CD25, que se expresa cuando la célula T recibe la señal coestimuladora, por lo que su expresión indica una activación temprana. De hecho, la tercera señal para la correcta activación linfocitaria se media a través de la unión de IL-2 a CD25. Otro marcador que es interesante medir es CD95, el cuál incrementa su expresión en las células del sistema inmunitario activadas para concluir, mediante apoptosis, la respuesta iniciada.

Stalder *et al.*, 2003 compararon la proliferación linfocitaria y la expresión de Ags de activación de las células T entre trasplantados renales estables y un grupo control de individuos sanos. Todos los trasplantados fueron tratados con CsA, MMF y prednisona durante seis meses tras trasplante. La proliferación linfocitaria (evaluada según la expresión de PCNA) estaba significativamente inhibida en los trasplantados en comparación con el grupo control. La expresión de los diferentes Ags de superficie evaluados se hallaba disminuida en trasplantados respecto al grupo control. Los más afectados fueron CD11a y CD154, cuya expresión en los trasplantados fue el 25% de la expresión observada en el grupo control. Respecto a CD25, CD71 y CD95, su expresión en el grupo de pacientes fue aproximadamente el 50% de la expresión obtenida en el grupo de individuos sanos no tratados.

Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se ha evaluado a trasplantados cardíacos tratados con CsA, TRL o SRL. El análisis de los marcadores del efecto inmunosupresor permitió observar como la combinación de concentraciones muy bajas de uno de los inhibidores de la actividad de la calcineurina (CsA o TRL) con concentraciones muy bajas de SRL producía sinergismo de acción respecto a la inhibición de la proliferación de la célula T (medida por expresión de PCNA) o respecto a la expresión del receptor específico para IL-2 (CD25) (Barten *et al.*, 2007).

El potencial del análisis de la expresión de Ags de superficie linfocitaria ya quedó de manifiesto en un estudio realizado por Chang *et al.* (1996), sobre trasplantados cardíacos. La expresión en células T de CD4⁺CD25⁺ se correlacionó con el grado de rechazo, en contraste, con la expresión de citocinas.

En otro estudio reciente sobre una población trasplantada renal estable tratada con SRL en régimen de monoterapia, se evaluó la inhibición de la proliferación linfocitaria por la incorporación de Timidina titriada, entre otros biomarcadores (Brunet *et al.*, 2007). A pesar de que las concentraciones de SRL de todos los pacientes se hallaban dentro del margen terapéutico (8-12 ng/ml), los resultados para este biomarcador demostraron una elevada variabilidad interindividual (valor de mediana de la inhibición: 60% [31%-96%]).

Este hecho, que es usual con otros biomarcadores, evidencia la relevancia de monitorizar al receptor, no solo desde el punto de vista farmacocinético, sino también desde el punto de vista farmacodinámico, para ajustar las dosis de forma personalizada en función de las necesidades reales de cada paciente.

En este trabajo de tesis doctoral se decidió medir la expresión de determinados Ags de superficie linfocitaria (CD25, CD38, CD69, CD95 y CD154) como biomarcadores del efecto inmunomodulador de los fármacos inmunosupresores. Cada una de ellas presenta una función relacionada con la activación, proliferación y apoptosis de la célula T y las señales que éstas emiten son indispensables para el desarrollo de una correcta respuesta inmune.

- 1. CD25:** Presenta tres epítomos: las regiones conocidas como A, B y C. El AcMo M-A251 reconoce el epítomo de la región B. La expresión en los linfocitos se puede aumentar por el uso de Acs anti-CD3 o tras estimulación con PHA. En reacciones inflamatorias se ha observado en el suero de los pacientes la presencia de CD25 soluble (Schlossman *et al.*, 1995; Knapp *et al.*, 1989).
- 2. CD38:** Es una glicoproteína TM de tipo II formada por una única cadena polipeptídica de 45 KD, también conocida como T10 o ADP-ribosil ciclasa. Es una ADP-ribosil hidrolasa, que se expresa con niveles variables en las células hematopoyéticas y en algunos tejidos no hematopoyéticos (como el cerebro, músculo y riñón). Otras células donde se ha observado expresión de este Ag incluyen a monocitos, macrófagos, CD8 y algunas células epiteliales. En humanos, se expresa con altos niveles en las células plasmáticas y en células T y B activadas. CD38 puede actuar tanto como una hidrolasa como una ciclasa, mediando la activación de linfocitos, así como moléculas de adhesión. También interviene en el metabolismo de cADPR y NAADP. CD31 es el ligando de CD38. El antígeno CD38 actúa como una ectoenzima que cataliza la síntesis y la hidrólisis del agente movilizador de Ca^{++} , ADP-ribosa cíclica. Este Ca intracelular juega un papel importante en las vías de señalización celulares. CD38 participa en la adhesión con CD31, funciones inmunorreguladoras que implican la transducción de señales que conducen al crecimiento, apoptosis, y diferenciación celular (Schlossman *et al.*, 1995; Kishimoto *et al.*, 1997; McMichael *et al.*, 1987).

- 3. CD154 (CD40L):** También se le conoce con los nombres CD40L, gp39, TRAP, T-BAM y TNFSF5. CD154 es una glicoproteína TM de tipo II de 32-39 KD. Pertenece a la superfamilia del TNF y es una molécula accesoria expresada en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ colaboradores activados. Se ha visto también expresión de CD154 en otros tipos de leucocitos, tales como linfocitos T CD8⁺, timocitos medulares, células NK-T activadas y células NK humanas. CD154 juega un papel importante en las interacciones CoS que se producen entre los linfocitos T, B y CPAs, regulando la respuesta inmunitaria a múltiples niveles. Adicionalmente, la unión de CD40L a CD40 sobre células B promueve la secreción de Igs y el cambio de isotipo de la cadena pesada Ig (*switching*). CD154 también está involucrado en la regulación de la producción de citocinas por parte de los linfocitos T. El AcMo MR1 inhibe la activación *in vitro* de los linfocitos B por células T_H mediante el bloqueo de la interacción de gp39 con CD40. Las interacciones de las células T y las CPAs también puede ser bloqueadas *in vitro* por el AcMo MR1. El tratamiento *in vivo* con MR1 bloquea el desarrollo de enfermedades autoinmunes, inhibe la formación de centros germinales y la generación de células B de memoria, reduce las respuestas de linfocitos T contra células alogénicas y contra aloinjertos, impide la eliminación intratímica de linfocitos T autorreactivos e interrumpe respuestas específicas de Ag de células T (Brams *et al.*, 2001; Kishimoto *et al.*, 1997; Nishioka *et al.*, 1994).
- 4. CD69:** También se le conoce por los nombres de Ag de activación muy temprano (VEA), molécula inductora de activación (AIM) y MLR3. CD69 es una glicoproteína TM de tipo II de 27-33 KD. Es miembro de la familia de proteínas lectina tipo C y se expresa como un homodímero unido por puentes disulfuro. Otros miembros de esta familia de proteínas incluyen los receptores NKG2, NKR-P1, CD94 y Ly49. CD69 se expresa de forma transitoria en leucocitos activados incluyendo los linfocitos T, timocitos, linfocitos B, células NK, neutrófilos y eosinófilos. CD69 presenta una expresión constitutiva en una subpoblación de timocitos maduros medulares, plaquetas, células B de la zona del manto y en ciertas células T CD4⁺ en la zona folicular del manto y en la zona perifolicular o interfolicular también conocida como zona de células T intragerminal de centros germinales o en los nódulos linfáticos. CD69 está involucrado en los procesos de activación temprana de linfocitos, monocitos y plaquetas, y presenta una función importante en la lisis mediada por células NK (Knapp *et al.*, 1989; Schlossman *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2005).

5. **CD95:** También se le conoce por los nombres Fas, Apo-1 o TNFRSF6. CD95 es una glicoproteína de membrana tipo I de cadena única de 45 KD. Pertenece a la superfamilia de los receptores de muerte tipo TNF. CD95 se expresa en linfocitos T y B, monocitos, neutrófilos y fibroblastos. La expresión de Fas ha sido descrita en diferentes tejidos como timo, hígado, corazón, pulmones y ovario. La expresión de CD95 se encuentra incrementada por procesos de activación celular. La región extracelular de CD95 se une a CD178 (FasL). La interacción entre CD178 con CD95 induce la muerte celular programada o apoptosis en la célula y se ha observado que esta función presenta un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Schlossman *et al.*, 1995; Cifone *et al.*, 1994; Kishimoto *et al.*, 1997).

1.11.5.2.6. Biomarcadores de tolerancia inmunológica

En los últimos años numerosos estudios realizados en el campo del trasplante se centran en evaluar lo que se denomina *estado de tolerancia inmunológica*. En el estado de tolerancia inmunológica el órgano trasplantado es aceptado de manera indefinida sin que sea necesario administrar tratamiento inmunosupresor. En algunos casos se han descrito trasplantados que han llegado a este estado de forma espontánea tras reducir el tratamiento inmunosupresor hasta su supresión total (*spontaneous operational tolerance* [SPOT]). Esta situación se ha observado en trasplantados de hígado con más frecuencia que en los receptores de otros órganos sólidos.

En la actualidad, se está realizando un notable esfuerzo por encontrar biomarcadores de utilidad en la identificación de pacientes con una predisposición a alcanzar el estado de tolerancia en ausencia de inmunosupresión. La identificación de esos biomarcadores conllevaría desarrollar estrategias de inducción de tolerancia, que permitirían reducir de forma más segura la inmunosupresión y toxicidad asociada en estos pacientes.

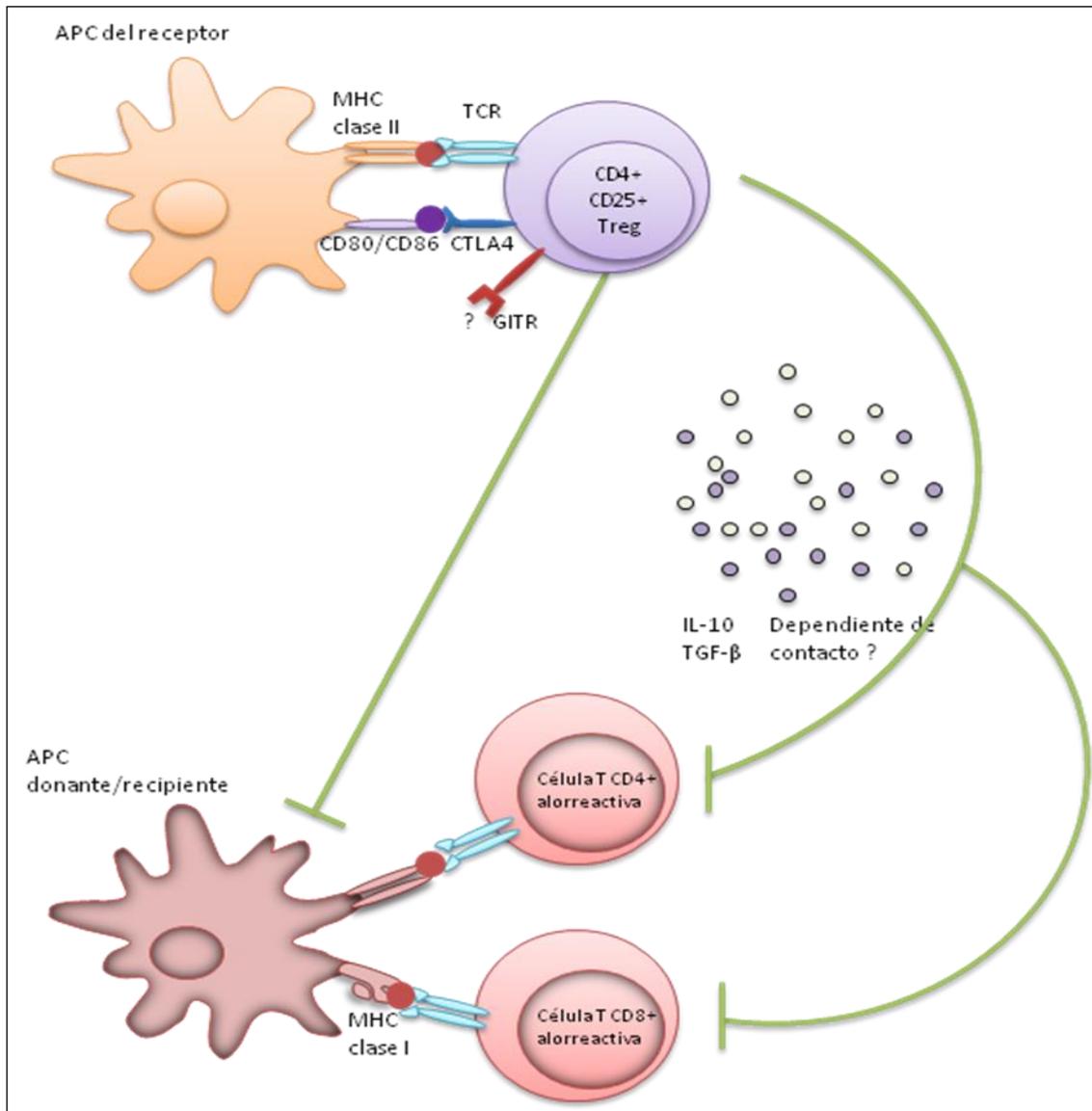


Figura 1.12. Reconocimiento alógeno por parte de células T reguladoras $CD4^+ CD25^{high}$. (Tomada y modificada de Monitorización de la inmunosupresión vol.8, 2008).

Para inducir el estado de tolerancia es preciso eliminar una gran proporción de linfocitos T_H1 , responsables del rechazo del injerto; al mismo tiempo, es necesario incrementar el número y la función de las células Treg, linfocitos reguladores que inhiben las respuestas citotóxicas y protegen los aloinjertos (Figura 1.12). Los linfocitos Treg que coexpresan los Ags CD4 y CD25 son el subtipo linfocitario regulador mejor estudiado. Las células Treg suprimen la activación inmunitaria y juegan un importante papel en el mantenimiento de la tolerancia. Se ha descrito que FoxP3, que se encuentra altamente expresado en esta población, es decisivo en el desarrollo de la función de dichas células.

Por este motivo, existen estudios en los que se ha evaluado como biomarcador de tolerancia la frecuencia de células $CD4^+ CD25^{high} FoxP3^+$ en receptores tras retirar

gradualmente el inmunosupresor. En un estudio reciente llevado a cabo por Braudeau *et al.*, en 2007 evidenciaron tolerancia operacional en una población poco habitual para ello: receptores renales libres de inmunosupresor, los cuales se compararon con un grupo de receptores renales estables. Los resultados mostraron una disminución de los transcritos de FoxP3 y de células T CD4⁺CD25⁺ en pacientes con rechazo crónico respecto a los pacientes sin inmunosupresor. Se han encontrado resultados similares en trasplantados de hígado.

Otros estudios han evaluado el efecto de diferentes fármacos inmunosupresores sobre el porcentaje de células T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ en receptores renales estables. En este estudio se observó que los fármacos anticalcineurínicos (CsA y TRL), al contrario que SRL, inducían una disminución de las Tregs circulantes, por lo que propusieron que la cuantificación de los niveles de Tregs en sangre podría ser de utilidad en la identificación de los receptores susceptibles de reducir la inmunosupresión (Segundo *et al.*, 2006).

De manera paralela, se están efectuando estudios experimentales en ratas en los que se evalúa la expresión de genes (TOAG-1, α -1,2-manosidasa) en el infiltrado leucocitario del injerto durante la inducción de tolerancia o rechazo tras trasplante de riñón (Sawitzki *et al.*, 2007). Los resultados muestran que dichos genes están altamente expresados durante la inducción y el mantenimiento de tolerancia y, disminuidos durante el rechazo.

Las células Treg específicas del donante se han convertido en un elemento esencial de la tolerancia en el trasplante al suprimir los efectos citotóxicos de las células T efectoras, en contraposición a la supresión que se consigue con los fármacos inmunosupresores. Entre los distintos tipos de células Treg que han surgido en los últimos años, las que se definen bajo el fenotipo CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ son las que parecen tener un papel principal. Junto con este fenotipo se han descrito otros marcadores celulares cuya identificación es de utilidad y que se pueden emplear en la CF, como son CD27, CD127 y CTLA-4.

Un factor a tener en cuenta respecto a las células Treg en el trasplante de es la coexistencia siempre de fármacos inmunosupresores, que son esenciales para evitar rechazo agudo. No obstante, tolerancia e inmunosupresión no deben estimarse como dos extremos sin conexión en el ámbito del trasplante, sino que se puede conseguir cierto grado de tolerancia en presencia de fármacos inmunosupresores. Por ello, las posibles aplicaciones clínicas de las células Treg en el trasplante deben explicarse en el contexto de los pacientes que están recibiendo inmunosupresión de manera crónica. El objetivo es

definir aquellos fármacos capaces de suprimir la respuesta de células T efectoras mientras mantienen e incluso potencian la actividad de las Tregs. En teoría, un paciente con una actividad elevada de Tregs sería candidato para reducir la inmunosupresión o cambiar a fármacos más tolerogénicos.

Parece que los inhibidores de la mTOR favorecen la acción de las células Treg. El tratamiento prolongado con inhibidores de la calcineurina produce un descenso en el número de células Treg circulantes, mientras que el SRL es capaz de conservar esas mismas células en sangre periférica. Además, hallazgos de San Segundo *et al.* (2006) indican que el tratamiento con SRL permite recuperar los niveles sanguíneos de células Treg tras un tratamiento con inhibidores de la calcineurina. Es decir, la CsA y el TRL tienen un efecto deletéreo sobre la población de células Treg, aunque la capacidad supresora y los niveles de expresión de FoxP3 son semejantes en las células CD4⁺CD25^{high} de ambos grupos de pacientes, tratados con inhibidores de la calcineurina o con inhibidores de mTOR. No obstante, estos mismos datos no demuestran si el mantenimiento de las células Treg en los receptores renales se debe a una supervivencia aumentada de las células nTreg derivadas del timo o si se han inducido *de novo* en la periferia como células iTreg, como consecuencia del tratamiento con SRL. El efecto negativo de los inhibidores de la calcineurina podría residir en la inhibición de la producción de IL-2, imprescindible para la función y la homeostasis de las células Treg. Así mismo, estos fármacos también pueden interferir en la interacción NFAT-FoxP3, inhibiendo la capacidad supresora de las células Treg.

Por otro lado, CsA y SRL no afectan a la activación de células nTreg, pero el SRL, y no la CsA, es capaz de expandir una población de células Treg que expresen niveles elevados de CD27. Esta subpoblación de células Treg muestra una capacidad supresora mayor que aquellas que expresan niveles normales de CD27 y, por lo tanto, el tratamiento con SRL expande esa subpoblación de células Treg con capacidad de inhibir alorrespuestas inmunitarias en marcha. Otro mecanismo adicional que apoya la supuesta capacidad tolerogénica del SRL consiste en su pobre capacidad estimuladora de la respuesta alogénica al inhibir la maduración de las CDs, junto con un mantenimiento de la maduración de las Tregs, favoreciendo el predominio de las Treg sobre las T efectoras. Es decir, la posible expansión de las Treg con los inhibidores de mTOR no solo sería consecuencia del efecto directo sobre las células T, sino también del efecto sobre las CD.

Prácticamente, no existen evidencias del papel del MMF respecto a las células Treg. Sin embargo, la administración de MMF conjuntamente con inhibidores de mTOR parece

favorecer la expansión de las Treg mediante la inducción de CDs tolerogénicas e inhibir la proliferación y expansión de las células T de memoria.

Por último, recientemente han aparecido evidencias sobre el efecto favorecedor de las células Treg debido a los protocolos de inducción con AcM que deplecionan células T. Así, el tratamiento deplecionante con Campath[®]-1H (anti-CD52) genera una expansión de la población de células Treg en presencia de SRL. Otros Acs utilizados en los protocolos de inducción en el trasplante renal, como la Timoglobulina, parecen favorecer también la generación de Tregs, aunque no hay evidencias *in vivo* todavía. Respecto a los Acs anti-CD25, las primeras evidencias sugieren que el tratamiento de inducción con estos Acs no altera la generación posterior de Tregs en trasplante renal, si bien los datos no son tan claros en el trasplante hepático.

Aunque las evidencias en los humanos no son tan claras como en los modelos animales, se podría plantear que la mejor estrategia terapéutica desde el punto de vista de la inducción de células Treg sería un protocolo de inducción con algún Ac deplecionante de células T antes del trasplante, seguido de inmunosupresión postrasplante con SRL, MMF y corticoesteroides.

Por todo ello uno de los objetivos del presente trabajo de tesis doctoral es la monitorización de las células nTreg CD4⁺CD25⁺. Entre los componentes celulares implicados en la buena aceptación de injertos, se encuentran las células nTreg CD4⁺CD25⁺ y una característica es su capacidad de suprimir las respuestas inmunitarias. Los mecanismos por los que estas células ejercen su efecto inmunosupresor son igualmente diversos y, en buena medida, dependen de la localización y del estado de maduración de la célula Treg. En 2008, Tang y Bluestone, propusieron un modelo de actuación de las Tregs a 3 niveles:

1. El primero tendría lugar en nódulo linfático, y se encargaría de regular respuestas primarias en sus inicios, y se realizaría por Tregs no activadas con fenotipo CD127⁻CD62L⁺⁺CD27⁺CCR7⁺, de forma bastante inespecífica consumiendo la IL-2 disponible para la respuesta y, probablemente, mediante la expresión de CTLA-4 y la secreción de TGFβ1.
2. Cuando el estado de tolerancia ya se ha perdido, como en las respuestas desencadenadas por un trasplante, un agente infeccioso vía receptores Toll-like, o un autoAg; las células Tregs se activan frente al agente inductor, por tanto se hacen más específicas, y adquieren fenotipo efector/memoria, pierden CD62L y CCR7, y ganan CD103, CCR2, CCR4 y CCR5, etc., permitiéndoles migrar a

tejidos donde, ahora, se enfrentan a respuestas inmunitarias ya establecidas, por lo que los mecanismos supresores tienen que ser más potentes y variados. Así, las células Tregs pueden llegar a eliminar CPAs, células B y efectores T mediante gránulos de perforina y granzima A y/o B.

3. En el tercer nivel y, para mantener la tolerancia inducida por la activación de células Treg específicas, se establece un proceso de “tolerancia infecciosa”, ya que la destrucción de los tejidos asociada a la respuesta inmunitaria, lleva a la presentación de nuevos autoAgs a CPAs silenciadas/reguladas por las Tregs. Estas CPAs tolerizadas hacen que células T efectoras se transformen en nuevas Tregs, extendiendo así su repertorio. Por ello, la disminución de expresión de CD62L podría ser un marcador importante en la migración a tejido y procesos de regulación inmunitaria en trasplante. Además, la intensidad de expresión de las moléculas CoS de la respuesta inmunitaria, tales como CD28 en la superficie de los linfocitos de los receptores de hígado, parecen influir en la incidencia de rechazo agudo (Minguela *et al.*, 2000).

En definitiva, todos estos estudios previos en los que se han evaluado los diferentes biomarcadores demuestran que concentraciones similares de fármaco inmunosupresor (inclusive dentro del margen terapéutico) producen grados de inmunosupresión muy diferentes en función de la susceptibilidad que el paciente presente al tratamiento (elevada variabilidad farmacodinámica interindividual). Por ello, la terapia inmunosupresora personalizada debe basarse en el conocimiento de las concentraciones de fármaco alcanzadas y en el grado de inmunosupresión producido (análisis de los biomarcadores del efecto inmunomodulador) para realizar un ajuste de dosis más racional. Pero para que este acto terapéutico sea completo debe considerar el estado de tolerancia del paciente.

1.12. Consideraciones finales

Actualmente no se disponen de suficientes datos sobre las moléculas y subpoblaciones linfocitarias expuestas anteriormente que apoyen la utilidad de éstas como biomarcadores farmacodinámico de la función inmunitaria. Lo que parece claro, a pesar de las limitaciones, es que una sola prueba es insuficiente para la monitorización farmacodinámica; por lo que, parece mejor determinar varias moléculas de forma simultánea.

Las técnicas utilizadas hasta la fecha se basan en la CF debido a su sencillez, versatilidad y rapidez. Además, la CF es más específica para medir la potencia y eficacia del fármaco *in vivo*. No obstante, los trabajos en que se basan las evidencias proceden de estudios unicéntricos y, generalmente, con series de pacientes pequeñas; asimismo, se trata de estudios que no han considerado la coexistencia de infección o de rechazo. Por ello, no hay estudios de validación y estandarización de estas técnicas en estudios multicéntricos y de forma secuencial que demuestren su utilidad como herramientas de monitorización y tengan en cuenta la variabilidad intra- e interindividual, rango de valores óptimos para cada parámetro, etc.

Los métodos para monitorizar la función inmunitaria de biomarcadores del efecto farmacodinámico están diseñados para su aplicación clínica y, aunque son relativamente sencillos, dependen de una serie de pasos generadores de variabilidad, como la activación celular *in vitro* y la subjetividad de la interpretación de las imágenes de CF. De hecho, existen marcadores de superficie celular, como CD25 o CD95, que no muestran imágenes de tinción discretas, sino continuas, y en las que la determinación de la positividad depende en gran medida de la subjetividad del analizador.

En los próximos años cabe pensar que aparecerán nuevas experiencias en el campo de la monitorización farmacodinámica a partir de las pruebas de función inmunitaria explicadas anteriormente y de otras en desarrollo. En todo caso, para llegar a la aplicación clínica de estas pruebas es preciso que los estudios sean multicéntricos, que comprendan todos los tipos de trasplantes y que cumplan las premisas técnicas establecidas antes de iniciar el trabajo. Éste ha sido el planteamiento, por ejemplo, del grupo de trabajo de Farmacodinamia creado en el contexto del grupo español ICET (Inmunosupresión Clínica y Experimental en Trasplante) del cual nuestro grupo de investigación forma parte y del que parte de sus resultados son incluidos en esta memoria de tesis.

Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

En la actualidad, la prevención del rechazo en los receptores de órganos sólidos se consigue, en un porcentaje alto de pacientes, por el uso de una inmunosupresión excesiva. Los "aparentes" buenos resultados, a corto plazo, de la eficacia de la inmunosupresión y, por supuesto, el perfil de seguridad requiere una mejora significativa que debe basarse en la personalización de este tratamiento crónico.

Estudios previos han puesto de manifiesto que una serie de biomarcadores con distintos comportamientos farmacodinámicos pueden jugar un papel importante en la predicción de la susceptibilidad que el paciente muestre ante el tratamiento inmunosupresor y de la evolución clínica del paciente. Pero, en realidad, únicamente podemos hablar de "probables" biomarcadores ya que están pendientes de estandarización y validación.

A través de esta memoria de tesis doctoral, se pretende validar y estandarizar algunos de los biomarcadores evaluados hasta el momento para su traslado a la práctica clínica.

Por tanto, la hipótesis de trabajo propuesta en su día, se centra en la posibilidad de determinar la expresión de determinadas moléculas costimuladoras, como CD28, junto con la de moléculas típicas de las células Treg como CD4, CD25, CD127, CD62L y FoxP3, y citoquinas intracitoplasmáticas, para evaluar el fenotipo de linfocito T efector activado que migra al tejido, y correlacionarlo con el estudio de farmacocinética de los inmunosupresores administrados.

Trabajos previos de diversos grupos y del nuestro propio, han establecido como distintos regímenes inmunosupresores pueden afectar a la expresión de determinadas moléculas en la superficie de las células inmunitarias que median la alotolerancia o la ruptura de la misma. Además, el análisis de las concentraciones de TRL y MMF, conjuntamente con el de biomarcadores de su efecto inmunosupresor (expresión y modulación de la misma) podría definir mejor el estado de tolerancia y la base para ajustar el tratamiento inmunosupresor a las necesidades de cada paciente.

2.2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo de tesis doctoral consiste en la selección, estandarización y validación de los biomarcadores más óptimos del efecto farmacodinámico y farmacocinético que reflejen la respuesta individual al tratamiento inmunosupresor y que puedan ser predictivos de la evolución clínica (rechazo agudo, infección oportunista, toxicidad, entre otros) en pacientes sometidos a distintos tipos de trasplante.

Los objetivos propios del presente trabajo son:

1. Monitorizar y evaluar la expresión de moléculas de superficie linfocitaria como CD25, CD38, CD69, CD95 y CD154 junto con moléculas típicas de las células Treg como CD4, CD25, CD27, CD127, FoxP3 y observar la expresión de las moléculas CD62L y CD45RO, por citometría de flujo.
2. Evaluar la utilidad de la cuantificación y monitorización del número de moléculas CD28 en la membrana celular de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica de trasplantados hepáticos y renales, para discriminar el rechazo agudo del injerto, la posibilidad de sufrir infecciones oportunistas y/o recidivas del virus de hepatitis C.
3. Monitorizar y evaluar la capacidad productiva y secretora de citoquinas (IL-2, IFN γ , IL-17, IL-10 y TGF β) *in vitro* y cuantificar su presencia intracitoplasmática y en sobrenadante de cultivo por citometría de flujo y ELISA.
4. Simplificar y unificar las metodologías para facilitar su posterior aplicación en la monitorización del receptor de aloinjerto en la rutina del laboratorio clínico de inmunología del trasplante.

Pacientes, Material y Métodos

3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Para facilitar la comprensión de los resultados descritos en esta memoria, entendemos que es necesario resumir unos conocimientos clínicos mínimos del proceso quirúrgico empleado, del seguimiento analítico realizado y del tipo de tratamiento inmunosupresor suministrado a los pacientes. Además, es imprescindible conocer los métodos realizados para el diagnóstico de los diferentes tipos de eventos clínicos, tales como rechazo agudo, infección oportunista y recidiva de VHC; así como los test estadísticos empleados para el análisis de las diferentes variables.

3.1. Pacientes

3.1.1. Grupos de estudio: Pacientes y controles

En el proyecto de investigación multicéntrico (financiado por el ISCIII) en donde se encuadra este trabajo de tesis doctoral se han incluido un total de 30 pacientes con TOH y otro 30 trasplantados renales consecutivos *de novo*, realizados en el HCUVA de Murcia, realizados desde el 22/10/2010 hasta 23/05/2012, siendo el período de inclusión de los pacientes de un año más el seguimiento post-trasplante. En el manejo general de los pacientes se incluyen todas las medidas de control, de diagnóstico y terapéuticas estándar en este tipo de pacientes, todas ellas recogidas en los protocolos asistenciales. En todos los pacientes se recogieron datos clínicos de interés para el objetivo del estudio: demográficos, datos de la enfermedad pre-trasplante, datos del donante, función hepática, desarrollo de rechazo y complicaciones relacionados con el tratamiento inmunosupresor (infecciones, diabetes *de novo*, hipertensión *de novo*, neurotoxicidad al tratamiento inmunosupresor, neoplasia *de novo*) así como datos farmacocinéticos relacionados con el tratamiento inmunosupresor administrado. También se recolectaron muestras de 20 individuos sanos seleccionados al azar entre donantes de sangre no relacionados de raza Caucasoide de la Región de Murcia, procedentes en su mayor parte del Banco de sangre de nuestro hospital que, se estudiaron como población control.

- Datos demográficos de los pacientes TOH: El trasplante hepático se realizó de donantes cadavéricos en estado de “no asistolia”. La edad media, medida en años, de los donantes fue de 59.90 ± 2.77 (rango: 24-81) años, la edad media de los receptores hepáticos fue de 52.43 ± 1.87 (rango: 20-66) años. En cuanto al sexo del receptor el

77% fueron varones y el 23% fueron mujeres. Los pacientes se clasificaron en diferentes grupos de estudio atendiendo a cuatro variables (tabla 3.1):

- A. Patología de base: Los pacientes fueron clasificados en función del tipo de patología de base. Un 40% de los pacientes tuvieron como indicación al trasplante cirrosis alcohólica, un 20% de pacientes tuvieron como indicación, cirrosis alcohólica + infección por VHC ó VHB, un 20% de pacientes tuvo como indicación, cirrosis por VHC y por último otro 20% se clasificó como “otras”; incluyendo pacientes que tuvieron como indicación al trasplante poliquistosis hepato-renal, cirrosis biliar primaria, colangiocarcinoma hepático, hemangioendotelioma y síndrome de Budd-Chiari.
- B. Rechazo celular agudo: De acuerdo a la presencia o no del mismo, los receptores hepáticos se clasificaron en dos grupos de estudio:
- *Receptores sin rechazo agudo (NRA)*: Donde se incluyeron pacientes que durante el período del estudio no presentaron ningún hallazgo clínico o histo-patológico que evidenciara la presencia de episodio de RA. El 60% de los pacientes trasplantados de nuestra serie no presentó evidencias de episodio de RA durante el período del estudio.
 - *Receptores con rechazo agudo (RA)*: Dentro de este grupo se incluyeron aquellos pacientes que presentaron hallazgos tanto histo-patológicos confirmados tras la biopsia, así como hallazgos clínicos compatibles con el diagnóstico de RA. El 40% de los pacientes presentó al menos un episodio de RA durante el período del estudio. Durante la 1ª semana post-trasplante el 23.3% de los pacientes desarrollaron episodio de RA, en la 2ª semana post-trasplante un 6.7% de los pacientes desarrolló episodio de RA, en el 3º mes post-trasplante un 10% de los pacientes presentó episodio de RA y en el 6º mes post-trasplante un 6.7% de los pacientes desarrolló episodio de RA. La mayor frecuencia de episodios de RA, por lo tanto, se concentró durante el periodo post-trasplante inmediato (primeras 4 semanas post-trasplante) con una tasa de RA acumulada del 30% de los pacientes.

C. Infecciones en el período post-trasplante:

- *Pacientes sin infección post-trasplante (NoINF):* Dentro de este grupo se incluyeron aquellos pacientes que no tuvieron ningún evento de infección oportunista post-trasplante. El 40% no desarrollaron infección post-trasplante de ningún tipo.
- *Pacientes con infección post-trasplante (INF):* Dentro de este grupo he diferenciado dos subgrupos, un subgrupo atendiendo al tipo de organismo causante de la infección (**viral, bacteriana y fúngica**) y el otro subgrupo atendiendo a todas las infecciones juntas sin tener en cuenta el tipo de organismo causante de la infección (**INF**). Durante la 1ª semana post-trasplante el 30% de los pacientes presentaron infección oportunista, de las cuales el 10% fue viral, el 13.3% fue bacteriana y el 6.7% fue fúngica; durante la 2ª semana post-trasplante un 10% de los pacientes presentó infección oportunista, de los cuales un 3.3% fue viral, un 3.3% fue bacteriana y otro 3.3% fue fúngica; durante el 1º mes post-trasplante un 23.3% de los pacientes presentó infección oportunista, de las cuales el 20% fue viral y el 3.3% fue bacteriana; durante el 2º mes post-trasplante el 10% de los pacientes tuvo infección vírica; en el 3º mes post-trasplante un 6.7% de los pacientes presentó infección oportunista, de las cuales el 3.3% fue viral y otro 3.3% fue vírica + bacteriana; en el 6º mes post-trasplante un 16.7% de los pacientes presentó infección vírica y al año post-trasplante un 6.7% de los pacientes presentó infección vírica. La mayor frecuencia de infecciones oportunistas post-trasplante se concentró durante el periodo de mantenimiento con una incidencia acumulada del 40% de eventos clínicos de infección oportunista.

D. Recidiva de VHC: Atendiendo únicamente a los pacientes que tuvieron como indicación al trasplante cirrosis VHC, éstos fueron clasificados en dos grupos en relación a la presencia de recidiva del virus en el período post-trasplante:

- *Pacientes sin recidiva por virus C (NVHC):* En este grupo se incluyeron aquellos pacientes que durante el período del estudio no presentaron ningún hallazgo clínico o histo-patológico que evidenciara

la presencia de recidiva de virus de Hepatitis C. El 41.7% de los trasplantados hepáticos no desarrolló recidiva de VHC durante el período post-trasplante.

- *Pacientes con recidiva por virus C (VHC):* Dentro de este grupo se incluyeron aquellos pacientes que durante el período del estudio presentaron hallazgos clínico-patológicos compatibles con recidiva de VHC. El 58.3% de los trasplantados desarrolló recidiva de VHC durante el post-trasplante del estudio. A este grupo de pacientes se les consideró como el grupo de enfermedad viral activa VHC.

Tabla 3.1. Pacientes trasplantados hepáticos agrupados en función de los siguientes grupos de estudio: Patología de base, rechazo celular agudo, infección post-trasplante, recidiva de virus de hepatitis C.

Variable de estudio	Pacientes trasplantados hepáticos (n=30)
Patología de base	
Cirrosis alcohólica	12 (40%)
Cirrosis alcohólica + (VHB o VHC)	6 (20%)
Cirrosis virus C	6 (20%)
Otras	6 (20%)
Rechazo celular agudo	
Ausencia (NRA)	18 (60%)
Presencia (RA)	12 (40%)
Infección post-trasplante	
Pacientes sin infección post-trasplante (NoInf)	12 (40%)
Pacientes con infección post-trasplante (INF)	18 (60%)
Recidiva de virus de Hepatitis C	
Ausencia (NVHC)	5 (41.7%)
Presencia (VHC)	7 (58.3%)

- *Datos demográficos de los pacientes trasplantados renales:* El trasplante renal se realizó de donantes cadavéricos en estado de “no asistolia”. La edad media de los donantes renales fue de 52.94 ± 2.44 (rango: 27-74) años y la edad media de los pacientes que recibieron el injerto renal fue de 51.48 ± 2.01 (rango: 27-76) años. En cuanto al sexo del receptor, el 77.4% de los pacientes fueron hombres y el 22.6% fueron mujeres. El tiempo medio del paciente sometido a diálisis previo al trasplante renal, medido en años, fue de 3.81 ± 0.4 (rango: 1-9) años; de todos ellos el 22.6% tuvo sensibilización previa por Acs anti-HLA y el 77.4% no presentó sensibilización previa al trasplante. La presencia de Acs anti-HLA se determinó utilizando la técnica de Luminex. Se determinó el PRA de los pacientes a lo largo del período de estudio. Se obtuvieron dos valores de PRA, el PRA máximo que presentó cada paciente durante el período de estudio y el PRA actual. El 25.8% de los pacientes trasplantados renales presentaron un PRA máximo medio de 4.90 ± 1.80 (rango: 0-42), mientras que el 74.2% no tuvieron presencia de Acs anti-HLA con PRA=0. El PRA actual

medio de los pacientes que presentaron Acs anti-HLA (n=8) durante el periodo del estudio fue de 3.55 ± 1.34 (rango: 0-27). Los pacientes se clasificaron en diferentes grupos de estudio atendiendo a cuatro variables (tabla 3.2):

- A. Patología de base: Los pacientes fueron clasificados en función del tipo de patología de base. Un 51.6% de los pacientes tuvieron como indicación al trasplante insuficiencia renal crónica 2ª a pielonefritis crónica y glomerulonefritis crónica, un 16.1% de los pacientes tuvieron como indicación poliquistosis hepato-renal, un 16.1% de pacientes tuvo como indicación al trasplante nefroangioesclerosis y por último otro 16.1% se clasificó como “nefropatías”; en este grupo se incluyeron aquellos pacientes que tuvieron como indicación al trasplante nefropatía IgA y nefropatía diabética.
- B. Rechazo celular agudo: De acuerdo a la presencia o no del mismo, los receptores renales se clasificaron en dos grupos de estudio:
- *Receptores sin rechazo agudo (NRA)*: Donde se incluyeron pacientes que durante el período del estudio no presentaron ningún hallazgo clínico o histopatológico que evidenciara la presencia de RA. El 77.4% no presentaron ningún evento de RA durante el período del estudio.
 - *Receptores con rechazo agudo (RA)*: Dentro de este grupo se incluyeron aquellos pacientes que presentaron hallazgos tanto histopatológicos confirmados tras la biopsia, así como hallazgos clínicos compatibles con el diagnóstico de RA. El 22.6% presentaron evento clínico compatible con RA durante el período del estudio. Durante la 1ª y 2ª semanas post-trasplante el 16.1% de los pacientes presentó RA, respectivamente, y en el 1º mes post-trasplante el 6.5% de los pacientes presentó RA. La mayor frecuencia, por tanto, de episodios de RA en los trasplantados renales de nuestra serie volvió a centrarse durante las primeras cuatro semanas post-trasplante, al igual que en trasplante hepático. La frecuencia acumulada de eventos clínicos de RA durante el primer mes post-trasplante fue de 38.7%.

C. Infecciones oportunistas en el período post-trasplante:

- *Pacientes sin infección post-trasplante (NoINF)*
- *Pacientes con infección post-trasplante (INF):* Dentro de este grupo hemos diferenciado dos subgrupos, un primer grupo de estudio atendiendo al tipo de organismo causante de la infección (**viral, bacteriana y fúngica**) y un segundo grupo de estudio atendiendo a todas las infecciones juntas sin tener en cuenta el tipo de organismo causante de la infección (**INF**). Durante la 1ª semana post-trasplante, 16.1% de trasplantados renales presentaron infección oportunista bacteriana; durante la 2ª semana post-trasplante el 12.9% de trasplantados renales presentó infección bacteriana; en el 1º mes post-trasplante el 22.6% de receptores renales presentó infección oportunista, de los cuales el 12.9% fue viral, el 6.5% fue bacteriana y el 3.2% fue fúngica; en el 2º mes post-trasplante el 25.8% presentó infección oportunista, de los cuales el 19.4% fue viral y el 6.5% fue bacteriana; en el 3º mes post-trasplante el 32.3% presentó infección, de los cuales 16.1% fue viral y el 16.1% fue bacteriana, en el 6º mes post-trasplante el 12.9% presentó infección bacteriana y al año post-trasplante, el 16.1% presentó infección post-trasplante de los cuales el 6.5% fue viral y el 9.7% fue bacteriana. La mayor frecuencia de infecciones oportunistas post-trasplante se concentraron durante el periodo de mantenimiento con una incidencia acumulada de episodios de infección oportunista del 71%, de los cuales el 16.1% fueron víricos, el 9.7% fueron bacterianos y el 1.1% fueron fúngicos.

Tabla 3.2. Pacientes trasplantados renales agrupados en función de los siguientes grupos de estudio: Patología de base, rechazo celular agudo e infección post-trasplante.

Variable de estudio	Pacientes trasplantados renales (n=31)
Patología de base	
Insuficiencia renal crónica	16 (51.6%)
Poliquistosis hepato-renal	5 (16.1%)
Nefroangioesclerosis	5 (16.1%)
Nefropatías	5 (16.1%)
Rechazo celular agudo	
Ausencia (NRA)	24 (77.4%)
Presencia (RA)	7 (22.6%)
Infección post-trasplante	
Pacientes sin infección post-trasplante (NoInf)	12 (38.7%)
Pacientes con infección post-trasplante (INF)	19 (61.3%)

- **Consentimiento informado:** Previamente a la inclusión en el estudio prospectivo multicéntrico, tanto los trasplantados hepáticos y renales en su totalidad como los individuos recolectados como controles sanos, fueron debidamente informados de las características del mismo y firmaron consentimiento para la monitorización inmunológica durante el primer año post-trasplante, así como también para la obtención, manipulación y almacenaje de las muestras y sus productos derivados.

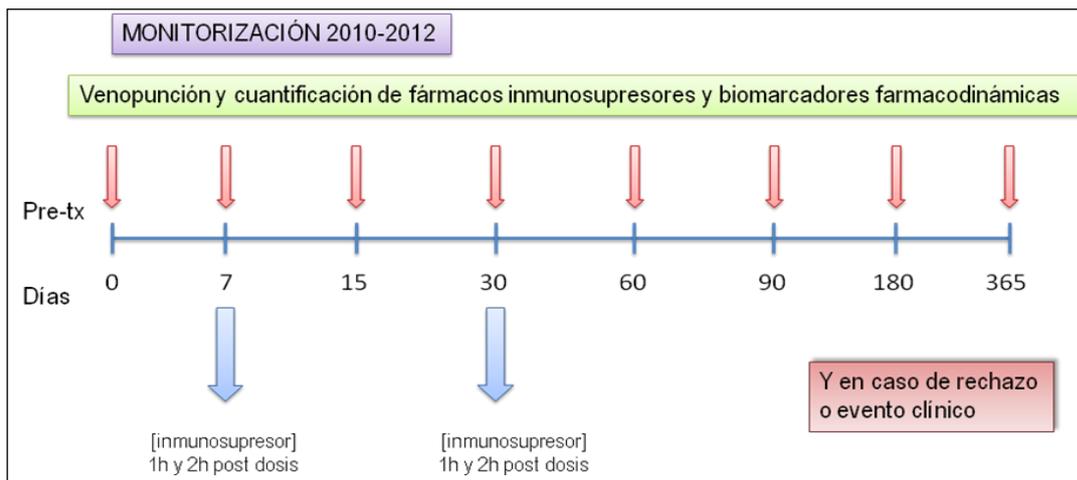


Figura 3.1. Monitorización farmacodinámica de la función inmunitaria durante el periodo de un año post-trasplante (2010-2012). Esquema de recogida de muestras de los trasplantados hepáticos y renales, y controles sanos.

- **Tipo de muestra a estudiar:** Se obtuvieron muestras de sangre periférica (SP) recolectadas en tubos Falcon™ estériles de fondo cónico (Becton Dickinson, BD) con heparina sódica como anticoagulante, a partir de trasplantados hepáticos, trasplantados renales e individuos sanos para evaluar la expresión de moléculas CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD28, CD38, CD69, CD95, CD127 y CD154 por análisis de CF. Además también se ha medido la capacidad de producción de citocinas intracitoplasmáticas producidas *in vitro* y cuantificación de células Treg a través del marcaje intracitoplasmático de FoxP3. Todo ello se hace a partir de la muestra de SP del paciente siguiendo el esquema de la figura 3.1. La toma de muestra se realiza de forma controlada y realizando una monitorización exhaustiva de la función inmunitaria para la validación de biomarcadores farmacodinámicos en cada paciente. El protocolo de recogida de muestras se llevó a cabo en nuestro Servicio de Inmunología para los trasplantados hepáticos y en la consulta de trasplante renal en el caso de los trasplantados renales; en ambos casos la recogida se realizó por venopunción. Las muestras de SP obtenidas para la monitorización de la función

inmunitaria de pacientes trasplantados de nuestra serie de estudio incluía venopunción en el momento previo al trasplante y durante el periodo post-trasplante (1ª semana, 15 días, final del 1er, 2º 3er, 6º y 12º mes. En el caso de que se produjera un evento clínico relevante (rechazo agudo o crónico, infección oportunista o recidiva de VHC o toxicidad) se obtuvo una muestra adicional. La extracción de muestras a los individuos sanos del grupo control fue el mismo que con los pacientes trasplantados. El protocolo de trabajo realizado tras la extracción de cualquier muestra SP se encuentra esquematizado en la figura 3.2. Los diferentes procedimientos experimentales fueron divididos durante cinco días, en función de las características específicas en cuanto a tiempo y manipulación de la muestra, así como complejidad de la tecnología necesaria para la medición de un determinado biomarcador.

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
Montar Cultivos: ILIC (4h; 16h) Sobrenadantes (48h, 72h) Antígenos de Superficie Montar técnicas: Panel Treg Expresión CD28 ILIC (tras 4h)	Lectura CANTO: Panel Treg CD28 ILIC(4h)	Recoger Sobrenadante 48h	Recoger Sobren 72h Montar técnicas: Antígenos de Superficie Lectura CANTO: Antígenos de Superficie	

Figura 3.2. Citación de pacientes en lunes o martes y distribución del plan de trabajo semanal. Si los pacientes se citaron en martes, este esquema se desplazó un día.

➤ Variables clínicas recogidas durante el estudio: Se revisaron continuamente las historias de cada uno de los trasplantados, recogiendo la siguiente información:

<ul style="list-style-type: none"> •Fecha del trasplante •Edad donante •Donante cadavérico o vivo •Si el donante fue cadavérico, estaba en asistolia? •Edad del receptor •Sexo del receptor •Enfermedad de base •Tiempo en diálisis •Sensibilización previa •PRA máximo •PRA actual •Incompatibilidad HLA-A, -B, -DR •Fecha del trasplante •Tratamiento posttrasplante •Terapia de inducción •Terapia de mantenimiento •Leucocitos •Linfocitos •Linfocitos totales 	<ul style="list-style-type: none"> •Dosis MMF •Dosis TRL •Dosis CsA •Cmin MMF •Cmin TRL •Cmin CsA •C30min MMF •C30min TRL •C30min CsA •C1H TRL •C2H TRL •C4H TRL •AUC TRL •C1H MMF •C2H MMF •C4H MMF •AUC MMF •C1H CsA •C2H CsA •C4H CsA •AUC CsA •Presencia/ausencia de necrosis tubular aguda 	<ul style="list-style-type: none"> •Presencia/ausencia de rechazo •Tipo de rechazo (celular o humoral) •Severidad del rechazo (leve, moderado, grave) •Presencia/ausencia de infección •Tipo de infección (viral, fúngica, bacteriana) •Presencia/ausencia y severidad de recidiva de VHC •Presencia/ausencia de neoplasias, neurotoxicidad, diabetes de novo •Creatinina sérica •Filtración glomerular
---	---	--

3.1.2. Técnica quirúrgica del trasplante hepático

A) *Cirugía del donante*

Ante una extracción orgánica, los principios fundamentales son: a) una disección adecuada que permita conocer las posibles alteraciones anatómicas y facilitar la posterior extracción, b) una perfusión *in situ* y enfriamiento de los órganos con la solución de preservación, generalmente Solución de Wisconsin (Soutohard, 1989; Belzer, 1989), que impida la isquemia caliente y c) la extracción de los órganos con sus correspondientes pedículos vasculares indemnes.

Generalmente se realiza una incisión desde el yugulum esternal hasta el pubis, mediante una esternotomía y laparotomía media, lo que permite una buena exposición de los órganos torácicos y abdominales. En ocasiones, si no hay extracción cardiaca, puede sustituirse la esternotomía por una incisión subcostal bilateral. En la disección de los órganos abdominales separamos cuatro fases bien definidas: a) *Exploración de la cavidad abdominal* valorando el tamaño, color y consistencia del hígado, riñones y páncreas. b) *Disección del retroperitoneo inframesocólico*, aislando la aorta abdominal, a nivel de la bifurcación y la vena cava inferior con el fin de realizar una canulación rápida de los dos vasos en caso de necesidad. c) *Identificación y disección del hilio hepático* (arteria hepática, vena porta y colédoco) y, si es necesario, disección del páncreas y d) *Fase de canulación*. Consiste en colocar las cánulas en la aorta abdominal y en el sistema portal para perfundir el líquido de preservación, y en la vena cava inferior para facilitar la exsanguinación e impedir el edema del hígado y los riñones (Sánchez-Bueno, 1999a).

Por último, la *cirugía de banco* tiene por finalidad examinar, en condiciones de hipotermia (4°C), cada uno de los órganos y preparar los cabos vasculares para su posterior anastomosis. En el hígado se realiza lo siguiente: a) Disección de la cava supradiafragmática, resecaando el diafragma adherido y ligando las venas frénicas. b) Disección de la vena cava infrahepática, comprobando la ligadura de la vena suprarrenal derecha. c) Disección de la vena porta, preparando el cabo distal y comprobando la existencia de colaterales. d) Disección del tronco celiaco y preparación del parche aórtico que, posteriormente, se anastomosa a la arteria hepática del receptor. e) Disección de la vía biliar. La colecistectomía suele realizarse tras la revascularización del hígado siempre y cuando no se utilice la vesícula para la reconstrucción biliar.

B) Cirugía del receptor

Separamos tres fases: una fase de disección con el fin de realizar la hepatectomía del hígado enfermo, una fase anhepática y una fase de reperfusión tras colocar el hígado donante (Calne *et al.*, 1987). La intervención se inicia con una incisión subcostal bilateral, seguido de una fase de disección de los elementos del hilio hepático (vía biliar, arteria hepática y vena porta). Con la técnica clásica de Starzl es necesario realizar una disección de la vena cava infrahepática y de la vena cava suprahepática así como comprobar la tolerancia hemodinámica tras la oclusión del hilio hepático y de la vena cava infrahepática (Sánchez-Bueno *et al.*, 1999b).

Una vez extraído el hígado, entramos en la *fase anhepática* procediéndose a la colocación del hígado del donante. La primera anastomosis que se realiza es a nivel de la vena cava suprahepática (técnica clásica) o de las venas suprahepáticas (técnica de piggy back). A continuación, se realiza la anastomosis de la vena porta y, en caso de realizar la técnica clásica, la anastomosis de la vena cava infrahepática. Sin embargo, con el piggy back la vena cava infrahepática del donante se sutura y no se anastomosa. Tras estas anastomosis se retiran los *clamps* vasculares de la vena cava y de la vena porta del receptor y se inicia la *fase de reperfusión* al pasar la sangre portal por el nuevo hígado. La intervención continúa con la anastomosis de la arteria hepática y la vía biliar extrahepática, respectivamente.

Durante los primeros días post-trasplante, los receptores hepáticos incluidos en esta memoria de tesis fueron sometidos al control y tratamiento habituales de toda UCI, monitorizando diariamente parámetros hematológicos, coagulación, iones, gases y marcadores del funcionalismo hepático (Bilirrubina total-BT, Glutámico oxalacético transaminasa-GOT, Glutámico pirúvico transaminasa-GPT, Fosfatasa alcalina-FA y Gamma-glutamilttransferasa-GGT), así como los niveles sanguíneos de CsA. Tras su ingreso en la Unidad de Trasplante, los controles se realizaron dos días por semana. La estancia en UCI y en Unidad de Trasplante varió para cada paciente, pero osciló normalmente de 3 a 7 días en la primera, y de 1 a 2 meses en la segunda.

Las complicaciones postoperatorias más frecuentes, además de las derivadas de la propia intervención quirúrgica, durante los primeros días fueron: rechazo agudo, infecciones, problemas con herida quirúrgica, ascitis, derrame pleural, fiebre, insuficiencia respiratoria, disfunción del injerto o efectos secundarios adversos a los fármacos inmunosupresores.

3.1.3. Técnica quirúrgica del trasplante renal

A) Ablación renal

Se entiende por ablación a la obtención de un órgano proveniente de un donante en condiciones tales que permiten su implante en el receptor. En el caso de la ablación renal, esta puede realizarse en un donante vivo ó cadavérico en muerte encefálica.

B) Cirugía de donante cadavérico

Por diversas razones, la obtención de riñones de buena calidad a partir de donante cadáver es mucho más difícil que usar los de donantes vivos. Muchos donantes cadavéricos potenciales tienen una condición de inestabilidad cardiovascular y están muy deshidratados en el momento en que sus riñones estén disponibles, debido al líquido de restricción para la reducción del edema cerebral. Una vez que se ha establecido el diagnóstico de muerte cerebral, es necesario un cambio agresivo en el régimen de infusión para promover la diuresis necesaria. Los grandes volúmenes de líquidos intravenosos en combinación con manitol y diuréticos se deben suministrar con frecuencia para mejorar el estado funcional de los riñones (Dreikorn, 1988).

Los riñones constituyen, dentro de los órganos sólidos intra-abdominales a trasplantar, los de mayor tolerancia a las condiciones extremas del donante. Así, la edad avanzada, los antecedentes alcohólicos, la hepatopatía grasa, la diabetes tipo II pueden impedir la obtención del hígado, páncreas e intestino pero no así la de los riñones. El procedimiento de ablación será entonces exclusivo para la procuración renal y sigue una técnica normalizada a favor de la perfusión *in situ* junto con la nefrectomía del riñón en bloque del donante (Ackermann *et al.*, 1968).

Técnica: La técnica que se realiza para la ablación renal de donante cadavérico se puede dividir en diferentes etapas: 1) *Laparotomía:* La incisión en cruz es la que ofrece mejor campo operatorio. La rama vertical es una incisión xifopubiana y la bilateral secciona los flancos a la altura del ombligo, esta incisión subcostal transversal garantiza la exposición completa del abdomen. Los cuatro vértices se repliegan sobre sí mismos y se fijan. 2) *Posicionamiento colónico derecho:* Tiene por objeto exponer el riñón y el uréter homolateral, la vena cava inferior a nivel de su formación y la bifurcación aórtica dentro del espacio retroperitoneal en el donante cadáver. 3) *Canulación de la cava y de la aorta:* Después de la ligadura distal de ambos vasos, se canula la aorta con una cánula o en su defecto con una sonda acoplada a la guía de perfusión, que deberá estar

debidamente purgada con la solución de perfusión fría. En la vena cava se coloca una sonda para permitir el drenaje de la sangre fuera del campo operatorio cuando comience la perfusión. 4) *Ligadura y sección de las ramas viscerales anteriores de la aorta*: Se procede a la identificación, ligadura y sección de las arterias mesentérica inferior, mesentérica superior y tronco celíaco respectivamente a nivel de la arteria aórtica. Para la correcta visualización del tronco celíaco es conveniente la sección con bisturí del pilar derecho del diafragma. Se debe rodear la aorta por encima del tronco celíaco con una ligadura de seda, que se ajustará en el momento de la perfusión, de igual forma se procede con la vena cava infrahepática por encima de las venas renales. 5) *Posicionamiento colónico izquierdo*: Con esta maniobra se exponen el riñón y el uréter izquierdos y se labra un paso por detrás de la raíz del mesenterio. 6) *Perfusión in situ*: Se ajustan las ligaduras superiores de la aorta y de la vena cava, debiendo tomarse en cuenta la hora en que se produce esta maniobra que llamaremos “hora de clampeo” y que indicará el comienzo de *isquemia* del órgano. Se liberan las cánulas colocadas en la aorta y la cava y comienza la perfusión del bloque renal con la preservación a 4°C. Simultáneamente a la perfusión se realizará el enfriamiento externo de los órganos mediante la colocación de escarcha de hielo estéril intraperitoneal. Si la perfusión es adecuada, los riñones rápidamente se vuelven pálidos y fríos. El tiempo de isquemia caliente se mantiene en el mínimo. Los riñones son liberados de todos los lados y, junto con la aorta, vena cava y las glándulas suprarrenales, todo el bloque de tejido se levanta hacia arriba por tracción suave y es diseccionado del retroperitoneo. La aorta y la vena cava se cortan transversalmente a nivel de la bifurcación aórtica, después del cual todo el bloque puede ser extraído. 7) *Liberación y movilización renal y uretral*: Con maniobras romas se liberan los riñones de los tejidos perirrenales (grasa y fascias) hasta el nivel de la columna vertebral. Los uréteres deben ser liberados con la mayor cantidad del tejido adiposo vecino para no lesionar su irrigación, seccionándolos a su entrada a la vejiga. 8) *Extracción del bloque renal*: Después de la sección de la aorta y de la cava entre las ligaduras colocadas para la canulación, se procede a la separación de estos vasos, se debe progresar por un plano muy cercano a la columna vertebral, para evitar lesionar los posibles vasos renales accesorios. Esta separación llega hasta las ligaduras superiores de la aorta y cava donde se seccionarán estos vasos. 9) *División del bloque renal (trabajo de banco)*: Una vez extraído el bloque renal, se debe seccionar la arteria aorta por su línea media anterior y posterior. La vena renal izquierda se secciona en su nacimiento, quedando la totalidad de la cava unida al riñón derecho. En este momento se debe examinar la cantidad y

características de los orificios de salida y entrada de los vasos renales en la aorta y la cava. 10) *Descripción de los hallazgos*: Se debe prestar especial atención a los siguientes detalles, para describirlos en el protocolo operatorio:

A) Medida tridimensional de cada riñón. B) Cantidad de vasos arteriales y venosos. C) Sitio de implantación de los accesorios. D) Grado de ateromatosis aórtica y compromiso de los orificios. E) Diámetro de los ostia arteriales. F) Diámetro de arteria/as renal/es a su salida de aorta. G) Características de uréteres. H) Características de superficie renal.

Los riñones están listos para ser separados por una incisión entre la línea media de la pared posterior de la vena cava y la pared anterior de la aorta. La obtención de muestra para biopsia se realiza ahora. 11) *Embolsado de los riñones*: Después de que los riñones hayan sido separados, se lleva a cabo una perfusión final después de la división del bloque renal ablacionado, se identifican los vasos no ligados y se ligan; una suave presión sobre la vena renal durante la perfusión revelará ramas no ligadas de la vena suprarrenal y espermiática. Los riñones son envueltos en bolsas de plástico y envasados en recipientes para el depósito de órganos (Dreikorn, 1988).

C) Cirugía del receptor

El implante renal se lleva a cabo en la fosa ilíaca derecha en localización extraperitoneal mediante incisión ilioinguinal. Esta fosa es la elegida habitualmente, ya que la disposición más superficial de la vena ilíaca facilita las anastomosis vasculares, que se realizan termino-lateralmente con los vasos ilíacos externos. Ante un segundo trasplante o en situaciones patológicas arteriales (ateromatosis) o venosas (trombosis venosa previa) se elige la fosa ilíaca izquierda. En terceros o cuartos trasplantes se opta por reutilizar alguna de las fosas ilíacas, colocando el injerto más alto conectado a vasos ilíacos primitivos.

Realizadas las anastomosis vasculares y perfundido el riñón, se lleva a cabo la ureteroneocistostomía, que establece la continuidad del tracto urinario entre el uréter del injerto y la vejiga del receptor. Existen dos técnicas de reimplantación ureteral: las intravesicales (Leadbetter-Politano, Paquin) y las extravesicales (Lich-Gregoir, Barry, Taguchi). En todas se intenta conseguir un túnel submucoso ureteral (2-3 cm), que actúe como mecanismo de anti-reflujo. Las extravesicales conllevan menor tiempo y apertura vesical, uréteres del injerto más cortos y menos complicaciones (Mangus *et al.*, 2004).

La técnica de Taguchi, en la que el uréter se fija con un solo punto, parece asociarse con una incidencia más alta de hematuria y complicaciones ureterales. Si el uréter es demasiado corto o la vejiga de baja capacidad, sólo es posible realizar una reimplantación directa en vejiga sin mecanismo anti-reflujo asociado.

La utilización sistemática de un catéter *doble J* monitorizando la reimplantación ureterovesical es controvertida. Meta-análisis recientes han evidenciado que el uso rutinario del catéter doble J disminuye de modo significativo la incidencia de fístula urinaria. Sin embargo, pudiera ser fuente de infección urinaria post-trasplante, y exige la realización posterior de una endoscopia para retirarlo a 2-3 semanas (Santos *et al.*, 2010).

3.1.4. Terapias inmunosupresoras y anti-rechazo

En este apartado, haremos una breve referencia de las terapias estándar con las que fueron tratados los pacientes incluidos y que se sometieron a trasplante hepático y renal. En la tabla 3.3 se refleja a modo de resumen el tipo de tratamiento y terapia recibido así como las dosis medias expresados como media \pm error típico de la media (ETM) de los distintos fármacos administrados y la concentración basal (C_{min}) de cada uno de ellos.

Actualmente, la inmunosupresión puede ser clasificada en periodos que son diferentes en cuanto a los tiempos de administración del fármaco, así como en función de los agentes y dosis utilizadas. Estas fases son catalogadas como de inducción, tratamiento post-trasplante inmediato, terapia de mantenimiento y tratamiento del rechazo (Wiesner *et al.*, 1998). La fase de inducción abarca desde el momento del implante del injerto y en general se caracteriza por un nivel de inmunosupresión elevado que tiene como objetivo principal evitar el rechazo celular agudo así como facilitar la aceptación. La fase de mantenimiento busca encontrar la dosis de inmunosupresión mínima necesaria para evitar el rechazo y minimizar efectos colaterales (Dagher *et al.*, 1999).

Tabla 3.3: Tratamiento inmunosupresor recibido durante el periodo de estudio en los pacientes con TOH y TR.

Tratamiento Inmunosupresor	Pacientes sometidos a TOH (n=30)	Pacientes sometidos a TR (n=31)
Terapia de Inducción (n, %)		
Basiliximab (anti-CD25)	3 (10.0%)	23 (74.2%)
Timoglobulina	0	4 (12.9%)
Ninguna	27 (90.0%)	4 (12.9%)
Terapia post-trasplante (n, %)		
TRL	17 (56.7%)	1 (3.2%)
MMF	0	2 (6.5%)
TRL + MMF	13 (43.3%)	28 (90.3%)

Terapia de mantenimiento (n, %)		
TRL	20 (66.7%)	2 (6.5%)
MMF	0	2 (6.5%)
TRL + MMF	10 (33.3%)	27 (87.1%)
Dosis TRL (mg/kg/día)	7.19±0.26	12.66±1.00
Dosis MMF (mg/kg/día)	1962.67±54.45	1802.58±76.33
Cmin TRL (ng/ml)	9.96±0.39	8.35±1.48
Cmin MMF (µg/ml)	2.40±0.48	2.16±0.78

Los datos referidos a dosis y Cmin están expresados como media ± ETM. *Abreviaturas:* **TOH**, trasplante ortotópico hepático; **TR**, trasplante renal; **TRL**, tacrolimus; **MMF**, micofenolato de mofetilo; **ETM**, Error típico de la media; **Cmin**, Concentración mínima basal.

3.1.4.1. Terapias inmunosupresoras en trasplante hepático

La mayoría de los centros de trasplante hepático utilizan tratamientos inmunosupresores que se basan en el uso de: inhibidores de la calcineurina (TRL), inhibidores de la enzima IMPDH (MMF), combinados con esteroides (Neuberger, 2001).

La dosis media (mg/kg/día) de TRL (Prograf[®], Astellas Pharma, Londres, Reino Unido, cápsulas 5 mg/día; 1 cápsula de 2 mg antes del desayuno y otra de 3 mg antes de la cena) suministrada a los pacientes fue de 7.19 ± 0.26 mg/kg/día. La concentración media del fármaco en sangre, medida como Cmin TRL (ng/ml), fue de 9.96 ± 0.39 ng/ml manteniéndose siempre dentro de los rangos de normalidad y margen terapéutico establecido (5-20 ng/ml). La dosis media de MMF (CellCept[®], Roche Farma, Basilea, Suiza. 500 mg; 2 comprimidos después del desayuno y 2 comprimidos después de la cena) suministrada a los pacientes fue de 1962.67 ± 54.45 mg/kg/día. La concentración media del fármaco en SP, medida como Cmin MMF (µg/ml), fue de 2.40 ± 0.48 µg/ml manteniéndose dentro de los rangos de normalidad para este fármaco (2-4 µg/ml).

3.1.4.1.1. Terapia de inducción

Los pacientes con TOH recibieron la siguiente terapia de inducción: Basiliximab (Simultec[®], Novartis Farma): Se administró por vía intravenosa en una dosis de 20 mg (10 mg para pacientes de menos de 35 kg de peso) el día del trasplante (antes de la 6ª hora del post-operatorio) y el día 4 post-trasplante, dos dosis en total. El 10% de los trasplantados hepáticos de nuestra serie de estudio recibieron Basiliximab como terapia de inducción mientras que el 90% restante no recibió ningún tipo de terapia de inducción.

3.1.4.1.2. Terapia inmunosupresora post-trasplante

De los 30 sujetos con TOH, el 56.7% de los pacientes recibieron como tratamiento post-trasplante un inhibidor de la calcineurina en monoterapia (TRL) y el 43.3% restante recibió un tratamiento post-trasplante basado en la combinación de un inhibidor de la calcineurina, TRL y un inhibidor de la síntesis de nucleótidos, MMF. Además todos los pacientes recibieron corticoterapia basada en la administración de metilprednisolona (Prednisona; Dacortin[®] 20 mg/kg/día) que comenzó durante el periodo intraoperatorio en dosis de 1 g intravenoso, utilizando posteriormente una pauta descendente, desde 200 mg el primer día hasta 20 mg en el séptimo día post-trasplante. Posteriormente, las dosis de corticoides se redujeron progresivamente hasta dosis de 5 mg/día a partir del tercer mes.

3.1.4.1.3. Terapia inmunosupresora de mantenimiento

El 66.7% de trasplantados hepáticos de nuestra serie de estudio recibieron como terapia inmunosupresora de mantenimiento el inhibidor de la calcineurina TRL (Prograf[®]) en monoterapia y en 33.3% de pacientes restante recibieron en mantenimiento el inhibidor de la calcineurina TRL (Prograf[®]) combinado con inhibidor de la síntesis de nucleótidos, MMF (CellCept[®]). Todos los pacientes hepáticos recibieron corticoterapia de mantenimiento con una dosis de 5 mg/kg/día desde el primer mes post-trasplante y hasta el final periodo del estudio (Prednisona; Dacortin[®] 5 mg/kg/día). Todos estos datos se encuentran resumidos en la tabla 3.1.

3.1.4.1.4. Terapia anti-rechazo agudo

En caso de aparición de episodios de rechazo agudo (RA), confirmado por biopsia hepática, los pacientes fueron tratados durante 3 días consecutivos con bolos de metilprednisolona (por vía intravenosa de 250 mg a 1 g/día), revirtiendo el episodio de RA en el 92% de los casos. En el caso de aparición y desarrollo de un fenómeno de rechazo crónico, los pacientes se manejaron mediante terapia de rescate con el inmunosupresor TRL, por vía oral con dosis iniciales bajas de 0.1 mg/kg/día, para obtener concentraciones en sangre en un margen de 5-20 ng/mL, revirtiendo el rechazo crónico en estadios iniciales (reduce la fibrosis asociada al rechazo crónico). En el caso de no reversión del fenómeno de rechazo crónico, el paciente se intentó someter a re-trasplante.

3.1.4.2. Terapias inmunosupresoras en trasplante renal

Los fármacos inmunosupresores suministrados habitualmente en trasplante renal tienen tres efectos: el efecto terapéutico deseado (suprimir los eventos de rechazo), consecuencias no deseadas de un estado de inmunodeficiencia iatrogénica (infección o cáncer) y toxicidad no inmune asociada a otros tejidos (nefrotoxicidad, hepatotoxicidad) (Halloran, 2004). Es por ello que la terapia inmunosupresora durante el período post-trasplante tiene que seguir unas pautas bien definidas tanto por la evidencia clínica como por la monitorización farmacocinética.

3.1.4.2.1. Terapia de inducción

La terapia de inducción que recibieron los pacientes sometidos a TR en esta memoria de tesis doctoral fue la siguiente (Tabla 3.1):

- ✓ Basiliximab (Simultec[®], Novartis Farma): Se administra por vía intravenosa al igual que en trasplante hepático. El 74.2% de trasplantados renales de nuestra serie de estudio recibió como terapia de inducción Basiliximab.
- ✓ Timoglobulina (25 mg/vial) (Genzyme Polyclonals S.A.S, Francia): Se administra por vía intravenosa asociado a corticoterapia durante al menos 4 horas. La primera dosis puede ser administrada durante un período más largo de tiempo. La dosis aceptada para la prevención de RA en TR es de de 1 a 1,5 mg de Timoglobulina por cada kilogramo de peso, cada día durante 3 a 9 días después del trasplante. El 12.9% de los pacientes de nuestra serie recibió Timoglobulina como inducción.
- ✓ Ninguna: El 12.9% restantes de trasplantados renales de nuestra serie no recibió ningún tipo de terapia de inducción.

3.1.4.2.2. Terapia inmunosupresora post-trasplante

Los trasplantados renales, una vez terminado el periodo post-trasplante inmediato, se les cambió la terapia de inducción por un tratamiento inmunosupresor basado principalmente en el uso combinado o en monoterapia de inhibidores de la calcineurina-TRL-Prograf o inhibidores de la IMPDH-MMF-CellCept. El 3.2% de trasplantados renales recibió como terapia inmunosupresora post-trasplante TRL en monoterapia. El 6.5% de trasplantados renales recibió como terapia post-trasplante MMF en régimen de monoterapia. Por último, el 87.1% de trasplantados renales recibió como terapia post-

trasplante un régimen en doble-terapia basado en la administración conjunta de TRL y MMF. Estos datos pueden ser consultados en la tabla 3.1.

3.1.4.2.3. Terapia inmunosupresora de mantenimiento

Pasados los primeros tres meses post-trasplante (+90 días), se procedió a realizar un ajuste de la terapia inmunosupresora y comenzar los protocolos de mantenimiento con el objetivo de ir reduciendo la dosis y así la concentración sanguínea del fármaco, evitando de esta manera las complicaciones que surgen como consecuencia del tratamiento inmunosupresor administrado.

El 6.5% de trasplantados renales recibieron como terapia de mantenimiento TRL en monoterapia, del mismo modo un 6.5% de trasplantados renales recibió MMF en monoterapia. Finalmente, el 87.1% de trasplantados renales restante recibió una doble terapia de mantenimiento basado en administración conjunta de TRL + MMF (Tabla 3.1).

3.1.5. Diagnóstico de rechazo agudo en trasplante hepático

El diagnóstico de rechazo agudo se estableció por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), y se basó en criterios convencionales clínicos, bioquímicos y anatomopatológicos (Adams *et al.*, 1990; Mor *et al.*, 1992; Ayres *et al.*, 1993). Cuando el paciente trasplantado presentaba síntomas clínicos de rechazo agudo y los parámetros bioquímicos en suero, como el aumento de la bilirrubina total (BT) o de las enzimas hepáticas (GOT, GPT, FA o GGT) estaban alterados, se realizó ecografía Doppler para excluir la patología biliar y vascular, y para indicar la realización de biopsia hepática. El diagnóstico histológico de rechazo agudo celular se realizó considerando una triada de hechos: 1) infiltración inflamatoria celular mixta de los espacios portales o periportales, 2) infiltración y daño del epitelio biliar de los conductos biliares intrahepáticos y, 3) presencia de endotelitis o flebitis en la vena porta o en las ramas de la vena hepática.

La sintomatología clínica y el patrón analítico no son patognomónicos de rechazo hepático, por lo que es necesario establecer el diagnóstico diferencial con los siguientes procesos patológicos: trombosis vascular (sobre todo de la arteria hepática), hepatitis vírica, colestasis simple postoperatoria o por mal funcionamiento de la vía biliar, colangitis aguda, hepatotoxicidad por fármacos (más habitualmente por ciclosporina) e infecciones bacterianas hepáticas o extrahepáticas graves.

Los receptores de injerto hepático fueron monitorizados, al menos, durante el primer año durante las visitas clínicas rutinarias para descartar presencia de episodio de RA. En este estudio se ha considerado solamente el *rechazo agudo temprano* (del inglés, EAR, *early acute rejection*), excluyendo cuatro casos de *rechazo agudo tardío* (del inglés, LAR, *late acute rejection*) detectados 5 meses después del trasplante.

3.1.6. Diagnóstico de rechazo agudo en trasplante renal

Como se describió en el apartado de la introducción, existen diversos tipos de rechazo agudo. El 100% de los casos descritos de rechazo agudo en los trasplantados renales incluidos en nuestra serie fueron diagnosticados como rechazo agudo celular por el Servicio de Anatomía Patológica del HCUVA. El diagnóstico se basó tanto en hallazgos clínicos, bioquímicos y anatomopatológicos. Los principales hallazgos clínicos descritos, aunque no en todos los pacientes, fueron hematuria, fiebre, nefritis intersticial y necrosis tubular aguda. La evaluación de la disfunción aguda del injerto se realizó mediante consulta clínica de los pacientes con sospecha de rechazo agudo en donde se realizó un examen físico del paciente, medición de los niveles séricos de inmunosupresor, estudio de imagen ultrasonidos por Doppler y pruebas bioquímicas en SP y orina (Djamali *et al.*, 2006). Los hallazgos bioquímicos consistieron en un aumento de la concentración de Creatinina sérica superiores a 0.3 mg/dl acompañado de una disminución en la diuresis. Posteriormente estos hallazgos fueron confirmados por biopsia renal. El rechazo agudo celular se caracteriza por tubulitis que tiene lugar cuando los linfocitos y monocitos avanzan hacia las paredes y luz de los tubulos renales, con cambios degenerativos asociados de las células epiteliales. En el rechazo agudo vascular mediado por células que puede ser diagnosticado como rechazo tubulointersticial (RATI), los linfocitos y monocitos favorecen la inflamación de la arteria del endotelio y en reacciones de rechazo más avanzadas se puede observar hasta necrosis de la pared vascular (Arns y Weber, 2002). La distinción entre rechazo agudo humoral mediado por anticuerpos (RAH ó RMA) y RATI es importante desde el punto de vista etiopatogénico, clínico y terapéutico, ya que el RAH conlleva un peor pronóstico y un mayor porcentaje de corticorresistencia (Crespo *et al.*, 2001; Mauiyyedi *et al.*, 2002; Koo *et al.*, 2004). Si bien el RATI presenta unos criterios histológicos bien caracterizados y graduados por consenso internacional según el grupo de expertos de Banff (Racusen *et al.*, 2004; Solez *et al.*, 1993, 2007 y 2008), la identificación de RAH en la biopsia renal es más problemática, por tres razones fundamentales. 1) No existen alteraciones histopatológicas

específicas; 2) las alteraciones pueden no ser representativas y de mínima intensidad y, 3) pueden coexistir con un RATI. Halloran *et al.*, 1990 describieron la tríada de disfunción del injerto renal como presencia de neutrófilos en capilares peritubulares junto con presencia de DSAs anti-HLA clase I definiendo así una entidad nueva distinta al rechazo celular agudo clásico y al rechazo hiperagudo. Posteriormente, Trpkov, *et al.*, en 1996, describen una serie de marcadores histológicos, entre los que destacan la vasculitis severa, que incluye necrosis fibrinoide, glomerulitis, trombos en capilares, infartos y presencia de neutrófilos polimorfonucleares en capilares peritubulares que, junto con la presencia de DSAs anti-HLA clase I, definen como específico la presencia de RMA. Estudios publicados por el grupo de Collins *et al.*, 1999, confirman y amplían estas características histológicas que definen al RMA. Entre estos marcadores histológicos cabe destacar la necrosis fibrinoide, tanto glomerular como arterial, ya que su presencia es casi patognomónica, a pesar de su baja incidencia en la biopsia y, además, indica un peor pronóstico del RMA. Feucht *et al.*, 1993, fueron los primeros investigadores que utilizaron como prueba diagnóstica el Ac anti-C4d. Éste es un producto de degradación del factor del complemento C4, que se activa normalmente en la vía clásica y que forma una unión covalente con los elementos tisulares en el lugar de activación que es estable y duradera; características por las cuales es útil como marcador diagnóstico. Estos autores comprobaron que la supervivencia del injerto a un año era muy inferior en los casos que expresan C4d (57% frente al 90%).

3.1.7. Diagnóstico y tratamiento de la recidiva de virus de hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) no se elimina del huésped con el trasplante hepático, re-infectando el injerto en prácticamente todos los casos originando grados variables de lesión del mismo (McCaughan *et al.*, 2004). Esta recidiva de la infección por el VHC después del trasplante hepático provoca una progresión de la hepatitis C acelerada y más grave que en los pacientes inmunocompetentes (Berenguer *et al.*, 2000a) y hasta un 30% de los pacientes desarrollan una nueva cirrosis hepática 5 años después del trasplante hepático, ocasionando una importante morbi-mortalidad (Berenguer *et al.*, 2000b). Además, la recidiva de la infección por VHC se ha convertido en la primera causa de mortalidad a partir del primer año del trasplante en los trasplantados por cirrosis de VHC. Así, la supervivencia de estos pacientes a los 5 años del trasplante es del 60-70% frente al 80% en los pacientes trasplantados por otras etiologías (Narang *et al.*, 2010;

Berenguer *et al.*, 2001). En la actualidad, no existen medidas eficaces para evitar la recidiva, esta se considera uno de los principales problemas en los pacientes que han recibido un trasplante. Así, conocer la fisiopatología del proceso y algún marcador predictivo que ayuden a tomar medidas preventivas es de vital importancia.

La terapia antiviral suministrada a los receptores hepáticos en el HCUVA, se basó en la administración de IFN α junto con ribavirina (Copegus[®] comp. recub. 200 mg, ROCHE FARMA; 2 comprimidos/12h). Este tratamiento en particular con IFN α y ribavirina, se ha mostrado eficaz únicamente en el 15-20% de los individuos con recidiva de la infección por VHC (Guillouche *et al.*, 2011), por lo que el resto de pacientes que no toleran el tratamiento, o que no responden al mismo, están predispuestos a una evolución más rápida y agresiva de una enfermedad cuyo único tratamiento en los estadios finales será el retrasplante hepático (Narang *et al.*, 2010).

El diagnóstico de la recidiva de VHC en el HCUV se realizó por PCR [detecta ARN viral en el suero (carga viral y logaritmo del ARN viral)]. En casi la totalidad de los pacientes con recidiva de VHC se detecta ARN en suero una vez trasplantados debido a que el VHC, a pesar de ser principalmente hepatotropo, se reproduce en otros reservorios extra-hepáticos, fundamentalmente en los ganglios linfoides, y desde esta localización vuelven a infectar el órgano injertado (Berenguer *et al.*, 2001; Roche *et al.*, 2007).

3.1.8. Control, diagnóstico y prevención de infecciones

Para evitar las infecciones más frecuentes durante las primeras semanas post-trasplante, se estableció la siguiente pauta de tratamiento:

- ✓ *Profilaxis quirúrgica*: Si el receptor ingresó procedente de su domicilio y el exudado nasal era negativo para *Staphilococcus* resistente a meticilina, se empleó cefuroxima 1500mg/vía intravenosa/8horas, 3 dosis. Cuando el paciente estaba ingresado o el exudado nasal era positivo para *Staphilococcus* resistente a meticilina, se usó teicoplanina 200 mg vía intravenosa en el preoperatorio y cada 12 horas durante las primeras 48 horas post-trasplante.
- ✓ *Profilaxis Candida sp*: Nistatina en suspensión (5cc/8horas) por vía oral.
- ✓ *Profilaxis Pneumocystis carinii*: Trimetoprin-sulfametoxazol 160/800 mg/vía oral/24horas (post-extubación), durante los 6 primeros meses. En el caso de

alergias a sulfamidas: pentamidina en aerosol 300 mg (disuelto en 6 ml de agua) una vez al mes.

- ✓ *Profilaxis Aspergillus sp*: Itraconazol 200mg/24horas/vía oral, durante tres meses.
- ✓ *Profilaxis Toxoplasma sp*: Pirimetamina 25mg/24horas/vía oral + ácido fólico 1 comprimido/24horas. Si el donante tuvo serología para *Toxoplasma* siendo el receptor seronegativo el tratamiento se alargó hasta los 6 meses post-trasplante.
- ✓ Si el mantoux fue positivo o existía sospecha de antecedentes de tuberculosis (lesiones radiológicas, contactos familiares, etc.) se administró isoniazida 300 mg por vía intravenosa durante 24 horas, y por vía oral durante un año.
- ✓ *Infección por Citomegalovirus (CMV)*: La infección más frecuente y problemática entre el 1º y el 6º mes post-trasplante fue la infección por CMV. Su profilaxis incluyó un tratamiento de inducción durante dos semanas con ganciclovir intravenoso (Cymevene, Roche Farma) a dosis de 5 mg/kg/12 horas o vanganciclovir (Valcyte, Roche Farma) vía oral, en dosis de 900 mg/12 horas, seguido de un tratamiento de mantenimiento durante 3 meses con vanganciclovir vía oral, en dosis 900 mg/24 horas. Dichas dosis fueron dependientes en todo momento de la función renal. Si el receptor fue seronegativo para CMV y el donante seropositivo o desconocido, se mantuvo el tratamiento de inducción 4 semanas y el tratamiento de mantenimiento 6 meses. El diagnóstico de infección por CMV se realizó mediante detección de material genómico en el suero de los pacientes mediante PCR (carga viral) en Microbiología.
- ✓ *Infección por virus BK (VBK)*: La presencia de VBK en los pacientes renales se basó en la detección por PCR de material genómico del virus tanto en plasma (viremia BK) como en orina (viuria BK). Otros rasgos diagnósticos característicos de la infección por virus BK fueron la presencia de necrosis tubular aguda (NTA) y/o nefritis intersticial confirmando la presencia del virus tras la biopsia renal (nefropatía viral). Para valorar la presencia de infección por VBK se realizó de forma sistemática un seguimiento de los pacientes de forma mensual durante los primeros 6 meses post-trasplante. El tratamiento de viremia por virus BK fue la reducción temprana de la dosis de inmunosupresión, y en aquellos pacientes refractarios a la disminución de la dosis inmunosupresora se administró

leflunomida vía oral (100 mg/día) por cinco días, reduciendo posteriormente la dosis a 20 a 60 mg/día, tratando de mantener niveles SP entre 50 a 100 µg/mL.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Parámetros farmacocinéticos

- *Análisis de las concentraciones de TRL y CsA en SP total*
- *Determinación de las concentraciones de MMF en plasma*

Para la determinación de las variables que corresponden con las concentraciones sanguíneas de los fármacos inmunosupresores (C_{min}, C_{30min}, C_{1H}, C_{2H}, C_{4H}, AUC), se llegó a un acuerdo con los servicios de Digestivo y de Nefrología del HCUVA por el que los facultativos especialistas de cada área se responsabilizarían de pedir como rutina la medición de concentraciones sanguíneas y plasmáticas de los fármacos inmunosupresores suministrados para así poder determinar la concentración basal (antes de la toma), la concentración a los 30 minutos tras la toma y la concentración a la hora, dos horas y cuatro horas post dosis. La medición de las concentraciones de los fármacos se realizó en la Unidad de Toxicología del Servicio de Análisis Clínicos del HCUVA.

3.2.2. Parámetros farmacodinámicos

En este apartado he desarrollado detalladamente cuál ha sido la metodología utilizada en este proyecto de tesis doctoral, para poder analizar todos los biomarcadores elegidos y así poder valorar su posible papel como biomarcador farmacodinámico del efecto inmunomodulador de la terapia inmunosupresora.

3.2.2.1. Determinación de la capacidad productora de citoquinas intracitoplasmáticas (IL-2, IFN γ , IL-10 e IL-17) por citometría tras estímulo policlonal de células T CD4⁺ y CD8⁺ *in vitro*

BD Bioscience ha desarrollado un protocolo de trabajo para la detección intracelular de citocinas en linfocitos y monocitos activados. El procedimiento ha sido optimizado con el uso de AcMo anti-citocinas de BD. El ensayo *FastImmune cytokine* comienza con la activación de la SP con PMA e Io durante 4 horas a 37°C. La BFA se

añade durante las 4 horas que dura la activación celular con el fin de inhibir el transporte intracelular de proteínas (Picker *et al.*, 1995; Openshaw *et al.*, 1995). De este modo, los antígenos y citocinas producidos durante la activación quedan retenidos en el interior celular. Las células se tiñen con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos contra marcadores de la superficie celular (CD3/CD8/CD69). A continuación las células activadas son lisadas, permeabilizadas y teñidas con AcMo conjugados con fluorocromos dirigidos contra las citocinas. Las células marcadas pueden ya ser lavadas y adquiridas a través del citómetro de flujo para su posterior análisis (Figura 3.3). Se determinó la capacidad de síntesis de IL-2, IFN γ , IL-10 e IL-17 en linfocitos T estimulados *in vitro* a partir de SP. Las muestras de SP recolectadas fueron procesadas dentro de las 8 horas posteriores a su recolección.

➤ Reactivos:

Agua destilada estéril Braun[®] *1L* (ref. 75/441451, Braun Medical; Melsungen, Germany).

Etanol (EtOH) absoluto (Merck, Barcelona), *se pre-enfrió a -20°C*.

Dulbecco's Phosphate buffered saline, DPBS 10x (ref. 14200-067, GibCo[®] by life Technologies[™], Waltham, MA); 500 ml. Almacenado entre 15°C-30°C.

Phosphate buffered saline, PBS 1x (Merck, Barcelona): Diluido 1/10: 100 ml PBS 10x + 900 ml agua destilada.

Phosphate buffered saline, PBS 20L BD FACSTFlow[™] (ref. 342003, BD Bioscience). Fluido optimizado para su uso en CF.

Dimethyl sulfoxide solution 100% (DMSO) cryopreservative solution, Ph. Eur. Grade (10 ml); (ref. V-10010, OriGen Biomedical Inc. Heisingborg, Sweden).

Dimetil sulfóxido 20%, DMSO: 80 ml de suero de ternera fetal (STF) descongelado + 20 ml de DMSO. Para filtrarlo, se mezcló STF con DMSO en la parte superior del filtro y con suaves movimientos se mezcló. Por vacío, fue filtrado y alicuotado en 5 ml.

Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, PMA (ref. P8139, SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, Missouri, USA): Reconstituido con DMSO (20%) a una concentración de 0.1 mg/ml (1 mg PMA + 10 ml DMSO 20%) (solución MADRE). Se alicuotó a 50 μ l/tubo y almacenó en cámara oscura a -20°C. En cultivos celulares el PMA actúa como activador de la Protein Kinasa C (Saitoh y Dobkins, 1986).

Solución de ensayo:

- Concentración final de 25 ng/ml.
- Concentración inicial de 1 μ g/ml: 5 μ l (0.1mg/ml) + 495 μ l PBS.

- Cultivo 4 horas: 62,5 µl/ tubo activado.

Ionomicina, Io (ref. I0634, SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, Missouri, USA): Es un antibiótico poliéter (C₄₁H₇₀O₉Ca) obtenido a partir de *Streptomyces conglobatus*. Io es un eficiente transportador de iones de Ca⁺² a través de las membranas biológicas. Este resultado de flujo de calcio tiene efectos directos en el interior celular, tales como, regular positivamente la expresión de CD7 en linfocitos T (Ware *et al.*, 1991), o hidrolizar los fosfatidilinositoles y posterior activación de la PKC en linfocitos T (Chatila *et al.*, 1989). Para preparar la solución de trabajo se reconstituyó en EtOH a una concentración de 0.5 mg/ml (1 mg Io + 2 ml EtOH) (solución MADRE). Se alicuotó en 40 µl/tubo y conservó en oscuridad a -20°C (caducidad 3 años).

Solución de ensayo:

- *Concentración final* de 1 µg/ml.
- *Concentración inicial* de 40 µg/ml: 30 µl (0.5 mg/ml) + 345 µl PBS estéril.
- *Cultivo 4h*: 62.5µl / tubo activado.

Brefeldina A, BFA (ref. B7651, SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, Missouri, USA): BFA es un metabolito de origen fúngico (*Penicillium brefeldianum*), el cuál exhibe un amplio rango de actividad antibiótica (Misumi *et al.*, 1986). BFA puede usarse en el estudio de procesos celulares los cuáles dependan de la secreción y transporte intracelular de proteínas. BFA inhibe de forma reversible la translocación intracelular de proteínas en eucariotas, como por ejemplo, procesos de transporte de proteínas hacia la membrana plasmática para su secreción o expresión (Misumi *et al.*, 1986). El uso *in vitro* de BFA (5 µg/ml) induce cambios en la morfología y dinámica de los endosomas, la red Trans-Golgi y los de los lisosomas (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991), induciendo cambios en la organización y distribución de los componentes en todos estos sistemas de orgánulos. Para preparar la solución de trabajo se reconstituyó en DMSO (20%) a una concentración de 5 mg/ml (5 mg BFA + 1 ml DMSO 20%) (solución MADRE). Se alicuotó en 40 µl/tubo y almacenó en oscuridad a -20°C (caducidad un año).

Solución de ensayo:

- *Concentración final* de 10 µg/ml.
- *Concentración inicial* de 400 µg/ml: 30 µl (5 mg/ml) + 345 µl PBS estéril.
- *Cultivo 4h*

62.5 µl / tubo NoAct	}	87,5 µl / paciente
62.5 µl / tubo Act		

BD FACS™ Lysing Solution 10x (ref. 349202, *BD® Biosciences Becton, Dickinson (BD), San Jose, CA*). La solución de lisado *BD FACS™* está destinada para la lisis de los eritrocitos, bajo suaves condiciones hipotónicas, después de la tinción inmunofluorescente directa de las células de SP con AcMo antes del análisis por CF. Para preparar la solución de trabajo se diluyó 1/10 la solución de lisado *BD FACS™* 10x con agua destilada (100 ml + 900 ml, respectivamente).

BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 10x (ref. 340973, *BD® Biosciences BD, San Jose, CA*): La solución permeabilizadora 2 *BD FACS™* (10X) es un solución concentrada premezclada formulada especialmente para el uso en CF. Esta solución actúa permeabilizando la membrana de los linfocitos antes de la tinción inmunofluorescente intracelular con AcMo; por tanto su aplicación es para la tinción intracelular de Ags, citocinas y otras proteínas (Nomura *et al.*, 2000; Suni *et al.*, 1998). Para preparar la solución de trabajo se diluyó 1/10 la solución permeabilizadora 2 *BD FACS™* (10X) con agua destilada (12 ml +120 ml, respectivamente). La solución 1x es estable 1 mes.

Solución de lavado: Esta solución de lavado jabonosa es la que hay que utilizar en los lavados posteriores a la fase de permeabilización de las células para evitar el cierre de los poros y permitir la entrada de los AcMo anti-citocina.

100ml PBSx10	}	Almacenado en cámara oscura a 4°C
900ml Agua destilada		
20ml FCS (2%)		
1/1000 NaN ₃ (ácida sódica)		

Solución de fijación

1ml Formaldehido (37%)	}	Almacenado en cámara oscura a 4°C
36ml PBSx1		

Isotipos y Anticuerpos:

APC Mouse IgG2a κ Isotype Control (ref. 550882, *BD® Biosciences BD*).

FastImmune CD8FITC/CD69PE/CD3PerCP (ref. 340367, *BD® Biosciences BD*).

BD FastImmune Anti-Human IL-2-APC (ref. 341116, *BD® Biosciences BD*).

BD FastImmune Anti-Human IFN-γ-APC (ref. 341117, *BD® Biosciences BD*).

APC Rat Anti-Human IL-10 (ref. 554707, *BD® Biosciences Becton, BD*).

Anti-Human IL-17A APC (ref. 17-7179, *eBioscience®*, Inc. San Diego, CA, USA).

➤ Material fungible:

Tubos 16x100 de fondo cónico enrasado con tapón (ref. T1641, Soria Genlab, S.A. Productos sanitarios. Valdemoro, Madrid). Para preparación de muestras diluidas.

Tubo de heparina sódica estéril BD VACUTAINER™ 10 ml (ref. 368480, Vacutainer Systems, Belliner Industrial Estate, Plymouth; UK). Para recoger muestras de SP.

Tubos FACS™ de poliestireno estériles de 5 ml, 12x75 mm (ref. 352052, BD Falcon™, BD Biosciences-Discovery labware, One Becton Circle, Durham, NC), para marcaje y adquisición de muestras en CF.

Tubos BD Falcon™ estéril cónico de polipropileno de alta transparencia de 15 ml (17x120 mm) (ref. 352096, BD Biosciences-Discovery Labware. One Becton Circle, Durham, NC). Para la realización del ensayo funcional.

Tubos para microcentrífuga de 1.5 ml (ref. 175508, Daslab Nirco. Barcelona).

Microtubos de 0.5 ml (ref. 4092. 1N Deltalab, S.L. PE Verneda, Barcelona).

Pipetas Pasteur desechables estériles graduada 3ml (ref. 200006-C y 200007. DeltaLab S.L.V. Barcelona). Capacidad total de 7 ml.

Pipetas Pasteur de polietileno desechables estériles graduada 3 ml (ref. 11725 Labbox pipp 003-500).

Pipetus® (ref. 95703; Hirschmann Laborgerate-BioBlock Scientific, concept by HIRSCHMANN).

Pipeta serológica estéril BD Falcon™ 10ml, (ref. 357551, BD Biosciences-Discovery Labware, One Becton Circle, Durham, NC).

Micropipetas BIOHIT.

Puntas de pipeta de 10 µl, 100 µl y 1000 µl con filtro pre-esterilizadas (ref. 311-4050, 342-4050, 361-4050. BioPointe Scientific, Mexico)

Puntas de pipeta de 40 µl y 200 µl esterilizadas (ref. 732-0528, 53510-106. VWR® International, LLC, Radnor).

Puntas de pipeta Corta S/Corona de 2-200 µl (ref. 4357230. AKRALAB).

Puntas de pipeta FINNTIP® 250 Universal de polipropileno (0.5-250µl) (ref. 9400230. Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland).

Citómetro de flujo FACScanto™ II [Becton Dickinson (BD), Mountain View, CA], equipado con tres fuentes de excitación: un láser azul de 488 nm, un láser rojo de 633nm y un láser violeta de 405nm. Los parámetros Side Scatter (SSC) con Forward Scatter (FSC), que determinan el tamaño y la complejidad celular, respectivamente,

vienen expresados en escala lineal, y las distintas fluorescencias FL1, FL2 y FL3 en escala logarítmica. Para la adquisición y análisis de las células marcadas con AcMo se utilizó el programa BD FACSDiva™ Software 6.0.

Agitador automático TopMIX FB 15024. (ref. F20220176FI, Fisher Scientific).

Estufa de incubación de CO₂ Nuair™ DH AUTOFLOW CO₂ air-jacketed Incubator, todas las incubaciones realizadas en los cultivos celulares se llevaron a cabo en estufa (Heraeus) de 37°C, con atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Centrífuga; Heraeus Multifuge 3L-R centrifuge. Thermo Electron Corporation. Osterode, Germany.

Cámara de flujo laminar CleanAir DIN 12980 (Telstar S.A., Terrasa, España), todos los pasos seguidos para la realización de los cultivos celulares se hicieron en ambiente estéril, trabajando en una cámara de flujo laminar de alta seguridad.

➤ Protocolo de trabajo:

A. Activación (En estéril):

Este paso se realizó por completo en el interior de la campana de flujo laminar. Como ya se ha mencionado, la activación (PMA + Io) se hace en presencia de BFA para retener las proteínas en el citoplasma de las células. Para este paso se utilizó un control sin estimular, el cual únicamente consistió en una alícuota de SP total + BFA. Todos los procedimientos de activación se realizarán en tubos de poliestireno con tapón de rosca de 15 ml Falcon (ref. 100480, LABOLAN®). El uso de un control sin estimular tenía como finalidad la determinación del nivel de síntesis de citocina residual procedente de la activación *in vivo*.

- En tubos Falcon de 15 ml:
 - Tubo A: SP completa (WB) sin estimular.
 - Tubo B: SP completa (WB) estimulada.
- Se añadió en cada tubo:
 - Tubo A: 2,4 ml WB + 125 µl PBS 1X + 62,5 µl BFA (10 µg/ml).
 - Tubo B: 2,4 ml WB + 62,5 µl PMA (25 ng/ml) + 62,5 µl Io (1 µg/ml) + 62,5 µl BFA (10 µg/ml).
- Se incubó 4 horas a 37°C 5% CO₂.

B. Lisis:

Una vez transcurridas las cuatro horas de cultivo para la activación de los linfocitos se procedió a realizar el protocolo completo para el marcaje intracitoplasmático de las citocinas. Lo primero que se hizo fue distribuir el contenido de ambos tubos (A y B) en tubos FACS™ de poliestireno BD Falcon™ (ref. 352052) siguiendo el siguiente esquema:

A las 4 horas distribuir en tubos de FACS:

- Tubo 1: 0.5 ml de tubo A (control FMO No Act)
- Tubo 2: 0.5 ml de tubo A (marcaje con AcM/IL2)
- Tubo 3: 0.5 ml de tubo A (marcaje con AcM/IFN)
- Tubo 4: 0.5 ml de tubo A (marcaje con AcM/IL10)
- Tubo 5: 0.5 ml de tubo A (marcaje con AcM/IL17)
- Tubo 6: 0.5 ml de tubo B (control FMO Act)
- Tubo 7: 0.5 ml de tubo B (marcaje con AcM/IL2)
- Tubo 8: 0.5 ml de tubo B (marcaje con AcM/IFN)
- Tubo 9: 0.5 ml de tubo B (marcaje con AcM/IL10)
- Tubo 10: 0.5 ml de tubo B (marcaje con AcM/IL17)

Una vez repartida la SP en cada tubo, se homogeneizó en un agitador automático (vortex). A continuación se procedió con el lisado propiamente dicho. Se añadió 3 ml de FACS Lysing solution x1 a cada tubo e incubó 15' en oscuridad y temperatura (T^a) ambiente (T^aA). Transcurrido el tiempo se centrifugaron las muestras 5' a 1800 rpm y se decantó. Se añadieron 3 ml/tubo de FACS Lysing solution x1 de nuevo para proceder con un segundo lisado incubando 7' en oscuridad y T^aA. Se centrifugó 5' a 1800 rpm y se decantó. Finalizado el procedimiento de lisado se lavaron las muestras. Se añadieron 4 ml/tubo de solución de lavado y se centrifugó 5' a 1800 rpm y decantando.

C. Permeabilización:

Para realizar la permeabilización de las células se añadió 1 ml/tubo de BD FACS™ Permeabilizing Solution 2 (1x) y se agitó para homogeneizar las células con la solución permeabilizadora. Se incubaron las muestras de 30'-60' en oscuridad y T^aA. Transcurrido el tiempo se centrifugó 5' a 1800 rpm y se decantó.

D. Marcaje intracitoplasmático de citocinas:

Se utilizó en el ensayo Acs de control de isotipo conjugado con un fluorocromo [APC Mouse IgG2a κ Isotype Control (ref. 550882), BD[®]]; se utilizaron a concentraciones coincidentes con los AcMo anti-citocinas para detectar la unión no específica a las células debido a la clase del AcMo de ratón utilizado. Para el control de la activación, se utilizó la expresión en superficie del marcador CD69, para evaluar si la activación había sido óptima.

Una vez terminadas las etapas de lisado y permeabilización de las células se procedió al marcaje intracitoplasmático. Se tuvo muy en cuenta que a partir de ese momento era muy importante realizar todos los lavados con la solución de lavado jabonosa preparada con anterioridad para evitar el cierre de los poros y así puedan pasar los Acs al interior de las células. Se añadió el volumen aconsejado por la casa comercial de cada Ac siguiendo el siguiente esquema:

A las 4 horas:

- Tubo 1 y 6 FMO: 7 μ l FITC-CD8/PE-CD69/-PerCP-CD3 + 2.5 μ l APC.
- Tubo 2 y 7: 7 μ l FITC-CD8/PE-CD69/-PerCP-CD3 + 5 μ l APC-IL-2.
- Tubo 3 y 8: 7 μ l FITC-CD8/PE-CD69/-PerCP-CD3 + 5 μ l APC-IFN γ .
- Tubo 4 y 9: 7 μ l FITC-CD8/PE-CD69/-PerCP-CD3 + 5 μ l APC-IL-10.
- Tubo 5 y 10: 7 μ l FITC-CD8/PE-CD69/-PerCP-CD3 + 5 μ l APC-IL-17.

Una vez marcados todos los tubos se incubó 30'-60' las muestras a T^aA en oscuridad. A continuación, se lavaron los tubos añadiendo 4 ml de solución de lavado y se centrifugó 5' a 1800 rpm, repitiendo este paso de lavado.

E. Fijación:

Cuando no fue posible adquisición inmediata de las células, se fijaron con 100 μ l de solución de fijación y se guardaron como máximo 24 horas a 4°C.

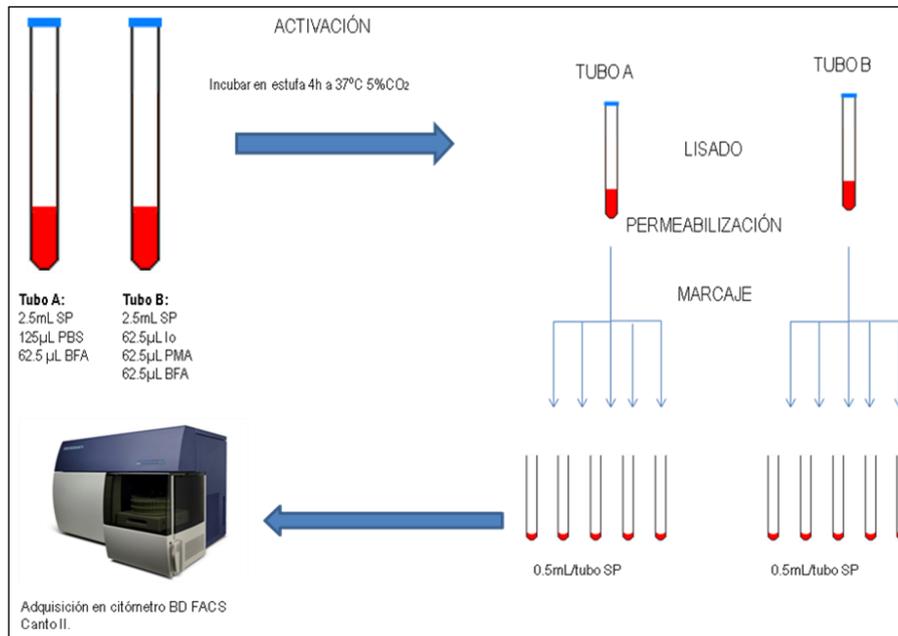


Figura 3.3. Esquema del marcate intracelular de citocinas a partir de muestras de SP.

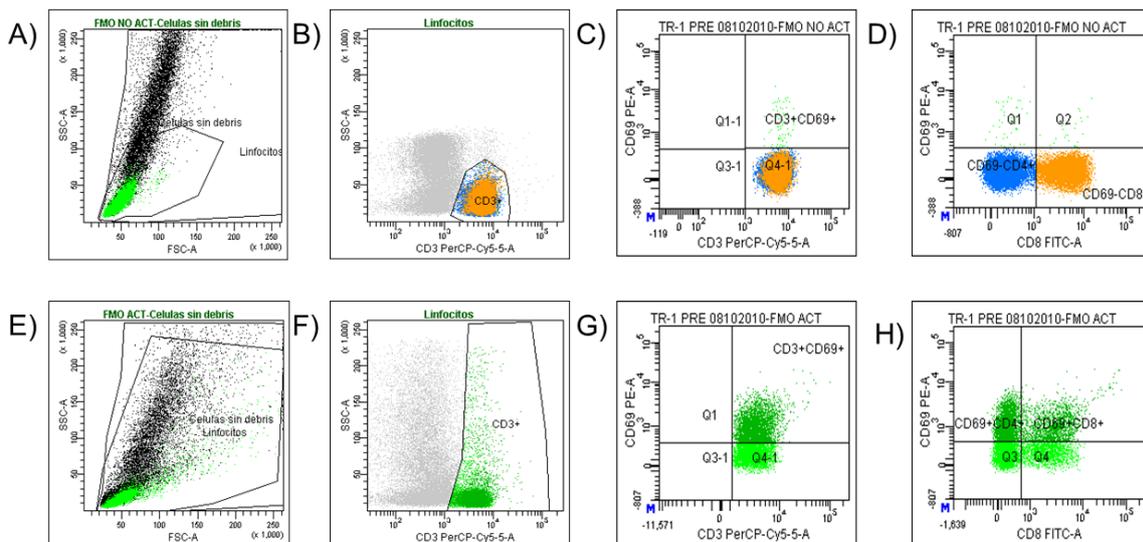


Figura 3.4. SSC/FSC plot para delimitar la población de linfocitos por tamaño y complejidad del citoplasma en células (A) sin estímulo y (E) con estímulo. (B) Población $CD3^+$ que no ha ganado complejidad en su citoplasma por no estar activada. (C) Población de linfocitos T $CD3^+CD69^+$ no activada, actuando como control negativo de activación. (D) Población $CD8^-CD69^-$ y $CD8^+CD69^+$ que actúa como control negativo de activación para ambas subpoblaciones. (F) Población de linfocitos T $CD3^+$ activados que han ganado complejidad en su citoplasma. (G) Población de linfocitos T $CD3^+CD69^+$ activados subpoblaciones de linfocitos T $CD8^-CD69^+$ y $CD8^+CD69^+$ activados. Todas las poblaciones se expresaron como % de células con respecto al total de células.

F. Adquisición, lectura y análisis:

Las muestras, una vez marcadas, se adquirieron en el CF hasta obtener 25.000 células $CD3^+$ por cada tubo, usando el programa BD FACSDiva™ Software 6.1.3. El % de linfocitos T citotóxicos se obtuvo a partir de la población $CD3^+/CD8^+$, mientras que el % de linfocitos T colaboradores $CD3^+/CD4^+$ se obtuvo a partir de la población $CD3^+/CD8^-$, porque la activación con PMA + Io regula negativamente la expresión de CD4 (Godoy-Ramirez *et al.*, 2004). Para ello se creó un diagrama de citometría enfrentándose SSC con FSC y así poder delimitar la población de linfocitos activados en función a su tamaño y complejidad del citoplasma excluyendo la población de monocitos (Figura 3.4A y E). Una vez delimitada la población de linfocitos, se determinó la población $CD3^+$ en un diagrama de puntos enfrentando FL3 (CD3PerCP) con SSC (Figura 3.4F); de esta manera se obtuvo el % de células T $CD3^+$ activadas (tubo A). Las figuras 3.4B y F reflejan la diferencia entre linfocitos activados y no activados (tubos A y B, respectivamente), en donde las células activadas aumentan la complejidad dentro de su citoplasma, a diferencia de la misma población correspondiente al tubo B sin estímulo. Para saber si la activación durante el cultivo ha sido efectiva, el % de expresión del marcador CD69 tiene que ser superior a 70% (control de activación). Para analizar los resultados de la activación por fluorescencia de CD69 se enfrentaron en un diagrama de citometría FL3 (CD3PerCP) con FL2 (CD69PE), analizando el % de células $CD3^+CD69^+$ en el cuadrante superior derecho, dándose el ensayo como válido cuando el % de eventos dentro de dicho cuadrante fue superior al 70%, estableciendo el punto de corte de positividad para CD69 en 2164 IMF. Dicho punto de corte se estableció comparando el % de células $CD3^+CD69^+$ entre los tubos A (activado) y B (no activado) (Figura 3.4C y G). Para saber que % de células T $CD3^+/CD8^-/CD69^+$ y $CD3^+/CD8^+/CD69^+$ activadas se comparó los diagramas de puntos correspondientes al tubo con estímulo (A) y sin estímulo (B) enfrentándose FL1 (CD8FITC) con FL2 (CD69PE) como se puede observar en las figuras 3.4D y H. Las células $CD4^+$ y $CD8^+$ se consideraron activadas cuando la IMF fue superior a 79.37 y 78.65, respectivamente. Los resultados se expresaron en porcentaje de células positivas respecto al total de células.

Para el cálculo del % de linfocitos T $CD3^+/CD4^+$ y $CD3^+/CD8^+$ productores de IL-2, $IFN\gamma$, IL-10 e IL-17 se utilizó el control de isotipo APC Mouse IgG2ak (ref. 550882) como punto de corte para discriminar entre positividad y negatividad del fluorocromo APC, ya que los distintos AcMo anti-citocinas estaban conjugados con APC.

Generalmente, en nuestro caso, la positividad para APC se estableció en 10^3 como se observan en las figuras 3.5A) y B). El % de células $CD3^+/CD8^+/CD69^+$ y $CD3^+/CD8^-/CD69^+$, esta población se estimó como $CD3^+/CD4^+/CD69^+$, productoras de IL-2/IFN γ /IL-10/IL-17 se calculó mediante un histograma de frecuencias en donde se enfrentó la frecuencia de células con FL4 (IL-2/IFN γ /IL-10/IL-17-APC) considerando positiva la fluorescencia a partir de 193,00 IMF para los linfocitos T $CD4^+$ y 301,60 para los linfocitos T $CD8^+$, como se puede ver en las figuras 3.5 C) y D).

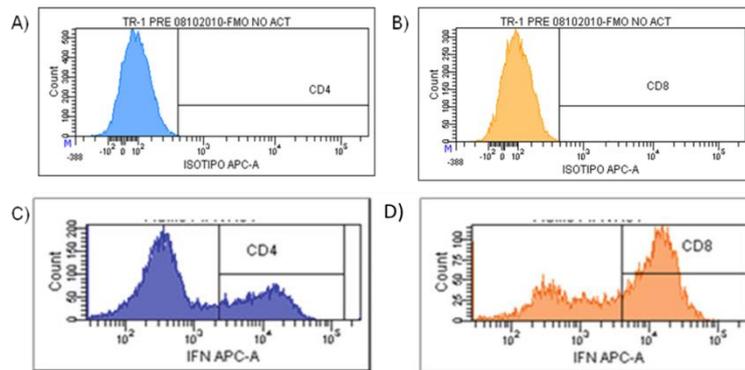


Figura 3.5. (A) y (B) se observa el punto de corte para la positividad de la fluorescencia del fluorocromo APC, utilizando como control negativo el APC Mouse IgG2a κ Isotype Control (ref. 550882, BD[®] Biosciences). En (C) y (D) se observa el % de células T $CD3^+/CD4^+$ y $CD3^+/CD8^+$ productoras, en este ejemplo, de IL-17.

3.2.2.2. Determinación de la expresión de CD25, CD38, CD69, CD95 y CD154 por citometría de flujo en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ tras estimulación *in vitro* con Con-A

Mediante el empleo de AcMo anti-CD3, -CD4 o -CD8 se diferencian los dos tipos principales de linfocitos T (colaboradoras y citotóxicas). Con este ensayo *in vitro*, se pretendía validar la expresión de CD25, CD38, CD69, CD95 y CD154 en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ cultivados *in vitro* como biomarcador predictivo así como para la estratificación del riesgo de desarrollar rechazo agudo, infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C.

➤ Reactivos:

Agua destilada estéril Braun[®] 1L. Citado previamente.

Dulbecco's Phosphate buffered saline, DPBS 10x. Citado previamente.

Phosphate buffered saline, PBS 1x. Diluido 1/10. Citado previamente.

Phosphate buffered saline, PBS 20L BD FACSTFlow™. Citado previamente.

Solución de fijación: PBS+1% Formaldehid (v/v); Citado previamente.

Medio de cultivo RPMI1640 BioWhittaker® estéril (500ml) sin glutamina (ref. BE12-167F. Lonza B-4800 Verviers, Belgium). Para cultivo celular.

Glutamina 200 mMoles estéril (ref. BE17-605E, Lonza).

Penicilina-estreptomicina 5000:5000 (100 ml) (ref. 802538, Analyzer, Barcelona).

Medio de cultivo completo (MCC), medio que sustenta las células en cultivo, compuesto por: 500 ml de RPMI1640 BioWhittaker® (ref. BE12-167F) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF), previamente descomplementado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, 5 ml de L-Glutamina 200 mM (ref. BE17-605E) y 5 ml de estreptomicina 50 µg/mL (ref. 802538). La mezcla se esterilizó mediante filtración por vacío dentro de la cabina de flujo laminar.

Concanavalin A, Con-A (ref. 11028-71-0 SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, Missouri, USA):

Con-A es una lectina que se aísla de plantas pertenecientes al género *Canavalia sp.* ConA no es una glicoproteína (Olson *et al.*, 1967), sino una metaloproteína y requiere un ion metálico de transición, como Mn, además del ion Ca⁺⁺ para sus funciones de reconocimiento celular (Sumner *et al.*, 1936). A pH>7 existe en forma tetramérica, y cada una de las subunidades de Con-A contiene dos sitios de unión conjugado con dos iones metálicos, un ion Ca⁺⁺ y un ion de Mn, esenciales para su función de unión a carbohidratos. A través de estos iones, Con-A se une específicamente con los grupos hidroxilos de las posiciones C3, C4 y C6 de los residuos D-glucopiranosil y D-manopiranosil de los polisacáridos y de glicoproteínas (Goldstein *et al.*, 1965). Una de las funciones atribuidas a la Con-A es la de presentar actividad mitogénica (Kitao *et al.*, 1977), por lo que es adecuada para evaluar la proliferación linfocitaria (Barten *et al.*, 2001). Para preparar la solución de trabajo se resuspendió Con-A con 5 ml de PBS estéril, agitando enérgicamente hasta que la Con-A disolvió por completo, con esto obtuvimos una solución madre con concentración de 1 mg/ml. A continuación se preparó la solución de Con-A de trabajo (60 µg/ml). Para ello se realizó la siguiente dilución: 120 µl Con-A (1 mg/ml) + 1880 µl PBS estéril, alicuotándola en viales de 2 ml, y almacenándola en la cámara oscura a 4°C. Al preparar el cultivo y añadir la Con-A en el pocillo, ésta alcanzó una concentración final por pocillo de 15 µg/ml.

Solución de ensayo:

Concentración de 1 mg/ml (solución MADRE)

Concentración de la solución de trabajo de 60 µg/ml:

120 µl Con-A (1 mg/ml) + 1880 µl PBS estéril

Concentración final por pocillo de 15µg/ml:

Cultivo 72h: 150 µl Con-A (60 µg/ml)/pocillo	} 2000 µl/paciente 1850µl sangre diluida/pocillo

BD FACS™ Lysing Solution 10x (ref. 349202, BD®).

Isotipos y anticuerpos:

IgG1-FITC/IgG1-PE Control de isotipo (ref. A07794, Beckman Coulter®, Marsella, Francia).

Mouse IgG₁K-APC (ref. 345818, BD® Biosciences BD, San Jose, CA).

Mouse IgG₁K-PerCP (ref. 345817, BD® Biosciences BD).

FITC Mouse Anti-Human CD3, mouse IgG_k (ref. 555332, BD® Biosciences BD).

PerCPCy™ 5.5 Mouse Anti-Human CD8, mouse IgG_{1k} (ref. 560662, BD® Biosciences BD).

APC Mouse Anti-Human CD4, mouse IgG_{1k} (ref. 555349, BD® Biosciences BD).

PE Mouse Anti-Human CD25, mouse IgG_{1k} (ref. 560989, BD® Biosciences BD).

PE Mouse Anti-Human CD38, mouse IgG_{1k} (ref. 560981, BD® Biosciences BD).

PE Mouse Anti-Human CD154 (CD40L), mouse IgG_{1k} (ref. IM2216U, Beckman Coulter®, Marseille, Francia).

PE Mouse Anti-Human CD69, mouse IgG_{1k} (ref. 555531, BD® Biosciences BD).

PE Mouse Anti-Human CD95, mouse IgG_{1k} (ref. 555674, BD® Biosciences BD).

➤ Material fungible:

Tubos 16x100 de fondo cónico enrasado con tapón (ref. T1641, Soria Genlab). Citado previamente.

Tubos de heparina sódica estéril BD VACUTAINER™ 10ml (ref. 368480 BD).

Tubos FACS™ de fondo redondo de poliestireno estériles de 5ml, 12x75 mm (ref. 352052, BD Falcon™, BD. Citado previamente.

Tubos BD Falcon™ estéril cónico de polipropileno de alta transparencia de 15ml (17x120mm) (ref. 352096, BD). Citado previamente.

Tubo para microcentrífuga de 1.5ml (ref. 175508. Daslab Nirco, Barcelona).

Microtubo de 0.5ml (ref. 4092. 1N Deltalab). Citado previamente.

Pipetas Pasteur desechables estériles graduada. Citado previamente.

Pipetas Pasteur de polietileno desechables estériles graduada. Citado previamente.

Pipetus® (ref. 95703; Hirschmann). Citado previamente.

Pipeta serológica estéril BD Falcon™ 10ml, Citado previamente.

Micropipetas BIOHIT. Citado previamente.

Puntas de pipeta de 10 µl, 100 µl y 1000 µl con filtro. Citado previamente.

Puntas de pipeta de 40 µl y 200 µl. Citado previamente.

Puntas de pipeta Corta S/Corona de 2-200 µl. Citado previamente.

Puntas de pipeta FINNTIP® 250 Universal de polipropileno (0.5-250µl). Citado previamente.

Citómetro de flujo FACScanto™ II [Becton Dickinson (BD)]. Citado previamente.

Agitador automático TopMIX FB 15024. Citado previamente.

Estufa de incubación de CO₂ Nuair™. Citado previamente.

Centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R centrifuge. Citado previamente.

Cámara de flujo laminar CleanAir DIN 12980 (Telstar). Citado previamente.

Placas de cultivo estériles de 96 pocillos de fondo plano. Citado previamente.

Placas de cultivo estériles de 24 pocillos de fondo plano. Citado previamente.

➤ Protocolo de trabajo:

A. Cultivo previo:

Se diluyo 1/10 la SP (tanto de paciente como sujeto control) con medio de cultivo RPMI sin suero de ternera fetal (STF) para obtener un volumen final de 5 ml (0,5 ml WB + 4,5 ml RPMI). Una vez realizada la dilución, se agitó el contenido para conseguir una mezcla homogénea y se montó el cultivo estéril.

Se diluyo 1/10 la WB del Paciente y del Control:

1. Muestra paciente = 10 ml WB (heparina sódica)
2. Muestra control sano = 10 ml WB (heparina sódica)

0.5 ml WB + 4.5 ml RPMI-1640+SIN FCS $\left\{ \begin{array}{l} \text{AgSup (Placa 24pocillos)} \end{array} \right\}$

Se repartieron los 5 ml en dos pocillos de una placa de 24 pocillos y se activaron con 150 µl/pocillo de Con-A (final 7,5 µg/ml): Se añadieron 1850 µl WB diluida 1/10/ pocillo + 150 µl Con-A (100 µg/ml)/pocillo. El volumen final por pocillo fue de 2 ml (Figura 3.6). Una vez terminado el montaje de la placa de cultivo se incubó ésta durante 72 horas a 37°C y 5% CO₂.

Se preparó la Con-A (Final=15 µg/ml; Inicial=60 µg/ml) según la disposición de la siguiente tabla, con las cantidades de Con-A (1 mg/ml) que se diluyeron con medio de cultivo RPMI para poder obtener la concentración final (15 µg/ml) en función del número de pacientes testados.

Con-A (1 mg/ml)	1 Paciente	2 pacientes	3 pacientes
CON FCS	150 µl ConA	168 µl	228 µl
	1850 µl MC	2632 µl MC	3572 µl MC
SIN FCS	42 µl ConA	60 µl	78 µl
	658 µl MC	940 µl MC	1222 µl MC
Volumen (1 mg/ml)	162 µl	228 µl	306 µl

B. *Protocolo de marcaje:*

Una vez pasadas las 72 horas el cultivo, se realizó el marcaje de superficie de los distintos Ags linfocitarios. Se dispensaron 600 µl de SP diluida y se adicionó en un tubo de FACs para marcaje y adquisición en el CF, obteniendo 6 tubos. A continuación, se centrifugó 5' a 1800 rpm todos los tubos para disminuir el volumen. Una vez terminado este paso, se procedió al marcaje con AcMo siguiendo el protocolo del fabricante y como se muestra en la siguiente tabla. Se marcaron con 5 µl de AcMo, de la siguiente forma:

	FITC	PE	PerCP	APC
Tubo 1	5 µl Isotipo conjunto		2.5 µl Isotipo	2.5 µl Isotipo
Tubo 2	5 µl CD3	5 µl CD25	5 µl CD8	5 µl CD4
Tubo 3	5 µl CD3	5 µl CD38	5 µl CD8	5 µl CD4
Tubo 4	5 µl CD3	5 µl CD154	5 µl CD8	5 µl CD4
Tubo 5	5 µl CD3	5 µl CD69	5 µl CD8	5 µl CD4
Tubo 6	5 µl CD3	5 µl CD95	5 µl CD8	5 µl CD4

Una vez marcados todos los tubos se agitaron para homogeneizar el contenido y se incubaron durante 20 minutos en oscuridad a T^aA. El siguiente paso fue la lisis de los eritrocitos añadiendo 2 ml de BD FACSTM Lysing Solution 1x e incubando 10 minutos en oscuridad y T^aA. Una vez transcurrido el tiempo de lisado, realizaron 2 lavados con PBS, añadiendo 2 ml de PBS 1x y centrifugando 5' a 1800 rpm. Se resuspendió el pellet en 100

μl de Solución de Fijación (o PBS si se leyó al momento) y se guardó hasta su lectura a 4°C y protegido de la luz.

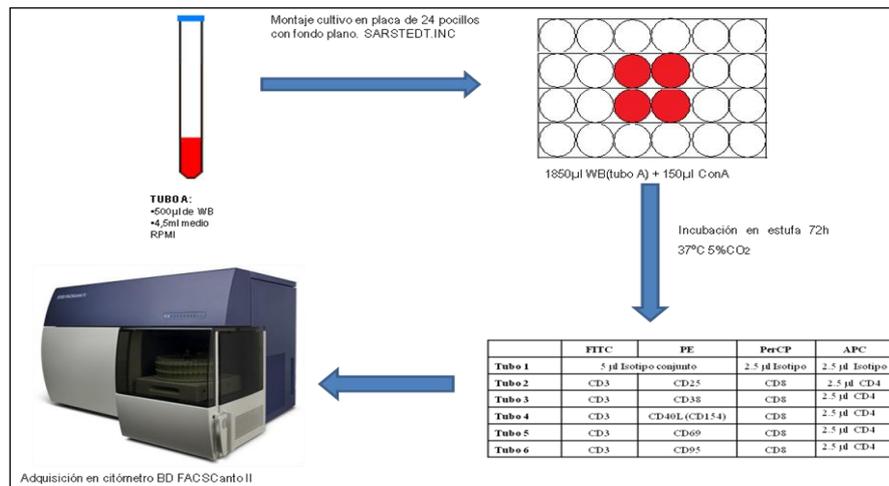


Figura 3.6. Esquema del marcaje de antígenos de superficie linfocitaria tras estimulación *in vitro* con ConA a partir de SP completa.

C. Adquisición y análisis en el citómetro de flujo FACScanto™ II:

Las células marcadas fueron adquiridas en el citómetro de flujo hasta obtener un total de 10.000 células CD3⁺ por cada tubo, usando el programa BD FACSDiva™ Software 6.1.3. Tras la adquisición, se procedió al análisis de las muestras adquiridas. Para poder delimitar la población de linfocitos activada tras el estímulo *in vitro* con ConA, se diseñó un diagrama de puntos enfrentando SSC con FSC. En este diagrama, como se muestra en la figura 3.7A, se puede diferenciar la población de linfocitos totales activados del resto de poblaciones leucocitarias. La población de linfocitos T CD3⁺ activada se delimitó en un diagrama de puntos en donde se enfrentó el SSC con FL1 (CD3-FITC). Como se observa en la figura 3.7B, la población de linfocitos T CD3⁺ activada ha ganado complejidad en su citoplasma.

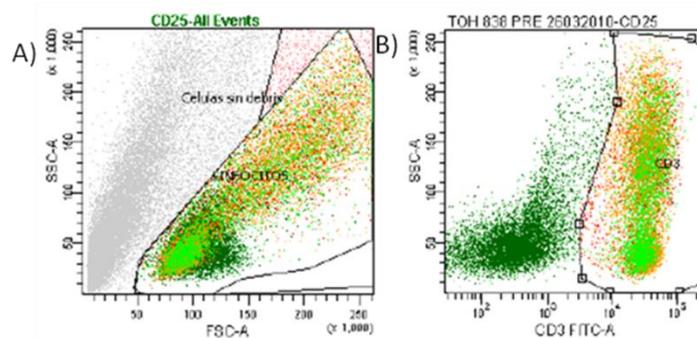


Figura 3.7. (A) Diagrama SSC/FSC para diferenciar linfocitos totales activados por su tamaño y complejidad

del citoplasma del resto de poblaciones leucocitarias. **(B)** Diagrama SSC/CD3-FITC para determinar la población de linfocitos T CD3⁺ activados tras el estímulo *in vitro* con Con-A.

En el análisis de los distintos Ags de superficie linfocitarios, se utilizó los Acs IgG1-FITC/IgG1-PE (ref. A07794, Beckman Coulter[®]), Mouse IgG₁κ-APC (ref. 345818, BD[®] Biosciences) y Mouse IgG₁κ-PerCP (ref. 345817, BD[®] Biosciences) como controles de isotipo interno para discriminar entre la positividad y negatividad de la fluorescencia de los distintos fluorocromos utilizados en el ensayo (Figura 3.8), estableciendo el punto de corte de positividad, en nuestro caso, de 10³ para FITC, 10² para APC y PerCP y 10² para PE; considerando positivas para un determinado biomarcador, aquellas células con una IMF superior a 42,609 para FITC, 3,677 para PE, 1,317 para PerCP y 2,251 para APC.

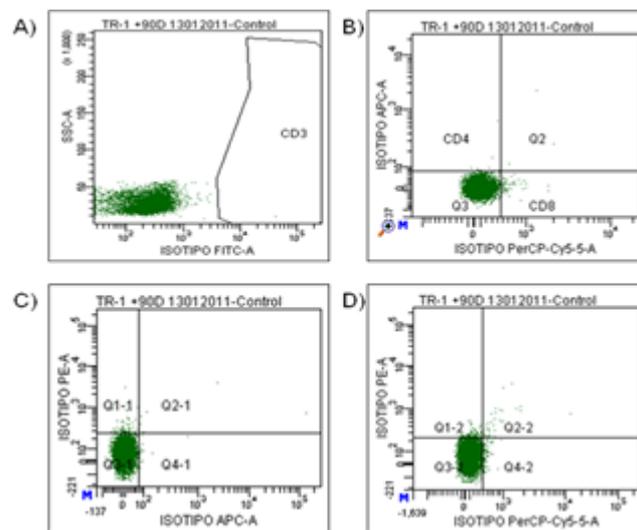


Figura 3.8. Control de isotipo interno para los distintos fluorocromos utilizados. **(A)** isotipo FITC, **(B)** isotipo PerCP y APC, **(C)** isotipo APC y PE y **(D)** isotipo PerCP y PE.

Para poder determinar el % de expresión de los distintos biomarcadores (CD25, CD38, CD154, CD69 y CD95) en la superficie de los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺, se diseñaron diferentes combinaciones de AcMo que permitieron delimitar las subpoblaciones linfocitarias de interés y de este modo se pudo cuantificarlas. Los diagramas de puntos utilizados para el análisis de los distintos marcadores linfocitarios fueron diseñados de tal modo que permitieran delimitar de forma precisa las poblaciones CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD38⁺, CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD95⁺, CD4⁺CD154⁺, CD8⁺CD25⁺,

CD8⁺CD38⁺, CD8⁺CD69⁺, CD8⁺CD95⁺ y CD8⁺CD154⁺. Para obtener dichas poblaciones se enfrentaron FL3 (CD8-PerCP) con FL2 CD25/CD38/CD154/CD69/CD95-PE) y FL4 (CD4-APC) con FL2 (CD25/CD38/CD154/CD69/CD95). En la figura 3.9 se representa como ejemplo el análisis de CF para el cálculo del % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ y el % de linfocitos T CD4⁺CD25⁺. Los resultados se expresaron en porcentaje de células positivas respecto al total de células de la muestra.

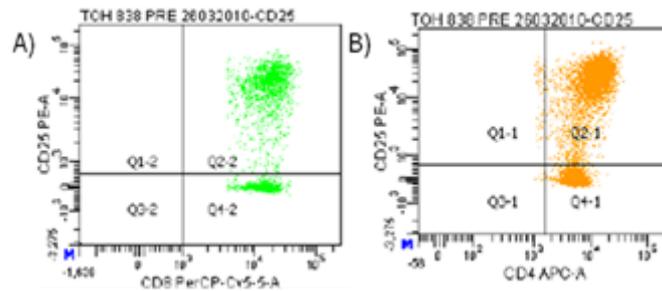


Figura 3.9. Marcaje con AcMo PerCP-anti-CD8, PE-anti-CD25, y APC-anti-CD4 de linfocitos T activados *in vitro* con Con-A a partir de una muestra de SP para el cálculo del (A) % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ y (B) % de linfocitos T CD4⁺CD25⁺.

3.2.2.3. Cuantificación del porcentaje y cifras absolutas de linfocitos aTreg y nTreg en sangre periférica de trasplantados hepáticos y renales

Para determinar el % y cifras absolutas de linfocitos Treg en muestras de SP anticoagulada con heparina de sodio, se utilizó el kit Anti-Human Foxp3-APC de eBioscience[®]. La expresión de FoxP3 se analizó por CF en un FACScanto™ II (BD[®]) tras teñir intracitoplásmicamente con un AcMo anti-FoxP3 humano (clona PCH101, de rata Ig2a), a la vez que se marcaron los Ags de superficie linfocitaria CD4, CD25, C45RO, CD62L, CD27 y CD127 siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

➤ Reactivos:

BD FACS™ Lysing Solution 10x (ref. 349202, BD[®]). Citado previamente.

Dulbecco's Phosphate buffered saline, DPBS 10x (GibCo). Citado previamente.

Phosphate buffered saline, PBS 1x: Citado previamente.

Phosphate buffered saline, PBS 20L BD FACSTFlow™ (BD). Citado previamente.

Fixation/Permeabilization Diluent, (ref. 00-5223, eBiosciencie[®], San Diego, CA, USA):

El diluyente de fijación/permeabilización de eBiosciencie[®] está destinado para el uso con el AcMo PCH101 anti-FoxP3 humano. El diluyente se encuentra listo para usar directamente con la solución de fijación/permeabilización concentrada. Se almacena en oscuridad y a 4°C.

Solución de fijación/permeabilización concentrada, (ref. 00- 5123, eBiosciencie[®], San

Diego, CA, USA): La solución de fijación/permeabilización concentrada de eBiosciencie[®] está destinada para el uso con el AcMo PCH101 anti-FoxP3 humano. La solución stock se encuentra concentrada 4x. La solución de trabajo a 1x se obtuvo por dilución ¼ (mezclando 0.5 ml solución fijación/permeabilización 4x + 1.5 ml de diluyente. Ambas soluciones de fijación/permeabilizada (4x y 1x) se conservaron en oscuridad y 4°C.

Anticuerpos monoclonales:

PE Mouse Anti-Human CD45RO, mouse IgG2 α κ (ref. 555493, BD[®]).

FITC Mouse Anti-Human CD62L, mouse IgG1κ (ref. 555543, BD[®]).

PerCP Mouse Anti-Human CD4, mouse IgG1κ, (ref. 550631, BD[®]).

APC Mouse Anti-Human CD25, mouse IgG1κ, (ref. 560987, BD[®]).

PE Mouse Anti-Human CD25, mouse IgG1κ, (ref. 557138, BD[®]).

FITC Anti-Human CD127, mouse IgG1κ, (ref. 11-1278-73, eBiosciencie[®], San Diego, CA, USA).

APC Anti-Human CD127, mouse IgG1κ, (ref. 17-1278-42, eBiosciencie[®]).

FITC Mouse Anti-Human CD27, mouse IgG1κ, (ref. 555440, BD[®]).

APC Anti-Human Foxp3 Staining Set, rat IgG2 α κ (ref. 77- 5776-40, eBiosciencie[®],

San Diego, CA, USA): Panel de AcMo para diferenciar epítomos del factor FoxP3.

El Ac PCH101 reacciona con el extremo aminoterminal de la proteína humana FoxP3.

➤ Material fungible:

Tubos de heparina sódica estéril BD VACUTAINERTM 10ml Citado previamente.

Tubos FACSTM de fondo redondo de 5ml, 12x75 mm. Citado previamente.

Micropipetas BIOHIT de varios volúmenes.

Puntas de pipeta de 10 μ l, 100 μ l y 1000 μ l con filtro. Citado previamente.

Puntas de pipeta de 40 μ l y 200 μ l esterilizadas. Citado previamente.

Puntas de pipeta Corta S/Corona de 2-200 μ l (ref. 4357230. AKRALAB).

Puntas de pipeta FINNTIP® 250 (0.5-250µl). Citado previamente.

Citómetro de flujo FACScanto™ II, Becton Dickinson (BD), Citado previamente.

Agitador automático TopMIX FB 15024. Citado Citado previamente.

➤ Protocolo de trabajo:

A. Marcaje de superficie (tubos 1 y 2):

Una vez obtenida la muestra de SP heparinizada, se agregó 3 µl de cada AcMo, siguiendo el esquema siguiente, para el marcaje de los Ags de superficie:

Tubos	FL-1 (FITC)	FL-2 (PE)	FL-3 (PerCP)	FL-4 (APC)
1	CD62L	CD45-RO	CD4	CD25
2	CD27	CD25	CD4	CD127
3	CD127	CD25	CD4	FOXP3

Una vez añadidos los AcMo se añadieron 100 µl de SP a cada tubo, se agitó y se incubó la muestra marcada durante 20 minutos en oscuridad y a T^a ambiente. Una vez transcurrido el período de incubación, se lisó la muestra añadiendo a cada tubo 2 ml de lisante BD FACS™ Lysing Solution 1x (ref. 349202) durante 10 minutos en oscuridad y a T^a ambiente. Transcurrido dicho tiempo hay que centrifugar 5 min a 1500 rpm, descartando el sobrenadante y lavando el *pellet* dos veces con PBS. Descartado el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 200 µl de PBS. Los tubos 1 y 2 se adquirieron.

B. Marcaje intracitoplasmático de FoxP3 (tubo 3):

Este tubo en realidad presenta un doble marcaje, primero se marcaron los Ags de superficie de la misma forma que los tubos 1 y 2. Para ello, se agregaron 3 µL de cada AcMo para el marcaje superficial del tubo 3 (ver esquema de arriba). A continuación, se añadieron 100 µL de SP anticoagulada, se agitó la muestra marcada en vortex e incubó 20 minutos en oscuridad y a T^a ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 2 mL de solución de lisis; esta solución de lisis presenta en su fórmula cloruro de amonio (ClNH₄), necesario para fijar las células. A continuación, se incubaron las muestras 10 minutos en oscuridad y a 4°C. Una vez lisado el tubo 3 se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y a 4°C, decantando el sobrenadante por aspiración (con especial cuidado de no perder células durante los lavados). A partir de este punto, comenzó el marcaje intracitoplasmático de FoxP3 propiamente dicho; siguiendo el protocolo del fabricante (eBioscience®): Se añadió 1 mL de solución de Fijación y permeabilización 1x e incubó a 4°C durante al menos 30 minutos, aunque lo más aconsejable para obtener una

permeabilización óptima es dejar la muestra incubando durante 60 minutos. Transcurrido los 60 minutos, se lavó con 1 mL de solución de Permeabilización (1x) y centrifugó 5 minutos a 1500 rpm. Se repitió el lavado en las mismas condiciones. El paso que viene a continuación es muy importante; se añadieron 2 μ L de suero de rata policlonal e incubó durante 15 minutos a 4°C. Con este paso evitamos que el Ac anti-FoxP3 se pegue en sitios de unión inespecíficos. Transcurrido el tiempo, se añadieron 7 μ L de anti-Foxp3-APC e incubó durante 30-60 minutos a 4°C y en oscuridad. A continuación, se lavó con 1 mL de solución de Permeabilización (1x) y centrifugó 5 minutos a 1500 rpm. Descartado el sobrenadante se resuspendió el pellet en 200 μ l de PBS y se adquirió.

C. Adquisición y análisis:

Las muestras una vez marcadas, se adquirieron y analizaron en el CF FACScanto™ II, con el programa BD FACSDiva™ Software 6.0. Se adquirieron 50.000 eventos en los tubos 1 y 2, en una región que incluyó linfocitos; y para el tubo 3 se adquirieron 100.000 eventos dentro de una región que incluyó linfocitos. Todos los tubos fueron adquiridos dentro de las 4 horas siguientes a de ser marcados.

Tubo 1: Valoración de la expresión de CD62L y CD45RO en células Treg

Con este tubo se pretendió cuantificar a la subpoblación de linfocitos aTreg con respecto a los linfocitos T totales y linfocitos T CD4⁺ totales de trasplantados hepáticos y renales de nuestra serie de estudio. Para cuantificación de la subpoblación de linfocitos aTregs se utilizó una combinación de diagramas de puntos que permitió delimitar a la población de linfocitos Tregs con el siguiente fenotipo, CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺CD62L⁺ (Baecher-Allan *et al.*, 2001; Miyara *et al.*, 2009). Se calculó el porcentaje y el número de células absolutas normalizado tanto con respecto a linfocitos totales como con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales. De esta forma pudimos inferir que número de células Treg presentaba fenotipo efector activado y están abandonando el ganglio linfático para dirigirse al aloinjerto (Tang *et al.*, 2008).

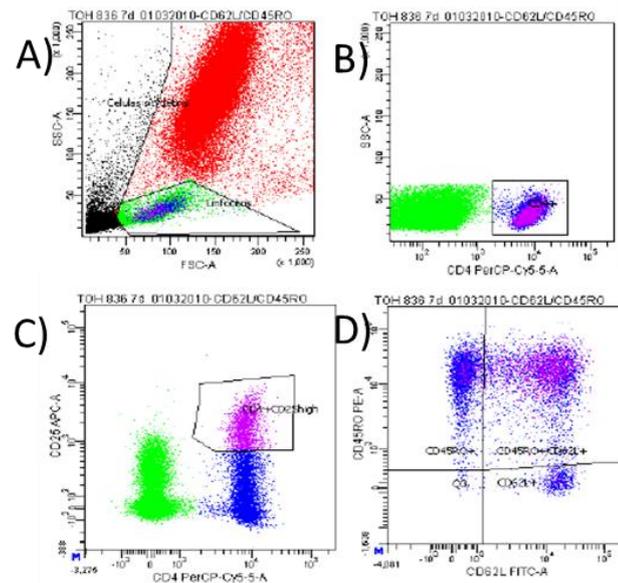


Figura 3.10. Estrategia de citometría de flujo para la cuantificación de linfocitos aTregs ($CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$). (A) Separación de la población de linfocitos totales en función al SSC y FSC. (B) Definición de la población de linfocitos $CD4^+$. (C) Definición de la subpoblación de linfocitos T $CD4^+CD25^{high}$. (D) Expresión de los marcadores CD45RO y CD62L sobre células Treg $CD4^+CD25^{high}$.

Para el cálculo de los % de expresión de $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$ con respecto a los linfocitos totales se utilizó la siguiente regla matemática % total $CD45RO^+CD62L^+ \times 0.01 \times$ % parental linfocitos. Para el cálculo de la población normalizada se divide el % de expresión de linfocitos T $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$ /número de linfocitos totales/ mm^3 obtenido del hemograma. El % de expresión de $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$ con respecto a los linfocitos T $CD4^+$ totales se calculó aplicando la fórmula matemática % parental $CD4^+CD25^{high} \times 0.01 \times$ % parental $CD45RO^+CD62L^+$. Para el cálculo de la población normalizada se dividió el % de expresión de $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$ /número de linfocitos totales/ mm^3 obtenido del hemograma.

Para la correcta estimación de la subpoblación de linfocitos aTregs, se diseñó una planilla de citometría en donde se crearon cuatro diferentes diagramas de puntos como se muestra en la figura 3.10. Para delimitar la población de linfocitos en función del tamaño y granularidad se utilizó un diagrama donde se enfrentó SSC con FSC (Figura 3.10A). Para delimitar la población de linfocitos T $CD4^+$ se creó un segundo diagrama enfrentando SSC con FL3 (CD4-PerCP). En este diagrama hay que tener en cuenta que la

población de monocitos expresa el marcador CD4 con baja intensidad (Figura 3.10B). Para delimitar la población de linfocitos T $CD4^+CD25^{high}$ se creó un diagrama, en donde sobre los linfocitos T $CD4^+$ totales, se enfrentó FL3 (CD4-PerCP) con FL4 (CD25-APC). En función del marcaje con CD25, se definieron 3 subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+$: linfocitos T $CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^{low}$ y $CD4^+CD25^{high}$, seleccionando la subpoblación de interés $CD4^+CD25^{high}$ (Figura 3.10C). Como se observa en la figura 3.10D, para el cálculo del % de $CD45RO^+CD62L^+$ sobre linfocitos T $CD4^+CD25^{high}$, se creó un diagrama enfrentando FL1 (CD62L-FITC) con FL2 (C45RO-PE).

Tubo 2: Análisis de la expresión de CD127 y CD27 en linfocitos Treg $CD25^{high}$. Definiendo el fenotipo $CD4^+CD25^{high}CD27^+CD127^{low}$

En este tubo se pretendió cuantificar el número de células con fenotipo extendido $CD4^+CD25^{high}CD27^+CD127^{low}$ con respecto a linfocitos T $CD4^+$ totales y con respecto a los linfocitos T totales. La caracterización de las células Treg usando solo los marcadores CD4 y CD25 no es muy específica ya que pueden cuantificarse células con este fenotipo que carezcan de actividad supresora. Ha sido descrito por varios grupos de investigación que las células Treg $CD4^+CD25^{high}$ tienen una regulación negativa de la expresión de CD127 (Liu *et al.*, 2006; Seddiki *et al.*, 2006); de tal modo que con este nuevo marcador se puede enriquecer la especificidad en la caracterización de los linfocitos Treg.

Como en el caso anterior, con el marcaje realizado en este tubo se pretendía cuantificar la subpoblación de linfocitos nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD27^+CD127^{low}$) (Battaglia y Roncarolo, 2009) de SP de trasplantados hepáticos y renales incluidos en nuestra serie de estudio. Para ello se calculó el % de expresión de linfocitos nTreg y el número de células absolutas normalizado de linfocitos nTregs con respecto a linfocitos totales y con respecto a linfocitos T $CD4^+$ totales.

Para el cálculo del % de expresión de $CD4^+CD25^{high}CD27^+CD127^{low}$ con respecto a los linfocitos totales se utilizó la siguiente regla matemática; % total $CD27^+$ x 0.01 x % total linfocitos. Para el cálculo de la población normalizada se divide el % de expresión de linfocitos T $CD4^+CD25^{high}CD27^+CD127^{low}$ /número de linfocitos totales/ mm^3 obtenido del hemograma. El % de expresión de $CD4^+CD25^{high}CD27^+CD127^{low}$ con respecto a los linfocitos T $CD4^+$ totales se calculó aplicando la fórmula matemática % parental $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ x 0.01 x % parental $CD27^+$. Para el cálculo de la población normalizada se dividió el % expresión de $CD4^+CD25^{high}CD27^+CD127^{low}$ /número de linfocitos totales/ mm^3 obtenido del hemograma.

La figura 3.11 representa la estrategia seguida para la correcta cuantificación de la subpoblación de linfocitos nTreg en función de los AcMo utilizados. Para el correcto fenotipado de dicha subpoblación, se diseñó una planilla de citometría en donde se crearon cuatro diagramas de puntos diferentes enfrentándose, en un primer diagrama SSC con FSC para delimitar la población de linfocitos en función del tamaño y granularidad (Figura 3.11A). Subsecuentemente, se delimitó la población de linfocitos T $CD4^+$ sobre la población de linfocitos totales en un segundo diagrama enfrentando SSC con FL3 (CD4-PerCP). En este diagrama hay que tener en cuenta que la población de monocitos expresa el marcador CD4 con baja intensidad (Figura 3.11B). Para delimitar la población de linfocitos T $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ se creó un diagrama, en donde sobre los linfocitos T $CD4^+$ totales, se enfrentó FL4 (CD127-APC) con FL2 (CD25-PE), como se observa en la figura 3.11C. Finalmente, para el fenotipado de los linfocitos nTregs, se delimitó la expresión del marcador CD27 sobre linfocitos T $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ enfrentando FL1 (CD27-FITC) con SSC (Figura 3.11D).

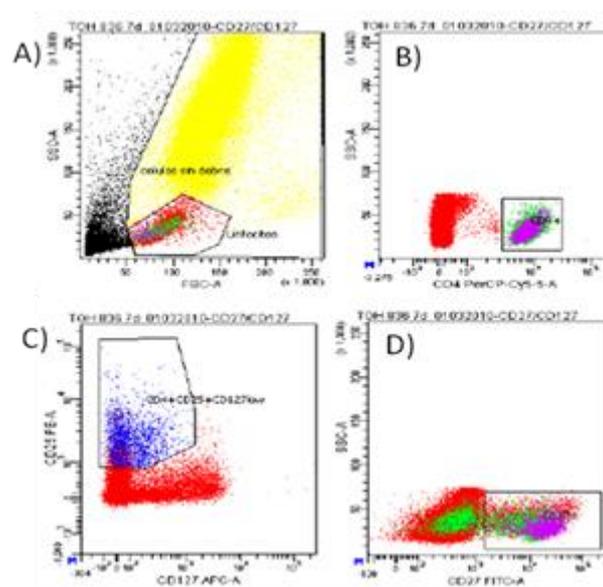


Figura 3.11. Estrategia de citometría de flujo para la cuantificación de linfocitos nTregs ($CD4^+CD25^{\text{high}}CD27^+CD127^{\text{low}}$). (A) Separación de la población de linfocitos totales en función al SSC y FSC. (B) Definición de la población de linfocitos $CD4^+$. (C) Definición de la subpoblación de linfocitos T $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$. (D) Expresión del marcador CD27 sobre linfocitos nTreg $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$.

Tubo 3: Valoración de la expresión del factor de transcripción FoxP3 en linfocitos nTreg

En este tubo se analizó la expresión del marcador FoxP3 mediante tinción intracitoplasmática de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} con respecto a los linfocitos totales y a los linfocitos T CD4⁺ totales. La subpoblación de linfocitos nTregs fue determinada en SP de trasplantados hepáticos y renales y definida como linfocitos T CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺ como ha sido previamente descrita por diferentes grupos de investigación (Kim *et al.*, 2009; San Segundo *et al.*, 2010). Se calculó el % linfocitos nTreg CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺ así como también el número de células absolutas normalizado de linfocitos nTreg CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺ con respecto a linfocitos totales; y el % de linfocitos nTregs CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺ y el número de células absolutas normalizado con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales.

Para el cálculo del % de expresión de CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺ con respecto a los linfocitos totales se utilizó la siguiente regla matemática, % total FoxP3⁺ x 0.01 x % parental linfocitos. Para el cálculo de la población normalizada se dividió el % de expresión de linfocitos T CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺/número de linfocitos totales/mm³ obtenido del hemograma. El % de expresión de CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺ con respecto a los linfocitos T CD4⁺ totales se calculó aplicando la fórmula matemática % parental FoxP3⁺ x 0.01 x parental CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}. Para el cálculo de la población normalizada se dividió el % de expresión de CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺/número de linfocitos totales/mm³ obtenido del hemograma.

En la figura 3.12 se muestra la estrategia seguida para el fenotipaje de los linfocitos nTregs CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺. La subpoblación de linfocitos nTreg fue caracterizada a partir de la población de linfocitos totales de SP adquiridos en función de SSC con FSC (Figura 3.12A). A continuación, la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ fue caracterizada en un diagrama de puntos enfrentando SSC con FL3 (CD4-PerCP). En este diagrama hay que tener en cuenta que la población de monocitos expresa el marcador CD4 con baja intensidad (Figura 3.12B). Como se observa en la figura 3.12C, para delimitar la subpoblación de linfocitos T CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} se creó un diagrama en donde, sobre los linfocitos T CD4⁺ totales, se enfrentó FL1 (CD127-FITC) con FL2 (CD25-PE). Finalmente, el marcador FoxP3 fue caracterizado utilizando un diagrama de puntos en donde se enfrentaron FL3 (CD4-PerCP) con FL4 (FoxP3-APC) a partir de

linfocitos T $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$. Con estos cuatro diagramas de puntos se pudo caracterizar de forma específica a la subpoblación de linfocitos nTreg como $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$ (Figura 3.11D).

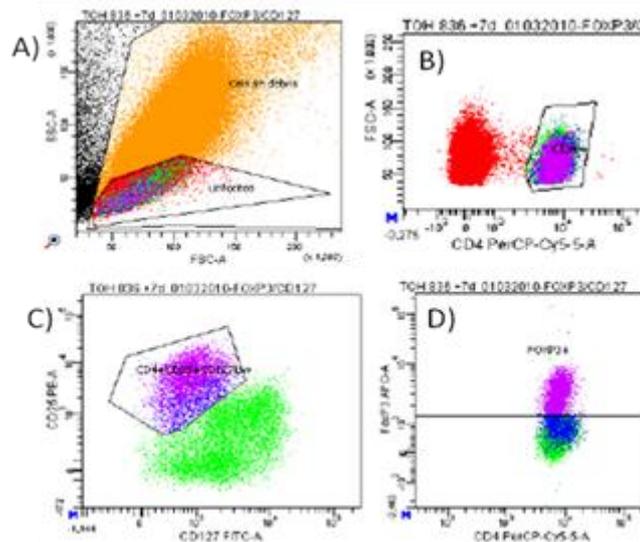


Figura 3.12. Estrategia de citometría de flujo para la cuantificación de linfocitos nTregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$). (A) Separación de la población de linfocitos totales en función al SSC y FSC. (B) Definición de la población de linfocitos $CD4^+$. (C) Definición de la subpoblación de linfocitos T $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$. (D) Expresión del marcador FoxP3 sobre linfocitos nTreg $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$.

3.2.2.4. Monitorización de la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ de sangre periférica

Con esta metodología se analizó por CF, el porcentaje de la subpoblación de linfocitos T $CD4^+CD28^+$ de SP, así como también se cuantificó el número de moléculas CD28 en cifras absolutas por membrana de linfocitos T $CD4^+$ de trasplantados hepáticos y renales incluidos en nuestra de estudio. Publicaciones recientes llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto la importancia que tiene la monitorización de la expresión de la molécula CoS CD28 sobre la aceptación de injerto hepático (Minguela *et al.*, 2000; Blanco-García *et al.*, 2011) y cardíaco (Blanco-García *et al.*, 2011) Basados en los datos previos publicados por nuestro grupo, nos propusimos validar la monitorización de la molécula CD28 para su uso como biomarcador farmacodinámico en trasplantados hepáticos y renales. El tiempo estimado para la

monitorización de los pacientes incluidos en el estudio fue de dos años; durante el primer año se analizó la expresión de CD28 de los pacientes y durante el segundo se concluyó el seguimiento anual de todos ellos. El ensayo se realizó sobre 1 ml de SP anticoagulada con heparina de sodio. El protocolo de recogida de muestras se llevó a cabo siguiendo el siguiente esquema:

- *Al Pre-Tx*: antes de la instauración del tratamiento inmunosupresor.
- *Del día 4/5 post-tx al 18*: cada lunes, miércoles y viernes.
- *Del día 18 al 30*: cada lunes y jueves.
- *Desde el 1er mes*: al 3, 6, 9 y 12 mes.

Pre-Tx	Del día 4/5 al 18*						Del día 18 al 30				Del 2º al 12 mes. (meses)			
Día-0	L	X	V	L	X	V	L	J	L	J	3 ^{er}	6 ^{er}	9 ^{er}	12 ^{er}

* L: lunes; X: miércoles; V: viernes; J: jueves.

➤ Reactivos:

Agua destilada estéril Braun® 1L. Citado previamente.

QuantiBRITE™ PE, (Ref. 340495, BD® Biosciences Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA): Cada tubo de *quantiBRITE™ PE* de BD contiene un conjunto de pequeñas microbolas conjugadas con cuatro niveles distintos de fluorocromo ficoeritrina (del inglés, *phycoerythrin*, PE). El conjunto de microbolas está retenido en el fondo del tubo por un elemento de retención de acero inoxidable. El número de moléculas de PE por microbola en cada nivel varía entre lotes, por lo que la información específica acerca de los valores de PE se encuentra en las instrucciones incluidas con cada kit. Los tubos *QuantiBRITE™* de PE están diseñados para su uso con AcMo marcados con PE con el propósito de estimar el número de AcMO pegado en cada célula por CF. Cuando se ejecuta un tubo *QuantiBRITE™ PE*, con la misma configuración y en el mismo CF por el que las células marcadas con PE fueron adquiridas, el eje FL2 (IMF emitida por el AcMo conjugado con PE) se puede convertir en el número de moléculas de antígeno por célula conjugadas con PE comparándolo con concentraciones conocidas de PE. Tanto las células marcadas como el tubo *QuantiBRITE™* tiene que conservarse entre 2°C-8°C.

➤ Reactivos:

Erythrocyte-Lysing Reagent without Fixative 5ml, EasyLyse™, (Ref. S2364 Dako®, Glostrup, Denmark): *EasyLyse™* está indicado para uso en CF y es un reactivo de

cloruro amónico tamponado para la lisis de eritrocitos. Esta solución rompe la membrana celular de los eritrocitos después del marcaje por inmunofluorescencia de células de SP completa y antes del análisis por CF. Además gracias a las propiedades ópticas coincidentes de EasyLyse™, se hace innecesario eliminar por centrifugación los restos de eritrocitos de la mayoría de las muestras, de manera que el reactivo es idóneo para procedimientos de tinción con “lavado” y “sin lavado”. El reactivo no contiene fijadores. EasyLyse™ se suministra en 6 viales con 5 ml de una solución concentrada 20 veces. Un vial sirve para 50 ensayos (2 mL de reactivo diluido por ensayo). Una vez abierto, el reactivo permanece estable durante cuatro meses entre 2–8°C. Para preparar la solución de trabajo se diluyó la solución EasyLyse™ 20x, mezclando 0.5 ml de lisante concentrado con 9.5 ml de agua destilada Braun®.

Dulbecco's Phosphate buffered saline, DPBS 10x. Citado previamente.

Phosphate buffered saline, PBS 1x: Diluir 1/10: Citado previamente.

Phosphate buffered saline, PBS 20L BD FACSTlow™ Citado previamente.

Anticuerpos monoclonales:

PE Mouse Anti-Human CD28, mouse IgG1κ, clon 28.2 (Ref. 555729, BD®).

APC Mouse Anti-Human CD4, mouse IgG1κ, clon SK3 (Ref. 345771, BD®).

➤ Material fungible:

Tubos de heparina sódica estéril BD VACUTAINER™ 10ml. Citado previamente.

Tubos FACST™ de fondo redondo de 5ml, 12x75 mm, Citado previamente.

Micropipetas BIOHIT de varios volúmenes. Citado previamente.

Puntas de pipeta de 10µl, 100µl y 1000µl con filtro. Citado previamente.

Puntas de pipeta de 40µl y 200µl. Citado previamente.

Puntas de pipeta Corta S/Corona de 2-200µl. Citado previamente.

Puntas de pipeta FINNTIP® 250 Universal de polipropileno. Citado previamente.

Citómetro de flujo FACSTcanto™ II (Becton Dickinson (BD)). Citado previamente.

Agitador automático TopMIX FB 15024. Citado previamente.

Centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R centrifuge. Citado previamente.

➤ Protocolo de trabajo:

Para la cuantificación del número de moléculas CD28 en la membrana celular de linfocitos T CD4⁺ de SP, se procedió al marcaje de las células obtenidas de SP en dos tubos separados, uno para el paciente y otro para la muestra control. Para el marcaje de la

molécula CD28 se utilizó el AcMo PE-anti-CD28 humano. Para la detección de linfocitos T CD4⁺ se utilizó el AcMo APC-anti-CD4 humano. Los AcMo conjugados con PE (CD28) tuvieron un ratio de conjugación AcMo:PE próximo a 1, de manera que casi el 100% de cada molécula de Ac tuvo 1 molécula de PE conjugada. Con el kit QuantiBRITE™ se puede construir una curva de calibración dado que contiene 4 grupos de bolas con un contenido en moléculas de PE diferente y conocido. A esta curva se pueden subsecuentemente, trasladar los valores de IMF de las moléculas CD28 marcadas con PE sobre las células CD4⁺ y de este modo entonces, se pudo calcular el número de moléculas CD28 por célula.

A. Tinción con AcMo fluorescentes y lisado de hematíes:

Se agitó bien el tubo de heparinizado que contenía la muestra de SP por inversión un par de veces antes del marcaje con AcMo. Se añadieron 100 µl de SP con 10 µl de AcMo (CD28-PE+CD4-APC) y se agitó. A continuación, se incubó por 15 minutos a T^a ambiente y oscuridad. Tras la incubación se lisó la muestra añadiendo 2 ml de lisante de Dako EasyLyse, mezclando el contenido del tubo en el agitador. Se incubó 15 minutos a T^a ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo, se mezcló el contenido una vez más en el agitador y se adquirieron las células marcadas antes de 30 minutos.

B. Preparación de QuantiBRITE:

Se desprecintó un tubo de QuantiBRITE™ (tubo 2) y se resuspendió con 500 µl de PBS. Se mezclaron bien las microbolas utilizando el agitador automático y conservándolas en oscuridad a 4°C hasta su uso.

C. Adquisición por Citometría de flujo:

Los tubos 1 (SP marcada con AcMo PE-anti-CD28 humano y APC-anti-CD4 humano) y 2 (quantiBRITIE™) se adquirieron en las mismas condiciones de voltaje y compensación en el CF FACScanto™ II. Al menos 5,000 células doblemente marcadas CD4⁺CD28⁺ se adquirieron en el tubo 1 utilizando un diagrama de puntos que incluía a los linfocitos. Por otro lado, un mínimo de 10,000 microbolas del tubo QuantiBRITE™ se adquirieron para la correcta cuantificación de las diferentes concentraciones de PE. Para la determinación del % de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ se diseñó una planilla de adquisición y análisis utilizando el programa BD FACSDiva™ Software 6.0. En un primer diagrama de puntos se enfrentó SSC con FSC para delimitar la población de linfocitos en función del tamaño y granularidad (Figura 3.13A). Como se muestra en la figura 3.13B, se utilizó

un diagrama de puntos enfrentando FL4 (C4-APC) con FSC sobre la población de linfocitos previamente delimitada para caracterizar a la subpoblación de linfocitos T $CD4^+$. Finalmente, en un tercer diagrama, se cuantificó el % de linfocitos T $CD4^+$ que expresaban CD28 en donde se enfrentó FL4 (CD4-APC) con FL2 (CD28-PE), como se puede observar en la figura 3.13C.

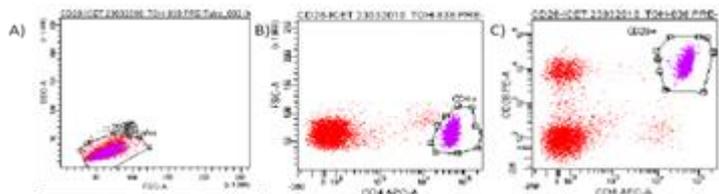


Figura 3.13. Estrategia de citometría de flujo para la cuantificación del % linfocitos T $CD4^+CD28^+$ de SP de trasplantados hepáticos y renales. (A) Delimitación de la población de linfocitos en función del tamaño (FSC) y la complejidad del citoplasma (SSC). (B) Delimitación de la población de linfocitos T $CD4^+$ sobre la población de linfocitos totales. (C) Delimitación de la población de linfocitos T $CD4^+CD28^+$ sobre la población de linfocitos T $CD4^+$ totales.

La figura 3.14 muestra, como ejemplo, el protocolo que se utilizó para la cuantificación del número de moléculas CD28 por membrana de linfocito T $CD4^+$ a partir de muestras de SP de trasplantados hepáticos y renales. Para el cálculo del número absoluto de AcMo conjugado con PE en función de las diferentes IMF obtenidas de las cuatro poblaciones de QuantiBRITE™ se diseñó una planilla de citometría utilizando el programa BD FACSDiva™ Software 6.0 con un diagrama de puntos para el análisis en la población de bolas sin agregados en función de FSC/SSC (Figura 3.14A). En la figura 4.13B se representa un ejemplo de cómo se obtuvieron las diferentes IMF a partir de las 4 poblaciones de microbolas (P1, P2, P3 y P4) mediante un histograma de CF donde se enfrentó el n° de eventos por población con FL2 (PE).

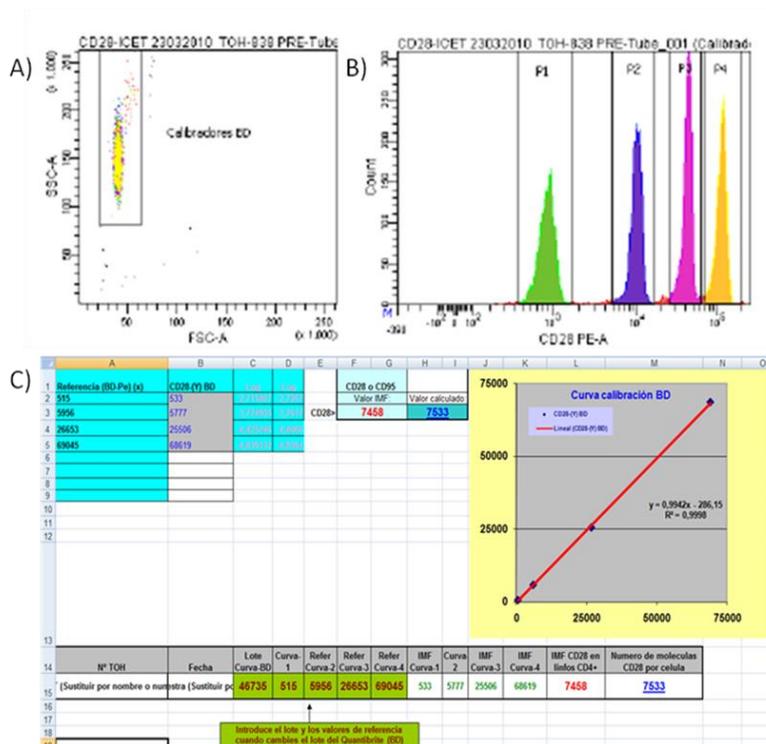


Figura 3.14. Cuantificación del número de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ en cifras absolutas a partir de muestras de SP de trasplantados. (A) Población de microbolas, sin agregados, adquiridas a partir del tubo QuantiBRITE™ en función de SSC y FSC. (B) IMF de las 4 poblaciones de microbolas contenidas en el tubo QuantiBRITE, en donde cada una de ellas (P1, P2, P3 y P4) presentó una concentración distinta y conocida. (C) Ejemplo de hoja de cálculo Excel para determinar el n° de moléculas CD28/linfocito T CD4⁺ a partir de la IMF del fluorocromo PE conjugado con el AcMo anti-CD28 humano y después de interpolar dicho valor de IMF en la recta construida con los valores de IMF obtenidos de las 4 poblaciones de microbolas del tubo QuantiBRITE.

D. Cálculo del número de moléculas por linfocito T CD4⁺:

La figura 3.14C muestra cómo se obtuvo el número de moléculas por linfocito T CD4⁺ a partir de muestras de SP. Para el cálculo del número de moléculas CD28/célula se diseñó una planilla EXCEL (Excel 12.0, Office 2007, Microsoft, Redmon, Washington, USA). Con todos los datos obtenidos de la CF (tubo 1: IMF de la molécula CD28 en los linfocitos T CD4⁺ y tubo 2: IMF de las cuatro poblaciones de QuantiBRITE). A continuación, se trasladaron los valores de IMF de las cuatro poblaciones de QuantiBRITE y de CD28 a la hoja Excel de análisis obteniéndose de este modo, e inferido a partir de la IMF de las muestras de cada paciente en un momento determinado

durante el periodo de monitorización, la cantidad de moléculas CoS CD28 expresadas en la superficie celular del linfocito T CD4⁺.

3.2.2.5. Determinación de la secreción de IL-17, IFN γ , IL-10 y TGF β en sobrenadante de cultivo de leucocitos estimulados *in vitro* con Con-A por ELISA en pacientes con trasplante hepático y renal

Para medir la capacidad de secreción de IL-2, IFN γ , IL-10 y TGF β en sobrenadante de cultivo de SP total se utilizaron los kits Quantikine[®] de R&D Systems[®]. El inmunoensayo es un ELISA en fase sólida de 4 horas y 30 minutos de duración diseñado para medir los niveles de las citocinas a partir de muestras de sobrenadante de cultivo, suero y plasma. Este ensayo emplea una técnica cuantitativa de inmunoensayo ligado a enzima en sándwich (ELISA).

➤ Reactivos:

Quantikine[®] ELISA Human IFN γ Immunoassay (ref. DIF50. R&D Systems, Inc. USA & Canada): Para la determinación cuantitativa de la concentración de IFN γ humano en sobrenadante de cultivo.

Quantikine[®] ELISA Human TGF β 1 Immunoassay (ref. DB100B. R&D Systems, Inc. USA & Canada): Para la determinación cuantitativa de la concentración de TGF β 1 activo humano en sobrenadante de cultivo.

Quantikine[®] ELISA Human IL-10 Immunoassay (ref. DB1000B. R&D Systems, Inc. USA & Canada): Para la determinación cuantitativa de la concentración de IL-10 humana en sobrenadante de cultivo.

Quantikine[®] ELISA Human IL-17 Immunoassay (ref. D1700B. R&D Systems, Inc. USA & Canada): Para la determinación cuantitativa de la concentración de IL-17 humana en sobrenadante de cultivo.

Agua destilada estéril Braun[®] 1L. Citado previamente.

Dulbecco's Phosphate buffered saline, DPBS 10x (Citado previamente).

Phosphate buffered saline, PBS 1x: Diluir 1/10: Citado previamente.

Medio de cultivo RPMI1640 BioWhittaker[®] estéril (500ml) sin glutamina (ref. BE12-167F. Lonza B-4800 Verviers, Belgium). Almacenado a 15°C-30°C.

Glutamina 200mMoles estéril (ref. BE17-605E, Lonza).

Penicilina-estreptomicina 5000:5000 (100ml) (ref. 802538, Analyzer).

Medio de cultivo completo (MCC), donde se realizaron los cultivos, compuesto por: 500 ml de RPMI1640 BioWhittaker[®] (ref. BE12-167F) suplementado con un 10% de STF previamente descomplementado a 56°C durante 30 minutos, 5 ml de L-Glutamina 200 mM (ref. BE17-605E) y 5 ml de estreptomicina 50 µg/mL (ref. 802538). La mezcla se esterilizará por filtración al vacío.

Concanavalin A, Con-A (ref. 11028-71-0 SIGMA-ALDRICH[®]): Citado previamente.

Solución de ensayo:

Concentración de 1mg/ml (solución MADRE)

Concentración de la solución de trabajo de 60 µg/ml:

120 µl Con-A (1 mg/ml) + 1880 µl PBS estéril

Concentración final por pocillo de 15 µg/ml

Cultivo 48h:

30 µl Con-A (60 µg/ml)/pocillo	}	200 µl/pocillo
170 µl sangre diluida/pocillo		

Cultivo 72h:

30 µl Con-A (60 µg/ml)/pocillo	}	200 µl/pocillo
170 µl sangre diluida/pocillo		

➤ Material fungible:

Tubos 16x100 de fondo cónico enrasado con tapón (ref. T1641, Soria Genlab, S.A. Productos sanitarios. Valdemoro, Madrid).

Tubos de heparina sódica estéril BD VACUTAINERTM 10ml (ref. 368480, Vacutainer Systems, Belliner Industrial Estate, Plymouth PL67BP; UK).

Tubos microcentrífuga de 1.5ml. Citado previamente.

Microtubos de 0.5ml (ref. 4092. 1N Deltalab, S.L. Citado previamente.

Pipetas Pasteur desechables estériles graduada 3ml. Citado previamente.

Pipetas Pasteur desechables estériles graduada 3ml. Citado previamente.

Pipetus[®] (ref. 95703; Hirschmann). Citado previamente.

Pipeta serológica estéril BD FalconTM 10ml. Citado previamente.

Micropipetas BIOHIT de varios volúmenes. Citado previamente.

Puntas de pipeta de 10µl, 100µl y 1000µl con filtro Citado previamente.

Puntas de pipeta de 40µl y 200µl Citado previamente.

Puntas de pipeta Corta S/Corona de 2-200µl. Citado previamente.

Puntas de pipeta FINNTIP® 250 Universal (0.5-250µl) (Citado previamente).

Agitador automático TopMIX FB 15024. Citado previamente.

Estufa de incubación de CO₂ NuairTM DH AUTOFLOW. Citado previamente.

Centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R centrifuge. Citado previamente.

Cámara de flujo laminar CleanAir DIN 12980. Citado previamente.

Placas de cultivo estériles de 96 pocillos de fondo plano. Citado previamente.

Placas de cultivo estériles de 24 pocillos de fondo plano. Citado previamente.

AP22 Speedy IF (A. Menarini Diagnostics[®], Barcelona, España): AP-22 es un procesador automatizado en la preparación de microplacas y portaobjetos para los métodos de ELISA e IFI. El instrumento es capaz de gestionar 2 microplacas de ELISA con 8 métodos en línea o 16 portaobjetos de IFI. Las fases del proceso analítico son: pre-dilución de muestra y dispensación de ésta y de reactivos, incubación y ciclos de lavado para la lectura final y el procesamiento de datos.

➤ Protocolo de trabajo:

A. Cultivo de SP total:

1. Cultivo 48h: Sobrenadante IL-17/IFN γ (con FCS):

Para realizar el cultivo de IL-17 e IFN γ se preparó un dilución 1/10: 0.5 ml de SP anticoagulada (WB) + 4.5 ml de MCC, suplementado con STF al 10%, Glutamina y estreptomycin. Una vez realizada la dilución se procedió al montaje de la placa de cultivo en campana de flujo laminar, añadiendo 170 µl WB 1/10 (Con FCS) + 30 µl Con-A (Concentración final=15 µg/ml). El montaje de la placa se realizó siguiendo el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(IL-17)			(IL-17)			(IFNγ)			(IFNγ)		
B	WB CONTROL + Con-A			WB CONTROL + Con-A			WB CONTROL + Con-A			WB CONTROL + Con-A		
C	WB PACIENTE 1 + Con-A			WB PACIENTE 1 + Con-A			WB PACIENTE 1 + Con-A			WB PACIENTE 1 + Con-A		
D	WB PACIENTE 2 + Con-A			WB PACIENTE 2 + Con-A			WB PACIENTE 2 + Con-A			WB PACIENTE 2 + Con-A		
E	WB PACIENTE 3 + Con-A			WB PACIENTE 3 + Con-A			WB PACIENTE 3 + Con-A			WB PACIENTE 3 + Con-A		

Tras las 48 horas de incubación, se centrifugó la placa durante 5 minutos a 1800 rpm y se recogieron 200 µl de sobrenadante para su congelación a -20°C, hasta la determinación de la capacidad secretora de citocinas por ELISA.

2. Cultivo 72h: Sobrenadante IL-10 (con STF) y TGFβ (sin STF)

Para realizar el cultivo de IL-10 se preparó una dilución 1/10: 0.5 ml de WB + 4.5 ml de MCC, suplementado con STF al 10%, Glutamina y estreptomicina. Para realizar el cultivo de TGFβ se preparó una dilución 1/10, diluyendo 0.5 ml de WB + 4.5 ml de RPMI. Así, se procedió al montaje de la placa de cultivo, añadiendo 170 µl WB 1/10 (con STF para IL-10) + 30 µl Con-A (Concentración final=15 µg/ml) y 170 µl WB 1/10 (sin STF para TGFβ) + 30 µl Con-A (Concentración final=15 µg/ml), siguiendo el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(IL-10)			(IL-10)			(TGFβ)			(TGFβ)		
B	WB CONTROL + Con-A			WB CONTROL + Con-A			WB CONTROL + Con-A			WB CONTROL + Con-A		
C	WB PACIENTE 1 + Con-A			WB PACIENTE 1 + Con-A			WB PACIENTE 1 + Con-A			WB PACIENTE 1 + Con-A		
D	WB PACIENTE 2 + Con-A			WB PACIENTE 2 + Con-A			WB PACIENTE 2 + Con-A			WB PACIENTE 2 + Con-A		
E	WB PACIENTE 3 + Con-A			WB PACIENTE 3 + Con-A			WB PACIENTE 3 + Con-A			WB PACIENTE 3 + Con-A		

Tras las 72 horas de incubación, se centrifugó la placa durante 5 minutos a 1800 rpm y se recogieron 200 µl de sobrenadante para su congelación a -20°C hasta la determinación de la capacidad secretora de citocinas por ELISA.

B. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA):

✓ Material provisto en cada kit:

○ *Quantikine*[®] *ELISA Human IFNγ Immunoassay*:

- Microplaca de poliestireno de 96 pocillos recubierto con Ac policlonal contra IFNγ.
- Solución de conjugado: 21 ml/vial de Ac policlonal anti-IFNγ conjugado con peroxidasa de rábano.

- Solución estándar: vial con IFN γ recombinante humana liofilizada de concentración de IFN γ a 1.0 ng/vial, para la preparación de la curva de calibración.
 - Diluyente del ensayo RD1-51: 11 ml/vial de solución de base proteica tamponada con conservantes de color azul.
 - Diluyente del calibrador RD6-21: 21 ml/vial de solución de base proteica tamponada con conservantes.
 - Tampón de lavado concentrado: 21 ml/vial de solución de lavado 25x de agente tensioactivo tamponada.
 - Reactivo de color A: 12.5 ml/vial de peróxido de hidrógeno.
 - Reactivo de color B: 12.5 ml/vial de cromógeno (tetrametilbencidina).
 - Solución de STOP: 6 ml/vial de ácido sulfúrico 2N.
- *Quantikine[®] ELISA Human TGF β 1 Immunoassay:*
- Microplaca de poliestireno de 96 pocillos recubierto con Ac policlonal contra TGF β .
 - Solución de conjugado: 12.5 ml/vial de Ac policlonal anti-TGF β 1 conjugado con peroxidasa de rábano.
 - Solución estándar: vial con TGF β 1 recombinante humana liofilizada de concentración de TGF β 1 a 4.0 ng/vial), para la preparación de la curva de calibración.
 - Diluyente del ensayo RD1-21: 12.5 ml/vial de solución de base proteica tamponada.
 - Diluyente del calibrador RD5-53 concentrado: 21 ml/vial de solución de base proteica tamponada, concentrada 4x.
 - Tampón de lavado concentrado: 50 ml/vial de solución de lavado 25x de agente tensioactivo tamponada.
 - Reactivo de color A: 12.5 ml/vial de peróxido de hidrógeno.

- Reactivo de color B: 12.5 ml/vial de cromógeno (tetrametilbencidina).
 - Solución de STOP: 23 ml/vial de ácido clorhídrico diluido.
- *Quantikine[®] ELISA Human IL-17 Immunoassay:*
- Microplaca de poliestireno de 96 pocillos recubierto con Ac monoclonal de ratón contra IL-17.
 - Solución de conjugado: 21 ml/vial de Ac policlonal anti-IL-17 conjugado con peroxidasa de rábano.
 - Solución estándar: vial con IL-17 recombinante humana liofilizada de concentración de IL-17 a 20 ng/vial), para la preparación de la curva de calibración.
 - Diluyente del ensayo RD1-36: 11 ml/vial de solución de base proteica tamponada.
 - Diluyente del calibrador RD5R: 21 ml/vial de solución de base proteica tamponada.
 - Tampón de lavado concentrado: 21 ml/vial de solución de lavado 25x de agente tensioactivo tamponada.
 - Reactivo de color A: 12.5 ml/vial de peróxido de hidrógeno.
 - Reactivo de color B: 12.5 ml/vial de cromógeno (tetrametilbencidina).
 - Solución de STOP: 6 ml/vial de ácido sulfúrico 2N.
- *Quantikine[®] ELISA Human IL-10 Immunoassay:*
- Microplaca de poliestireno de 96 pocillos recubierto con Ac monoclonal de ratón contra IL-10.
 - Solución de conjugado: 21 ml/vial de Ac monoclonal de ratón anti-IL-10 conjugado con peroxidasa de rábano.
 - Solución estándar: vial con IL-10 recombinante humana liofilizada de concentración de IL-10 a 5.0 ng/vial, para la preparación de la curva de calibración.

- Diluyente del ensayo RDIW: 11 ml/vial de solución de base proteica tamponada.
- Diluyente del calibrador RD5C concentrado: 21 ml/vial de solución de base proteica concentrada 5x tamponada.
- Tampón de lavado concentrado: 21 ml/vial de solución de lavado 25x de agente tensioactivo tamponada.
- Reactivo de color A: 12.5 ml/vial de peróxido de hidrógeno.
- Reactivo de color B: 12.5 ml/vial de cromógeno (tetrametilbencidina).
- Solución de STOP: 6ml/vial de ácido sulfúrico 2N.

Una vez obtenidas suficientes alícuotas de sobrenadante de cultivo como para montar una placa entera de Quantikine[®] se procedió a la descongelación de las muestra a -20°C. La descongelación se debe realizar a 4°C para evitar la formación de agregados de proteína. El procedimiento de las muestras fue, en general, igual para todas las citocinas. La preparación de todos los reactivos de cada kit se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez preparados todos los reactivos se procedió al montaje de las placas de ELISA, en función del kit y utilizando el analizador automático de microplacas ELISA e IFI, AP-22 de Menarini. Los pasos para realizar el ELISA fueron:

- Pre-dilución de muestra (únicamente para Quantikine[®] para IL-10).
- Se añadió el diluyente del ensayo correspondiente para cada kit.
- Se añadieron los estándares, controles y muestras por duplicado.
- Se incubaron de dos a tres horas en función del kit.
- Se aspiraron y lavaron las placas con 400 µl de solución de lavado.
- Se añadieron 200 µl de conjugado/pocillo, incubando 1-2 hrs según kit.
- Se aspiraron y lavaron las placas con 400 µl de solución de lavado.
- Se añadieron 200 µl de sustrato/pocillo, e incubaron 30 minutos.
- Se añadieron 50 µl de solución STOP/pocillo.

- Se determinó la densidad óptica de cada pocillo dentro de los 30 minutos siguientes a la adición de la solución STOP, utilizando un lector de microplaca a 450 nm de longitud de onda.

3.2.2.6. Análisis estadístico de los datos

Los resultados obtenidos a partir de los diferentes ensayos fueron recolectados en una base de datos (SPSS 18.0 paquete estadístico, Inc., Chicago, IL, USA) junto con todos los datos demográficos, clínicos, inmunológicos y farmacocinéticos para cada trasplantado hepático y renal incluido en nuestra serie. El análisis estadístico de los datos de citometría y ELISA fue procesado durante el 2º año de desarrollo de esta Tesis. Se establecieron 2 subgrupos en función del tipo de trasplante: **renal y hepático**, y dentro de ellos, los pacientes fueron agrupados en categorías como se desarrolló en el punto 3.1.8. Nuestro análisis se realizó con los siguientes pasos:

1. Análisis descriptivo de los parámetros clínicos, inmunológicos, farmacocinéticos y farmacodinámicos: Para cada grupo de estudio se obtuvo una distribución de frecuencias resumiendo y expresando los valores de las distintas variables como $\text{media} \pm \text{ESM}$.
2. Análisis de la correlación entre los biomarcadores y variables clínicas, farmacocinéticas de interés: (Ej. edad donante y receptor, sexo del receptor, fármaco inmunosupresor) y los eventos clínicos de interés (RA, infección oportunista y recidiva de VHC).
 - a. *Análisis Chi-cuadrado*: Para estudiar la relación existente entre las distintas variable cualitativas (Ej. sexo y presencia/ausencia de evento clínico), se realizó un análisis de tablas de contingencia mediante test de Chi-cuadrado de Pearson y el subsiguiente análisis de residuos. Cuando las frecuencias esperadas fueron bajas se utilizó el test exacto de Fisher.
 - b. *Prueba de normalidad*: Para determinar si las distintas frecuencias obtenidas tras el análisis descriptivo se ajustaban a una población con distribución paramétrica, se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. Las frecuencias de las variables se ajustaron a una distribución normal cuando el $p\text{-valor} > 0.05$ aceptando la hipótesis nula [$H_0: x \sim N(\mu, \sigma)$]. Por el contrario, las frecuencias de las variables no se ajustaron a una distribución

paramétrica cuando el p -valor < 0.05 aceptando la hipótesis alternativa ($H_1: x \sim N(\mu, \sigma)$).

- c. *Análisis univariante*: Se realizó mediante la comparación de los pacientes que desarrollaron el evento con los pacientes que no lo desarrollaron, en relación a cada biomarcador. Dicha comparación se llevó a cabo con los tests de t de Student (o Mann-Whitney en caso de que las variables no siguieran una distribución no paramétrica) y chi-cuadrado. Otra forma de analizar este aspecto se hizo mediante curvas ROC, las cuales no solo permitieron conocer los biomarcadores significativamente asociados con el desarrollo de un evento determinado, sino que permitió conocer otros datos de interés, como la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, y cuál es el mejor punto de corte para el biomarcador. La capacidad discriminatoria para cada biomarcador determinada por el AUC del análisis ROC realizado, fue analizada según el siguiente criterio: aceptable cuando el AUC fue entre 0.7-0.8, excelente cuando fue entre 0.8-0.9 y perfecto cuando fue superior a 0.9 (Hanley y McNeil, 1982).
- d. *Análisis de regresión logística*: Las variables que alcanzaron significación estadística en el anterior análisis se introdujeron en un análisis multivariado (stepwise, sigmoidal Emax) para identificar cuál biomarcador se relacionó de forma independiente con el evento. El análisis de regresión logística se aplicó para calcular la probabilidad de predicción de evento clínico (rechazo agudo, infección oportunista y recidiva de VHC), como variable dependiente binaria, y los niveles de los biomarcadores propuestos en escala numérica como variable predictiva utilizando el modelo propuesto por Hosmer y Lemeshow (Hosmer y Lemeshow, 2000; Hilbe, 2009). Este modelo fue aplicado para obtener los coeficientes de regresión logística. Estos coeficientes pueden ser utilizados para el cálculo del logit de rechazo (logit RA), de infección oportunista (logit INF) y de recidiva de VHC (logit VHC) para un determinado paciente, el cual puede entonces ser utilizado para determinar la probabilidad de evento clínico mediante las fórmulas $e^{\text{logit AR}} / 1 + e^{\text{logit AR}}$, $e^{\text{logit INF}} / 1 + e^{\text{logit INF}}$ y $e^{\text{logit VHC}} / 1 + e^{\text{logit VHC}}$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Datos demográficos, clínicos y farmacocinéticos en receptores de trasplante

En el siguiente apartado se muestra el análisis estadístico realizado entre las variables clínicas, demográficas y farmacocinéticas, y los grupos de estudio de pacientes con enfermedad hepática y renal terminal en pre- y post-trasplante incluidos. Con este análisis se pretende investigar si existe relación entre las variables estudiadas (edad del receptor y donante, sexo del receptor, enfermedad de base, tratamiento o dosis de inmunosupresor post-trasplante) con el desarrollo de RA, INF o reinfección VHC.

4.1.1. Características demográficas, clínicas y farmacocinéticas de los receptores hepáticos y su relación con el desarrollo de RA, INF y VHC

En la tabla 4.1 se muestra un resumen detallado de las características demográficas, clínicas y farmacocinéticas de los receptores hepáticos incluidos en la serie (n=30), según los grupos estudiados, ausencia de rechazo/presencia de rechazo (NRA/RA) y ausencia de infección oportunista/presencia de infección (NoINF/INF).

Tanto la edad del donante como del receptor no presentaron diferencias significativas en cuanto al desarrollo de RA o INF post-trasplante; aunque se observa una tendencia en la edad del receptor, en donde aquellos receptores con menor edad presentaron mayor frecuencia de episodios de RA y de INF.

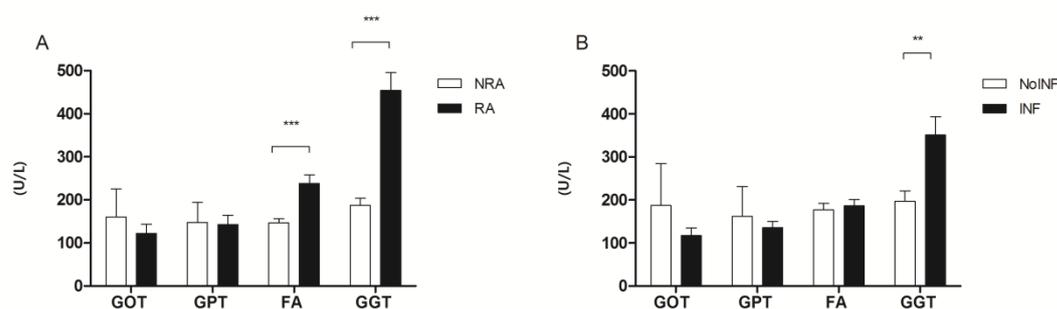


Figura 4.1. Niveles de enzimas hepáticas en pacientes sometidos a trasplante hepático. (A) diferencias en los niveles séricos de enzimas hepáticas en receptores con y sin RA. (B) diferencias en los niveles séricos de enzimas hepáticas en receptores hepáticos con y sin INF. Abreviaturas: GOT, transaminasa glutámico oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; FA, fosfatasa alcalina; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

El sexo del receptor no presentó diferencias significativas ni con RA ni con INF. Sin embargo, el 83.34% de los receptores con RA fueron del sexo masculino frente al

16.66% que fueron del sexo femenino. Del mismo modo, el 64.3% de los receptores del sexo masculino desarrollaron INF post-trasplante frente al 35.7% de las mujeres sometidas a trasplante. De este análisis se puede inferir que los receptores masculinos presentaron mayor susceptibilidad de desarrollar tanto RA como INF post-trasplante.

Tanto los niveles séricos de FA (146.39 ± 9.97 vs 237.92 ± 19.6 , $P < 0.001$) como GGT (454.15 ± 62.77 vs 187.32 ± 16.24 , $P = 0.001$) fueron significativamente superiores en los pacientes del grupo RA. Del mismo modo, los niveles séricos de GGT fueron significativamente superiores en los pacientes del grupo de INF (197.27 ± 23.65 vs 351.28 ± 42.44 , $P = 0.004$). Estos resultados están representados en la figura 4.1.

No se observaron diferencias significativas entre la presencia de RA y el tipo de terapia post-trasplante (TRL o TRL+MMF) suministrada. Sin embargo, los pacientes que recibieron TRL como terapia de mantenimiento presentaron una menor frecuencia de episodios de RA en comparación con los pacientes que recibieron TRL+MMF, indicando que los pacientes que recibieron TRL en monoterapia presentaron una mejor aceptación del injerto a largo plazo (72.2% vs 27.8%; $P = 0.036$).

Del mismo modo no se observaron diferencias significativas entre el tipo de tratamiento inmunosupresor post-trasplante suministrado y la aparición de INF. Sin embargo, el tratamiento post-trasplante de larga duración si que tuvo efecto sobre la aparición de INF post-trasplante, de tal modo que pacientes que recibieron TRL en regimen de monoterapia presentaron mayor tasa de INF en comparación con aquellos pacientes que recibieron una combinación de TRL+MMF (72.2% vs 27.8%; $P = 0.025$).

Tabla 4.1. Características demográficas, clínicas, inmunológicas y farmacocinéticas de los pacientes sometidos a trasplante hepático

	Total (n=30)	NRA (n=18)	RA (n=12)	NoINF (n=12)	INF (n=18)
Edad del donante (media±SEM)	59.90±0.97	60.67±3.45	58.75±4.80	60.75±3.32	58.93±4.71
Edad del receptor (media±SEM)	52.43±0.65	53.61±2.03	50.67±3.63	51.25±2.87	53.79±2.37
Sexo masculino (n, %)	23(77%)	13(72.22%)	10(83.34%)	14(87.5%)	9(64.3%)
Sexo femenino (n, %)	7(23%)	5(27.78%)	2(16.66%)	2(12.5%)	5(35.7%)
Incompatibilidad HLA-A (0/1/2)	0/13(43.3%)/17(56.7%)	0/8(44.4%)/10(55.6%)	0/5(41.7%)/7(58.3%)	0/6(50%)/6(50%)	0/7(38.9%)/11(61.1%)
Incompatibilidad HLA-B (0/1/2)	1(3.3%)/8(26.7%)/21(70%)	0/7(38.9%)/11(61.1%)	1(8.3%)/1(8.3%)/10(83.3%)	1(8.3%)/2(16.7%)/9(75%)	0/6(33.3%)/12(66.7%)
Incompatibilidad HLA-DR (0/1/2)	0/11(36.7%)/19(63.3%)	0/8(44.4%)/10(55.6%)	0/3(25%)/9(75%)	0/3(25%)/9(75%)	0/8(44.4%)/10(55.6%)
Linfocitos totales (%)	12.98±1.91	7.98±1.89	16.33±2.68*	15.38±3.63	11.39±2.08
Linfocitos totales (células/mm ³)	775.33±130.55	448.34±107.86	993.34±190.92**	813.34±163.70	750.02±191.84
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	6.77±0.69	6.75±1.05	6.81±0.77	6.29±0.55	7.09±1.10
GOT sérica (U/L)	145.13±40.14	160.10±65.31	122.47±20.95	187.44±97.28	117.16±18.09
GPT sérica (U/L)	145.96±28.85	147.76±46.02	143.23±20.64	161.69±69.20	135.56±14.77
FA sérica (U/L)	183.01±10.45	146.39±9.97	237.92±19.96***	177.47±14.72	186.62±14.40
GGT sérica (U/L)	289.18±27.57	187.32±16.24	454.15±62.77***	197.27±23.65	351.28±42.44**
Enfermedad de base:					
Cirr. Alcohólica	12(40%)	8(44.4%)	4(33.3%)	6(50.0%)	6(33.3%)
Cirr. Alcohólica + VHC	6(20%)	5(27.8%)	1(8.30%)	2(16.7%)	4(22.2%)
Cirrosis virus C	6(20%)	2(11.1%)	4(33.3%)	1(8.30%)	5(27.8%)
Otras	6(20%)	3(16.7%)	3(25.0%)	3(25.0%)	3(16.7%)
Terapia post-trasplante (TRL/TRL+MMF)	17(56.7%)/13(43.3%)	10(55.6%)/8(44.4%)	7(58.3%)/5(41.7%)	7(58.3%)/5(41.7%)	10(55.6%)/8(44.4%)
Terapia de mantenimiento (TRL/TRL+MMF)	20(66.7%)/10(33.3%)	13(72.2%)/5(27.8%)	7(58.3%)/5(41.7%)	7(58.3%)/5(41.7%)	13(72.2%)/5(27.8%)
Dosis TRL (mg/día)	7.19±0.26	7.59±0.36	6.63±0.35	7.92±0.28	6.67±0.39***
Dosis MMF (mg/día)	1962.67±54.45	1937.5±58.4	1991.43±96.2	2062.50±73.45	1848.57±79.00*
Cmin TRL (ng/ml)	9.96±0.39	9.69±0.53	10.35±0.58	10.46±0.69	9.61±0.47
Cmin MMF (µg/ml)	2.40±0.48	1.75±0.34	2.64±0.64	2.91±0.60	0.97±0.29**

Abreviaturas: NRA, no rechazo agudo; RA, rechazo agudo; NoINF, no infección oportunista post-trasplante; INF, infección oportunista post-trasplante; GOT, transaminasa glutámico oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; FA, fosfatasa alcalina; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; TRL, tacrolimus; MMF, micofenolato mofetilo; Cmin, concentración basal.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

El estudio realizado entre la dosis de TRL (mg/día), dosis de MMF (mg/día), Cmin TRL (ng/ml) y Cmin MMF ($\mu\text{g/ml}$) y presencia/ausencia de RA no reflejó ninguna diferencia significativa (Tabla 4.1). Del mismo modo, en el análisis realizado entre la dosis de TRL (mg/día) y la presencia de INF post-trasplante reveló que, los pacientes que presentaron INF en post-trasplante recibieron una dosis menor de TRL frente a aquellos pacientes que no tuvieron INF (7.92 ± 0.28 vs 6.67 ± 0.39 , $P=0.0002$). Igualmente, la dosis de MMF (mg/día) fue significativamente menor en pacientes con INF post-trasplante en comparación con los pacientes NoINF (1848.57 ± 79.00 vs 2062.50 ± 73.45 , $P=0.034$). La Cmin TRL (ng/ml) no mostró tampoco diferencias significativas entre pacientes con y sin INF, sin embargo, la Cmin MMF ($\mu\text{g/ml}$) en pacientes con INF fue significativamente menor en comparación con NoINF (0.97 ± 0.29 vs 2.91 ± 0.60 , $P=0.009$).

En la tabla 4.2 se muestran las características demográficas, clínicas y farmacocinéticas de los pacientes sometidos a trasplante hepático y su relación con el desarrollo de recidiva de VHC. Los pacientes fueron clasificados en 2 grupos; que no tuvieron recidiva de VHC (NVHC) y los que si sufrieron recidiva de virus C (VHC).

No se observó relación entre la edad del donante y presencia/ausencia de VHC; por el contrario, la edad de receptores con VHC post-trasplante fue estadísticamente menor que la de NVHC (48.57 ± 2.74 vs 58.60 ± 3.39 , $P=0.043$).

De la misma manera, el análisis realizado entre el sexo del receptor y presencia/ausencia de recidiva VHC no reveló ninguna diferencia significativa ($P=0.468$). Sin embargo, y aunque la asociación entre ambas variables es débil, el 85.7% de los pacientes NVHC fueron hombres frente al 14.3% de mujeres.

El análisis realizado para valorar si existía alguna diferencia entre los niveles séricos de las enzimas hepáticas (GOT, GPT, FA y GGT) en situación pre-trasplante y ambos grupos NVHC y VHC no reveló ninguna diferencia significativa.

Asimismo, el análisis realizado para valorar si existía alguna relación entre el tipo de tratamiento post-trasplante (TRL y TRL+MMF) y si/no recidiva de VHC tampoco reveló diferencias significativas entre ambos grupos ($P=0.235$). Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas entre el tipo de terapia de mantenimiento (TRL o TRL+MMF) y presencia/ausencia de VHC entre ambos grupos de estudio ($P=0.152$).

Por otro lado, en el análisis realizado entre la dosis de TRL (mg/día) y presencia/ausencia de VHC no se observaron diferencias significativas ($P=0.324$); sin embargo la Cmin de TRL (ng/ml) en pacientes con recidiva VHC fue significativamente menor que en pacientes NVHC (4.00 ± 2.58 vs 9.60 ± 1.25 , $P=0.024$).

Tabla 4.2. Características demográficas, clínicas, inmunológicas y farmacocinéticas de los pacientes sometidos a trasplante hepático y su relación con presencia de recidiva de VHC

	Total (n=30)	NVHC (n=19)	VHC (n=11)
Edad del donante (media±SEM)	59.90±0.97	56.74±3.90	65.36±3.01***
Edad del receptor (media±SEM)	52.43±0.65	52.58±2.57	52.18±2.69
Género masculino (n, %)	23(76.7%)	15(78.9%)	8(34.8%)
Género femenino (n, %)	7(23.3%)	4(21.1%)	3(42.9%)
Incompatibilidad HLA-A (0/1/2)	0/13(43.3%)/17(56.7%)	0/11(57.9%)/8(42.1%)	0/2(18.2%)/9(81.8%)*
Incompatibilidad HLA-B (0/1/2)	1(3.3%)/8(26.7%)/21(70%)	0/3(15.8%)/16(84.2%)	1(9.1%)/5(45.5%)/5(45.5%)*
Incompatibilidad HLA-DR (0/1/2)	0/11(36.7%)/19(63.3%)	0/5(26.3%)/2(73.7%)	0/6(54.5%)/5(45.5%)
Linfocitos totales (%)	12.98±1.91	14.75±2.84	9.94±1.49
Linfocitos totales (células/mm ³)	775.33±130.55	828.42±174.72	683.64±196.38
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	6.77±0.69	7.06±0.97	6.27±0.89
GOT sérica (U/L)	408.07±60.82	400.53±67.02	421.09±123.56
GPT sérica (U/L)	242.73±43.01	236.53±56.18	253.45±69.24
FA sérica (U/L)	154.93±21.89	142.23±23.68	175.73±43.69
GGT sérica (U/L)	740.01±149.90	109.01±23.12	216.82±71.14
Terapia post-trasplante (TRL/TRL+MMF)	17(56.7%)/13(43.3%)	9(47.4%)/10(52.6%)	8(72.7%)/3(27.3%)
Terapia de mantenimiento (TRL/TRL+MMF)	20(66.7%)/10(33.3%)	11(57.9%)/8(42.1%)	9(81.8%)/2(18.2%)
Dosis TRL (mg/día)	7.19±0.26	7.94±1.08	5.95±0.24
Dosis MMF (mg/día)	1962.67±54.45	2120.01±166.08	1333.25±49.15*
Cmin TRL (ng/ml)	9.96±0.39	9.77±0.48	10.22±0.69
Cmin MMF (µg/ml)	2.41±0.48	2.47±0.50	2.35±0.79

Abreviaturas: NVHC, no recidiva de virus de hepatitis C; RA, recidiva de virus de hepatitis C; VHC, GOT, transaminasa glutámico oxalacética; GPT, transaminasa glutámico-pirúvica; FA, fosfatasa alcalina; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; TRL, tacrolimus; MMF, micofenolato mofetil; Cmin, concentración basal. *P<0.05.

4.1.1.1. Infecciones oportunistas en el periodo post-trasplante

En la figura 4.2 se detalla la frecuencia y el momento de aparición de las distintas INF a lo largo de la evolución post-trasplante de la serie de receptores hepáticos.

Durante el primer mes post-trasplante, las INFs desarrolladas por los pacientes fueron predominantemente de origen bacteriano y fúngico derivadas mayormente del proceso quirúrgico. Entre el primer y sexto mes post-trasplante las infecciones más frecuentes fueron las infecciones por CMV. Entre el sexto mes y el primer año post-trasplante las infecciones predominantes fueron de tipo viral, tanto por CMV como por VHZ, VHZ y VEB. En lo que concierne a las recidivas de VHC, éstas estuvieron repartidas a lo largo del primer año post-trasplante, siendo en los últimos 6 meses del periodo de estudio en donde mayor frecuencia de recidivas por VHC se observaron.

En la tabla 4.3 se muestra la relación existente entre la presencia de INF y RA. De este estudio se puede inferir que existe una relación inversa entre la presencia de INF y evento de RA. El 80% de los pacientes NRA presentaron INF de tipo bacteriana y/o fúngica frente al 20% de pacientes RA. Del mismo modo, 60% de los pacientes con INF de origen viral no tuvo RA, frente al 40% de pacientes con RA. Únicamente se invirtió la tendencia cuando la infección fue mixta (viral y bacteriana/fúngica), de tal modo que el 33.3% de los pacientes con infección mixta no tuvo RA frente al 66.7% que si tuvo. Del mismo modo, aquellos pacientes NoINF tuvieron más episodios de RA. El 58.3% de los

pacientes NoINF tuvo RA, frente al 41.7% con función estable del injerto. En cuanto a los pacientes que desarrollaron VHC, el 71.4% no tuvo RA frente al 28.6% de pacientes RA.

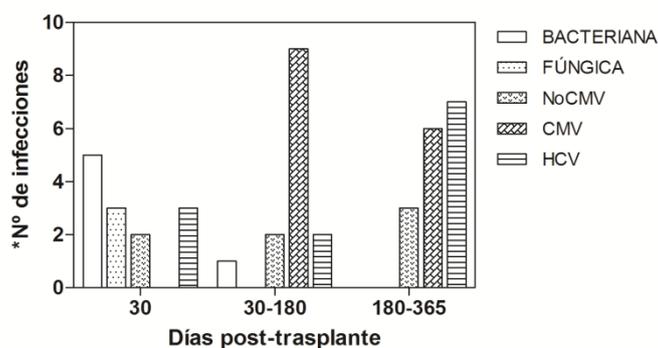


Figura 4.2: Frecuencia y distribución temporal del tipo de infección en el post-trasplante. En blanco se representan las INFs tipo bacteriano; en blanco punteado las INFs fúngicas; en moteado se representan las INFs tipo viral distintas a CMV, entre ellas virus herpes-zoster (VHZ), virus herpes simple (VHS) y virus de Epstein-Bar (VEB); en ladrillo las INF por CMV y en rayado horizontal las INF por VHC. *Hay que tener en cuenta que cada paciente puede haber presentado más de un tipo de INF en el mismo período.

Tabla 4.3. Relación entre infección post-trasplante, RA y VHC

Tipo de infección	NRA (n,%)	RA (n,%)
Bacteriana/fúngica	4 (80%)	1 (20%)
Vírica	6 (60%)	4 (40%)
Mixta	1 (33.3%)	2 (66.7%)
VHC	5 (71.4%)	2 (28.6%)
Ausencia	5 (41.7%)	7 (58.3%)

. Estudio realizado mediante el test exacto de Fisher con corrección de Bonferroni.

4.1.1.2. RA y niveles de inmunosupresor en receptores hepáticos

En la figura 4.3 se observa la frecuencia de episodios de RA en receptores hepáticos a lo largo de la evolución post-trasplante. Como se observa en la misma, los episodios de RA fueron mayoritarios en el transcurso del 1^{er} mes post-trasplante. Como se verá más adelante, es en este periodo donde se observan las mayores diferencias en los biomarcadores estudiados entre los diferentes grupos de receptores con y sin RA.

En la misma figura se representan los niveles sanguíneos de TRL (ng/ml) a lo largo de la evolución post-trasplante, observándose una relación inversa entre los niveles sanguíneos de TRL y la aparición de RA. Los niveles de TRL en SP en ambas poblaciones de estudio aumentaron durante los 2 primeros meses post-trasplante hasta llegar a niveles de 11-12 ng/ml, para después disminuir gradualmente hasta niveles de 8-

10 ng/ml en todos los pacientes. Aunque los niveles sanguíneos de TRL durante el período post-trasplante no mostraron diferencias significativas entre los pacientes NRA y RA, como se observa en la figura 4.3, los episodios de RA siempre coincidieron con niveles sanguíneos de TRL inferiores en pacientes RA en comparación con NRA.

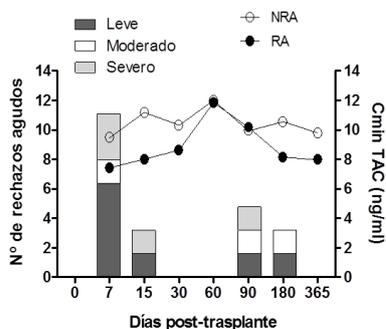


Figura 4.3. Distribución temporal de episodios de RA y su severidad (leve, moderada y severa) en receptores hepáticos. En gris oscuro se representa el nivel leve de RA, en blanco el nivel moderado y en gris claro el nivel severo (barras). Niveles de tacrolimus (TRL) en SP (líneas), en pacientes RA (negro) y NRA (blanco).

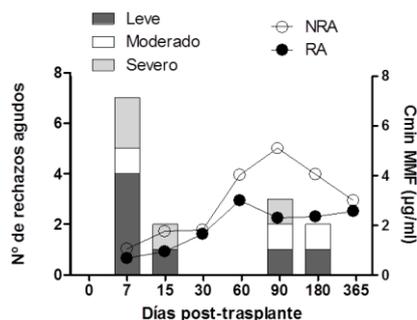


Figura 4.4. Distribución temporal de los episodios de RA y su severidad (leve, moderada y severa) en receptores hepáticos. En gris oscuro se muestra el nivel leve de RA, blanco el moderado y en gris claro el severo (barras). Niveles de micofenolato en SP (líneas), en pacientes RA (negro) y NRA (blanco).

Del mismo modo, en la figura 4.4 se ha representado la distribución temporal de los episodios de RA en función de su severidad junto con los niveles sanguíneos de MMF. En el caso de la población NRA los niveles sanguíneos MMF aumentaron durante los 3 primeros meses hasta niveles de 5.1 $\mu\text{g/ml}$ y para después disminuir hasta 3 $\mu\text{g/ml}$, mientras que los niveles de MMF en la población RA aumentaron en los 2 primeros meses hasta niveles de 3 $\mu\text{g/ml}$ y después disminuyen hasta llegar a niveles de 2.3-2.5 $\mu\text{g/ml}$. Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles sanguíneos de

MMF entre ambos grupos RA y NRA, la mayor frecuencia de episodios de RA coincide con menores niveles de MMF en el grupo RA comparado a pacientes NRA.

4.1.2. Características demográficas, clínicas y farmacocinéticas en receptores renales y su relación con rechazo agudo e infección oportunista

En este apartado se muestra el análisis estadístico realizado a los receptores renales que se incluyeron en este trabajo de tesis. En la tabla 4.4 se ofrece un resumen detallado de las características demográficas, clínicas y farmacocinéticas de los pacientes de nuestra serie según los grupos de estudio NRA/RA y NoINF/INF.

La edad del donante no presentó ninguna diferencia significativa entre receptores renales RA y NRA ($P=0.352$). En cuanto a la relación existente entre la edad del receptor y la incidencia de RA, pacientes con edad más avanzada presentaron mayor tasa de RA en comparación con receptores renales más jóvenes (57.86 ± 2.65 vs 49.63 ± 2.49 , $P=0.037$). Tanto la edad del donante ($P=0.382$) como la edad del receptor ($P=0.971$) no presentaron diferencias significativas entre los pacientes NoINF/INF.

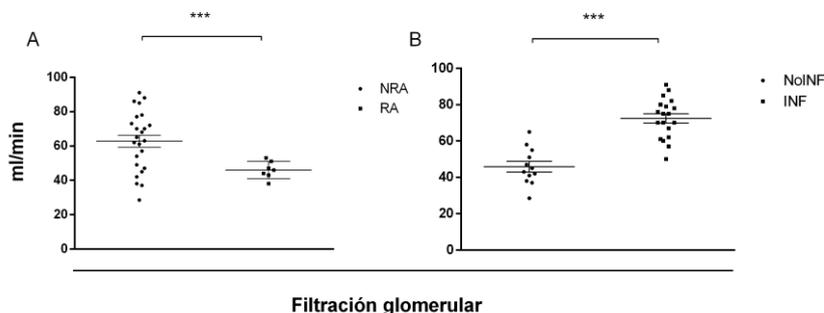


Figura 4.5: Filtración glomerular (ml/min) en receptores renales agrupados en función de (A) presencia/ausencia de RA y (B) presencia/ausencia de INF post-trasplante. *** $P<0.001$.

En cuanto al análisis del sexo del receptor, esta variable tampoco presentó diferencias significativas entre pacientes RA y NRA ($P=0.490$). Sin embargo de los receptores renales RA, el 85.7% eran hombres frente al 14.3% de mujeres. Del mismo modo, el sexo del receptor no presentó ninguna diferencia significativa entre pacientes con y sin INF post-trasplante ($P=0.435$). Sin embargo, de los pacientes que desarrollaron INF el 73.7% eran hombres frente al 26.3% de mujeres.

Los niveles de creatinina sérica (mg/dl) entre pacientes con y sin RA e INF tampoco presentaron diferencias significativas. Como se observa en la figura 4.5, la filtración glomerular (ml/min) entre pacientes RA (46.14 ± 1.90 vs 62.77 ± 3.55 , $P<0.001$)

fue significativamente menor que en el grupo NRA. Por el contrario, la filtración glomerular de pacientes INF (72.42 ± 2.52 vs 45.87 ± 2.90 , $P < 0.001$) fue significativamente mayor que en pacientes NoINF.

La dosis de TRL (mg/dl) no presentó diferencias significativas entre los pacientes RA y NRA ni INF. Sin embargo, la dosis de MMF (mg/ml) presentó diferencias significativas entre pacientes con y sin RA (2000 ± 0.01 vs 1745 ± 95.81 , $P = 0.014$) y así como también entre pacientes con y sin INF (1917.9 ± 58.9 vs 1620.0 ± 164.7 , $P = 0.05$).

En cuanto a la concentración basal de inmunosupresor dada como Cmin, el único que mostró diferencias significativas fue Cmin de MMF ($\mu\text{g/ml}$), donde los pacientes INF tenían niveles mayores que pacientes NoINF (3.80 ± 1.20 vs 1.07 ± 0.18 , $P = 0.05$).

Tabla 4.4. Características demográficas, clínicas y farmacocinéticas de los pacientes sometidos a trasplante renal

	Total (n=31)	NRA (n=24)	RA (n=7)	NoINF (n=12)	INF (n=19)
Edad del donante (media \pm SEM)	52.94 \pm 2.44	51.92 \pm 2.96	56.43 \pm 3.64	55.67 \pm 3.83	51.21 \pm 3.17
Edad del receptor (media \pm SEM)	51.48 \pm 2.01	49.63 \pm 2.49	57.86 \pm 2.65*	51.58 \pm 3.25	51.42 \pm 2.81
Sexo masculino (n, %)	24(77.4%)	18(75%)	6(25%)	10(41.7%)	14(58.3%)
Sexo femenino (n, %)	7(22.6%)	6(85.7%)	1(14.3%)	2(28.6%)	5(71.4%)
Incompatibilidad HLA-A (0/1/2)	2(6.5%)/17(54.8%)/12(38.7%)	2(8.3%)/13(54.2%)/9(37.5%)	0/4(57.1%)/3(42.9%)	1(8.3%)/6(50%)/5(41.7%)	1(5.3%)/11(57.9%)/7(36.8%)
Incompatibilidad HLA-B (0/1/2)	4(12.9%)/15(48.4%)/12(38.7%)	4(16.7%)/11(45.8%)/9(37.5%)	0/4(57.1%)/3(42.9%)	3(25%)/4(33.3%)/5(41.7%)	1(5.3%)/11(57.9%)/7(36.8%)
Incompatibilidad HLA-DR (0/1/2)	6(19.4%)/18(58.1%)/7(22.6%)	6(25%)/15(62.5%)/3(12.5%)	0/3(42.9%)/4(57.1%)	3(25%)/6(50%)/3(25%)	3(15.8%)/12(63.2%)/4(21.1%)
Sensibilización previa (Si/No)	7(22.6%)/24(77.4%)	7(29.2%)/17(70.8%)	0/7(100%)	4(33.3%)/8(66.7%)	3(15.8%)/16(84.2%)
Tiempo previo en diálisis (años)	3.81 \pm 0.40	4.04 \pm 0.49	3 \pm 0.49	3.67 \pm 0.54	3.89 \pm 0.57
Linfocitos totales (%)	23.08 \pm 0.77	17.36 \pm 0.91	24.69 \pm 11.74*	16.09 \pm 2.85	11.66 \pm 2.33
Linfocitos totales (células/mm ³)	1091.94 \pm 157.19	1149.58 \pm 198.25	894.29 \pm 149.01	1121.67 \pm 173.35	1073.16 \pm 235.68
Leucocitos ($\times 10^9$ /L)	9.96 \pm 0.94	7.934 \pm 2.16	9.22 \pm 4.50*	8.36 \pm 1.15	10.98 \pm 1.33
Filtración glomerular (ml/min)	65.56 \pm 2.94	62.77 \pm 3.55	46.14 \pm 1.90***	45.87 \pm 2.90	72.42 \pm 2.52***
Creatinina sérica (mg/dl)	5.98 \pm 0.38	5.92 \pm 0.44	6.18 \pm 0.83	6.22 \pm 0.60	5.83 \pm 0.51
Enfermedad de base:					
Insuficiencia Renal	16(51.6%)	13(54.2%)	3(42.9%)	5(41.7%)	11(57.9%)
Poliquistosis Renal	5(16.1%)	3(12.5%)	2(28.6%)	2(16.7%)	3(15.8%)
Nefroangioesclerosis	5(16.1%)	3(12.5%)	2(28.6%)	2(16.7%)	3(15.8%)
Nefropatía	5(16.1%)	5(20.8%)	0	3(25.0%)	2(10.5%)
Terapia de inducción (No/TG/CD25)	4(12.9%)/4(12.9%)/23(74.2%)	2(8.3%)/2(8.3%)/20(83.3%)	2(28.6%)/2(28.6%)/3(42.9%)	1(8.3%)/0/11(91.7%)	3(15.8%)/4(21.1%)/12(63.2%)
Terapia post-trasplante (TRL/MMF/TRL+MMF)	1(3.2%)/2(6.5%)/28(90.3%)	1(4.2%)/1(4.2%)/22(91.7%)	0/1(14.3%)/6(85.7%)	0/0/12(100%)	1(5.3%)/2(10.5%)/16(84.2%)
Terapia de mantenimiento (TRL/MMF/TRL+MMF)	2(6.5%)/2(6.5%)/27(87.1%)	1(4.2%)/1(4.2%)/22(91.7%)	1(14.3%)/1(14.3%)/5(71.4%)	0/0/12(100%)	2(10.5%)/2(10.5%)/15(78.9%)
Dosis TRL (mg/ml)	12.66 \pm 1.01	12.73 \pm 1.13	12.33 \pm 2.40	13.08 \pm 1.51	12.35 \pm 1.37
Dosis MMF (mg/ml)	1802.58 \pm 76.33	1745 \pm 95.81	2000 \pm 0.01*	1620 \pm 164.70	1917.89 \pm 58.87*
Cmin TRL (ng/ml)	8.35 \pm 1.47	8.41 \pm 1.57	8.10 \pm 5.61	10.54 \pm 1.98	6.53 \pm 1.97
Cmin MMF ($\mu\text{g/ml}$)	2.16 \pm 0.78	2.40 \pm 1.31	1.81 \pm 0.81	1.07 \pm 0.18	3.80 \pm 1.20*

Abreviaturas: NRA, no rechazo agudo; RA, rechazo agudo; NoINF, no infección oportunista post-trasplante; INF, infección oportunista post-trasplante; TG, Timoglobulina; CD25, inducción con anti-CD25; TRL, tacrolimus; MMF, micofenolato mofetilo; Cmin, concentración basal. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

4.1.2.1. Infecciones oportunistas en el periodo post-trasplante

En la figura 4.6 se representa la frecuencia y distribución de IFN, así como el tipo de INF a lo largo del post-trasplante que los receptores de injerto renal desarrollaron.

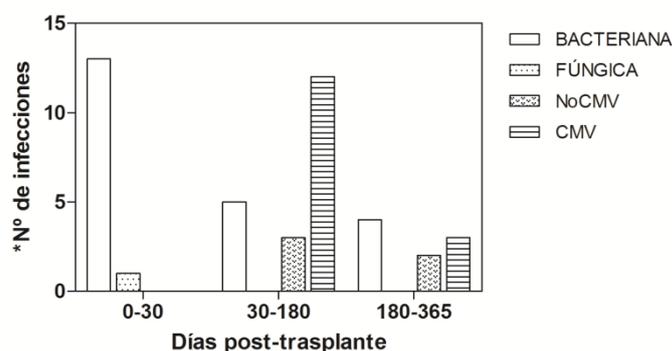


Figura 4.6: Frecuencia y distribución temporal del tipo de infección en el periodo post-trasplante. En blanco se representan las infecciones de tipo bacteriana; en blanco punteado las infecciones fúngicas; en moteado se representan las infecciones de tipo viral diferentes a CMV, entre ellas virus herpes-zoster (VHZ), virus herpes simple (VHS) y virus de Epstein-Bar (VEB) y en rayado horizontal las infecciones virales por citomegalovirus (CMV). *Hay que tener en cuenta que cada paciente puede haber presentado más de un tipo de infección en el mismo período.

Durante el primer mes post-trasplante, las INFs de los pacientes fueron en su mayoría de tipo bacteriana y fúngica al igual que en receptores hepáticos. Éstas fueron derivadas fundamentalmente del proceso quirúrgico. Entre el 1er y 6º mes post-trasplante, las INFs fueron en su mayoría de tipo viral, siendo más frecuentes las INFs por CMV, aunque también se produjeron infecciones bacterianas y virales, por otros virus que no fueron CMV como VEB, VEZ y VHS. Durante los últimos 6 meses de estudio se observó una reducción marcada en el número de INFs, aunque los agentes causantes fueron igualmente bacterias, CMV, VEB, VEZ y VHS.

Tabla 4.5. Relación entre infección post-trasplante, RA y NRA

Tipo de infección	NRA n (%)	RA n (%)
Bacteriana	17 (68%)	8 (32%)
Fúngica	1 (100%)	0 (0%)
Vírica	16 (94.1%)	1 (5.9%)
Ausencia	2 (16.7%)	10 (83.3%)*

Comparaciones entre los grupos mediante test exacto de Fisher, con corrección de Bonferroni. * $P < 0.05$.

En lo referente al estudio entre presencia/ausencia de IFN post-trasplante y la aparición de RA, los datos parecen demostrar una relación inversa entre la presencia de IFN y la aparición de RA. Entre los pacientes que sufrieron IFN de tipo bacteriano el 68% de los mismos no tuvieron RA, y el 32% sí. El único paciente que tuvo INF de tipo fúngica no presentó RA y de los pacientes que tuvieron INF viral post-trasplante, el

94.1% no presento RA frente al 5.9% que sí. Por el contrario, entre los pacientes NoIFN post-trasplante, el 83.3% sufrieron RA frente al 16.7% de los pacientes NRA ($P=0.045$).

4.1.2.2. Rechazo agudo y niveles de inmunosupresor en sangre periférica

En la figura 4.7 se muestra la frecuencia de RA de receptores renales durante el post-trasplante, agrupados en función de la severidad del mismo como leve, moderado y severo. Como se observa en el gráfico, la frecuencia de episodios de RA se concentra en el primer mes post-trasplante. En la misma figura se representan los niveles sanguíneos de MMF ($\mu\text{g/ml}$) a lo largo de la evolución post-trasplante, observándose de nuevo una relación inversa entre los niveles de MMF y la aparición de episodios de RA. Los niveles de MMF en SP de la población NRA fue aumentando paulatinamente durante el primer mes post-trasplante hasta niveles de $4.05 \mu\text{g/ml}$, para después ir disminuyendo gradualmente hasta el año post-trasplante a niveles de $2.98 \mu\text{g/ml}$. Del mismo modo, los niveles sanguíneos de MMF en la población RA aumentaron progresivamente hasta el segundo mes alcanzando niveles de $4.02 \mu\text{g/ml}$ para después disminuir de forma acusada hasta el sexto mes post-trasplante a niveles de $2.13 \mu\text{g/ml}$, volviendo a aumentar a niveles máximos de $4.88 \mu\text{g/ml}$. Como se observa en el gráfico, los niveles más bajos de inmunosupresión en el grupo RA coinciden con la aparición de episodios de RA durante el primer mes post-trasplante. Por el contrario los niveles de MMF en pacientes NRA fueron significativamente superiores a los niveles en la población RA (3.24 ± 0.39 vs 2.02 ± 0.43 , $P=0.049$) a los siete días post-trasplante. Del mismo modo, los niveles de MMF en el grupo RA fueron significativamente mayores a los del grupo NRA al año post-trasplante (4.88 ± 1.41 vs 2.98 ± 0.43 , $P=0.01$). Como se observa en la figura 4.6, es durante los últimos seis meses cuando los pacientes desarrollaron una mayor incidencia de INFs de origen viral y menor frecuencia de episodios de RA.

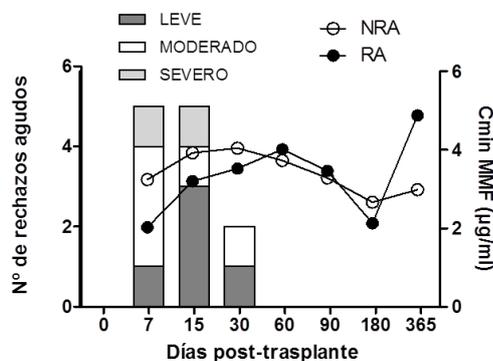


Figura 4.7. Distribución temporal de los episodios de rechazo agudo (RA) y su severidad (leve, moderada y severa) de los pacientes receptores renales.

En gris oscuro se representa el nivel leve de RA, en blanco el nivel moderado y en gris claro el nivel severo (barras). Niveles de micofenolato (MMF) en SP (líneas), en pacientes del grupo RA (negro) y NRA (blanco).

En la figura 4.8 se muestra la frecuencia de episodios de RA en función de la severidad (leve, moderado y severo) en el post-trasplante de receptores renales junto con los niveles sanguíneos de TRL (ng/ml). Como en el caso anterior, el mayor número de episodios de RA se concentran en el primer mes post-trasplante. En la misma figura están representados los niveles sanguíneos de TRL (ng/ml) para ambos grupos de pacientes RA y NRA. Los niveles de TRL en el grupo NRA presentaron un pico máximo de 10.71 ng/ml a los 15 días post-trasplante para después ir disminuyendo progresivamente hasta alcanzar niveles de 7.06 ng/ml. Los niveles de TRL en el grupo Ra fueron aumentando hasta niveles de 12.08 ng/ml durante el primer mes, para después disminuir hasta alcanzar niveles mínimos de 6.42 ng/ml. Como se observa en la figura 4.8, los menores niveles de inmunosupresión durante los primeros quince días post-trasplante coincidieron con un incremento en la frecuencia de episodios de RA, siendo la diferencia a los quince días post-trasplante cercana a la significación estadística (NRA: 10.70 ± 0.68 vs RA: 8.23 ± 0.88 , $P=0.089$). Cabe destacar que en el grupo RA se produce un incremento de los niveles sanguíneos de TRL al mes post-trasplante, coincidiendo con una disminución en el número de episodios de RA siendo la diferencia en los niveles de TRL entre ambos grupos estadísticamente significativa (NRA: 9.71 ± 0.53 vs RA: 12.08 ± 0.87 , $P=0.044$).

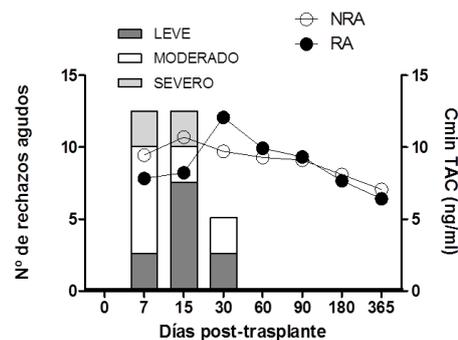


Figura 4.8. Distribución temporal de los episodios de rechazo agudo (RA) y su severidad (leve, moderada y severa) de los receptores renales. En gris oscuro se representa el nivel leve de RA, en blanco el moderado y en gris claro el severo (barras). Niveles de tacrolimus (TRL) en SP (líneas), en pacientes RA (negro) y NRA (blanco).

4.2. Poblaciones celulares en sangre periférica previos al trasplante de pacientes con enfermedad hepática y renal terminal

En este trabajo de tesis se ha estudiado la expresión de diferentes moléculas (citocinas), marcadores celulares y subpoblaciones linfocitarias reguladoras, con el fin de determinar su potencial papel como biomarcadores farmacodinámicos específicos que predigan el riesgo para un determinado paciente de desarrollar RA, INF, o en el caso de receptores hepáticos, recidiva de VHC, tanto en el período pre- como post-trasplante. Para ello se desarrollaron cuatro paneles diferentes para abordar los distintos objetivos planteados en este trabajo. El papel potencial de las citocinas como biomarcador fue estudiado tanto en linfocitos T CD4⁺ como linfocitos T CD8⁺ usando dos paneles distintos. Por un lado, se determinó la expresión intracitoplasmática de IL-2, IFN γ , IL-10 e IL-17 en linfocitos T mediante marcaje por CF, y en segundo lugar se valoró la expresión soluble de citocinas en sobrenadantes mediante ELISA tras estimulación *in vitro* de IL-10, IL-17, TGF β e IFN γ . La expresión intracitoplasmática de citocinas se midió como % de expresión media de cada citocina (IMF) y la expresión de citocinas solubles se midió como ng/ μ l. Con estos dos paneles se ha intentado abarcar las principales moléculas solubles efectoras de la inmunidad celular adaptativa que intervienen en la alorespuesta inmunitaria específica contra el injerto en términos de respuesta inflamatoria (IL-2, IL-17 e IFN γ), así como en términos de supresión de la misma (IL-10 y TGF β). El tercer panel que se realizó en esta tesis fue la expresión en superficie celular de determinados marcadores celulares (CD25, CD28, CD38, CD69, CD95 y CD154) sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. La expresión de CD28 se midió como % de MFI, calculándose además el número de moléculas CD28 en superficie de linfocitos T CD4⁺ en términos de cifras absolutas. La expresión de CD25, CD38, CD69, CD95 y CD154 se midió cómo % de expresión media y como IMF. Por último, también se monitorizó el número de linfocitos aTreg y nTreg CD4⁺CD25^{high} para valorar su posible papel como biomarcador específico de respuesta contra el injerto. Los resultados se obtuvieron como porcentaje (%) de expresión y en cifras absolutas.

4.2.1. Poblaciones leucocitarias y linfocitarias totales en SP de receptores

4.2.1.1. Leucocitos totales en trasplante hepático y renal

La medición, durante el periodo de estudio y de forma rutinaria, de los leucocitos totales (leucocitos $\times 10^9/\text{ml}$) se realizó mediante *coulter* sobre SP total para cada muestra extraída, tanto a los receptores hepáticos como renales de nuestra serie. Dichos valores fueron comparados entre los diferentes grupos de estudio.

4.2.1.1.1. Leucocitos totales ($\times 10^9/\text{ml}$) en receptores hepáticos:

Como se observa en la figura 4.9, la población de leucocitos en cifras absolutas entre los diferentes grupos de estudio no presentó diferencias significativas, excepto en el caso de pacientes IFN post-trasplante de origen no vírico, donde se observó un aumento significativo en el número de leucocitos en comparación con pacientes NoINF y IFN post-trasplante de origen vírico. (Figura 4.9C; 11142 ± 6888.57 vs 6292.50 ± 1895.58 , $P=0.034$; 11142 ± 6888.57 vs 5223 ± 2680.62 , $P=0.029$; respectivamente). También se observaron diferencias significativas entre pacientes VHC con respecto a receptores NVHC (Fig.4.9D; 5670 ± 1647.81 vs 7108.30 ± 1212.36 , $P=0.01$). Se podría inferir que la respuesta leucocitaria en los receptores hepáticos fue elevada en receptores INF de origen bacteriano y fúngica, y que esta respuesta es muy débil en INFs de etiología vírica.

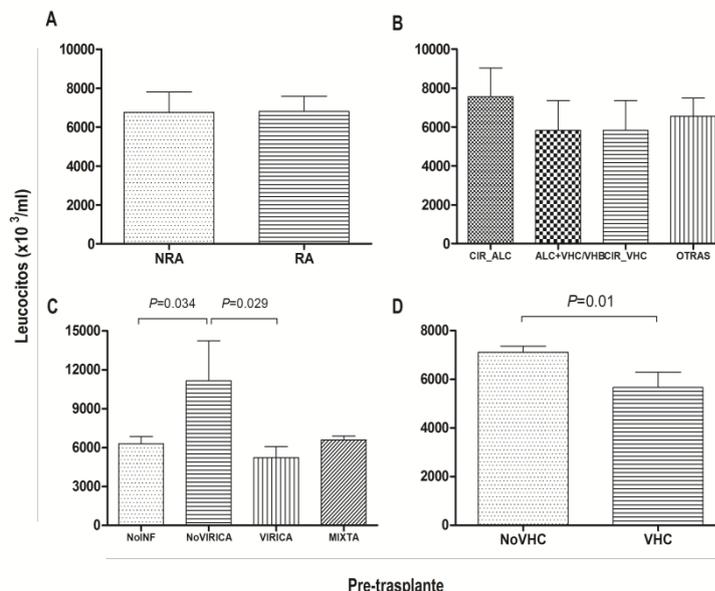


Figura 4.9: Cifras absolutas de leucocitos en sangre periférica de receptores hepáticos en pre-trasplante. Niveles de leucocitos ($\times 10^9/\text{ml}$) en (A) pacientes sin episodio de rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); (B) en pacientes con cirrosis alcohólica (CIR_ALC), cirrosis por virus hepatitis C (CIR_VHC), cirrosis alcohólica + infección por virus de hepatitis C o B (ALC+VHC/VHBCIR_VHC) y con otras enfermedades hepáticas de base; (C) en pacientes con ausencia de infección oportunista post-trasplante: NoINF, NoVIRICA, VIRICA, y MIXTA; (D) en pacientes con ausencia de infección oportunista post-trasplante: NoVHC y VHC.

trasplante (NoINF), con infección bacteriana o fúngica (NoVIRICA), con infección por CMV (VÍRICA), por infección bacteriana y/o fúngica con CMV (MIXTA); (D) en pacientes sin recidiva de virus de hepatitis C (NVHC) y con recidiva de virus de hepatitis C (VHC). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio se indican en cada gráfico. Los valores de leucocitos ($\times 10^9/\text{ml}$) están representados como media \pm SEM.

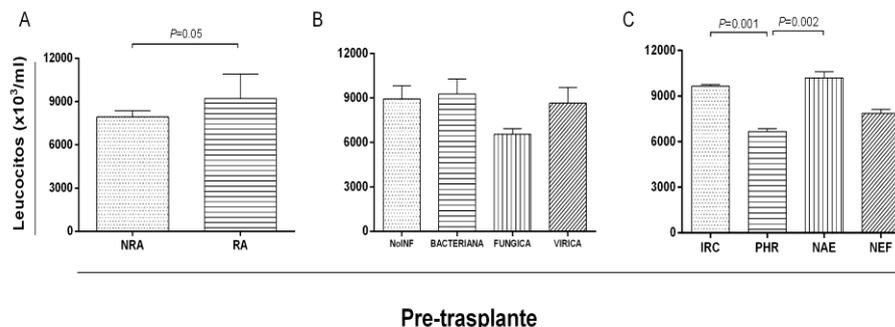


Figura 4.10: Cifras absolutas de leucocitos en SP de receptores renales en pre-trasplante. (A) Niveles de leucocitos de SP ($\times 10^9/\text{ml}$) en el grupo NRA y RA; (B) Niveles de leucocitos de SP ($\times 10^9/\text{ml}$) en el grupo de pacientes NoINF, pacientes con infección de origen bacteriana, pacientes con infección de fúngica y pacientes con infección de origen vírico y (C) Niveles de leucocitos de SP ($\times 10^9/\text{ml}$) en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), poliquistosis hepato-renal (PHR), nefroangioesclerosis (NAE) y nefropatía (NEF). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico. Los valores de leucocitos ($\times 10^9/\text{ml}$) están representados como media \pm SEM.

4.2.1.1.2. Leucocitos totales ($\times 10^9/\text{ml}$) en receptores renales:

Como se observa en la figura 4.10, las cifras absolutas de leucocitos totales fueron significativamente mayores en la población RA en comparación con el grupo NRA (Fig.4.10A; 9221.2 ± 4503.74 vs 7933.7 ± 2157.15 , $P=0.05$). Del mismo modo, la población de leucocitos no mostró significación entre los grupos INF y NoINF (Fig.4.10B).

Por otro lado, los niveles de leucocitos de pacientes con poliquistosis hepatorenal fueron significativamente menores que los niveles observados en pacientes con insuficiencia renal crónica (Fig.4.10D; 6678.30 ± 407.90 vs 9652.9 ± 398.63 , $P=0.001$) y con nefroangioesclerosis (Fig.4.10C; 6678.30 ± 407.90 vs 10183.6 ± 964.83 , $P=0.002$).

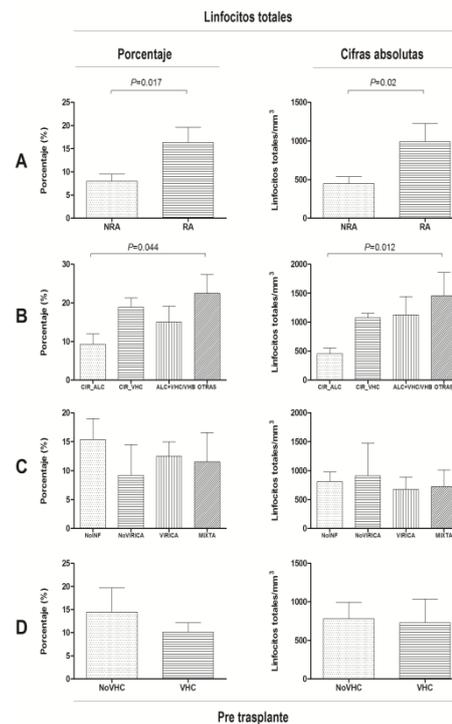


Figura 4.10: Porcentaje y cifras absolutas de los linfocitos totales en sangre periférica en receptores hepáticos en pre-trasplante. En la columna de la izquierda se representa la frecuencia (%) de los linfocitos totales y en la columna de la derecha los valores en cifras absolutas (linfocitos $\times 10^3/\mu\text{l}$) de (A) pacientes sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); (B) con cirrosis alcohólica (CIR_ALC), cirrosis por virus hepatitis C (CIR_VHC), cirrosis alcohólica + infección por virus de hepatitis C o B (ALC+VHC/VHB) y otras enfermedades de base; (C) con ausencia de infección oportunista (NoINF), con infección bacteriana o fúngica (NoVIRICA), con infección por CMV (VIRICA), por infección bacteriana y/o fúngica con CMV (MIXTA) y (D) pacientes sin recidiva de VHC (NVHC) y con recidiva de VHC (VHC). Las diferencias significativas entre cada grupo se indican en cada gráfico. Los valores de linfocitos totales tanto en % como en cifras absolutas están representados como media \pm SEM.

4.2.1.2. Linfocitos totales en trasplante hepático y renal

Durante el periodo de estudio se midieron las cifras de linfocitos totales, tanto en porcentaje (%) como en cifras absolutas (linfocitos totales $\times 10^3/\mu\text{l}$) en los pacientes de nuestra serie. Las mediciones de linfocitos totales se obtuvieron tanto en situación pre-trasplante como durante el periodo post-trasplante. El recuento linfocitario tanto en porcentaje como en cifras absolutas fue comparado entre los diferentes grupos de estudio.

4.2.1.2.1. Frecuencia y cifras absolutas de linfocitos en receptores hepáticos:

La población de linfocitos totales, tanto en porcentaje (%) como cifras absolutas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de pacientes RA fue significativamente mayor que pacientes NRA (Fig.4.10A; 16.33 ± 2.68 vs 7.98 ± 1.89 , $P=0.017$; 993.33 ± 190.92 vs 448.33 ± 107.86 , $P=0.020$).

Los pacientes que presentaron como indicación al trasplante cirrosis biliar primaria, hepatocarcinoma o síndrome de Budd-Chihari presentaron un porcentaje de linfocitos mayor que los pacientes que tuvieron como enfermedad de base cirrosis alcohólica (Fig.3.10B; 22.52 ± 4.86 vs 9.27 ± 2.70 , $P=0.044$). Los niveles de linfocitos en cifras absolutas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de pacientes con cirrosis biliar 1ª, hepatocarcinoma o síndrome de Budd-Chihari fueron significativamente mayores que en pacientes con cirrosis alcohólica (Fig.3.10B; 1456.67 ± 399.20 vs 458.33 ± 95.21 , $P=0.012$).

Como se observan en las figuras 4.10C y 4.10D, el recuento de linfocitos totales periféricos entre pacientes INF y NoINF, así como recidiva por VHC no presentó diferencias estadísticamente significativas.

4.2.1.2.2. Frecuencia (%) y cifras absolutas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) de linfocitos totales en receptores renales:

En la figura 4.11 se encuentran representados los niveles de linfocitos totales de SP de receptores renales en pre-trasplante. Tanto el porcentaje como las cifras absolutas en pacientes RA fueron mayores que los niveles de pacientes NRA, aunque únicamente el % presentó diferencias significativas (Fig.4.11A; 24.69 ± 11.74 vs 17.36 ± 9.91 , $P=0.017$).

Tanto el porcentaje como las cifras absolutas de linfocitos totales de pacientes que presentaron poliquistosis hepatorrenal como indicación al trasplante fueron menores que los niveles de los pacientes con insuficiencia renal crónica, nefroangioesclerosis y nefropatía. La diferencia en los niveles linfocitarios entre estos grupos de estudio fue más acusada en cifras absolutas, siendo la diferencia entre los pacientes con poliquistosis e insuficiencia renal crónica estadísticamente significativa (Fig.4.11B; 1194 ± 572.18 vs 2924.90 ± 233.77 , $P<0.001$). Como se muestra en la figura 4.11C, el porcentaje de linfocitos en pacientes NoINF fue significativamente mayor que el de los pacientes con INF bacteriana (31.35 ± 9.16 vs 18.40 ± 2.61 , $P=0.0002$), fúngica (31.35 ± 9.16 vs 17.46 ± 3.45 , $P=0.04$) y viral (31.35 ± 9.16 vs 26.25 ± 2.22 , $P=0.003$). Tanto el porcentaje como las cifras absolutas de linfocitos totales en pacientes con INF bacteriana fueron significativamente inferiores a los niveles en pacientes con infección viral (18.40 ± 2.61 vs 26.25 ± 2.22 , $P=0.01$ y 1744 ± 192.97 vs 2541.18 ± 304.63 , $P=0.025$; respectivamente). Las cifras absolutas de linfocitos en pacientes NoINF fueron significativamente mayores que en pacientes con INF bacteriana (2467.58 ± 168.26 vs 1744 ± 192.97 , $P=0.006$).

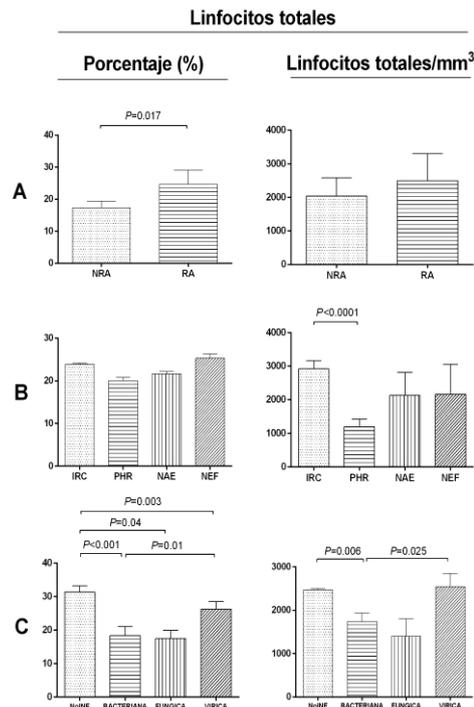


Figura 4.11: Porcentaje y cifras absolutas de los linfocitos totales en sangre periférica en receptores renales en pre-trasplante. En la columna de la izquierda se representan la frecuencia (%) de los linfocitos totales y en la columna de la derecha los valores en cifras absolutas (linfocitos $\times 10^3/\mu\text{l}$) de (A) pacientes sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); (B) pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), con poliquistosis hepatorenal (PHR), con nefroangioesclerosis (NAE) y con nefropatía (NEF) y (C) pacientes sin infección oportunista post-trasplante (NoINF), con infección bacteriana (BACTERIANA), fúngica (FUNGICA) y vírica (VÍRICA). Las diferencias significativas entre cada grupo se indican en cada gráfico. Los valores de linfocitos totales tanto en % como en cifras absolutas están representados como media \pm SEM.

4.2.2. Evaluación pre-trasplante de la capacidad productora de citocinas intracitoplasmática en eceptores hepáticos y renales

La producción de las citocinas IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ estudiadas en esta memoria se obtuvieron mediante la realización de un ensayo funcional *in vitro* midiendo la expresión intracitoplasmática de las mismas por CF. La expresión de dichas citocinas se midió a partir de muestras de SP recogidas en el momento previo al trasplante (día 0) y a los días 7, 15, 30, 60, 90, 180 días y un año post-trasplante. Los valores obtenidos fueron comparados entre los distintos grupos de estudio.

En este primer estudio se ha evaluado el potencial uso de la expresión intracitoplasmática de citocinas en situación pre-trasplante como biomarcador predictivo para la estratificación de pacientes como alto riesgo de sufrir evento clínico y por tanto de predecir la aparición de RA, INF y VHC en receptores. Las subpoblaciones celulares fueron caracterizadas como linfocitos T CD3⁺CD4⁺CD69⁺IL-2⁺, CD3⁺CD4⁺CD69⁺IL-

10⁺, CD3⁺CD4⁺CD69⁺IL-17⁺, CD3⁺CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺IL-2⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺IL-10⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ y CD3⁺CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ por CF. Los resultados se representan en histogramas de frecuencias como la media \pm SEM del porcentaje (%) de la IMF para cada citocina. Las diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes, o de éstos con el grupo control se representan en cada gráfico así como en el texto.

4.2.2.1. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de receptores hepáticos y RA

En la figura 4.12 se muestra la expresión de las citocinas en pre-trasplante de receptores hepáticos con y sin RA, así como del grupo control. En primer lugar, la expresión intracitoplasmática de IL-2 en el grupo RA fue significativamente mayor en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ en comparación con la observada en el grupo NRA (Fig. 4.12B; 39.36 \pm 5.27 vs 14.31 \pm 1.93, P <0.001). La expresión de IL-2 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ aunque no presentó significación entre ambos grupos de estudio, presentó la misma tendencia que en el caso anterior (Fig. 4.12A; 19.28 \pm 1.31 vs 15.46 \pm 1.99, P =0.121).

Por otro lado, la expresión intracitoplasmática de IFN γ fue significativamente mayor en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ de pacientes RA en comparación con los pacientes NRA (Fig. 4.12C; 21.55 \pm 2.07 vs 8.51 \pm 1.47, P <0.001); sin embargo los niveles de IFN γ en la población de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Fig. 4.12D; 30.62 \pm 1.98 vs 24.66 \pm 2.61, P =0.108).

Con respecto a la expresión intracitoplasmática de IL-10, tanto linfocitos T CD4⁺CD69⁺ (Fig. 4.12E; 10.46 \pm 1.41 vs 12.38 \pm 1.58, P =0.404) como CD8⁺CD69⁺ (Fig. 4.12F; 17.47 \pm 3.49 vs 13.36 \pm 1.57, P =0.293) no mostraron diferencias significativas entre pacientes RA y NRA.

La expresión intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de pacientes RA fue significativamente mayor (Fig. 4.12H; 13.51 \pm 2.03 vs 4.81 \pm 0.71, P <0.001) que en NRA. Esta expresión en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ no mostró diferencias entre ambos grupos (Fig. 4.12G; 3.17 \pm 0.60 vs 2.01 \pm 0.47, P =0.133).

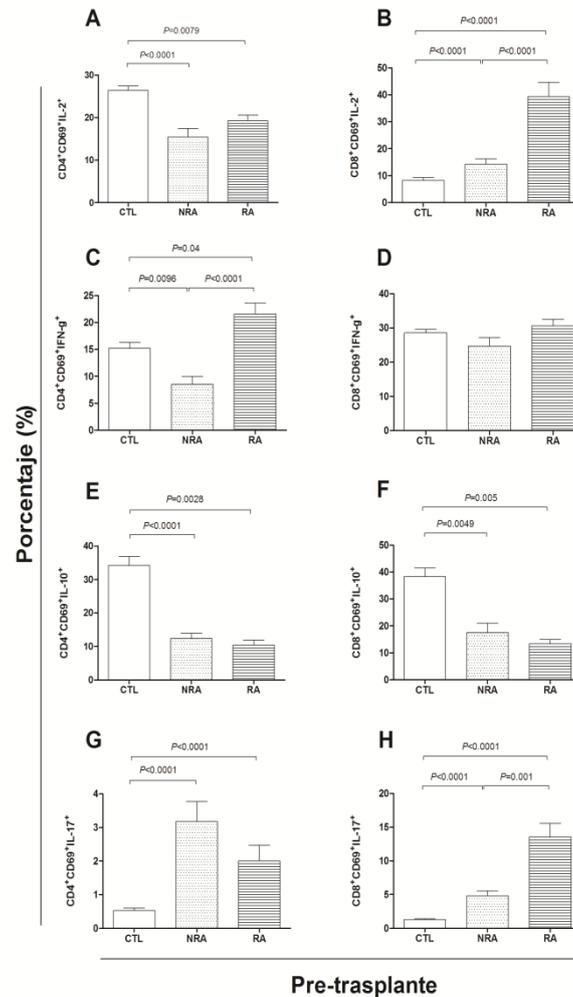


Figura 4.12. Expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores hepáticos en pre-trasplante. (A) % CD4⁺CD69⁺IL-2⁺ en individuos sanos (CTL), pacientes NRA y RA; (B) % CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (C) % CD4⁺CD69⁺IFN-γ⁺ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (D) % CD8⁺CD69⁺IFN-γ⁺ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (E) % CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (F) CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (G), CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (H) CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ en individuos CTL, pacientes NRA y RA.

En cuanto a la expresión de citocinas intracitoplasmáticas entre ambos grupos de pacientes y el grupo control, se observó que la población de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-2⁺ fue significativamente mayor en los controles en comparación con el grupo NRA (Fig. 4.12A; 26.43±8.92 vs 15.46±1.99, $P < 0.001$), así como también con el grupo RA (Fig. 4.12A; 26.43±8.92 vs 19.28±1.31, $P = 0.0079$). La expresión intracitoplasmática de IL-2 en la población de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ fue significativamente inferior en los controles en comparación con ambos grupos de pacientes, NRA (Fig. 4.12B; 8.27±0.95 vs 14.31±1.93, $P < 0.001$) y RA (Fig. 4.12B; 8.27±0.95 vs 39.36±5.27, $P < 0.001$). La expresión de CD4⁺CD69⁺IFN-γ⁺ en la población control fue significativamente mayor que en pacientes NRA (Fig. 4.12C; 15.18±10.30 vs 8.51±6.22, $P = 0.0096$); sin embargo fue

significativamente menor que pacientes RA (Fig. 4.12C; 15.18 ± 10.30 vs 21.55 ± 7.16 , $P=0.04$). La expresión intracitoplasmática de IFN γ tanto en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ como CD8⁺CD69⁺ no mostró diferencias significativas entre el grupo control y ambos grupos de pacientes. La expresión de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ del grupo control fue significativamente mayor tanto en pacientes NRA (Fig. 4.12E; 34.3 ± 24.47 vs 10.46 ± 1.41 , $P < 0.001$; Fig. 4.12F; 38.33 ± 29.88 vs 17.47 ± 14.81 , $P=0.0049$) como RA (Fig. 4.12E; 34.30 ± 24.47 vs 12.38 ± 1.58 , $P=0.0028$; Fig. 4.12F; 38.33 ± 29.88 vs 13.36 ± 5.43 , $P=0.005$). Por último, la expresión intracitoplasmática de IL-17 tanto en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ como CD8⁺CD69⁺ del grupo control fue significativamente menor en comparación con ambos grupos, NRA (Fig. 4.12G; 0.53 ± 0.07 vs 3.18 ± 2.53 , $P < 0.001$; Fig. 4.12H; 1.25 ± 0.18 vs 4.81 ± 0.71 , $P < 0.001$) y RA (Fig. 4.12G; 0.53 ± 0.07 vs 2.01 ± 1.63 , $P < 0.001$; Fig. 4.12H; 1.25 ± 0.18 vs 13.51 ± 2.03 , $P < 0.001$).

- **Puntos de corte (cut-off) para la expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores hepáticos con rechazo agudo en situación pre-trasplante**

Los valores de corte (cut-off) para la estratificación de los pacientes como alto o bajo riesgo de aparición de episodios de RA fue determinada con el área bajo curva (AUC, del inglés *'area under curve'*) del análisis ROC (del inglés *'Receiver Operating Characteristic'*) y aplicando el índice J de Youden [sensibilidad + (1-especificidad)] para cada biomarcador que presentó diferencias significativas en el apartado anterior. Los valores de % de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, % de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y % de IL-17 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ fueron capaces de discriminar de forma precisa a receptores hepáticos como alto riesgo de desarrollar RA (Figura 4.13). El punto de corte para las distintas citocinas que mejor discriminó a receptores hepáticos como alto riesgo de desarrollar RA junto con las sensibilidades y especificidades se ven en la tabla 4.6.

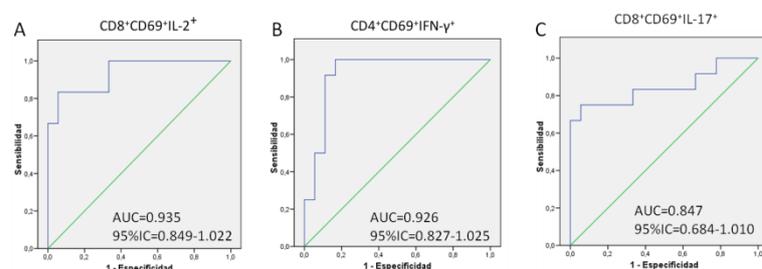


Figura 4.13. Curvas ROC con los valores de corte (cut-off) capaces de discriminar a receptores hepáticos con y sin rechazo agudo en pre-trasplante. Valores de AUC para (A) % de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, (B) % de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y (C) % de IL-17 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺.

- Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IL-2 superior a 26% en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos (Fig.4.13A; AUC=0.935, 95%IC=0.849-1.022; $P<0.001$) fue capaz de discriminar a los pacientes como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo para la estratificación de pacientes en función de la expresión intracitoplasmática de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, clasificándolos como bajo riesgo de RA cuando los niveles de IL-2<26% o como alto riesgo de RA cuando los niveles de IL-2≥26%. El 63.34% de los pacientes fueron clasificados como bajo riesgo de desarrollar RA con un % de IL-2<26%, de los cuáles el 89.47% de los pacientes no desarrolló RA, mientras que el 10.53% de los pacientes desarrolló RA a pesar de haber sido clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 36.66% de los pacientes fue clasificado como alto riesgo de RA con un % de IL-2≥26%, de los cuáles el 90.91% desarrolló RA, mientras que el 9.09% de los pacientes no desarrolló RA a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.58-97.42; especificidad=94.44%, 95%IC=72.63-99.07; $P<0.001$).

- Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFNγ⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IFNγ > 13.35% en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos (Fig.4.13B; AUC=0.926, 95%IC=0.827-1.025; $P<0.001$) fue capaz de discriminar a los pacientes como alto riesgo de RA. El 50% de los pacientes fueron clasificados como bajo riesgo de desarrollar RA con un % de IFNγ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺<3.35%, de los cuáles el 100% no desarrollaron RA. El 50% de pacientes restante fue clasificado dentro del grupo de alto riesgo de RA con un % de IFNγ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺≥13.35%, de los cuales el 80% de los pacientes tuvo RA, mientras que el 20% de los pacientes no tuvo RA a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=100%, 95%IC=73.35-100; especificidad=83.33%, 95%IC=58.56-96.23; $P<0.001$).

- Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IL-17 \geq 10.04% en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos (Fig.4.13D; AUC=0.847, 95%IC=0.684-1.010; $P=0.001$) fue capaz de discriminar a los pacientes como alto riesgo de RA. El 66.67% de los pacientes fueron clasificados como bajo riesgo de sufrir RA con niveles intracitoplasmáticos de IL-17 < 10.04%, de los cuales el 85% de los pacientes no tuvo RA, mientras que el 15% de los pacientes tuvo RA a pesar de haber sido clasificado dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 33.33% de los pacientes fueron clasificados como alto riesgo de RA con niveles intracitoplasmáticos de IL-17 \geq 10.04%, de los cuales el 90% de los pacientes tuvo RA, mientras que el 10% de los pacientes restantes no tuvo Ra a pesar de haber sido clasificado dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=75%, 95%IC=42.84-94.22; especificidad=94.44%, 95%IC=72.63-99.07; $P=0.00013$).

Tabla 4.6. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores hepáticos como alto riesgo de desarrollar rechazo agudo.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Rechazo agudo</i>				
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺	25.99	0.935 (0.849-1.022)	83.33 (51.58-97.42)	94.44 (72.63-99.07)
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	13.35	0.926 (0.827-1.025)	100 (73.35-100)	83.33 (58.56-96.23)
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	10.04	0.847 (0.684-1.010)	75 (42.84-94.22)	94.44 (72.63-99.07)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de rechazo agudo basado en el logit RA**

Tras haber estudiado qué citocinas discriminaron mejor a los receptores hepáticos como alto riesgo de desarrollar RA, se obtuvo el logit RA ($e^{\text{logit RA}} / 1 + e^{\text{logit RA}}$) para cada biomarcador de forma individual. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron los coeficientes necesarios para poder calcular el logit RA. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA y como variable predictiva el nivel de expresión (%) de IL-2, IL-17 e IFN γ sobre linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular el logit de RA para la expresión intracitoplasmática de IL-2, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ se indican en tabla 4.7.

- Predicción de rechazo agudo basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática pre-trasplante de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ predijo que del grupo NRA, el 94.44% no desarrollarían RA, mientras en el 5.56% de los pacientes se predijo presencia de RA a pesar de que no lo desarrollaron. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo RA, el 83.33% de los pacientes desarrollarían RA, mientras que en el 16.67% de los pacientes restantes, el modelo predijo ausencia de RA a pesar de que sí tuvieron RA (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.58-97.42; especificidad=94.44%, 95%IC=72.63-99.07; OR=1.242, 95%IC=1.055-1.462; *P*=0.009).

- Predicción de rechazo agudo basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFNγ⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática pre-trasplante de IFNγ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ predijo que del grupo NRA, no rechazarían el 88.89% de los pacientes, mientras que en el 11.11% restante el modelo predijo presencia de RA a pesar de que no desarrollaron evento alguno. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo RA, el 83.34% desarrollarían RA, mientras que 16.66% de pacientes restante no tendrían RA a pesar de haberlo sufrido (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.58-97.42; especificidad=88.89%, 95%IC=65.25-98.30; OR=1.368, 95%IC=1.093-1.713; *P*=0.006).

- Predicción de rechazo agudo basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática pre-trasplante de IL-17 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ predijo que del grupo NRA, no rechazarían el 72.22% de los pacientes, mientras que en el 27.78% de pacientes restante, el modelo predijo presencia de RA a pesar de no haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo RA, el 75% desarrollaría RA, mientras que el 25% restante no tendrían RA a pesar de haberlo desarrollado (sensibilidad=75%, 95%IC=42.84-94.22; especificidad=72.22%, 95%IC=46.53-90.20; OR=1.388, 95%IC=1.096-1.758; *P*=0.006).

Tabla 4.7. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de rechazo agudo en situación pre-trasplante en función de la expresión intracitoplasmática de IL-2, IFN γ e IL-17 en linfocitos T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ de receptores hepáticos.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
CD8 $^+$ CD69 $^+$ IL-2 $^+$	0.2165	6.776	1.242 (1.055-1.462)	83.33 (51.58-97.42)	94.44 (72.63-99.07)	0.009
Constante	-5.6009					
Logit RA = -5.6009 + (CD8 $^+$ CD69 $^+$ IL-2 $^+$ x 0.2165)						
CD4 $^+$ CD69 $^+$ IFN γ $^+$	0.3134	7.478	1.368 (1.093-1.713)	83.33 (51.58-97.42)	88.89 (65.25-98.30)	0.006
Constante	-4.9342					
Logit RA = -4.9342 + (CD4 $^+$ CD69 $^+$ IFN γ $^+$ x 0.3134)						
CD8 $^+$ CD69 $^+$ IL-17 $^+$	0.3279	7.418	1.388 (1.096-1.758)	75.00 (42.84-94.22)	72.22 (46.53-90.20)	0.006
Constante	-3.1094	-	-	-	-	-
Logit RA = -3.1094 + (CD8 $^+$ CD69 $^+$ IL-17 $^+$ x 0.3279)						

La fórmula para el logit de RA derivada de los coeficientes del modelo también se muestra. El logit de RA puede ser utilizado para predecir la probabilidad de rechazo agudo con la fórmula $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$.

4.2.2.2. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$ y CD8 $^+$ CD69 $^+$ de receptores renales y su relación con rechazo agudo

En la figura 4.14 se ha representado la expresión intracitoplasmática de citocinas en situación previa al trasplante de receptores renales RA y NRA.

La expresión intracitoplasmática de IL-2, tanto en linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$ como en T CD8 $^+$ CD69 $^+$ fue mayor en el grupo RA comparado con pacientes NRA; sin embargo únicamente se observaron diferencias significativas en los niveles intracitoplasmáticos de IL-2 en linfocitos T CD8 $^+$ CD69 $^+$ (Fig.4.14B; 20.06 \pm 1.63 vs 11.41 \pm 1.03, $P=0.001$).

La expresión intracitoplasmática de IFN γ fue significativamente mayor en el grupo RA en ambas poblaciones linfocitarias, CD4 $^+$ CD69 $^+$ (Fig.4.14C; 33.83 \pm 3.00 vs 16.51 \pm 1.59, $P<0.001$) y CD8 $^+$ CD69 $^+$ (Fig.4.14D; 49.48 \pm 3.79 vs 24.62 \pm 2.30, $P=0.0001$), en comparación con los niveles de pacientes NRA.

La expresión intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$ y CD8 $^+$ CD69 $^+$ no presentó diferencias significativas entre ambos grupos (Fig.4.14G; 19.09 \pm 6.61 vs 12.59 \pm 2.67, $P=0.532$ y Fig.4.14H; 14.59 \pm 4.26 vs 13.29 \pm 1.77, $P=0.764$; respectivamente).

En cuanto a la expresión intracitoplasmática de citocinas entre el grupo control y los pacientes; los niveles de IL-2 en linfocitos T CD8 $^+$ CD69 $^+$, IL-17 en ambas poblaciones linfocitarias e IFN γ en linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$ fueron significativamente mayores en el grupo RA en comparación con el grupo control. Del mismo modo, los niveles de IL-2 en linfocitos T CD8 $^+$ CD69 $^+$ e IL-17 en ambas poblaciones linfocitarias,

fueron significativamente mayores en el grupo NRA en comparación con la población control. Por el contrario, los niveles de IL-10 tanto en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ como $CD8^+CD69^+$ de la población control fueron significativamente mayores que los niveles del grupo RA. Por último, los niveles de IL-10 del grupo control para ambas poblaciones de linfocitos T fueron significativamente mayores en comparación con el grupo NRA.

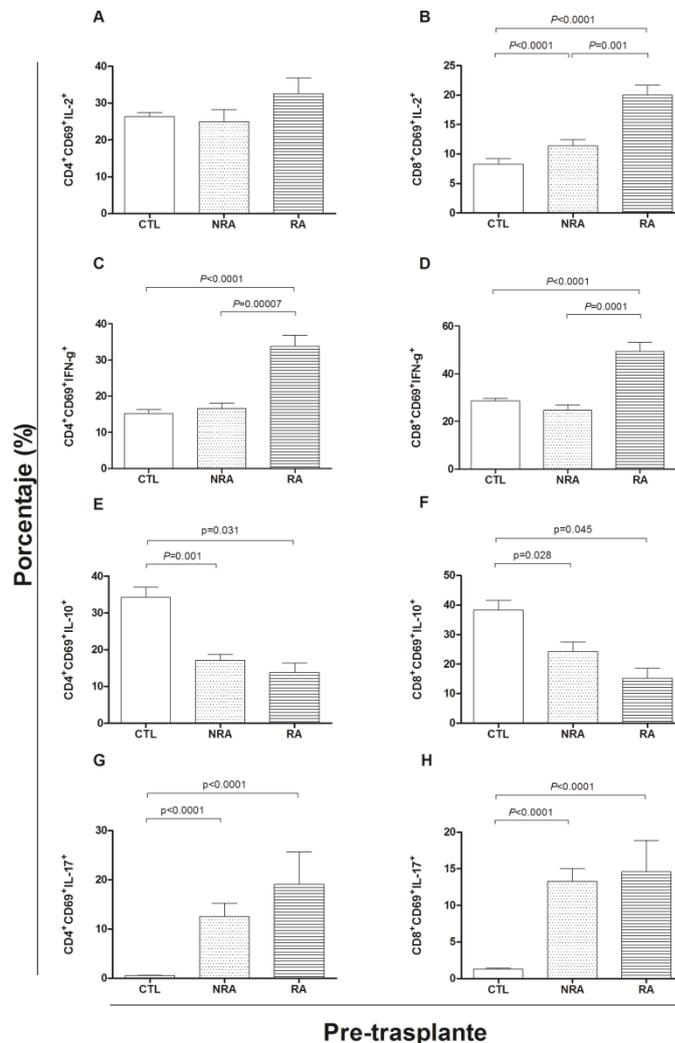


Figura 4.14. Expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores renales en pre-trasplante. (A) % $CD4^+CD69^+IL-2^+$ en individuos sanos (CTL), pacientes sin rechazo agudo (NRA) y pacientes con rechazo agudo (RA); (B) % $CD8^+CD69^+IL-2^+$ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (C) % $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (D) % $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (E) % $CD4^+CD69^+IL-10^+$ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (F) % $CD8^+CD69^+IL-10^+$ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (G) % $CD4^+CD69^+IL-17^+$ en individuos CTL, pacientes NRA y RA; (H) % $CD8^+CD69^+IL-17^+$ en individuos CTL, pacientes NRA y RA.

- **Puntos de corte (cut-off) para la expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores renales con rechazo agudo en situación pre-trasplante**

Los valores de corte (cut-off) para la estratificación de los pacientes renales como alto riesgo de RA en pre-trasplante en función de los niveles intracitoplasmáticos de

citocinas se muestran en la tabla 4.8. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el apartado previo. El % de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ y % de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ fue capaz de discriminar de forma precisa a receptores renales como alto riesgo de RA en situación pre-trasplante (Fig.4.15).

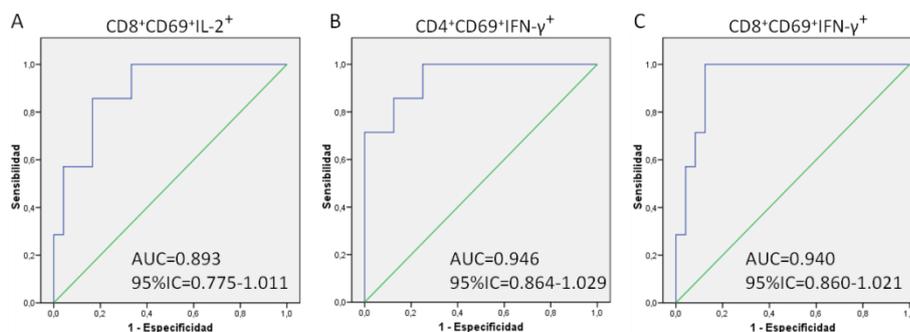


Figura 4.15. Curvas ROC con los valores de corte (cut-off) capaces de discriminar a receptores renales con y sin rechazo agudo en situación pre-trasplante. Valores de AUC para (A) % IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, (B) % de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y (C) % de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺.

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IL-2 > 15.98% (Fig.4.15A; AUC=0.893, 95% IC=0.775-1.011, $P=0.002$) en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ fue capaz de discriminar a los pacientes como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, como bajo riesgo de RA cuando los niveles de IL-2 fueron < 15.98% o como alto riesgo de RA cuando los niveles de IL-2 fueron \geq 15.98%.

El 67.74% de los pacientes fueron clasificados como bajo riesgo de RA con un % de IL-2 < 15.98%, de los cuáles el 95.24% no desarrolló RA; por el contrario el 4.76% tuvo RA a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 32.26% de los pacientes fueron clasificados como alto riesgo de RA con un % de IL-2 \geq 15.98%, de los cuáles el 60% tuvo RA, mientras que el 40% no desarrolló RA a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=85.71%, 95% IC=42.23-97.63; especificidad=83.33%, 95% IC=62.60-95.16; $P=0.002$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ y CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IFN γ >25.21% (Fig.4.15B; AUC=0.946, 95% IC=0.864-1.029, $P=0.0003$) en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y un % superior a 42.53% (Fig.4.15C; AUC=0.940, 95% IC=0.860-1.021, $P=0.0004$) en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ fueron capaces de discriminar a los pacientes como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la expresión intracitoplasmática de IFN γ en ambas poblaciones linfocitarias, como bajo riesgo de RA cuando los niveles de IFN γ fueron <25.21% para linfocitos T CD4⁺CD69⁺ e <42.53% para linfocitos T CD8⁺CD69⁺, o como alto riesgo de RA cuando los niveles de IFN γ fueron $\geq 25.21\%$ y $\geq 42.53\%$ para linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺, respectivamente.

El 70.97% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de desarrollar RA con un % de IFN γ <25.21% en linfocitos T CD4⁺CD69⁺, de los cuáles el 95.45% no desarrolló RA, mientras que el 4.55% tuvo RA a pesar de haber sido incluido en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 29.03% de los pacientes fueron clasificados como de alto riesgo de RA con un % de IFN γ $\geq 25.21\%$ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺, de los cuáles el 66.67% desarrolló RA, mientras que el 33.33% no tuvo RA a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=42.23-97.63; especificidad=87.50%, 95%IC=67.61-97.20; $P=0.001$).

Del mismo modo, el 77.42% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de RA con un % de IFN γ <42.53% en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, de los cuáles el 91.67% no desarrolló RA, mientras que el 8.33% desarrolló RA a pesar de haber sido incluido en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 22.58% de los pacientes fue clasificado como alto riesgo de RA con un % de IFN γ $\geq 42.53\%$ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, de los cuáles el 71.43% desarrolló RA, mientras que el 28.57% no tuvo RA a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.27-95.48; especificidad=91.67%, 95%IC=72.96-98.73; $P=0.002$).

Tabla 4.8. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores renales como alto riesgo de rechazo agudo.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Rechazo agudo</i>				
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺	15.98	0.893 (0.775-1.011)	85.71 (42.23-97.63)	83.33 (62.60-95.16)
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺	25.21	0.946 (0.864-1.029)	85.71 (42.23-97.63)	87.50 (67.61-97.20)
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺	42.53	0.940 (0.860-1.021)	71.43 (29.27-95.48)	91.67 (72.96-98.73)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariado para el cálculo de la probabilidad de rechazo agudo basado en el logit RA**

Tras haber estudiado los biomarcadores que mejor discriminaron a receptores renales como alto riesgo de RA, se obtuvieron los logit RA para cada biomarcador de forma individual. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron todos los coeficientes necesarios para poder calcular la probabilidad de RA aplicando la fórmula $e^{\text{logit RA}} / (1 + e^{\text{logit RA}})$. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente presencia de RA y como variable predictiva la expresión intracitoplasmática de IL-2 e IFN γ para las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular el logit de RA para la expresión intracitoplasmática de IL-2 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ se muestran en la tabla 4.9.

- Predicción de rechazo agudo basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariado propuesto para la expresión intracitoplasmática de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ en pre-trasplante predijo que, del grupo RA, el 57.1% desarrollarían episodio de RA, mientras que en el 42.9% restante se predijo ausencia de RA a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que de la población NRA, el 95.8% desarrollaría RA, mientras que en el 4.2% restante se pronosticó presencia de RA a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=57.14%, 95%IC=18.75-89.58; especificidad=95.83%, 95%IC=78.81-99.30; OR=1.401 95%IC=1.084-1.810; $P=0.01$).

➤ Predicción de rechazo agudo basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ y linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática pre-trasplante de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ predijo que del grupo de receptores renales RA, el 71.43% desarrollaría RA, mientras que el 28.8% restante, se pronosticó ausencia de RA a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 95.83% no desarrollaría RA, mientras que en el 4.2% restante se pronosticó RA a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.27-95.48; especificidad=95.83%, 95%IC=78.81-99.30; OR=1.277 95%IC=1.069-1.525; $P=0.007$).

De igual modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática pre-trasplante de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ predijo que del grupo de receptores renales RA, 71.4% no desarrollaría RA, mientras que el 28.6% restante se predijo RA a pesar de no haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 91.7% no desarrollaría episodio de RA, mientras que en el 8.3% restante se pronosticó RA a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.27-95.48; especificidad=91.67%, 95%IC=72.96-98.73; OR=1.171 95%IC=1.046-1.311; $P=0.006$).

Tabla 4.9. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de rechazo agudo en pre-trasplante en función de la expresión de citocinas intracitoplasmáticas IL-2 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de receptores renales.

Biomarcador	Coefficient e	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺	0.337	6.643	1.401 (1.084-1.810)	57.14 (18.75-89.58)	95.83 (78.81-99.30)	0.01
Constante	-6.555					
Logit RA = -6.555 + (CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺ x 0.337)						
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	0.244	7.251	1.277 (1.069-1.525)	71.43 (29.27-95.48)	95.83 (78.81-99.30)	0.007
Constante	-7.428					
Logit RA = -7.428 + (CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺ x 0.244)						
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	0.158	7.555	1.171 (1.046-1.311)	71.43 (29.27-95.48)	91.67 (72.96-98.73)	0.006
Constante	-7.065	-	-	-	-	-
Logit RA = -7.065 + (CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺ x 0.158)						

La fórmula para el logit de RA deriva de los coeficientes del modelo que también se muestra. El logit de RA puede ser utilizado para predecir la probabilidad de rechazo agudo con la fórmula $e^{\text{logit RA}} / (1 + e^{\text{logit RA}})$.

4.2.2.3. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos y su relación con infección oportunista

En la figura 4.16 se encuentran representados los niveles de expresión intracitoplasmáticos para las citocinas estudiadas en función de los grupos de estudio control, sin infección oportunista e infección oportunista en situación pre-trasplante.

La expresión intracitoplasmática de IL-2 no mostró diferencias significativas entre receptores hepáticos INF y NoINF para las poblaciones de linfocitos T CD4⁺CD69⁺ (Fig.4.16A; 22.19 \pm 2.05 vs 25.75 \pm 4.01, $P=0.394$) y CD8⁺CD69⁺ (Fig.4.16B; 14.15 \pm 1.89 vs 16.98 \pm 2.33, $P=0.350$).

La expresión intracitoplasmática de IFN γ en células T CD4⁺CD69⁺ tampoco presentó diferencias significativas entre receptores hepáticos INF/NoINF (Fig.4.16C; 14.76 \pm 1.51 vs 17.25 \pm 1.44, $P=0.28$); sin embargo, fue significativamente menor en células T CD8⁺CD69⁺ del grupo INF (Fig.4.16D; 18.87 \pm 2.31 vs 34.29 \pm 2.86, $P=0.028$).

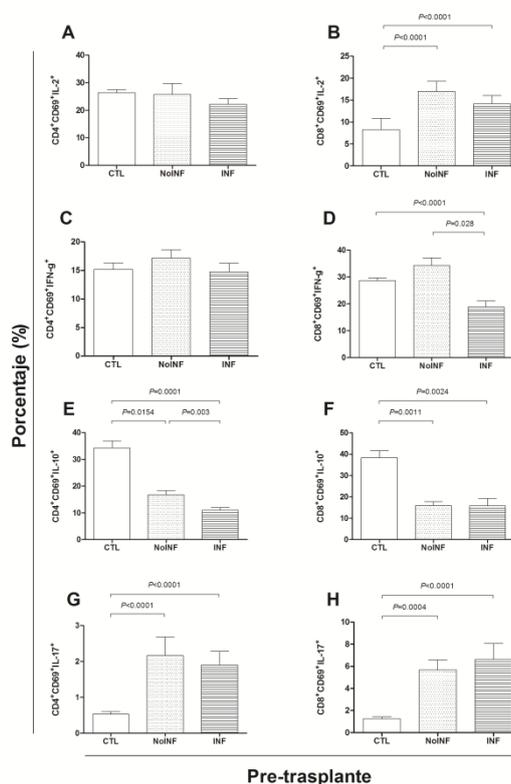


Figura 4.16. Expresión intracitoplasmáticas de citocinas en receptores hepáticos en pre-trasplante. (A) % CD4⁺CD69⁺IL-2⁺ en individuos sanos (CTL), pacientes sin infección oportunista (NoINF) y pacientes con infección oportunista (INF); (B) % CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en individuos CTL, pacientes NoINF y INF; (C) % CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en individuos CTL, pacientes NoINF y INF; (D) % CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en individuos CTL, pacientes NoINF y INF; (E) % CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ en individuos CTL, pacientes NoINF y INF; (F) % CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en individuos CTL, pacientes NoINF y INF; (G) % CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en individuos CTL, pacientes NoINF y INF; (H) % CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ en individuos CTL, pacientes NoINF y INF.

Por otro lado, la expresión intracitoplasmática de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ del grupo INF presentó niveles significativamente menores en comparación con los observados en el grupo NoINF (Fig.4.16E; 10.94±1.08 vs 16.72±1.57, $P=0.003$). Sin embargo, los niveles de IL-10 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ no mostraron significación entre los grupos de pacientes INF y NoINF (figura 4.16F) ($P=0.981$).

Finalmente, la expresión intracitoplasmática de IL-17 tanto en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ (Fig.4.16G; 1.90±0.38 vs 2.17±0.51, $P=0.676$) como CD8⁺CD69⁺ (Fig.4.16H; 6.64±1.42 vs 5.68±0.89, $P=0.572$) no mostró diferencias significativas entre los grupos INF y NoINF.

Los niveles intracitoplasmáticos de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ del grupo control fueron significativamente menores que los niveles en ambos grupos de estudio (Fig.4.16B). La expresión de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ del grupo control fue significativamente menor a la del grupo NoINF, pero significativamente mayor a los niveles del grupo INF (Fig.4.16D). La expresión de IL-10 tanto en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ como CD8⁺CD69⁺ del grupo control mostró niveles significativamente mayores a ambos grupos de estudio (Fig.4.16E y F). La expresión de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ del grupo control fue significativamente inferior en comparación con ambos grupos de pacientes (Fig.4.16G y H).

- **Puntos de corte (cut-off) para la expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores hepáticos con infección oportunista en situación pre-trasplante**

Los valores de corte (cut-off) para la estratificación de receptores hepáticos como alto riesgo de INF en pre-trasplante en función de los niveles intracitoplasmáticos de citocinas se muestran en la tabla 4.10. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el apartado previo. El % de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ y el % de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ fueron capaces de discriminar de forma precisa a receptores hepáticos con alto riesgo de desarrollar INF en situación pre-trasplante (Fig.4.17).

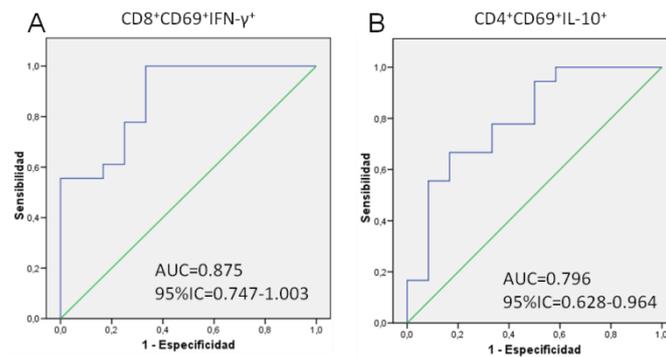


Figura 4.17. Curvas ROC con los valores de corte (cut-off) que mejor discrimina a receptores hepáticos con y sin infección oportunista en pre-trasplante. Valores de AUC para (A) % de IFN γ en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ y (B) % de IL-10 en linfocitos T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$.

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % de linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ IFN γ $^{+}$ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IFN γ \leq 30.66% (Fig.4.17A; AUC=0.875, 95%IC=0.747-1.003, $P=0.001$) en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo para sufrir INF post-trasplante. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la expresión intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$, como bajo riesgo de INF cuando los niveles de IFN γ fueron $>$ 30.66% o como alto riesgo de INF cuando los niveles de IFN γ fueron \leq 30.66%.

El 26.67% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de sufrir INF con un % de IFN γ en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ $>$ 30.66%, de los cuáles el 100% no sufrió INF. Del mismo modo, el 73.33% restante de receptores hepáticos fue clasificado como alto riesgo de INF con un % de IFN γ \leq 30.66%, de los cuáles el 81.82% desarrolló INF, mientras que el 18.18% restante no tuvo INF a pesar de haber sido clasificados como alto riesgo de INF (sensibilidad=100%, 95%IC=81.32-100; especificidad=66.67%, 95%IC=34.95-89.87; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % de linfocitos T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ IL-10 $^{+}$ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IL-10 \leq 13.58% (Fig.4.17B; AUC=0.796, 95%IC=0.628-0.964, $P=0.007$) en linfocitos T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la expresión intracitoplasmática

de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺, como bajo riesgo de INF con niveles de IL-10 >13.58% o como alto riesgo de INF cuando los niveles de IL-10 fueron ≤13.58%.

Tabla 4.10. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos, capaces de clasificar a receptores como alto riesgo de infección oportunista.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Infección oportunista</i>				
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	30.66	0.875 (0.747-1.003)	100 (81.32-100)	66.67 (34.95-89.87)
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	13.58	0.796 (0.628-0.964)	61.12 (35.77-82.64)	83.34 (51.5-97.42)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

El 56.67% de receptores fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de IL-10 >13.58%, de los cuáles el 58.82% no tuvo INF; mientras que 41.18% tuvo INF, a pesar de ser clasificados como bajo riesgo. Del mismo modo, el 43.33% de receptores restantes fueron clasificados como alto riesgo de INF con %IL-10 ≤13.58%, de los cuales el 84.62% desarrolló INF, mientras que el 15.38% restante no tuvo INF a pesar de haber sido clasificados en el grupo de alto riesgo (sensibilidad=61.12%, 95%IC=35.77-82.64; especificidad=83.34%, 95%IC=51.5-97.42; $P=0.026$).

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de infección oportunista basado en el logit INF**

Una vez realizado el análisis ROC para los niveles de expresión de IFN γ e IL-10 intracitoplasmática que mejor estratificaron a receptores hepáticos como alto riesgo de INF, se realizó un modelo de regresión logística univariante para calcular la probabilidad de INF para los biomarcadores propuestos en pre-trasplante. Para ello se aplicó el modelo propuesto por Hosmer y Lemeshow por el cual se calculó el logit de INF para linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ y CD4⁺CD69⁺IL-10⁺, el cual puede posteriormente ser usado para determinar la probabilidad de INF utilizando la fórmula $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente INF y como variable predictiva la expresión intracitoplasmática de citocinas en ambas subpoblaciones de linfocitos T. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular el logit de INF para la expresión intracitoplasmática de IFN γ e IL-10 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ y CD4⁺CD69⁺ se muestran en la tabla 4.11.

➤ Predicción de infección oportunista basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo NoINF, el 75% no presentarían INF, mientras que en el 25% restante se predijo presencia de INF a pesar de que no la desarrollaron. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo INF, el 77.8% desarrollaría INF, mientras que en el 22.2% se pronosticó NoINF a pesar de haberla desarrollado (sensibilidad=77.78%, 95%IC=52.36-93.45; especificidad=75%, 95%IC=42.84-94.22; OR=1.807, 95%IC=1.716-1.897; $P=0.020$).

➤ Predicción de infección oportunista basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ predijo que del grupo NoINF, el 50% no presentarían INF, mientras que en el 50% restante se predijo INF, a pesar de que no la desarrollaron. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo INF, el 77.8% desarrollaría INF, mientras que en el 22.2% restante se pronosticó NoINF, a pesar de haberla desarrollado (sensibilidad=77.78%, 95%IC=52.36-93.45; especificidad=50%, 95%IC=21.21-78.79; OR=1.755, 95%IC=1.597-1.957; $P=0.020$).

Tabla 4.11. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de infección oportunista en situación pre-trasplante en función de la expresión de citocinas intracitoplasmáticas en receptores hepáticos

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	<i>P</i>
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	-0.214	5.441	1.807 (1.716-1.897)	77.78 (52.36-93.45)	75 (42.84-94.22)	0.020
Constante	4.379					
Logit INF = 4.379 + (CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺ x -0.214)						
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	-0.280	5.418	1.755 (1.597-1.957)	77.78 (52.36-93.45)	50 (21.21-78.79)	0.020
Constante	4.297					
Logit INF = 4.297 + (CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺ x -0.280)						

La fórmula para el logit de INF deriva de los coeficientes del modelo que también se muestra. El logit de INF puede ser utilizado para predecir la probabilidad de infección oportunista con la fórmula $e^{\text{logit INF}} / 1 + e^{\text{logit INF}}$.

4.2.2.4. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ de receptores renales y su relación con infección oportunista

En la figura 4.18 se encuentran representados los niveles intracitoplasmáticos de citocinas en pre-trasplante de receptores renales de nuestra serie NoINF y INF.

La expresión intracitoplasmática de IL-2 en ambas poblaciones de linfocitos T, CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$, entre los grupos NoINF y INF no mostró diferencias significativas (Fig.4.18A; 26.29 \pm 4.72 vs 29.42 \pm 4.13, $P=0.653$ y Fig.4.18B; 23.76 \pm 3.12 vs 19.53 \pm 3.69; $P=0.395$, respectivamente).

La expresión intracitoplasmática de IFN γ en células T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ de receptores INF fue significativamente menor en comparación con el grupo NoINF (Fig.4.18C; 13.16 \pm 1.7 vs 36.43 \pm 4.49, $P=0.0002$); mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles intracitoplasmáticos de IFN γ en células T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ entre ambos grupos (Fig.3.18D; 27.96 \pm 2.43 vs 22.77 \pm 4.25, $P=0.262$).

La expresión intracitoplasmática de IL-10 en ambas poblaciones de linfocitos T, CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$, fue significativamente menor en receptores renales con INF en comparación con el grupo NoINF (Fig.4.18E; 11.96 \pm 1.49 vs 27.44 \pm 1.98, $P<0.0001$ y Fig.4.18F; 7.65 \pm 0.91 vs 19.22 \pm 1.78, $P<0.0001$).

La expresión intracitoplasmática de IL-17 tanto en células T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ como CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ no mostró significación entre ambos grupos de estudio (Fig.4.18G; 15.31 \pm 3.59 vs 12.09 \pm 3.39, $P=0.546$ y Fig.4.18H; 14.10 \pm 2.67 vs 12.76 \pm 2.35, $P=0.696$).

En cuanto a los niveles de expresión intracitoplasmática de citocinas entre el grupo control y los grupos de pacientes, la expresión de IL-2 e IL-17 en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ y la expresión de IFN γ e IL-17 en linfocitos T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ de receptores NoINF fue significativamente mayor que en el grupo control. Del mismo modo, la expresión de IL-2 e IL-17 en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ así como la expresión de IL-17 en linfocitos T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ en receptores INF fue significativamente mayor que la del grupo control. Por el contrario, la expresión intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ e IL-10 en ambas poblaciones de linfocitos T en receptores INF fue significativamente menor que los niveles de expresión de la población control.

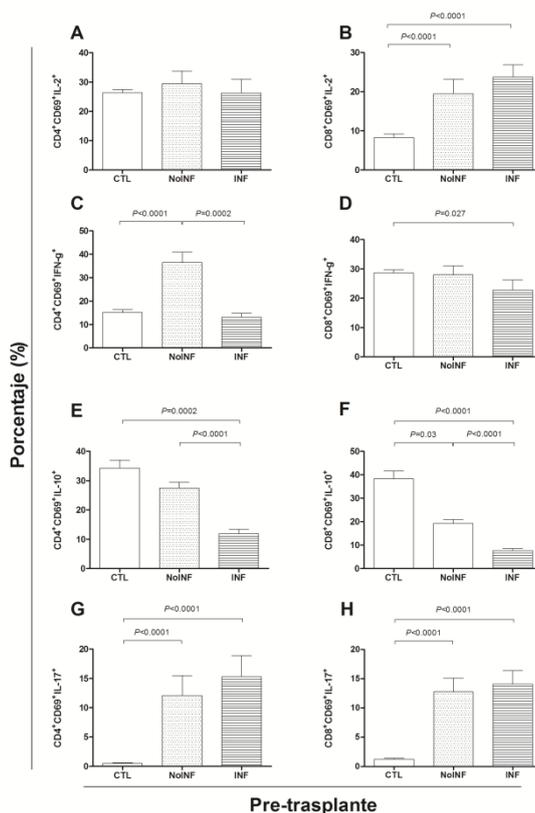


Figura 4.18. Expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores renales en pre-trasplante. (A) % CD4⁺CD69⁺IL-2⁺ en individuos sanos (CTL), pacientes sin infección oportunista (NoINF) y pacientes con infección oportunista (INF); (B) % CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en individuos CTL, pacientes NoINF y INF; (C) % CD4⁺CD69⁺IFNγ⁺ en individuos CTL, NoINF y INF; (D) % CD8⁺CD69⁺IFNγ⁺ en individuos CTL, NoINF y INF; (E) % CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ en individuos CTL, NoINF y INF; (F) % CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en individuos CTL, NoINF y INF; (G) % CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en individuos CTL, NoINF y INF; (H) % CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ en individuos CTL, NoINF y INF.

- **Puntos de corte (cut-off) para la expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores renales con infección oportunista en situación pre-trasplante.-**

Los valores de corte (cut-off) para la estratificación de receptores renales como alto riesgo de INF en pre-trasplante en función de los niveles intracitoplasmáticos de citocinas se muestran en la tabla 4.12. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el apartado previo. Los valores de % en pre-trasplante de IFNγ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ e IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ fueron capaces de discriminar de forma exacta receptores renales NoINF y INF (Fig.4.19).

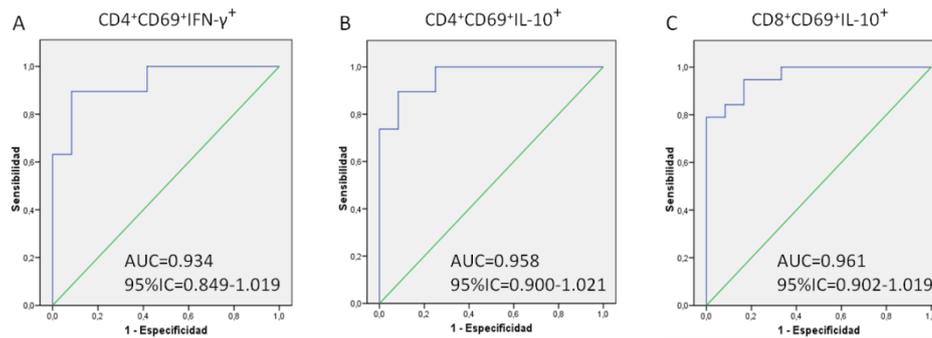


Figura 4.19. Curvas ROC con los valores de corte (cut-off) que mejor discrimina a receptores renales con y sin infección oportunista en situación pre-trasplante. Valores de AUC para (A) % IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺, (B) % de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y (C) % de IL-10 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺.

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IFN γ inferior a 25.12% (Fig.4.19A; AUC=0.934, 95% IC=0.849-1.019, $P<0.001$) en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ fue capaz de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la expresión intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺, como bajo riesgo de INF cuando los niveles de IFN γ fueron $>25.12\%$ o como alto riesgo de INF cuando los niveles de IFN γ fueron $\leq 25.12\%$.

El 38.71% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un % de IFN- $\gamma >25.12\%$, de los cuáles el 83.33% no tuvo INF, mientras que el 16.67% restante desarrollaron INF a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 61.29% restante de receptores renales fueron clasificados como alto riesgo de INF con un % de IFN $\gamma \leq 25.12\%$, de los cuáles el 89.47% tuvo INF, mientras que el 10.53% restante no desarrolló INF a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=89.47%, 95%IC=66.82-98.39; especificidad=83.33%, 95%IC=51.58-97.42; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IL-10 inferior a 18.4% en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ (Fig.4.19B; AUC=0.958, 95% IC=0.900-1.021, $P<0.001$) e inferior a 11.2% en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ (Fig.4.19C; AUC=0.961, 95% IC=0.902-

1.019, $P < 0.001$) fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-10, como bajo riesgo de INF cuando los niveles de IL-10 fueron $>18.4\%$ en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ y $>11.20\%$ en linfocitos T $CD8^+CD69^+$ o como alto riesgo de INF cuando los niveles de IL-10 fueron $\leq 18.4\%$ para linfocitos T $CD4^+CD69^+$ y $\leq 11.2\%$ para linfocitos T $CD8^+CD69^+$.

El 41.94% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un % de IL-10 $>18.40\%$ en células T $CD4^+CD69^+$, de los cuáles el 84.62% no tuvo INF; mientras que el 15.38% restante desarrollaron INF a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 58.06% de receptores renales fueron clasificados como alto riesgo de INF con un % de IL-10 $\leq 18.40\%$ en células T $CD4^+CD69^+$, de los cuáles 94.44% tuvo INF, mientras que el 5.56% restante no tuvo INF a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=89.47%, 95% IC=66.82-98.39; especificidad=91.67%, 95% IC=61.46-98.61; $P < 0.001$).

Tabla 4.12. Valores de corte (cut-off) en pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores renales como alto riesgo de infección oportunista.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Infección oportunista</i>				
$CD4^+CD69^+IFN-\gamma^+$	25.12	0.934 (0.849-1.019)	89.47 (66.82-98.39)	83.33 (51.58-97.42)
$CD4^+CD69^+IL-10^+$	18.40	0.958 (0.900-1.021)	89.47 (66.82-98.39)	91.67 (61.46-98.61)
$CD8^+CD69^+IL-10^+$	11.20	0.961 (0.902-1.019)	78.95 (54.43-93.82)	100 (73.35-100.00)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

De igual modo, el 51.61% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un % de IL-10 $>11.20\%$ en células T $CD8^+CD69^+$, de los cuáles el 75% no tuvo INF; mientras que el 25% restante tuvo INF a pesar de haber sido clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 48.39% de receptores renales restantes fueron clasificados como alto riesgo de INF con un % de IL-10 $\leq 11.2\%$ en células $CD8^+CD69^+$, de los cuáles el 100% tuvo INF (sensibilidad=78.95%, 95% IC=54.43-93.82; especificidad=100%, 95% IC=73.35-100; $P < 0.001$).

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de infección oportunista post-trasplante basado en el logit INF**

Tras haber estudiado los biomarcadores que mejor discriminaron a receptores renales como alto riesgo de INF, se obtuvieron los logit INF ($e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$) para

cada biomarcador de forma individual. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron todos los coeficientes necesarios para poder calcular el logit INF. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente INF y como variable predictiva el % de células T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺, CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular el logit de INF para la expresión intracitoplasmática de IFN γ e IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ se muestran en la tabla 4.13.

➤ Predicción de infección oportunista basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo de INF, desarrollarían INF el 89.47%; mientras que en el 10.53% restante se predijo ausencia de INF a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo de NoINF, el 91.67% no tuvo INF, mientras que en el 8.33% restante se pronosticó desarrollo de INF, a pesar de no haberla desarrollado (sensibilidad=89.47%, 95%IC=66.82-98.39; especificidad=91.67%, 95%IC=61.46-98.61, OR=1.798 95%IC=1.683-1.932; $P=0.004$).

➤ Predicción de infección oportunista basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo receptores renales INF, el 89.47% desarrollarían INF, mientras que el 10.53% restante no presentaría INF a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 83.33% no desarrollaría INF, mientras que en el 16.67% restante se pronosticó desarrollo de INF, a pesar de no haberla desarrollado (sensibilidad=89.47%, 95%IC=66.82-98.39; especificidad=83.33%, 95%IC=51.58-97.42, OR=1.647 95%IC=1.467-1.896; $P=0.009$).

Del mismo modo y en función de los niveles intracitoplasmáticos de IL-10 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, el modelo predijo que del grupo INF, el 94.73% desarrollarían INF, mientras que el 5.26% restante no presentaría INF, a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 83.33% no desarrollaría

INF, mientras que en el 16.67% restante se pronosticó INF, a pesar de no haberla desarrollado (sensibilidad=94.74%, 95%IC=73.90-99.12; especificidad=83.33%, 95%IC=51.58-97.42, OR=1.533 95%IC=1.319-1.891; $P=0.016$).

Tabla 4.13. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de infección oportunista en situación pre-trasplante en función de la expresión de citocinas intracitoplasmáticas en receptores renales.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ	-0.226	8.105	1.798 (1.683-1.932)	89.47 (66.82-98.39)	91.67 (61.46-98.61)	0.004
Constante	5.438					
Logit INF = 5.438 + (CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ x -0.226)						
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	-0.436	6.888	1.647 (1.467-1.896)	89.47 (66.82-98.39)	83.33 (51.58-97.42)	0.009
Constante	8.953					
Logit INF = 8.953 + (CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺ x -0.436)						
CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	-0.629	5.765	1.533 (1.319-1.891)	94.74 (73.90-99.12)	83.33 (51.58-97.42)	0.016
Constante	8.481					
Logit INF = 8.481 + (CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺ x -0.629)						

La fórmula para el logit de INF deriva de los coeficientes del modelo que también se muestra. El logit de INF puede ser utilizado para predecir la probabilidad de infección oportunista con la fórmula $e^{\text{logit INF}} / (1 + e^{\text{logit INF}})$.

4.2.2.5. Niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos y su relación con recidiva de virus de hepatitis C

En la figura 4.20 se han representado los niveles intracitoplasmáticos de citocinas de controles sanos, receptores hepáticos NVHC y receptores VHC.

La expresión intracitoplasmática de IL-2 no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio NVHC y VHC tanto en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ (Fig.4.20A; 16.61 \pm 5.42 vs 13.26 \pm 2.16; $P=0.832$), como en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ (Fig.4.20B; 17.24 \pm 4.49 vs 25.88 \pm 4.72, $P=0.185$).

La expresión intracitoplasmática de IFN γ no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de estudio, ni en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ (Fig.4.20C; 10.91 \pm 2.87 vs 10.51 \pm 2.03; $P=0.866$), ni en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ (Fig.4.20D, 21.35 \pm 4.02 vs 20.63 \pm 3.12; $P=0.899$).

Del mismo modo, la expresión intracitoplasmática de IL-10 tanto en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ como CD8⁺CD69⁺ no presentó diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Fig.4.20E; 9.94 \pm 1.19 vs 9.03 \pm 1.53; $P=0.216$; Fig.4.20F; 17.63 \pm 2.66 vs 17.13 \pm 3.55; $P=0.372$, respectivamente).

Por el contrario, la expresión intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ fue significativamente mayor en el grupo VHC en comparación con el grupo NVHC (Fig.4.20G; 4.89±0.57 vs 1.63±0.31; $P=0.00004$); mientras que aunque no se observaron diferencias significativas en la expresión de IL-17 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ entre ambos grupos de estudio, receptores hepáticos VHC presentaron niveles de expresión superiores en comparación con receptores NVHC (Fig.4.16H; 9.18±1.92 vs 7.42±1.68; $P=0.232$).

En cuanto a la expresión de citocinas intracitoplasmáticas en el grupo control, se observa que los niveles de IL-2 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ ($P=0.0006$), IFN γ tanto en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ ($P=0.02$) e IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ ($P=0.002$) y linfocitos T CD8⁺CD69⁺ ($P=0.03$) fueron significativamente mayores en comparación con el grupo VHC. Del mismo modo, los niveles intracitoplasmáticos de IL-2 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ ($P<0.001$), IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ ($P=0.002$) e IL-10, tanto en linfocitos T CD4⁺ ($P<0.001$) como en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ ($P=0.003$) del grupo control fueron significativamente superiores en comparación con el grupo NVHC.

Por el contrario, los niveles intracitoplasmáticos de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ ($P<0.001$) y de IL-17, en ambas poblaciones de linfocitos T, CD4⁺CD69⁺ ($P<0.001$) y CD8⁺CD69⁺ ($P<0.001$) fueron significativamente inferiores en el grupo control en comparación con el grupo NVHC. La expresión de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ ($P<0.001$) e IL-17 en individuos control también fue significativamente inferior en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ ($P<0.001$) y linfocitos T CD8⁺CD69⁺ ($P<0.001$) del grupo control fue significativamente inferior en comparación con el grupo VHC.

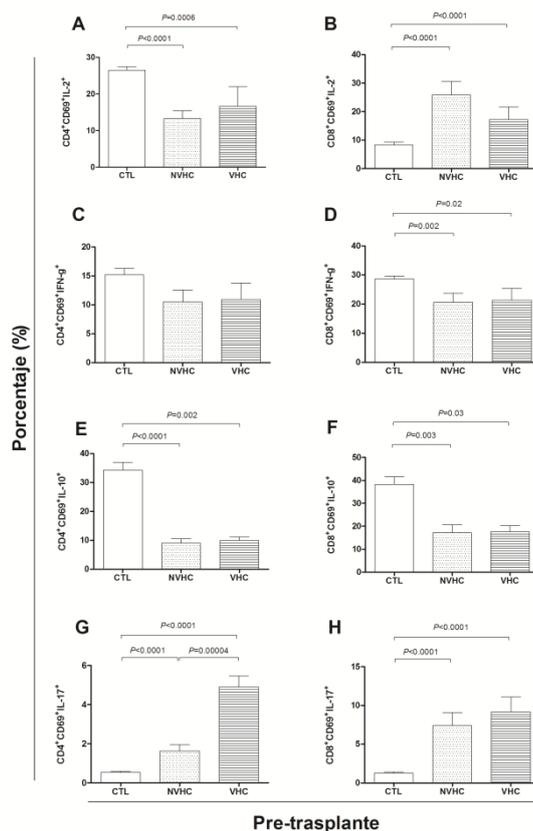


Figura 4.20. Expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores hepáticos en situación pre-trasplante. (A) % CD4⁺CD69⁺IL-2⁺ en individuos sanos (CTL), pacientes sin recidiva de virus de hepatitis C (NVHC) y pacientes con recidiva de virus de hepatitis C (VHC); (B) % CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en individuos CTL, NVHC y VHC; (C) % CD4⁺CD69⁺IFNγ⁺ en individuos CTL, NVHC y VHC; (D) % CD8⁺CD69⁺IFNγ⁺ en individuos CTL, NVHC y VHC; (E) % CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ en individuos CTL, NVHC y VHC; (F) % CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en individuos CTL, NVHC y VHC; (G) % CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en individuos CTL, NVHC y VHC; (H) % CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ en individuos CTL, NVHC y VHC.

- **Puntos de corte (cut-off) para la expresión intracitoplasmática de citocinas en receptores hepáticos con recidiva de virus de hepatitis C en pre-trasplante**

El valor de corte (cut-off) para la estratificación de receptores hepáticos como alto riesgo de VHC en pre-trasplante en función del porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ se muestra en la tabla 4.14. En el estudio únicamente fue incluido el único biomarcador que presentó diferencias estadísticamente significativas en el apartado previo. El % en pre-trasplante de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ fue capaz de discriminar de forma exacta receptores hepáticos NVHC y VHC (Fig.4.21).

El punto de corte para la expresión intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ en pre-trasplante que mejor discriminó a los receptores hepáticos como alto riesgo de VHC, junto con el área bajo curva, sensibilidades y especificidades se muestra en la tabla 4.14.

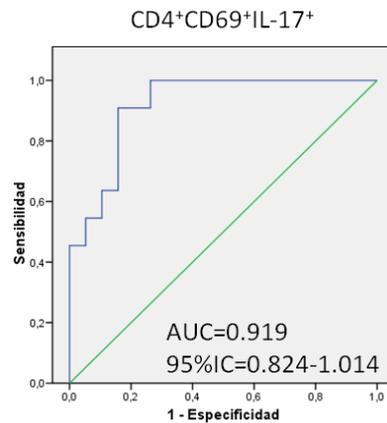


Figura 4.21. Curva ROC pre-trasplante con el valor de corte (cut-off) que mejor discriminó a receptores hepáticos con recidiva de virus de hepatitis C. % IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺.

➤ Estratificación del riesgo de recidiva de virus de hepatitis C en función del % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un % de IL-17 superior a 2.77% (Fig.4.21; AUC=0.919, 95% IC=0.824-1.014, $P=0.0002$) en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺, como bajo riesgo de VHC cuando los niveles de IL-17 fueron <2.77% o como alto riesgo de VHC cuando los niveles de IL-17 fueron $\geq 2.77\%$.

El 56.67% de los receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de VHC con un % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ <2.77%, de los cuáles el 94.12% no tuvo VHC, mientras que el 5.88% desarrolló VHC a pesar de haber sido clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 43.33% de receptores hepáticos fueron clasificados como alto riesgo VHC con un % de células T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ $\geq 2.77\%$, de los cuáles el 76.92% desarrolló VHC, mientras que el 23.08% restantes no desarrolló VHC, a pesar de ser clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=90.91%, 95% IC=58.67-98.49; especificidad=84.21%, 95% IC=60.40-96.43; $P<0.001$).

Tabla 4.14. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para el biomarcador propuesto capaz de clasificar a receptores hepáticos como alto riesgo de recidiva de VHC

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
VHC				
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	2.77	0.919 (0.824-1.014)	90.91 (58.67-98.49)	84.21 (60.40-96.43)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de recidiva de virus de hepatitis C basado en el logit VHC**

Tras haber estudiado qué biomarcadores que discriminaron de forma precisa a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC, se obtuvo el logit VHC ($e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$) para el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron todos los coeficientes necesarios para poder calcular la probabilidad de VHC. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente presencia VHC y como variable predictiva la expresión intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular el logit de VHC para la expresión intracitoplasmática de IL-17 en células T CD4⁺CD69⁺ se muestran en la tabla 4.15.

➤ Predicción de recidiva de virus de hepatitis C basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la expresión intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo NVHC, no presentarían INF el 84.21%, mientras que en el 15.79% restante se predijo presencia de VHC a pesar de que no la desarrollaron. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo VHC, el 72.73% desarrollaría VHC, mientras que en el 27.27% restante se pronosticó ausencia de recidiva VHC, a pesar de haberla desarrollado (sensibilidad=72.73%, 95%IC=39.08-93.65; especificidad=84.21%, 95%IC=60.40-96.43; OR=3.050 95%IC=1.432-6.498; $P=0.004$).

Tabla 4.15. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de recidiva de virus de hepatitis C en situación pre-trasplante en función de la expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en receptores hepáticos.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	1.115	8.354	3.050 (1.432-6.498)	72.73 (39.08-93.65)	84.21 (60.40-96.43)	0.004
Constante	-3.944					
Logit VHC = -3.944 + (CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺ x 1.115)						

La fórmula para el logit de INF deriva de los coeficientes del modelo que también se muestra. El logit de VHC puede ser utilizado para predecir la probabilidad de recidiva de virus de hepatitis C con la fórmula $e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$.

4.2.2.6. Niveles pre-trasplante de IFN γ , IL-17, IL-10 y TGF β soluble de receptores hepáticos y su relación con rechazo agudo

En la figura 4.22 se representan las concentraciones de IFN γ , IL-10, IL-17 y TGF β obtenidas tras estimulación *in vitro* de receptores hepáticos RA y NRA pre-trasplante.

Tanto los niveles solubles de IFN γ como de IL-17 (pg/ml) del grupo RA fueron significativamente superiores en comparación con el grupo NRA (Fig.4.22A; 767.67 ± 111.73 vs 248.78 ± 25.32 , $P=0.001$ y Fig.4.22B; 271.68 ± 18.84 vs 148.31 ± 10.06 , $P=0.00002$; respectivamente).

Los niveles solubles de IL-10 Y TGF β no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Fig.4.22C; 51.73 ± 9.94 vs 45.31 ± 7.19 , $P=0.643$ y Fig.4.22D; 688.81 ± 141.33 vs 628.05 ± 99.04 , $P=0.719$; respectivamente).

Los niveles solubles de IFN γ , IL-10 y TGF β de controles fueron significativamente inferiores comparados con los niveles de receptores hepáticos NRA (Fig.4.22A, $P=0.02$; Fig.4.22C, $P=0.03$ y Fig.4.22D, $P=0.002$; respectivamente) y con respecto a receptores RA (Fig.4.22A, $P=0.0003$; Fig.4.22C, $P=0.02$ y Fig.4.22D, $P<0.0001$; respectivamente). Contrariamente, los niveles de IL-17 de controles fueron significativamente mayores que en el grupo NRA (Fig.4.22B, $P<0.0001$).

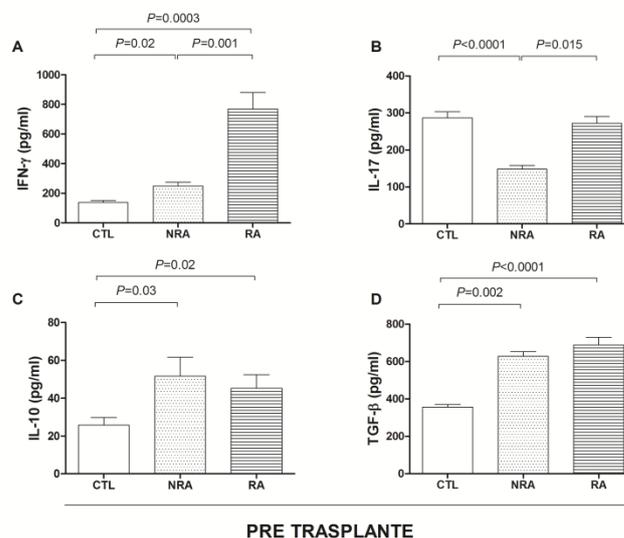


Figura 4.22: Niveles pre-trasplante de citocinas soluble *in vitro* de receptores hepáticos. (A) expresión soluble de IFN γ (pg/ml) en el grupo control (CTL), pacientes sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); (B) expresión soluble de IL-17 (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NRA y RA; (C) expresión soluble de IL-10 (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NRA y RA; (D) expresión soluble de TGF β (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NRA y RA.

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de citocinas soluble en receptores hepáticos en situación pre-trasplante**

Los valores de corte (cut-off) para la estratificación de receptores hepáticos como alto riesgo de RA en pre-trasplante en función de los niveles solubles de IFN γ e IL-17 se muestran en la tabla 4.16. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el apartado previo. Los niveles solubles de IFN γ e IL-17 (pg/ml) en pre-trasplante fueron capaces de discriminar de forma exacta entre receptores hepáticos NRA y RA (Figura 4.23).

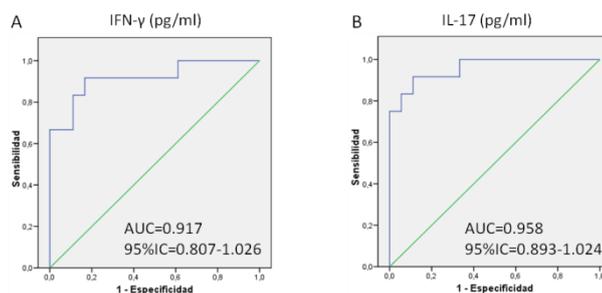


Figura 4.23. Curvas ROC pre-trasplante con los valores de corte (cut-off) que mejor discriminaron receptores hepáticos con y sin rechazo agudo. Valores de AUC para (A) niveles solubles de IFN γ (pg/ml) y (B) niveles solubles de IL-17 (pg/ml).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de los niveles solubles *in vitro* de IFN γ (pg/ml) en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, una concentración soluble de IFN γ superior a 330.41 pg/ml (Fig.4.23A; AUC=0.917, 95%IC=0.807-1.026, $P=0.0002$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles solubles de IFN γ , como alto riesgo de RA cuando los niveles de IFN γ fueron ≥ 330.41 pg/ml o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de IFN γ fueron < 330.41 pg/ml.

El 53.33% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con una concentración soluble de IFN γ < 330.41 pg/ml, de los cuáles el 93.75% no desarrolló RA; por el contrario, el 6.25% tuvo RA a pesar de haber sido clasificados como de bajo riesgo. Del mismo modo, el 46.67% de receptores restantes fueron clasificados como alto riesgo de RA con una concentración soluble de IFN γ ≥ 330.41 pg/ml, de los cuáles 78.57% tuvo RA, mientras que 21.43% restante no tuvo

RA, a pesar de haber sido clasificados en el grupo de alto riesgo (sensibilidad=91.67%, 95%IC=61.46-98.61; especificidad=83.33%, 95%IC=58.56-96.23; $P=0.0001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de los niveles solubles *in vitro* de IL-17 (pg/ml) en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, una concentración soluble de IL-17 superior a 198.10 pg/ml (Fig.4.23B; AUC=0.958, 95%IC=0.893-1.024, $P=0.0003$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles solubles de IL-17, como alto riesgo de RA cuando éstos fueron ≥ 198.10 pg/ml o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de IL-17 fueron < 198.10 pg/ml.

El 56.7% de receptores fue clasificado como bajo riesgo de RA con una concentración soluble de IL-17 < 198.10 pg/ml, de los cuáles 94.1% no tuvo RA; mientras que el 5.9% restante tuvo RA, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 43.3% de receptores hepáticos restante fueron clasificados como alto riesgo de RA con una concentración soluble de IL-17 ≥ 198.1 pg/ml, de los cuáles el 84.6% desarrolló RA, mientras que el 15.4% restante no tuvieron RA, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=91.67%, 95%IC=61.46-98.61; especificidad=88.89%, 95%IC=65.25-98.30; $P=0.0002$).

Tabla 4.16. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores hepáticos como alto riesgo de rechazo agudo.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Rechazo agudo</i>				
IFN γ (pg/ml)	330.41	0.917 (0.807-1.026)	91.67 (61.46-98.61)	83.33 (58.56-96.23)
IL-17 (pg/ml)	198.10	0.958 (0.893-1.024)	91.67 (61.46-98.61)	88.89 (65.25-98.30)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en el logit RA**

Tras haber estudiado los biomarcadores que mejor discriminaron a receptores hepáticos como alto riesgo de RA en función de los niveles solubles de IFN γ e IL-17, se obtuvieron los logit RA ($e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$) para cada biomarcador individualmente. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron todos los coeficientes necesarios para poder calcular el logit RA. Para la

realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA y como variable predictiva los niveles solubles de IFN γ e IL-17 (pg/ml). Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular el logit de RA para los niveles solubles de IFN γ e IL-17 se muestran en la tabla 4.17.

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en los niveles solubles de IFN γ en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles solubles de IFN γ en pre-trasplante predijo que del grupo RA, desarrollarían RA el 75%, mientras que en el 25% restante se predijo ausencia de RA a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 88.9% no desarrollaría RA, mientras que en el 11.1% restante se pronosticó RA, a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=75%, 95%IC=42.84-94.22; especificidad=88.89%, 95%IC=62.25-98.30; OR=1.011, 95%IC=1.003-1.019; $P=0.01$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en los niveles solubles de IL-17 en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles solubles de IL-17 en pre-trasplante predijo que del grupo RA, desarrollarían RA el 83.3%, mientras que el 16.7% restante se predijo ausencia de RA a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 94.4% no desarrollaría RA, mientras que en el 5.6% restante se pronosticó RA a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.58-97.42; especificidad=94.44%, 95%IC=72.63-99.07; OR=1.054, 95%IC=1.013-1.096; $P=0.009$).

Tabla 4.17. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de rechazo agudo en situación pre-trasplante en función de los niveles solubles de IFN γ e IL-17 en receptores hepáticos.

Biomarcador	Coficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
IFN γ (pg/ml)	0.011	6.591	1.011 (1.003-1.019)	75 (42.84-94.22)	88.89 (62.25-98.30)	0.01
Constante	-4.813					
Logit RA = -4.813 + (IFN γ x 0.011)						
IL-17 (pg/ml)	0.052	6.844	1.054 (1.013-1.096)	83.33 (51.58-97.42)	94.44 (72.63-99.07)	0.009
Constante	-10.994					
Logit RA = -10.994 + (IL-17 x 0.052)						

La fórmula para el logit de RA deriva de los coeficientes del modelo que también se muestra. El logit de RA puede ser utilizado para predecir la probabilidad de rechazo agudo con la fórmula $e^{\text{logit RA}} / (1 + e^{\text{logit RA}})$.

4.2.2.7. Niveles pre-trasplante de IFN γ , IL-17, IL-10 y TGF β soluble de receptores hepáticos y su relación con INF y VHC

En la figura 4.24 se encuentran representados los niveles basales de citocinas solubles tras estimulación *in vitro* de ambos grupos de estudio (INF y VHC) de receptores hepáticos.

Los niveles solubles de IFN γ (pg/ml) no mostraron diferencias significativas entre los grupos NoINF y INF (Fig.4.24A; 389.91 ± 69.92 vs 374.25 ± 74.36 , $P=0.883$); ni tampoco entre receptores hepáticos NVHC y VHC (Fig.4.24B; 705.28 ± 163.67 vs 595.77 ± 141.42 , $P=0.484$).

Los niveles solubles de IL-17 (pg/ml) en receptores hepáticos NoINF y INF no mostraron diferencias significativas (Fig.4.24C; 229.85 ± 24.02 vs 181.14 ± 38.25 , $P=0.269$); sin embargo, los niveles de IL-17 en receptores VHC fueron significativamente superiores comparados con los niveles del grupo NVHC (Fig.4.24D; 287.39 ± 22.01 vs 143.12 ± 17.95 , $P=0.00007$).

Los niveles solubles de IL-10 (pg/ml) en receptores con INF fueron significativamente inferiores que en el grupo NoINF (Fig.4.24E; 41.39 ± 3.36 vs 60.81 ± 4.33 , $P=0.007$); sin embargo, éstos no mostraron diferencias significativas entre receptores NVHC y VHC (Fig.4.24F; 50.62 ± 15.93 vs 56.95 ± 9.12 , $P=0.243$).

Los niveles solubles de TGF β (pg/ml) no presentaron diferencias significativas ni entre receptores hepáticos NoINF y INF (Fig.4.24G; 675.18 ± 95.16 vs 616.12 ± 157.15 , $P=0.735$) ni entre receptores hepáticos NVHC y VHC (Fig.4.24H; 682.61 ± 151.44 vs 638.25 ± 98.02 , $P=0.981$).

En cuanto a los niveles de citocinas solubles entre el grupo control y ambos grupos de estudio; el grupo control presentó niveles significativamente inferiores de IFN γ en comparación con receptores hepáticos NoINF y INF (Fig.4.24A, $P=0.003$ y $P=0.002$; respectivamente), así como también en receptores hepáticos NVHC y VHC (Fig.4.24B, $P=0.0003$ y $P=0.004$; respectivamente). Los niveles solubles de IL-17 del grupo control fueron significativamente superiores que los niveles observados en los grupos NoINF (Fig.4.24C, $P=0.01$) y NVHC (Fig.4.24D, $P<0.0001$). Los niveles solubles de IL-10 fueron significativamente menores en el grupo control en comparación con los niveles de receptores hepáticos NoINF y INF (Fig.4.24E, $P=0.01$ y $P<0.0001$), así como también con los niveles de receptores NVHC (Fig.4.24F, $P=0.007$). Por último, los niveles de TGF β del grupo control fueron significativamente inferiores que los niveles de receptores

INF (Fig.4.24G, $P=0.009$), así como también con los niveles observados en los grupos NVHC y VHC (Fig.4.24H, $P=0.01$ y $P=0.02$).

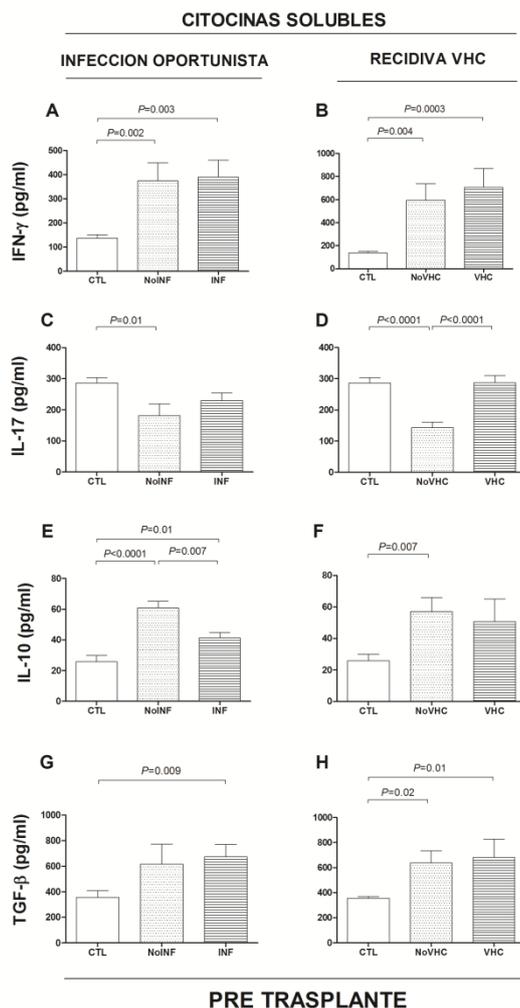


Figura 4.24: Niveles pre-trasplante de citocinas soluble a partir de cultivo de sangre periférica de receptores hepáticos en pre-trasplante. (A) niveles soluble de IFN γ (pg/ml) en el grupo control (CTL), en pacientes sin infección oportunista (NoINF) y con infección oportunista (INF); (B) niveles soluble de IFN γ (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NVHC y VHC; (C) niveles soluble de IL-17 (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NoINF y INF; (D) niveles soluble de IL-17 (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NVHC y VHC; (E) niveles soluble de IL-10 (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NoINF y INF; (F) niveles soluble de IL-10 (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NVHC y VHC; (G) niveles soluble de TGF- β (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NoINF y INF; (H) niveles soluble de TGF β (pg/ml) en el grupo CTL, en pacientes NVHC y VHC.

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de citocinas soluble en receptores hepáticos en situación pre-trasplante**

Los valores de corte (cut-off) para la estratificación de receptores hepáticos como alto riesgo, tanto para INF como para VHC en pre-trasplante, en función de los niveles solubles de citocina se muestran en la tabla 4.18. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis previamente realizado. Los niveles de citocina soluble (pg/ml)

en pre-trasplante de IL-10 e IL-17 fueron capaces de discriminar de forma exacta entre pacientes NoINF y INF, y NVHC y VHC, respectivamente (Fig.4.25).

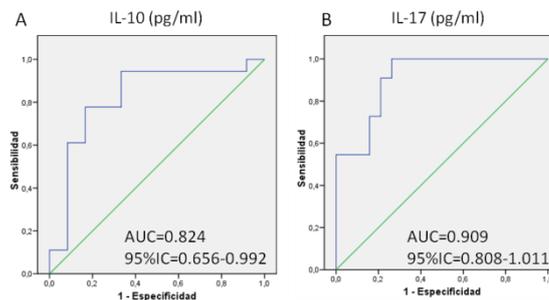


Figura 4.25. Curvas ROC pre-trasplante para los valores de corte (cut-off) que mejor discriminaron de forma precisa a receptores hepáticos con infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C. Valores de AUC para (A) niveles solubles de IL-10 (pg/ml) en pacientes con infección oportunista y (B) niveles solubles de IL-17 (pg/ml) en pacientes con recidiva de virus de hepatitis C.

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función de los niveles solubles de IL-10 (pg/ml) en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, niveles solubles de IL-10 inferiores a 50.49 pg/ml (Fig.4.25A; AUC=0.824, 95%IC=0.656-0.992, $P=0.003$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles solubles de IL-10, como alto riesgo de INF cuando los niveles de IL-10 fueron ≤ 50.49 pg/ml o como bajo riesgo de INF cuando éstos fueron >50.49 pg/ml.

El 46.67% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles solubles de IL-10 >50.49 pg/ml, de los cuáles el 71.43% no desarrolló INF, mientras que el 28.57% restante desarrollaron INF, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 53.33% de receptores hepáticos restante fueron clasificados como alto riesgo de INF con niveles solubles de IL-10 ≤ 50.49 pg/ml, de los cuáles el 87.5% tuvo infección, mientras que el 12.5% restante no desarrolló INF, a pesar de haber sido clasificados en el grupo de alto riesgo (sensibilidad=77.78%, 95%IC=52.36-93.45; especificidad=83.33%, 95%IC=51.50-97.42; $P=0.002$).

- Estratificación del riesgo de recidiva de virus de hepatitis C en función de los niveles solubles de IL-17 (pg/ml) en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles solubles de IL-17 superiores a 178.8 pg/ml (Fig.4.25C; AUC=0.909, 95%IC=0.808-1.011, $P=0.002$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles solubles de IL-17, como alto riesgo de RA cuando los niveles de IL-17 fueron ≥ 178.8 pg/ml o como bajo riesgo de VHC cuando los niveles de IL-17 fueron < 178.8 pg/ml.

El 46.67% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de VHC con niveles solubles de IL-17 < 178.8 pg/ml, de los cuáles el 100% no desarrollaron VHC. Del mismo modo, el 53.33% de receptores hepáticos restantes fueron clasificados como alto riesgo de VHC con niveles solubles de IL-17 ≥ 178.8 pg/ml, de los cuáles el 68.75% desarrolló VHC, mientras que el 31.25% restante no desarrollaron VHC, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=100%, 95%IC=71.33-100; especificidad=73.68%, 95%IC=48.80-90.75; $P=0.008$).

Tabla 4.18. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores hepáticos como alto riesgo de infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Infección oportunista</i>				
IL-10 (pg/ml)	50.49	0.824 (0.656-0.992)	77.78 (52.36-93.45)	83.33 (51.50-97.42)
<i>Recidiva de virus C</i>				
IL-17 (pg/ml)	178.8	0.909 (0.808-1.011)	100 (71.33-100)	73.68 (48.80-90.75)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de infección oportunista y recidiva de VHC basado en el logit INF y logit VHC**

Tras haber estudiado los biomarcadores que mejor discriminaron a receptores hepáticos como alto riesgo de INF y recidiva VHC, se obtuvieron el logit INF y logit VHC para cada biomarcador de forma individual. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron todos los coeficientes necesarios para poder calcular la probabilidad de INF ($e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$) y recidiva VHC ($e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$). Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente INF y VHC, y como variable predictiva los niveles solubles

de IL-10 para INF e IL-17 para recidiva VHC. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular los logit de INF y VHC para niveles solubles de IL-17 e IFN γ se muestran en la tabla 4.19.

➤ Predicción de infección oportunista en receptores hepáticos basado en los niveles solubles de IL-10 en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles solubles de IL-10 en pre-trasplante predijo que del grupo INF, el 77.8% desarrollarían INF; mientras que el 22.2% restante se predijo ausencia de INF a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 75% no desarrollaría INF, mientras que en el 25% restante se pronosticó INF, a pesar de no haberla desarrollado (sensibilidad=77.78%, 95%IC=52.36-93.45; especificidad=75%, 95%IC=42.84-94.22; OR=1.918, 95%IC=1.862-1.977; $P=0.007$).

➤ Predicción de recidiva de virus de hepatitis C en receptores hepáticos basado en los niveles solubles de IL-17 en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles solubles de IL-17 en pre-trasplante predijo que del grupo VHC, el 81.8% desarrollarían VHC, mientras que el 18.2% restante se predijo ausencia de VHC, a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NVHC, el 84.2% no desarrollaría recidiva, mientras que en el 15.8% restante se pronosticó VHC, a pesar de no tenerla (sensibilidad=81.82%, 95%IC=48.24-97.18; especificidad=84.21%, 95%IC=60.40-96.43; OR=1.023, 95%IC=1.007-1.040; $P=0.002$).

Tabla 4.19. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C en situación pre-trasplante en función de los niveles solubles de IL-10 e IL-17 en receptores hepáticos.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
<i>Infección oportunista</i>						
IL-10 (pg/ml)	-0.086	7.176	1.918 (1.862-1.977)	77.78 (52.36-93.45)	75 (42.84-94.22)	0.007
Constante	4.778					
Logit INF = 4.778 + (IL-10 x -0.086)						
<i>Recidiva de virus de hepatitis C</i>						
IL-17 (pg/ml)	0.023	7.840	1.023 (1.007-1.040)	81.82 (48.24-97.18)	84.21 (60.40-96.43)	0.002
Constante	-5.520					
Logit VHC = -5.520 + (IL-17 x 0.023)						

La fórmula para los logit de INF y VHC deriva de los coeficientes del modelo que también se muestra. Los logit de INF y VHC pueden ser utilizados para predecir la probabilidad ambos eventos clínicos con las fórmulas $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$ y $e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$.

4.2.2.8. Niveles pre-trasplante de IFN γ , IL-17, IL-10 y TGF β soluble de receptores renales y su relación con RA e INF

En la figura 4.26 se encuentran representados los niveles en pre-trasplante de citocinas solubles tras estimulación *in vitro* de ambos grupos de estudio (RA e INF) de receptores renales.

Los niveles solubles de IFN γ (pg/ml) no mostraron significación tanto entre en el grupo NRA y RA (Fig.4.26A; 564.26 ± 178.83 vs 691.15 ± 106.31 , $P=0.798$), como entre el grupo NoINF y INF (Fig.4.26B; 580.24 ± 97.71 vs 803.57 ± 178.59 ; $P=0.264$).

Del mismo modo, los niveles solubles de IL-17 (pg/ml) no mostraron significación ni en el grupo NRA y RA (Fig.4.26C; 157.39 ± 25.06 vs 266.92 ± 35.88 , $P=0.115$), ni en el grupo NoINF e INF (Fig.4.26D; 233.21 ± 38.35 vs 256.39 ± 47.29 , $P=0.734$).

Los niveles solubles de IL-10 (pg/ml) tampoco mostraron diferencias significativas entre receptores renales NRA y RA (Fig.4.26E; 70.41 ± 30.07 vs 64.98 ± 10.09 , $P=0.979$), así como tampoco entre los grupos NoINF y INF (Fig.4.26F; 74.28 ± 13.01 vs 52.74 ± 14.73 , $P=0.159$).

Por último, y al igual que en los casos anteriores, los niveles solubles de TGF β (pg/ml) no presentaron diferencias significativas ni entre receptores renales NRA y RA (Fig.4.26G; 897.77 ± 178.59 vs 1096.22 ± 131.76 , $P=0.441$), ni entre los grupos NoINF y INF (Fig.4.26H; 1090.85 ± 120.22 vs 1003.71 ± 201.25 , $P=0.456$).

En cuanto a los niveles de citocinas solubles entre el grupo control y ambos grupos de estudio; el grupo control presentó niveles significativamente inferiores de IFN γ en comparación con los grupos de estudio RA y NRA (Fig.4.26A, $P=0.001$ y $P=0.0001$; respectivamente), así como también entre los grupos NoINF y INF (Fig.4.26B, $P=0.0002$ y $P=0.0001$; respectivamente). Por el contrario, los niveles solubles de IL-17 del grupo control fueron significativamente superiores a los niveles de receptores renales con RA (Fig.4.26C, $P=0.0004$). Los niveles solubles de IL-10 fueron significativamente menores en el grupo control en comparación con los niveles de los grupos RA y NRA (Fig.4.26E, $P=0.03$ y $P=0.005$), así como también en comparación con los niveles de receptores renales NoINF y INF (Fig.4.26F, $P=0.003$ y $P=0.05$). Por último, los niveles de TGF β del grupo control fueron significativamente inferiores que los niveles de receptores renales RA y NRA (Fig.4.26G, $P=0.0001$ y $P<0.0001$), así como también con los niveles de receptores renales NoINF y INF (Fig.4.26H, $P<0.0001$ y $P=0.001$).

Ya que no se observaron diferencias significativas en los niveles de citocinas solubles entre los distintos grupos en pre-trasplante, no se incluyeron estas citocinas como posibles biomarcadores predictivos de evento clínico en pre-trasplante renal.

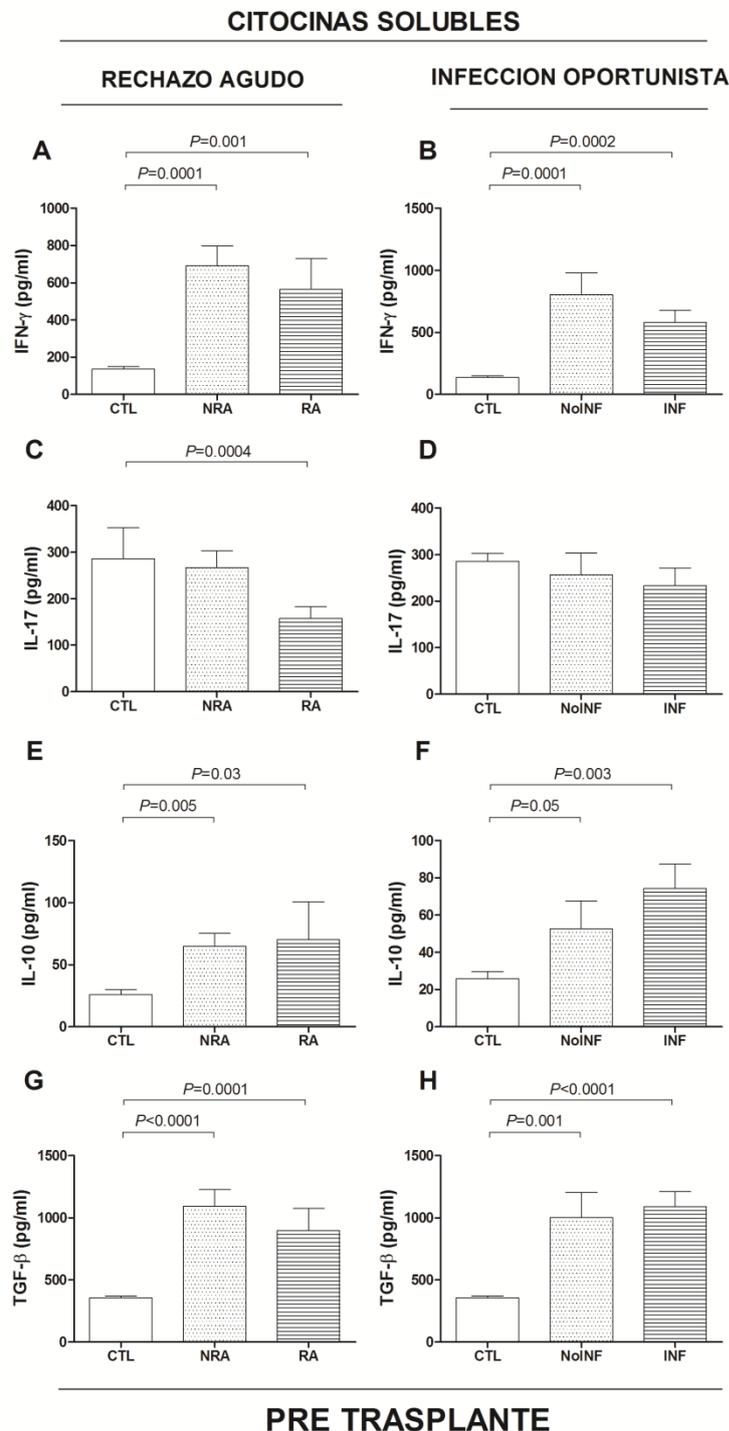


Figura 4.26: Niveles pre-trasplante de citocinas soluble a partir de cultivo de sangre periférica de receptores renales. (A) expresión soluble de IFN- γ (pg/ml) en controles (CTL), pacientes sin rechazo agudo (NRA) y pacientes con rechazo agudo (RA); (B) expresión soluble de IFN γ (pg/ml) en controles, en pacientes NoINF y INF; (C) expresión soluble de IL-17 (pg/ml) en controles CTL, pacientes NRA) y RA; (D) expresión soluble de IL-17 (pg/ml) en controles, en pacientes NoINF y INF; (E) expresión soluble de IL-10 (pg/ml) en controles, pacientes NRA y RA; (F) expresión soluble de IL-10 (pg/ml) en controles, en pacientes NoINF y INF; (G) expresión soluble de TGF β (pg/ml) en controles, pacientes NRA y RA; (H) expresión soluble de TGF β (pg/ml) en controles, en pacientes NoINF y INF.

4.2.2.9. Niveles pre-trasplante de linfocitos aTreg ($CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$) y linfocitos nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) en receptores hepáticos y su relación con rechazo agudo e infección oportunista

Como se observa en la figura 4.27, tanto los niveles pre-trasplante de las subpoblaciones de aTregs y de nTregs en hepáticos presentaron diferencias estadísticamente significativa entre los grupos de estudio (RA e INF). En concreto, niveles pre-trasplante (%) de células aTreg con respecto a las células T $CD4^+$ periféricas totales de receptores hepáticos con RA fue significativamente inferior en comparación con los niveles observados en receptores hepáticos NRA (Fig.4.27A; 0.91 ± 0.15 vs 2.04 ± 0.25 , $P=0.002$). Del mismo modo, receptores hepáticos con RA presentaron cifras absolutas (n° células/ mm^3), en pre-trasplante, de células aTreg con respecto a las células T $CD4^+$ periféricas totales significativamente inferior en comparación con receptores hepáticos NRA (Fig.4.27C; 11.07 ± 1.87 vs 35.75 ± 6.75 , $P=0.001$).

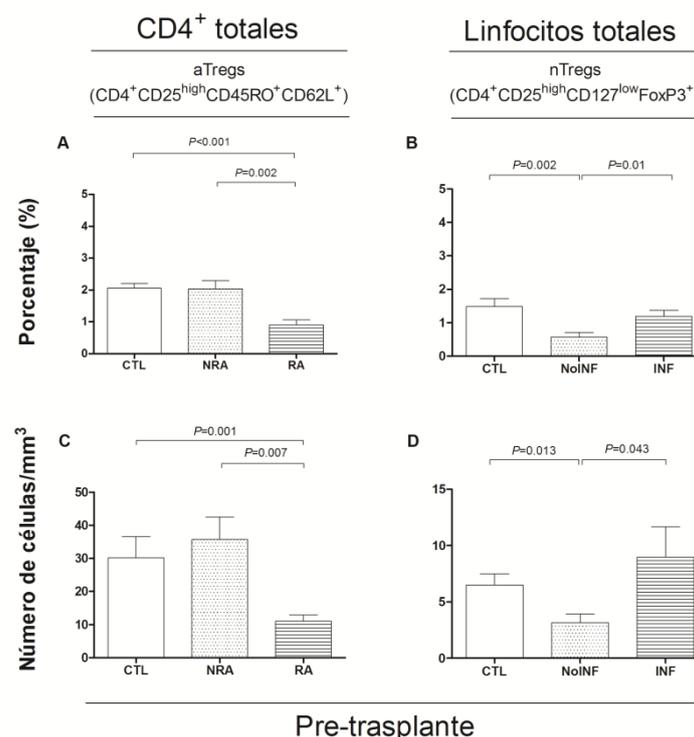


Figura 4.27: Niveles de linfocitos T reguladores de receptores hepáticos en pre-trasplante. (A) frecuencia (%) de linfocitos aTreg ($CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$) con respecto a linfocitos T $CD4^+$ totales de SP en controles (CTL), pacientes sin rechazo agudo (NRA) y pacientes con rechazo agudo (RA); (B) frecuencia (%) de linfocitos nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) con respecto a linfocitos T totales de SP en controles, pacientes NoINF y INF; (C) cifras absolutas (n° células/ mm^3) de linfocitos aTreg ($CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$) con respecto a linfocitos T $CD4^+$ totales de SP en controles, pacientes NRA y RA; (D) cifras absolutas (n° células/ mm^3) de linfocitos nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) con respecto a linfocitos T totales de SP en controles, en pacientes NoINF y INF.

En cuanto al grupo de INF; la frecuencia (%) de la subpoblación de nTregs con respecto a linfocitos T totales de SP de receptores hepáticos INF fue significativamente superior comparados con grupo NoINF (Fig.4.27B; 1.19 ± 0.18 vs 0.57 ± 0.14 , $P=0.01$). Del mismo modo, las cifras absolutas (n° células/ mm^3) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales de SP de receptores hepáticos INF fueron significativamente superiores comparadas con grupo NoINF (Fig.4.27D; 8.99 ± 2.66 vs 3.14 ± 0.79 , $P=0.043$).

En cuanto a los niveles de ambas subpoblaciones de linfocitos T reguladores (aTregs y nTregs) entre el grupo control y los grupos de estudio, tanto el porcentaje (Fig.4.27B; $P=0.002$) como las cifras absolutas (Fig.4.27D; $P=0.013$) de nTregs con respecto a linfocitos T totales de SP del grupo control fueron significativamente superiores en comparación con los niveles observados en receptores hepáticos NoINF. Del mismo modo, tanto el porcentaje como las cifras absolutas de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4^+ totales del grupo control fueron significativamente superior comparadas con receptores hepáticos RA (Fig.4.27A; $P<0.001$ y Fig.4.27C; $P=0.001$).

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de linfocitos aTreg y nTreg en receptores hepáticos en situación pre-trasplante**

Los valores de corte para la estratificación de receptores hepáticos como alto riesgo, tanto para RA como INF, en pre-trasplante, en función de los niveles en SP de las subpoblaciones de aTregs y nTregs se muestran en la tabla 4.20. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis previo.

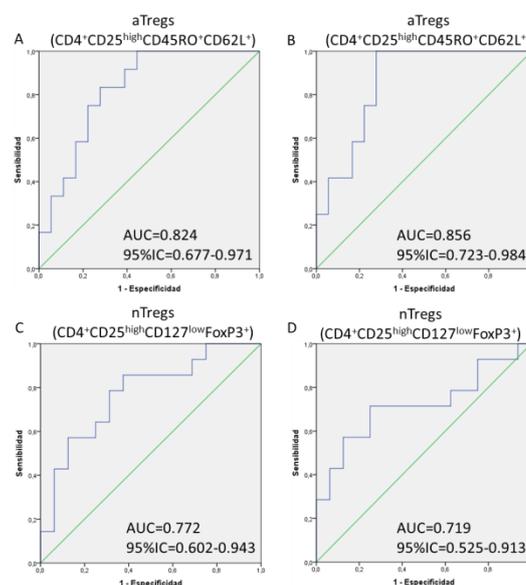


Figura 4.28. *Curvas ROC pre-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores hepáticos con rechazo agudo e infección oportunista. Valores de AUC para (A) frecuencia (%) de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ en pacientes con RA, (B) cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ en pacientes con RA, (C) frecuencia (%) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pacientes con INF y (D) cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pacientes con INF.*

Tanto la frecuencia (%) como las cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ de SP en pre-trasplante fueron capaces de discriminar de forma precisa a receptores hepáticos con alto riesgo de RA. Del mismo modo, tanto la frecuencia (%) como las cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales de SP en pre-trasplante fueron capaces de discriminar de forma precisa a pacientes con alto riesgo de INF (Fig.4.28).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos aTreg en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, niveles pre-trasplante de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales $\leq 1.5\%$ (Fig.4.28A; AUC=0.824, 95%IC=0.677-0.971, $P=0.003$) fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la frecuencia de aTreg, como alto riesgo de RA cuando los niveles de aTreg fueron $\leq 1.5\%$ o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de aTregs fueron $> 1.5\%$.

El 50% de receptores hepáticos fue clasificado como bajo riesgo de RA con una frecuencia de aTregs $> 1.5\%$, de los cuáles el 86.7% no desarrolló RA, mientras que el 13.3% restante tuvo RA, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 50% de receptores hepáticos restante fue clasificado como alto riesgo de RA con una frecuencia de aTregs $\leq 1.5\%$, de los cuáles el 66.7% tuvo RA, mientras que el 33.3% restante no desarrollaron RA, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.59-97.91; especificidad=72.22%, 95%IC=46.52-90.31; $P=0.008$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de las cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos aTreg en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, una concentración de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales ≤ 21.08 células/mm³ (Fig.4.28B; AUC=0.856,

95%IC=0.723-0.984, $P=0.001$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de linfocitos aTreg en cifras absolutas, como alto riesgo de RA cuando la concentración de aTreg fue ≤ 21.08 células/mm³ o como bajo riesgo de RA cuando la concentración de aTregs fue >21.08 células/mm³.

El 43.3% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con cifras de aTregs >21.08 células/mm³, de los cuáles el 100% no tuvo RA. Del mismo modo, el 56.7% de receptores hepáticos restante fueron clasificados como alto riesgo de RA con cifras de aTregs ≤ 21.08 células/mm³, de los cuáles el 70.6% tuvo RA, mientras que el 29.4% restante no tuvo RA, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=100%, 95%IC=73.54-100; especificidad=72.22%, 95%IC=46.52-90.31; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % de linfocitos nTreg en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, un porcentaje de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales $\geq 0.42\%$ (Fig.4.28C; AUC=0.772, 95%IC=0.602-0.943, $P=0.011$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la frecuencia de nTreg, como alto riesgo de INF cuando el porcentaje de nTreg fue $\geq 0.42\%$ o como bajo riesgo de INF cuando la concentración de nTregs fue $<0.42\%$.

El 40% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de tener INF con una frecuencia de nTregs $<0.42\%$, de los cuáles el 83.3% no desarrolló INF, mientras que el 16.7% restante tuvieron INF, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 60% de receptores hepáticos restante fueron clasificados como alto riesgo de INF con una frecuencia de nTregs $\geq 0.42\%$, de los cuáles el 77.8% desarrolló INF, mientras que el 22.2% restante no desarrolló INF, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=87.50%, 95%IC=61.65-98.45; especificidad=71.43%, 95%IC=41.90-91.61; $P=0.011$).

- Estratificación del riesgo de infección oportunista en función de las cifras absolutas (n° células/ mm^3) de linfocitos nTreg en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado para nTregs en cifras absolutas (n° células/ mm^3) con respecto a linfocitos T totales, niveles superiores a 3.42 células/ mm^3 (Fig.4.28D; AUC=0.719, 95%IC=0.525-0.913, $P=0.042$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de las cifras absolutas de nTreg en SP, como alto riesgo de INF cuando los valores de nTreg fueron ≥ 3.42 células/ mm^3 o como bajo riesgo de INF cuando los valores de nTregs fueron < 3.42 células/ mm^3 .

El 53.33% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de nTregs < 3.42 células/ mm^3 , de los cuáles el 75% no desarrolló INF, mientras que el 25% restante desarrolló INF, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 46.67% de receptores hepáticos restante fueron clasificados como alto riesgo de INF con niveles de nTregs ≥ 3.42 células/ mm^3 , de los cuáles el 71.4% desarrolló INF, mientras que el 28.6% restante no tuvo INF, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=71.43%, 95%IC=41.90-91.61; especificidad=75%, 95%IC=47.62-92.73; $P=0.026$).

Tabla 4.20. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores hepáticos como alto riesgo de rechazo agudo e infección oportunista.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Rechazo agudo</i>				
Linfocitos T CD4				
% aTregs	1.5	0.824 (0.677-0.971)	83.33 (51.59-97.91)	72.22(46.52-90.31)
aTregs/ mm^3	21.08	0.856 (0.723-0.984)	100 (73.54-100)	72.22(46.52-90.31)
<i>Infección oportunista</i>				
Linfocitos T totales				
% nTregs	0.42	0.772 (0.602-0.943)	87.50 (61.65-98.45)	71.43(41.90-91.61)
nTregs/ mm^3	3.42	0.719 (0.525-0.913)	71.43 (41.90-91.61)	75.00 (47.62-92.73)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de rechazo agudo e infección oportunista basado en el logit RA y logit INF en receptores hepáticos**

Tras haber estudiado los biomarcadores que mejor discriminaron a receptores hepáticos como alto riesgo de RA e INF, se obtuvieron los logit RA y logit INF para cada biomarcador de forma individual. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto

por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron todos los coeficientes necesarios para poder calcular la probabilidad de desarrollar RA ($e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$) e INF ($e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$). Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA e INF, y como variable predictiva la frecuencia y cifras absolutas de aTregs y nTregs con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales para RA y linfocitos totales para INF, respectivamente. Los coeficientes del modelo de regresión usados para calcular los logit de RA e INF para % y cifras absolutas de células aTreg y nTreg se ven en la tabla 4.21.

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en niveles pre-trasplante de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles pre-trasplante de células aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales predijo que del grupo de estudio con RA, desarrollarían RA el 83.3%; mientras que en el 16.7% restante se predijo NRA, a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo de NRA, el 72.2% no desarrollaría RA, mientras que en el 27.8% restante se pronosticó RA, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.59-97.91; especificidad=72.22%, 95%IC=46.52-90.31; OR=1.358, 95%IC=1.239-1.397; $P=0.011$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en cifras absolutas (células/mm³) pre-trasplante de células aTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ totales

El modelo de regresión logística univariante propuesto para cifras absolutas (células/mm³) de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales en pre-trasplante predijo que del grupo de RA, el 75% desarrollarían RA, mientras que en el 25% restante se predijo ausencia de RA, a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 77.8% no desarrollarían RA, mientras que en el 22.2% restante se pronosticó desarrollo de RA, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=75%, 95%IC=42.81-94.51; especificidad=77.78%, 95%IC=52.36-93.59; OR=1.259, 95%IC=1.196-1.322; $P=0.017$).

➤ Predicción de infección oportunista en receptores hepáticos basado en la frecuencia de nTregs con respecto a linfocitos T totales en situación pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la frecuencia de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pre-trasplante predijo que del grupo

INF, desarrollarían INF el 71.43%, mientras que en el 28.57% restante se predijo NoINF, a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo de receptores hepáticos NoINF, el 87.5% no desarrollaría INF, mientras que en el 12.5% restante se pronosticó desarrollo de INF, a pesar de no haberla desarrollado (sensibilidad=71.43%, 95%IC=41.90-91.61; especificidad=87.50%, 95%IC=61.65-98.45; OR=1.136, 95%IC=0.797-1.619; $P=0.005$).

➤ Predicción de infección oportunista en receptores hepáticos basado en las cifras absolutas (células/mm³) de nTregs respecto a linfocitos T totales en pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para las cifras absolutas (células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pre-trasplante predijo que del grupo INF, el 85.71% desarrollarían INF, mientras que el 14.29% restante se predijo NRA, a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 93.75% no desarrollaría INF, mientras que en el 6.25% restante se pronosticó INF, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=57.19-98.22; especificidad=93.75%, 95%IC=69.77-99.84; OR=1.019, 95%IC=0.981-1.037; $P=0.014$).

Tabla 4.21. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de rechazo agudo e infección oportunista en pre-trasplante de receptores hepáticos en función de la frecuencia y cifras absolutas de células aTreg y nTreg.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
Rechazo agudo	Linfocitos T CD4					
% aTregs	-1.783	6.392	1.358 (1.239-1.397)	83.33 (51.59-97.91)	72.22 (46.52-90.31)	0.011
Constante	2.037					
	Logit RA = 2.037 + (% aTregs x -1.783)					
aTregs/mm ³	-0.152	5.710	1.259 (1.196-1.322)	75 (42.81-94.51)	77.78 (52.36-93.59)	0.017
Constante	2.286					
	Logit RA = 2.286 + (aTregs/mm ³ x -0.152)					
Inf. oportunista	Linfocitos T totales					
% nTregs	2.349	7.863	1.136 (0.797-1.619)	71.43 (41.90-91.61)	87.50 (61.65-98.45)	0.005
Constante	-2.338					
	Logit INF = -2.338 + (% nTregs x 2.349)					
nTregs/mm ³	0.920	6.082	1.019 (0.981-1.037)	85.71 (57.19-98.22)	93.75 (69.77-99.84)	0.014
Constante	-3.333					
	Logit INF = -3.333 + (nTregs/mm ³ x 0.920)					

Las fórmulas para los logit de RA e INF derivan de los coeficientes del modelo que también se muestra. Los logit de RA e INF pueden ser utilizados para predecir la probabilidad de RA e INF con las fórmulas $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$ y $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$, respectivamente.

4.2.2.10. Niveles pre-trasplante de nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) en receptores renales y relación con RA e INF

En la figura 4.29 se muestran los resultados del análisis realizado en relación con el porcentaje y cifras absolutas de linfocitos nTreg en receptores renales RA y NRA. Tanto el porcentaje de linfocitos nTreg periféricos con respecto a linfocitos T $CD4^+$ así como con respecto a linfocitos T totales de receptores renales en pre-trasplante con RA fue significativamente inferior que en el grupo NRA (Fig.4.29A; 1.09 ± 0.34 vs 2.81 ± 0.32 , $P=0.005$ y Fig.4.29B; 0.38 ± 0.09 vs 0.97 ± 0.15 , $P=0.018$). Del mismo modo, tanto los niveles en cifras absolutas (células/ mm^3) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T $CD4^+$ como con respecto a linfocitos T totales de receptores renales con RA fueron significativamente inferiores a los niveles observados en el grupo NRA (Fig.4.29C; 10.52 ± 5.26 vs 35.16 ± 8.66 , $P=0.01$ y Fig.4.29D; 3.52 ± 1.51 vs 11.48 ± 2.66 , $P=0.038$).

En la figura 4.30 se muestran los resultados del análisis realizado en relación con el porcentaje y cifras absolutas de linfocitos nTreg en receptores renales INF y NoINF. En cuanto a los niveles pre-trasplante de linfocitos nTreg y su relación con presencia de INF, el análisis mostró que tanto la frecuencia como las cifras absolutas (células/ mm^3) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales de receptores renales con INF fueron significativamente mayor que en el grupo NoINF (Fig.4.30A; 1.77 ± 0.23 vs 0.71 ± 0.15 , $P=0.001$ y Fig.4.30B; 18.62 ± 3.49 vs 7.69 ± 1.87 , $P=0.039$).

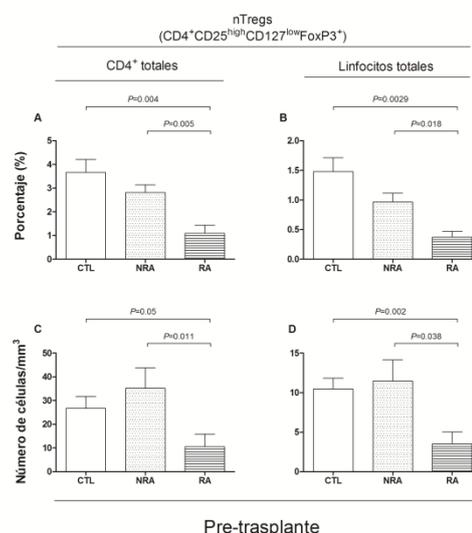


Figura 4.29: Niveles pre-trasplante de linfocitos T reguladores de receptores renales. (A) % de linfocitos nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) con respecto a los linfocitos T $CD4^+$ totales de SP en controles (CTL), pacientes sin rechazo agudo (NRA) y pacientes con rechazo agudo (RA); (B) % de linfocitos nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) con respecto a linfocitos T totales de SP en controles CTL, pacientes NRA y RA; (C) cifras absolutas (n° células/ mm^3) de linfocitos nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) con respecto a linfocitos T $CD4^+$ totales de SP en controles CTL, pacientes NRA y RA y (D) cifras absolutas (n° células/ mm^3) de nTregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) con respecto a linfocitos T totales de SP en controles CTL, en pacientes NRA y RA.

Por otro lado, tanto la frecuencia (%) como las cifras absolutas (células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ así como también con respecto a linfocitos T totales del grupo control fueron significativamente superiores que en el grupo RA (Fig.4.29A, $P=0.004$; Fig.4.29B, $P=0.0029$; Fig.4.29C, $P=0.05$; Fig.4.29D, $P=0.002$; respectivamente). Por el contrario, la frecuencia de nTregs, pero no las cifras absolutas, del grupo CTL fueron superiores a la observada en pacientes NoINF (Fig.4.30A, $P=0.02$).

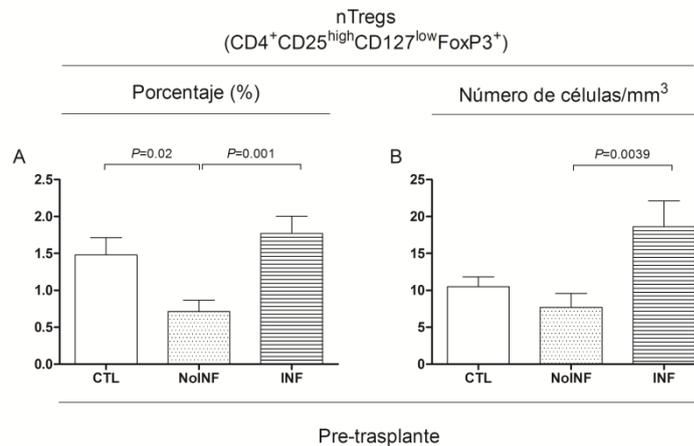


Figura 4.30: Niveles pre-trasplante de linfocitos T reguladores de receptores renales. (A) % de linfocitos nTreg (CD4⁺CD25^{high}CD127⁺FoxP3⁺) con respecto a los linfocitos T totales de SP en controles (CTL), pacientes sin infección oportunistista (NoINF) y pacientes con infección oportunistista (INF) y (B) cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos nTreg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺) respecto a linfocitos T de SP en CTL, NoINF y INF.

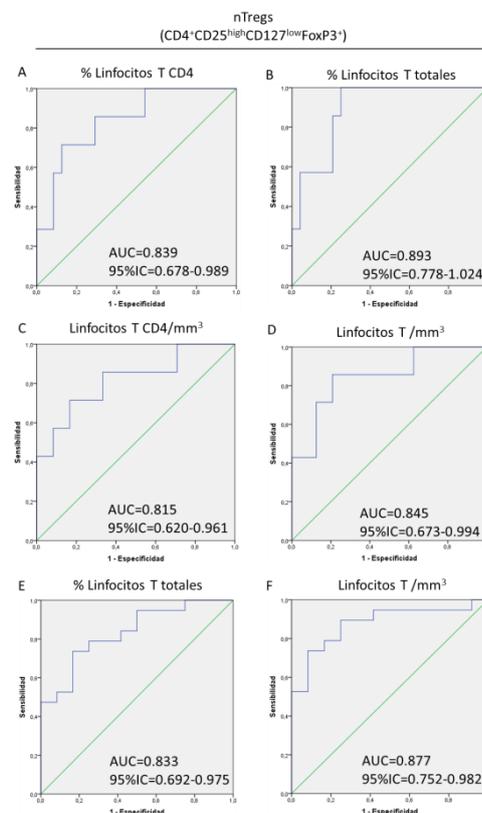


Figura 4.31. Curvas ROC pre-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores renales con rechazo agudo e infección oportunistista. Valores de AUC para (A) % de

linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ en pacientes con RA, **(B)** % de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pacientes con RA, **(C)** cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ en pacientes con RA, **(D)** cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pacientes con RA, **(E)** % de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pacientes con INF y **(F)** cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pacientes con INF.

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de nTreg en pre-trasplante renal**

Los valores de corte para la estratificación de receptores renales como alto riesgo, tanto para RA como INF en pre-trasplante, en función de los niveles en SP de linfocitos aTreg y nTreg se muestran en la tabla 4.22. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis previo.

Tanto la frecuencia (%) como las cifras absolutas (n° células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T totales en pre-trasplante fueron capaces de discriminar de forma precisa a receptores renales como alto riesgo de RA. Del mismo modo, tanto la frecuencia (%) como las cifras absolutas (n° células/mm³) de nTregs con respecto a los linfocitos T totales de SP en pre-trasplante fueron capaces de discriminar de forma precisa a receptores renales como alto riesgo de IFN (Fig.4.31).

- Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de frecuencia (%) de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ y T totales en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, una frecuencia de nTregs $\leq 1.03\%$ con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales (Fig.4.31A; AUC=0.839, 95%IC=0.678-0.989, $P=0.007$) así como también $\leq 0.7\%$ con respecto a linfocitos T totales (Fig.4.31B; AUC=0.792, 95%IC=0.627-0.957, $P=0.021$) en pre-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la frecuencia de nTregs, como alto riesgo de RA cuando los niveles de nTregs fueron $\leq 1.03\%$ o como bajo riesgo cuando los niveles de nTregs fueron $> 1.03\%$ con respecto a linfocitos T CD4⁺; y como alto riesgo de RA cuando la frecuencia de nTregs fue $\leq 0.7\%$ o como bajo riesgo cuando la frecuencia de nTregs fue $> 0.7\%$ con respecto a linfocitos T totales.

El 74.2% de receptores renales fue clasificado como bajo riesgo de RA con una frecuencia de nTregs $> 1.03\%$ respecto a linfocitos T CD4⁺, de los cuáles el 95.65% no desarrolló RA, mientras que el 4.35% restante tuvo RA, a pesar de haber sido clasificados

dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 25.8% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de RA con frecuencia de nTregs $\leq 1.03\%$ respecto a linfocitos T CD4⁺, de los cuáles 75% tuvo RA, mientras que el 25% restante no presentó, a pesar de ser clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=42.13-99.64; especificidad=91.67%, 95%IC=73.00-98.97; $P=0.006$).

Asimismo el 67.7% de receptores renales fue clasificado como bajo riesgo de RA con una frecuencia de nTregs $>0.7\%$ respecto a linfocitos T totales, de los cuáles el 100% no tuvo RA. Del mismo modo, el 32.3% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de RA con una frecuencia de nTregs $\leq 0.7\%$ con respecto a linfocitos T totales, de los cuáles el 70% tuvo RA, mientras que el 30% restante no lo tuvo, a pesar de ser clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=100%, 95%IC=59.04-100; especificidad=87.50%, 95%IC=67.64-97.34; $P=0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de las cifras absolutas (células/mm³) de linfocitos nTreg respecto a T CD4⁺ y T totales en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, niveles de nTregs ≤ 7.32 células/mm³ con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales (Fig.4.31C; AUC=0.815, 95%IC=0.620-0.971, $P=0.012$), así como también ≤ 3.69 células/mm³ con respecto a linfocitos T totales (Fig.4.31D; AUC=0.845, 95%IC=0.673-0.994, $P=0.006$) en pre-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de las cifras absolutas de nTregs, como alto riesgo de RA cuando los niveles de nTregs fueron ≤ 7.32 células/mm³ o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de nTregs fueron >7.32 células/mm³ respecto a linfocitos T CD4⁺; y como alto riesgo de RA cuando los niveles de nTregs fueron ≤ 3.69 células/mm³ o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de nTregs fueron >3.69 células/mm³ con respecto a linfocitos T totales.

El 80.7% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de RA con cifras absolutas de nTregs >7.32 células/mm³ respecto a linfocitos T CD4⁺, de los cuáles el 92% no tuvo RA, mientras que el 8% restante si tuvo, a pesar de haber sido clasificados como de bajo riesgo. Del mismo modo, el 19.3% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de RA con cifras absolutas de nTregs ≤ 7.32 células/mm³ con respecto a linfocitos T CD4⁺, de los cuáles el 83.3% tuvo RA, mientras que el 16.7%

restante no lo tuvo, a pesar de ser clasificados como alto riesgo (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.04-96.33; especificidad=95.83%, 95%IC=78.88-99.87; $P=0.012$).

Asimismo, el 71% de receptores renales fue clasificado como bajo riesgo de RA con cifras absolutas de nTregs >3.69 células/mm³ con respecto a linfocitos T totales, de los cuáles el 95.5% no tuvo RA, mientras que el 4.5% restante lo tuvo, a pesar de haber sido clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 29% de receptores renales fueron clasificados como alto riesgo de RA con cifras absolutas de nTregs ≤ 3.69 células/mm³ respecto a células T totales, de los cuáles el 66.7% tuvo RA, mientras que el 33.3% no tuvo, aún clasificándose de alto riesgo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=42.13-99.64; especificidad=87.50%, 95%IC=67.64-97.34; $P=0.004$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función de frecuencia (%) y cifras absolutas (células/mm³) de nTreg respecto a células T totales pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, una frecuencia de nTregs $\leq 0.95\%$ (Fig.4.31E; AUC=0.833, 95%IC=0.692-0.975, $P=0.002$) así como también niveles de nTregs ≤ 13.87 células/mm³ con respecto a linfocitos T totales (Fig.4.31F; AUC=0.877, 95%IC=0.752-0.982, $P=0.0005$) en pre-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de la frecuencia y cifras absolutas de nTregs, como alto riesgo de INF cuando la frecuencia de nTregs fueron $\geq 0.95\%$ o como bajo riesgo de INF cuando la frecuencia de nTregs fueron $<0.95\%$; así como también como alto riesgo de INF con cifras absolutas de nTregs fue ≥ 13.87 células/mm³ o como bajo riesgo de INF con cifras absolutas de nTregs fue <13.87 células/mm³ con respecto a linfocitos T totales.

El 41.9% de receptores renales fue clasificado como bajo riesgo de INF con una frecuencia de nTregs $<0.95\%$, de los cuáles el 84.6% no tuvo INF, mientras que el 15.4% restante tuvo INF, a pesar de ser clasificados como bajo riesgo. Del mismo modo, el 58.1% de receptores renales restantes fue clasificado como alto riesgo de INF con una frecuencia de nTregs $\geq 0.95\%$, de los cuáles el 83.3% tuvo INF, mientras que el 16.7% restante no tuvo, a pesar de ser clasificados de alto riesgo (sensibilidad=88.24%, 95%IC=63.56-98.54; especificidad=78.57%, 95%IC=49.20-95.34; $P=0.008$).

Asimismo, el 51.6% de receptores renales fue clasificado como bajo riesgo de INF con cifras absolutas de nTregs <13.87 células/mm³, de los cuáles el 81.3% no tuvo INF, mientras que el 18.7% restante la tuvo, a pesar de ser clasificados como de bajo riesgo.

Del mismo modo, el 48.4% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de INF con cifras absolutas de nTregs ≥ 13.87 células/mm³, de los cuáles el 93.3% tuvo INF, mientras que el 6.7% restante no la tuvo, a pesar de ser clasificados como de alto riesgo (sensibilidad=82.35%, 95% IC=56.57-96.20; especificidad=92.86%, 95% IC=66.13-99.82; $P=0.001$).

Tabla 4.22. Valores de corte (cut-off) en pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a los receptores renales como alto riesgo de rechazo agudo e infección oportunista.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Rechazo agudo</i>				
% nTregs (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺)				
Linfocitos T CD4	1.03	0.839 (0.678-0.989)	85.71 (42.13-99.64)	91.67 (73.00-98.97)
Linfocitos T totales	0.70	0.792 (0.627-0.957)	100 (59.04-100)	87.50 (67.64-97.34)
nTregs/mm ³ (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺)				
Linfocitos T CD4	7.32	0.815 (0.620-0.971)	71.43 (29.04-96.33)	95.83 (78.88-99.87)
Linfocitos T totales	3.69	0.845 (0.673-0.994)	85.71 (42.13-99.64)	87.50 (67.64-97.34)
<i>Infección oportunista</i>				
% nTregs (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺)				
Linfocitos T totales	0.95	0.833 (0.692-0.975)	88.24 (63.56-98.54)	78.57 (49.20-95.34)
nTregs/mm ³ (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} FoxP3 ⁺)				
Linfocitos T totales	13.87	0.877 (0.752-0.982)	82.35 (56.57-96.20)	92.86 (66.13-99.82)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de rechazo agudo e infección oportunista basado en logit RA y INF en renales**

Tras haber estudiado los biomarcadores que mejor discriminaron a receptores renales como alto riesgo de RA e INF, se obtuvieron los logit RA y logit INF para cada biomarcador de forma individual. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron todos los coeficientes necesarios para poder calcular la probabilidad de RA ($e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$) y de INF ($e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$). Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA e INF, y como variable predictiva la frecuencia y cifras absolutas de nTregs con respecto a los linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T totales para RA y, la frecuencia y cifras absolutas de nTregs con respecto a linfocitos T totales para INF, respectivamente. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular el logit de RA e INF para la frecuencia y cifras absolutas de nTregs se muestran en la tabla 4.23.

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores renales basado en la frecuencia de nTregs con respecto a linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T totales en pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la frecuencia (%) de nTregs con respecto a linfocitos T CD4⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo RA, desarrollarían RA el 71.4%, mientras que en el 28.6% restante se predijo NRA, a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 91.7% no desarrollaría RA, mientras que en el 8.3% restante se pronosticó RA, a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.04-96.33; especificidad=91.67%, 95%IC=73.00-98.97; OR=1.083, 95%IC=1.028-1.137; *P*=0.032).

Asimismo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para la frecuencia (%) de nTregs con respecto a linfocitos T totales en pre-trasplante predijo que del grupo RA, desarrollarían RA el 85.7%, mientras que en el 14.3% restante se predijo NRA a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 95.8% no desarrollaría RA, mientras que en el 4.2% restante se pronosticó RA, a pesar de no tenerlo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=42.13-99.64; especificidad=95.83%, 95%IC=78.88-99.89; OR=1.121, 95%IC=1.064-1.177; *P*=0.003).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores renales basado en cifras absolutas (células/mm³) de linfocitos nTreg respecto a T CD4⁺ y T totales en pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para las cifras absolutas de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ en situación pre-trasplante predijo que del grupo RA, desarrollarían RA el 71.4%, mientras que en el 28.6% restante se predijo NRA, a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 91.7% no desarrollaría RA, mientras que en el 8.3% restante se pronosticó RA, a pesar de no tenerlo (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.04-96.33; especificidad=91.67%, 95%IC=73.00-98.97; OR=1.721, 95%IC=1.635-1.807; *P*=0.043).

Asimismo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para las cifras absolutas (células/mm³) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T totales en pre-trasplante predijo que del grupo de receptores renales RA, el 85.7% tendrían RA, mientras que en el 14.3% restante se predijo NRA, a pesar de haberlo desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 100% no desarrollaría RA (sensibilidad=85.71%, 95%IC=42.13-99.64; especificidad=100%, 95%IC=85.75-100; OR=1.817, 95%IC=1.726-1.908; *P*=0.002).

➤ Predicción de infección oportunista en receptores renales basado en frecuencia (%) y cifras absolutas (células/mm³) de nTreg frente a T totales pre-trasplante

El modelo de regresión logística univariante propuesto para la frecuencia (%) de linfocitos nTreg con respecto a T totales en pre-trasplante predijo que del grupo de receptores renales INF, desarrollarían INF el 78.9%, mientras que en el 21.1% restante se predijo NoINF, a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 83.3% no desarrollaría INF, mientras que en el 16.7% restante se pronosticó INF, a pesar de no haberla tenido (sensibilidad=78.95%, 95%IC=54.43-93.95; especificidad=83.33%, 95%IC=51.59-97.91; OR=1.366, 95%IC=1.297-1.434; $P=0.015$).

Asimismo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para las cifras absolutas (células/mm³) de linfocitos nTreg respecto a T totales en pre-trasplante predijo que del grupo INF, desarrollarían INF el 89.5%, mientras que en el 10.5% restante se predijo NoINF, a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 75% no tendrían INF, mientras que en el 25% restante se predijo INF, a pesar de no haberla tenido (sensibilidad=89.47%, 95%IC=66.86-98.70; especificidad=75%, 95%IC=42.81-94.51; OR=1.211, 95%IC=1.045-1.404; $P=0.011$).

Tabla 4.23. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de rechazo agudo e infección oportunista en situación pre-trasplante de receptores renales en función de la frecuencia y cifras absolutas de linfocitos nTreg.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
Rechazo agudo						
Linfocitos T CD4						
% nTregs	-1.179	4.576	1.083 (1.028-1.137)	71.43 (29.04-96.33)	91.67 (73.00-98.97)	0.032
Constante	0.858	-	-	-	-	-
Logit RA = 0.858 + (%nTregs x -1.179)						
nTregs/mm ³	-0.327	4.091	1.721 (1.635-1.807)	71.43 (29.04-96.33)	91.67 (73.00-98.97)	0.043
Constante	2.147	-	-	-	-	-
Logit RA = 2.147 + (nTregs/mm ³ x -0.327)						
Linfocitos T totales						
%nTregs	-0.268	1.237	1.121 (1.064-1.177)	85.71 (42.13-99.64)	95.83 (78.88-99.89)	0.003
Constante	0.680	-	-	-	-	-
Logit RA = 0.680 + (%nTregs x -0.268)						
nTregs/mm ³	-1.328	3.665	1.817 (1.726-1.908)	85.71 (42.13-99.64)	100 (85.75-100)	0.002
Constante	3.841	-	-	-	-	-
Logit RA = 3.841 + (nTregs/mm ³ x -1.328)						
Inf. Oportunista						
Linfocitos T totales						
% nTregs	1.769	5.971	1.366 (1.297-1.434)	78.95 (54.43-93.95)	83.33 (51.59-97.91)	0.015
Constante	-1.544	-	-	-	-	-
Logit INF = -1.544 + (%nTregs x 1.769)						
nTregs/mm ³	0.192	6.509	1.211 (1.045-1.404)	89.47 (66.86-98.70)	75 (42.81-94.51)	0.011
Constante	-1.669	-	-	-	-	-
Logit INF = -1.669 + (nTregs/mm ³ x 0.192)						

Las fórmulas para los logit de RA e INF derivan de los coeficientes del modelo que también se muestra. Los logit de RA e INF pueden ser utilizados para predecir la probabilidad de rechazo agudo e infección oportunista con las fórmulas $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$ y $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$, respectivamente.

4.2.2.11. Niveles pre-trasplante de expresión *in vitro* de Ags de superficie CD38, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y análisis de la expresión (% y cifras absolutas) de CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ de SP de receptores y su relación con rechazo agudo

En la figura 4.32 se muestran los niveles de expresión (%) de las moléculas de superficie CD38 y CD154 sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ cultivados de receptores hepáticos con y sin RA en pre-trasplante.

Receptores hepáticos con RA presentaron niveles de expresión de la proteína de superficie CD38 sobre linfocitos T CD8⁺ significativamente mayores que los observados en NRA (Fig.4.32A; 75.51 ± 3.32 vs 55.57 ± 4.6 , $P=0.03$). Del mismo modo, receptores hepáticos RA presentaron niveles de expresión (%) de CD154 sobre linfocitos T CD4⁺ significativamente superiores a los niveles observados en el grupo NRA (Fig.4.32B; 4.28 ± 0.43 vs 2.25 ± 0.22 , $P=0.001$). Por el contrario, la expresión (%) de la proteína de superficie CD154 sobre linfocitos T CD8⁺ de receptores hepáticos RA presentó niveles pre-trasplante significativamente inferiores en comparación con los niveles observados en los del grupo NRA (Fig.4.32C; 0.62 ± 0.13 vs 0.99 ± 0.27 , $P=0.002$).

En cuanto los niveles de expresión de los Ags de superficie entre el grupo control y ambos grupos de estudio; la expresión de CD38 en linfocitos T CD8⁺ y CD154 en linfocitos T CD4⁺ en el grupo control presentó niveles significativamente superiores respecto al grupo NRA (Fig.4.32A, $P=0.02$ y Fig.4.32B, $P<0.001$). Receptores hepáticos con RA presentaron niveles significativamente superiores de CD38 en linfocitos T CD8⁺ respecto a controles (Fig.4.32A, $P=0.05$) y por el contrario, niveles significativamente inferiores de CD154 tanto en linfocitos T CD4⁺ (Fig.4.32B, $P<0.001$) como CD8⁺ (Fig.4.32C, $P=0.001$) con respecto a los niveles observados en controles.

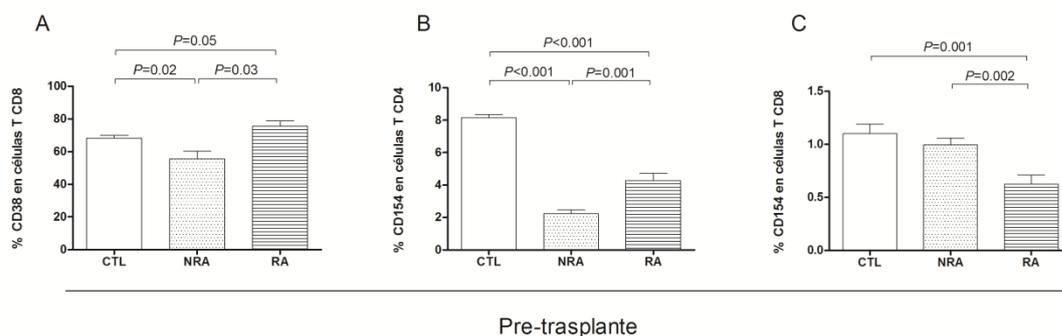


Figura 4.32. Niveles de expresión (%) de Ags de superficie en linfocitos T de SP estimulados *in vitro* de receptores hepáticos en pre-trasplante. (A) niveles de expresión (%) de CD38 en linfocitos T CD8⁺ en el grupo control (CTL), pacientes sin rechazo agudo (NRA) y pacientes con rechazo agudo (RA); (B) niveles de expresión (%) de CD154 en linfocitos T CD4⁺ en grupo CTL, pacientes NRA y RA y (C) niveles de expresión (%) de CD154 en linfocitos T CD8⁺ en el grupo CTL, pacientes NRA y RA.

En la figura 4.33 se muestran los niveles de expresión (%) de las moléculas de superficie CD38 y CD95 sobre linfocitos T CD4⁺ de receptores renales con y sin RA en pre-trasplante. Tras la estimulación *in vitro*, tanto la expresión de la proteína de superficie CD38 como CD95 sobre linfocitos T CD4⁺ de SP del grupo RA fueron significativamente superiores a los niveles en receptores renales NRA (Fig.4.33A; 80.49±4.12 vs 60.86±2.95, $P=0.001$ y Fig.4.33B; 70.45±4.66 vs 44.23±2.74, $P=0.0002$).

En cuanto los niveles de expresión de las moléculas CD38 y CD95 en linfocitos T CD4⁺ de controles, presentaron niveles de CD38 significativamente superiores a receptores renales NRA (Fig.4.33A; $P=0.0001$), mientras que los niveles de CD95 fueron significativamente inferiores a los del grupo RA (Fig.4.33B; $P<0.0001$).

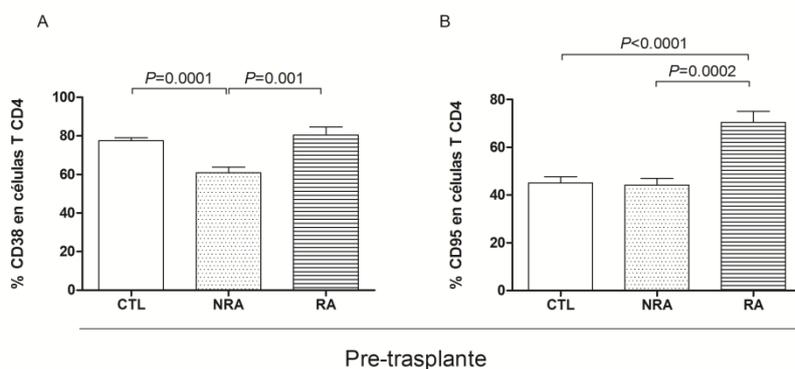


Figura 4.33. Niveles de expresión (%) de Ags de superficie en linfocitos T de SP estimulados *in vitro* de receptores renales en pre-trasplante. (A) niveles de expresión (%) de CD38 en linfocitos T CD4⁺ en el grupo control (CTL), pacientes sin rechazo agudo (NRA) y pacientes con rechazo agudo (RA) y (B) niveles de expresión (%) de CD95 en linfocitos T CD4⁺ en CTL, NRA y RA.

En la figura 4.34 se observa el estudio sobre expresión (%) de la molécula CD28 y número de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ en receptores con y sin RA.

Los niveles de expresión (%) de la molécula CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ en receptores hepáticos (Fig.4.34A; 33.28±2.05 vs 42.45±1.65, $P=0.002$), pero no en receptores renales (Fig.4.34B; 44.29±5.62 vs 41.06±2.45; $P=0.532$), con RA fueron significativamente inferiores que en receptores hepáticos NRA. Del mismo modo, el número de moléculas CD28 en membrana de linfocitos T CD4⁺ del grupo RA tanto de receptores hepáticos (Fig.4.34C; 6793±774.24 vs 9824±883.71, $P=0.02$), como renales

(Fig.4.34D; 6425 ± 903.66 vs 7170 ± 521.97 , $P=0.047$) presentó niveles significativamente inferiores que en ambos grupos de receptores sin RA.

La única diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de receptores hepáticos y renales con y sin RA se observó en el nivel de expresión (%) de CD28 sobre linfocitos T $CD4^+$ de receptores hepáticos RA (Fig.4.34A). En el resto de grupos de estudio no se observaron diferencias significativas en comparación con el grupo control.

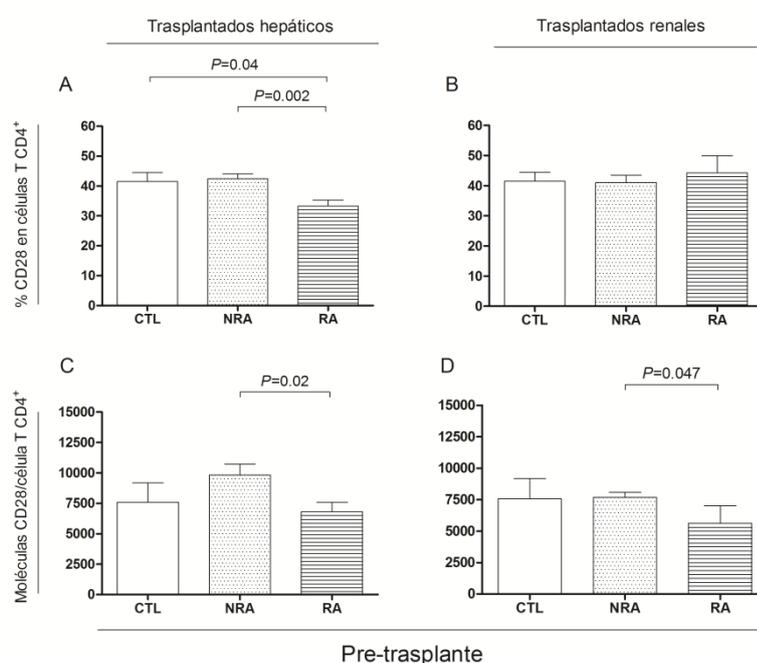


Figura 4.34. Niveles de expresión (%) de la molécula CD28 y número de moléculas CD28 sobre membrana de linfocito T $CD4^+$ de receptores hepáticos y renales en pre-trasplante. (A) en el grupo control (CTL), receptores hepáticos sin rechazo agudo (NRA) y receptores hepáticos con rechazo agudo (RA); (B) en el grupo CTL, receptores renales NRA y RA; (C) en el grupo CTL, receptores hepáticos NRA y RA; y (D) en el grupo CTL, receptores renales NRA y RA.

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de expresión de moléculas de superficie CD28, CD38, CD95 y CD154 en linfocitos T en receptores en pre-trasplante**

Los valores de corte para la estratificación de receptores hepáticos y renales como alto riesgo de RA en pre-trasplante en función de la expresión (%) de las moléculas de superficie CD28, CD38, CD95 y CD154 sobre linfocitos T se muestran en la tabla 4.24. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis previo. El número de moléculas CD28 en membrana de linfocito T $CD4^+$ (Figura 4.35), así como también los niveles de expresión (%) de las moléculas de superficie CD28, CD38, CD95 y CD154 en linfocitos

T CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 4.36) de receptores hepáticos y renales en pre-trasplante fueron capaces de discriminar de forma precisa a pacientes con alto riesgo de RA.

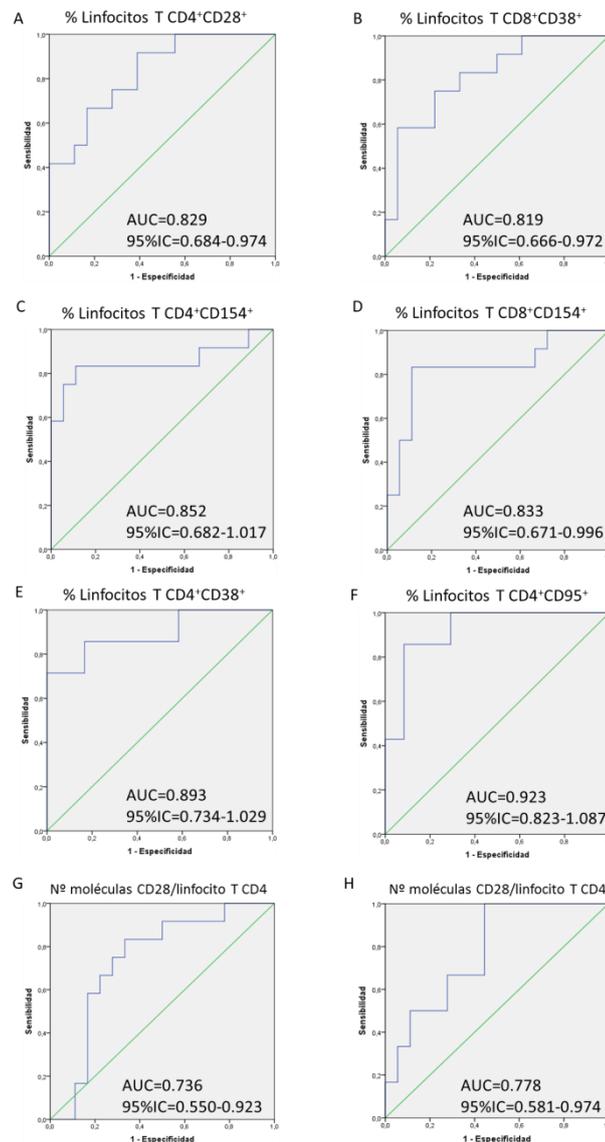


Figura 4.36. Curvas ROC pre-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores hepáticos y renales con rechazo agudo. Valores de AUC para (A) niveles de expresión (%) de células T CD4⁺CD28⁺ de receptores hepáticos con RA, (B) niveles de expresión (%) de células T CD8⁺CD38⁺ de receptores hepáticos con RA, (C) niveles de expresión (%) de células T CD4⁺CD154⁺ de receptores hepáticos con RA, (D) niveles de expresión (%) de células T CD8⁺CD154⁺ de receptores hepáticos con RA, (E) niveles de expresión (%) de células T CD4⁺CD38⁺ de receptores renales con RA, (F) niveles de expresión (%) de células T CD4⁺CD95⁺ de receptores renales con RA, (G) nº de moléculas CD28 en células T CD4⁺ de receptores hepáticos RA y (H) nº de moléculas CD28 en células T CD4⁺ de receptores renales RA.

- Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC realizado, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ ≤41.94% (Fig.4.36A; AUC=0.829, 95%IC=0.684-0.974, P=0.003) en pre-

trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de la molécula CD28 en linfocitos T CD4⁺, como alto riesgo de RA cuando los niveles de CD28 fueron $\leq 41.94\%$ o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de CD28 fueron $> 41.94\%$.

El 40% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD28 $> 41.94\%$, de los cuáles el 91.7% no tuvo RA, mientras que el 8.3% restante desarrolló RA, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 60% de receptores hepáticos restante fueron clasificados como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD28 $\leq 41.94\%$, de los cuáles el 61.1% tuvo RA, y el 38.9% no tuvo RA, a pesar clasificarse como alto riesgo (sensibilidad=91.67%, 95%IC=61.52-99.79; especificidad=61.11%, 95%IC=35.75-82.70; $P=0.007$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de células T CD8⁺CD38⁺ $\geq 73.56\%$ (Fig.4.36B; AUC=0.819, 95%IC=0.666-0.972, $P=0.003$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos con alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de la molécula CD38 en células T CD8⁺, como alto riesgo de RA cuando los niveles de CD38 son $\geq 73.56\%$ o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de CD38 son $< 73.56\%$.

El 56.7% de receptores hepáticos fue clasificado como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD38 $< 73.56\%$, de los cuáles el 82.4% no tuvo RA, mientras que el 17.6% restante desarrolló RA, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 43.3% de receptores hepáticos fue clasificado como alto riesgo RA con niveles de expresión de CD38 $\geq 73.56\%$, de los cuáles 69.2% tuvo RA, mientras que el 30.8% no tuvo RA, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=75%, 95%IC=42.81-94.51; especificidad=77.78%, 95%IC=52.36-93.59; $P=0.008$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ $> 3.18\%$ (Fig.4.36C; AUC=0.852, 95%IC=0.682-1.017, $P=0.001$) en pre-

trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de la molécula CD154 en células T CD4⁺, como alto riesgo de RA cuando los niveles de CD154 son $\geq 3.18\%$ o bajo riesgo de RA cuando éstos son $< 3.18\%$.

El 60% de receptores hepáticos fue clasificado como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD154 $< 3.18\%$, de los cuáles el 88.9% no tuvo RA, mientras que el 11.1% restante tuvo RA, a pesar de ser clasificados como de bajo riesgo. Del mismo modo, el 40% de receptores hepáticos restante fue clasificado como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD154 $\geq 3.18\%$, de los cuáles el 83.3% tuvo RA, y el 16.7% no tuvo RA, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.59-97.91; especificidad=88.89%, 95%IC=65.29-98.62; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ $< 0.8\%$ (Fig.4.36D; AUC=0.833, 95%IC=0.671-0.996, $P=0.002$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de CD154 en linfocitos T CD8⁺, como alto riesgo de RA cuando los niveles de CD154 son $\leq 0.8\%$ o como bajo riesgo de RA cuando los niveles eran $> 0.8\%$.

El 60% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD154 $> 0.8\%$, de los cuáles el 88.9% no tuvo RA, mientras que el 11.1% tuvo RA, a pesar clasificarse como bajo riesgo. Del mismo modo, el 40% de receptores se clasificó como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD154 $\leq 0.8\%$, de los cuáles 83.3% tuvo RA, mientras que 16.7% no tuvo RA, aunque se clasificó de alto riesgo (sensibilidad=76.92%, 95%IC=46.19-94.96; especificidad=88.24%, 95%IC=63.53-98.54; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ $\geq 75.11\%$ (Fig.4.36E; AUC=0.893, 95%IC=0.734-1.029, $P=0.002$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó

un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de CD38 en linfocitos T CD4⁺, como alto riesgo de RA cuando los niveles de CD38 fueron $\geq 75.11\%$ o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de CD38 fueron $< 75.11\%$.

El 67.7% de receptores renales fue clasificado como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD38 $< 75.11\%$, de los cuáles el 95.2% no tuvo RA, mientras que el 4.8% restante tuvo RA, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 32.3% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD38 $\geq 75.11\%$, de los cuáles el 60% tuvo RA, mientras que 40% no tuvo RA, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=42.13-99.64; especificidad=83.33%, 95%IC=62.62-95.26; $P=0.002$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ $\geq 63.41\%$ (Fig.4.36F; AUC=0.923, 95%IC=0.823-1.087, $P=0.001$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de la molécula CD95 en linfocitos T CD4⁺, como alto riesgo de RA cuando los niveles de CD95 son $\geq 63.41\%$ o como bajo riesgo de RA cuando los niveles de CD95 son $< 63.41\%$.

El 74.2% de receptores renales fue clasificado como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD95 $< 63.41\%$, de los cuáles el 95.7% no tuvo RA, mientras que el 4.3% restante tuvo RA, a pesar de ser clasificados como bajo riesgo. Del mismo modo, el 25.8% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD95 $\geq 63.41\%$, de los cuáles el 75% tuvo RA, mientras que el 25% no tuvo RA, a pesar clasificarse como alto riesgo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=42.13-99.64; especificidad=91.67%, 95%IC=73.00-98.97; $P=0.0002$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del número de moléculas CD28 en linfocitos T CD4⁺ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, un número de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ ≤ 8359 (Fig.4.36G; AUC=0.736, 95%IC=0.550-0.923, $P=0.031$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función del número de moléculas

CD28 sobre linfocitos T CD4⁺, como alto riesgo de RA cuando las cifras de la molécula CD28 son ≤ 8359 o como bajo riesgo cuando las cifras son > 8359 .

El 46.7% de receptores hepáticos fue clasificado como bajo riesgo de RA con cifras de CD28 > 8359 , de los cuáles el 85.7% no tuvo RA, mientras que el 14.3% tuvo RA, a pesar de ser clasificados como bajo riesgo. Del mismo modo, el 53.3% de receptores hepáticos restante fueron clasificados como alto riesgo de RA con cifras de CD28 ≤ 8359 , de los cuáles el 62.5% tuvo RA, mientras que el 37.5% no tuvo RA, a pesar de haber sido clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.59-97.91; especificidad=66.67%, 95%IC=40.99-86.66; $P=0.01$).

De igual modo, un número de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ ≤ 7669 (Fig.4.36H; AUC=0.778, 95%IC=0.581-0.974, $P=0.046$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función del número de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺, como alto riesgo de RA cuando las cifras de la molécula CD28 son ≤ 7669 o como bajo riesgo de RA, cuando las cifras de la molécula CD28 son > 7669 .

El 77.4% de receptores renales fue clasificado como bajo riesgo de RA cifras de CD28 > 7669 , de los cuáles el 91.7% no tuvo RA, mientras que el 8.3% restante tuvo RA, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 22.6% de receptores restante fue clasificado como alto riesgo de RA con cifras de CD28 ≤ 7669 , de los cuáles el 71.4% tuvo RA, y 28.6% sin RA, aunque se estimó de riesgo (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.04-96.33; especificidad=91.67%, 95%IC=73.0-98.97; $P=0.02$).

Tabla 4.24. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores hepáticos y renales como alto riesgo de rechazo agudo.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Receptores hepáticos</i>				
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD28 ⁺	41.94	0.829 (0.684-0.974)	91.67 (61.52-99.79)	61.11 (35.75-82.70)
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺	73.56	0.819 (0.666-0.972)	75.00 (42.81-94.51)	77.78 (52.36-93.59)
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD154 ⁺	3.18	0.852 (0.682-1.017)	83.33 (51.59-97.91)	88.89 (65.29-98.62)
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺	0.80	0.833 (0.671-0.996)	76.92 (46.19-94.96)	88.24 (63.53-98.54)
Nº moléculas CD28	8359	0.736 (0.550-0.923)	83.33 (51.59-97.91)	66.67 (40.99-86.66)
<i>Receptores renales</i>				
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD38 ⁺	75.11	0.893 (0.734-1.029)	85.71 (42.13-99.64)	83.33 (62.62-95.26)
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD95 ⁺	63.41	0.923 (0.823-1.087)	85.71 (42.13-99.64)	91.67 (73.00-98.97)
Nº moléculas CD28	7669	0.778 (0.581-0.974)	71.43 (29.04-96.33)	91.67 (73.00-98.97)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de rechazo agudo en receptores hepáticos y renales basado en el logit RA**

Tras haber estudiado qué moléculas de superficie discriminaron a receptores hepáticos y renales como alto riesgo de RA, se obtuvo el logit RA para cada biomarcador de forma individual. Aplicando el modelo de regresión logística, propuesto por Hosmer y Lemeshow, se obtuvieron los coeficientes necesarios para poder calcular la probabilidad de RA mediante la fórmula $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA y como variable predictiva el nivel de expresión (%) de CD28, CD38, CD95 y CD154 así como también el número de moléculas CD28 en superficie con respecto a las células T CD4⁺ y CD8⁺. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular el logit de RA para los niveles de expresión de CD28, CD38, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de receptores hepáticos y renales en pre-trasplante se muestran en la tabla 4.25.

- Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺ CD28⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de células T CD4⁺CD28⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo RA, el 66.7% tendrían RA, mientras que en el 33.3% se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 83.3% no tendría RA, y el 16.7% se pronosticó RA, a pesar de no tenerlo (sensibilidad=66.67%, 95%IC=34.89-90.08; especificidad=83.33%, 95%IC=58.58-96.42; OR=1.286, 95%IC=0.705-1.811; $P=0.013$).

- Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo RA, el 75% tendrían RA, mientras que en el 25% se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 72.2% no tendría RA, y el 27.8% se pronosticó RA, a pesar de desarrollarlo (sensibilidad=75%, 95%IC=42.81-94.51; especificidad=72.22%, 95%IC=46.52-90.31; OR=1.089, 95%IC=1.017-1.166; $P=0.014$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺ CD154⁺ y CD8⁺CD154⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión linfocitos T CD4⁺CD154⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo RA, el 75% tendrían RA, mientras que en el 25% se predijo NRA, a pesar de tenerlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 88.9% no tendría RA, mientras que en el 11.1% se pronosticó RA, a pesar de no tenerlo (sensibilidad=75%, 95%IC=42.81-94.51; especificidad=88.89%, 95%IC=65.29-98.62; OR=3.363, 95%IC=1.496-7.561; $P=0.003$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión linfocitos T CD8⁺CD154⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo RA, el 66.7% tendrían RA, y en el 33.3% se predijo NRA, a pesar de tenerlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 94.4% no tendría RA, y en el 5.6% se pronosticó RA, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=66.67%, 95%IC=34.89-90.08; especificidad=94.44%, 95%IC=72.71-99.86; OR=1.517, 95%IC=1.087-2.117; $P=0.011$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores renales basado en los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ y CD4⁺CD95⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de células T CD4⁺CD38⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo RA, el 71.4% tendrían RA, y en el 28.6% se predijo NRA, teniéndolo. Igualmente, el modelo predijo que del grupo NRA, 100% no tendría RA (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.04-96.33; especificidad=100%, 95%IC=85.75-100; OR=1.19, 95%IC=1.022-1.386; $P=0.025$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión linfocitos T CD4⁺CD95⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo RA, el 71.4% tendrían RA, y que en el 28.6% se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Igualmente, el modelo predijo que del grupo NRA, el 91.7% no tendría RA, y en el 8.3% se pronosticó RA, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.04-96.33; especificidad=91.67%, 95%IC=73.00-98.97; OR=1.212, 95%IC=1.025-1.433; $P=0.024$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos y renales basado en el número de moléculas CD28 en superficie de linfocito T CD4⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para el número de moléculas CD28 en superficie de linfocito T CD4⁺ de receptores hepáticos en pre-

trasplante predijo que del grupo RA, el 83.3% desarrollarían RA, mientras que en el 16.7% se predijo NRA, a pesar de tenerlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 77.8% no desarrollaría RA, y en el 22.2% se pronosticó RA, a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=83.33%, 95%IC=51.59-97.91; especificidad=77.78%, 95%IC=52.36-93.59; OR=1.152, 95%IC=1.094-1.209; $P=0.04$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para el número de moléculas CD28 en superficie de linfocito T CD4⁺ de receptores renales en pre-trasplante predijo que del grupo RA, el 71.4% desarrollarían RA, mientras que en el 28.6% se predijo NRA, a pesar de tenerlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 94.4% no tendría RA, y en el 5.6% se pronosticó RA, a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=71.43%, 95%IC=29.04-96.33; especificidad=94.44%, 95%IC=72.71-99.86; OR=1.419, 95%IC=1.348-1.490; $P=0.04$).

Tabla 4.25. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de rechazo agudo en pre-trasplante de receptores hepáticos y renales en función de la expresión (%) de CD28, CD38, CD95 y CD154 así como del número de moléculas CD28.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
Receptores hepáticos						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD28 ⁺	-0.198	6.562	1.286 (0.705-1.811)	66.67 (34.89-90.08)	83.33 (58.58-96.42)	0.013
Constante	7.106	-	-	-	-	-
Logit RA = 7.106 + (%CD4 ⁺ CD28 ⁺ x -0.198)						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺	0.085	6.030	1.089 (1.017-1.166)	75.00 (42.81-94.51)	72.22 (46.52-90.31)	0.014
Constante	-6.142	-	-	-	-	-
Logit RA = -6.142 + (%CD8 ⁺ CD38 ⁺ x 0.085)						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD154 ⁺	1.213	8.611	3.363 (1.496-7.561)	75 (42.81-94.51)	88.89(65.29-98.62)	0.003
Constante	-4.296	-	-	-	-	-
Logit RA = 1.213 + (%CD4 ⁺ CD154 ⁺ x -4.296)						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺	3.689	11.706	1.517 (1.087-2.117)	66.67 (34.89-90.08)	94.44 (72.71-99.86)	0.011
Constante	-2.079	-	-	-	-	-
Logit RA = 3.689 + (%CD8 ⁺ CD154 ⁺ x -2.079)						
Nº moléculas CD28	-0.327	5.123	1.152 (1.094-1.209)	83.33 (51.59-97.91)	77.78 (52.36-93.59)	0.04
Constante	1.356	-	-	-	-	-
Logit RA = 1.356 + (nº moléculas CD28 x -0.327)						
Receptores renales						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD38 ⁺	0.174	5.026	1.190 (1.022-1.386)	71.43 (29.04-96.33)	100 (85.75-100)	0.03
Constante	-13.964	-	-	-	-	-
Logit RA = -13.964 + (CD4 ⁺ CD38 ⁺ x 0.174)						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD95 ⁺	0.192	5.063	1.212 (1.025-1.433)	71.43 (29.04-96.33)	91.67 (73.00-98.97)	0.024
Constante	-12.455	-	-	-	-	-
Logit RA = -12.455 + (CD4 ⁺ CD95 ⁺ x 0.192)						
Nº moléculas CD28	-0.247	3.456	1.419 (1.348-1.490)	71.43 (29.04-96.33)	94.44 (72.71-99.86)	0.04
Constante	2.107	-	-	-	-	-
Logit RA = 2.107 + (nº moléculas CD28 x -0.247)						

La fórmula para el logit de RA deriva de los coeficientes del modelo que también se muestra. Los diferentes logit de RA pueden ser utilizados para predecir la probabilidad de rechazo agudo con la fórmula $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$.

4.2.2.12. Niveles pre-trasplante de expresión *in vitro* de Ags de superficie CD25, CD69 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y análisis de la expresión (% y cifras absolutas) de CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ de SP de receptores y su relación con INF y recidiva de VHC

En la figura 4.37 se muestran los niveles de expresión (%) de las moléculas de superficie CD25, CD69 y CD154 sobre linfocitos T CD8⁺ de receptores con y sin INF, así como recidiva de VHC en pre-trasplante.

Receptores hepáticos con INF tuvieron niveles de expresión pre-trasplante de células T CD8⁺CD25⁺ significativamente superiores que los del grupo NoINF (Fig.4.37A; 43.90±5.86 vs 17.94±2.92, $P=0.005$). Del mismo modo, receptores hepáticos con INF tuvieron niveles de expresión pre-trasplante de células T CD8⁺CD69⁺ significativamente superiores a los del grupo NoINF (Fig.4.37B; 46.01±5.60 vs 21.41±2.85, $P=0.004$).

Por otro lado, receptores hepáticos que tuvieron recidiva VHC mostraron niveles de expresión pre-trasplante de células T CD8⁺CD154⁺ significativamente inferiores a hepáticos NVHC (Fig.4.37C; 1.48±0.17 vs 3.68±0.47, $P=0.002$).

Finalmente, los niveles pre-trasplante de expresión (%) de células T CD8⁺CD25⁺ de receptores renales INF son significativamente superiores a los niveles observados en receptores renales NoINF (Fig.4.37D; 38.90±4.77 vs 16.89±2.58, $P=0.001$).

En cuanto los niveles de expresión de Ags de superficie entre el grupo control y ambos grupos de estudio (INF y recidiva de VHC); la expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ y CD8⁺CD69⁺ en del grupo control presentó niveles significativamente superiores con respecto a receptores hepáticos y renales NoINF (Fig.4.37A, $P=0.002$, Fig.4.37B, $P=0.002$ y Fig.4.37D, $P=0.02$); y los niveles de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ del grupo control fueron significativamente inferiores a los niveles en receptores hepáticos NVHC (Fig.4.37C, $P<0.001$) como con recidiva VHC (Fig.4.37C, $P=0.04$).

Contrariamente, receptores hepáticos con INF tuvieron niveles significativamente superiores de células T CD8⁺CD25⁺ y CD8⁺CD69⁺ con respecto a los niveles de controles (Fig.4.37A, $P<0.001$ y Fig.4.37B, $P<0.001$). Del mismo modo, receptores renales con INF presentaron niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ significativamente superiores en comparación con los niveles de controles (Fig.4.37D, $P=0.006$).

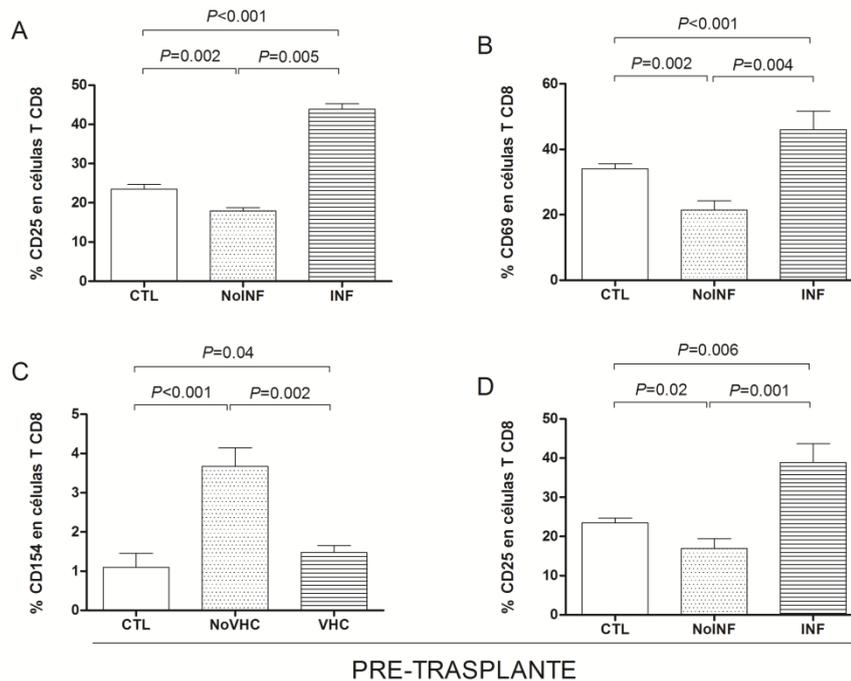


Figura 4.37. Niveles *in vitro* de expresión (%) de las proteínas de superficie CD25, CD69 y CD154 en linfocitos T CD8⁺ de receptores hepáticos y renales en pre-trasplante. (A) % de células T CD8⁺CD25⁺ en el grupo control (CTL), receptores hepáticos sin infección oportunista (NoINF) y con infección oportunista (INF), (B) % de células T CD8⁺CD69⁺ en el grupo CTL, receptores hepáticos NoINF y INF, (C) % de células T CD8⁺CD154⁺ en el grupo CTL, receptores hepáticos NVHC y VHC y (D) % de células T CD8⁺CD25⁺ en el grupo CTL, receptores renales NoINF y INF.

En la figura 4.38 se encuentran representados los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ así como también el número de moléculas CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺ de receptores con y sin INF y recidiva de VHC en pre-trasplante.

Tanto el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ (Fig.4.38A; 41.90±2.11 vs 33.17±1.76, $P=0.006$) como el número de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ (Fig.4.38B; 10221±792.88 vs 6864±710.14, $P=0.001$) de receptores hepáticos con INF presentaron niveles significativamente superiores comparados con los del grupo NoINF.

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje y número de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ en receptores hepáticos con y sin recidiva de VHC en pre-trasplante (Fig.4.38C y Fig.4.38D; respectivamente). Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en porcentaje y número de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ en receptores renales INF y NoINF (Fig.4.38E y Fig.4.38F; respectivamente). Por último, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ y moléculas de CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ entre grupo control y los grupos estudiados.

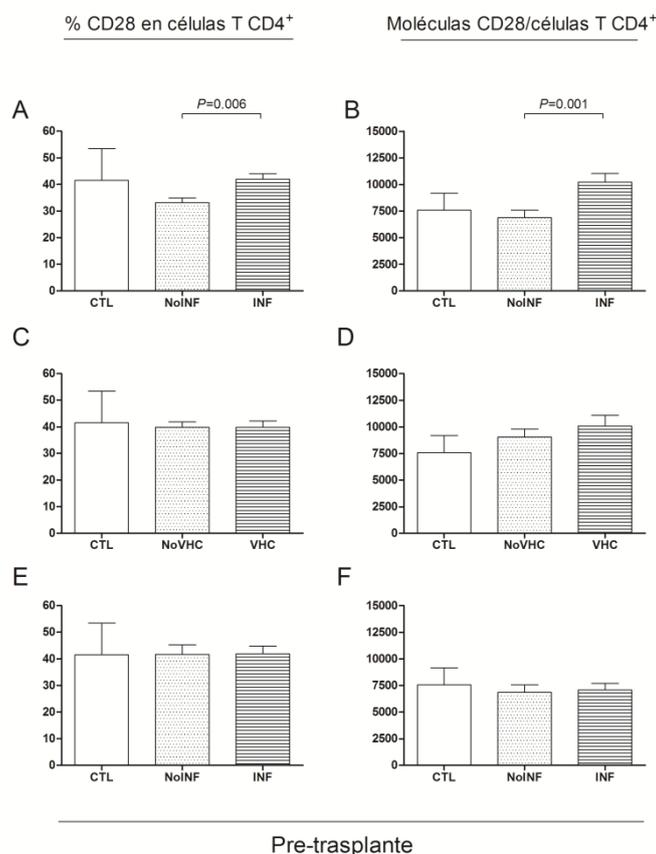


Figura 4.38. Niveles de expresión (%) de la molécula CD28 y número de moléculas CD28 sobre membrana de linfocito T CD4⁺ de receptores hepáticos y renales en pre-trasplante. (A) % de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ en el grupo control (CTL), receptores hepáticos sin infección oportunista (NoINF) y receptores hepáticos con infección oportunista (INF); (B) moléculas CD28/linfocito T CD4⁺ en el grupo CTL, receptores hepáticos NoINF y INF; (C) % de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ en el grupo CTL, receptores hepáticos NVHC y VHC; (D) moléculas CD28/célula CD4⁺ en el grupo CTL, receptores hepáticos NVHC y VHC; (E) % de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ en el grupo CTL, receptores renales NoINF y INF y (F) moléculas CD28/célula CD4⁺ en el grupo CTL, receptores renales NoINF y INF.

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de expresión de las moléculas CD25, CD28, CD69 y CD154 en linfocitos T en receptores en pre-trasplante**

Los valores de corte para la estratificación de receptores hepáticos como alto riesgo de INF y recidiva de VHC, así como también de receptores renales como alto riesgo de INF en pre-trasplante en función del porcentaje de expresión de las moléculas de superficie CD25, CD28, CD69 y CD154 sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se muestran en la tabla 4.26. En el estudio únicamente fueron incluidos aquellos biomarcadores que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis previo.

Los niveles de expresión (%) de CD25, CD69 y CD154 en células T CD8⁺, así como también niveles de expresión y número de moléculas CD28 en membrana de células T CD4⁺ de receptores en pre-trasplante fueron capaces de discriminar de forma precisa a pacientes con alto riesgo de INF y recidiva de VHC (Figura 4.39).

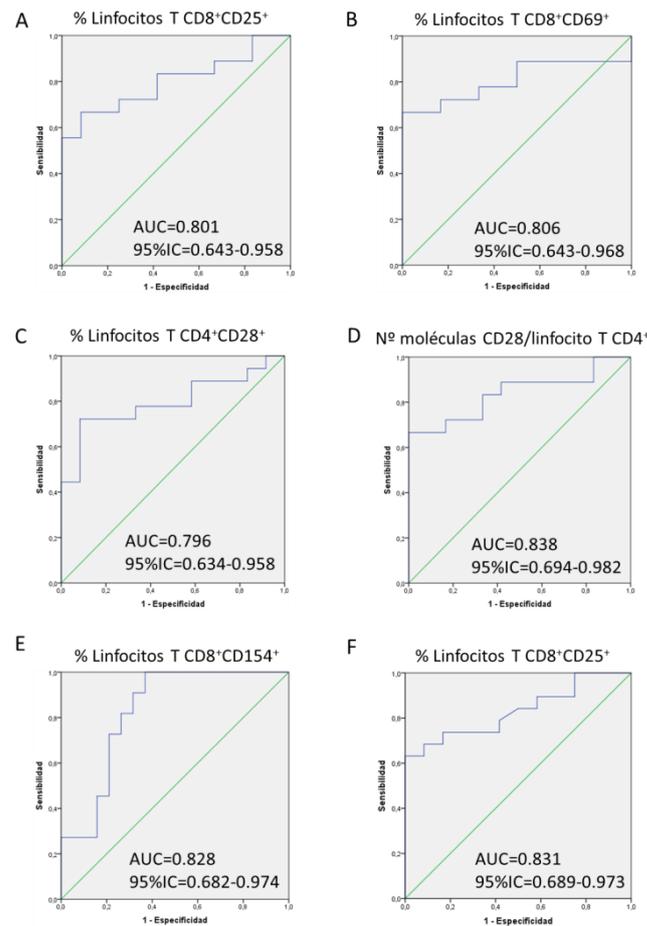


Figura 4.39. Curvas ROC pre-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores con INF y VHC. Valores de AUC para (A) % de células T CD8⁺CD25⁺ de receptores hepáticos INF, (B) % de células T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos INF, (C) % de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ de receptores hepáticos INF, (D) número de moléculas CD28/membrana de células T CD4⁺ en receptores hepáticos INF, (E) % de células CD8⁺CD154⁺ de receptores hepáticos con recidiva de VHC y (F) % de células T CD8⁺CD25⁺ de receptores renales con INF.

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ $\geq 29.83\%$ (Fig.4.38A; AUC=0.801, 95%IC=0.643-0.958, $P=0.006$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de la molécula CD25 en linfocitos T CD8⁺, como alto riesgo de INF con niveles de CD25 $\geq 29.83\%$ o como bajo riesgo INF con niveles CD25 $< 29.83\%$.

El 56.7% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de expresión de CD25 $< 29.83\%$, de los cuáles el 64.7% no tuvo INF, mientras que el 35.3% desarrolló INF, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo

modo, el 43.3% de receptores hepáticos fue clasificado como alto riesgo de INF con niveles de expresión de $CD25 \geq 29.83\%$, de los cuáles el 92.3% tuvo INF, y el 7.7% no tuvo INF, a pesar de ser clasificados como alto riesgo (sensibilidad=66.67%, 95%IC=40.99-86.66; especificidad=91.67%, 95%IC=61.52-99.79; $P=0.002$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T $CD8^+CD69^+$ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T $CD8^+CD69^+ \geq 38.22\%$ (Fig.4.38B; AUC=0.806, 95%IC=0.643-0.968, $P=0.005$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de la molécula CD69 en células T $CD8^+$, como alto riesgo de INF con niveles de $CD69 \geq 38.22\%$ o como bajo riesgo de INF cuando $CD69 < 38.22\%$.

El 60% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de expresión de $CD69 < 38.22\%$, de los cuáles el 66.7% no tuvo INF, mientras que el 33.3% tuvo INF, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 40% de receptores hepáticos fue clasificado como alto riesgo de INF con niveles de expresión de $CD69 \geq 38.22\%$, de los cuáles 100% desarrolló INF (sensibilidad=66.67%, 95%IC=40.99-86.66; especificidad=100%, 95%IC=73.54-100; $P=0.0003$).

➤ Estratificación del riesgo de INF en función de los niveles de expresión (%) de células T $CD4^+CD28^+$ y nº de moléculas CD28/células T $CD4^+$ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T $CD4^+CD28^+ \geq 38.31\%$ (Fig.4.38C; AUC=0.796, 95%IC=0.634-0.958, $P=0.007$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles de expresión de la molécula CD28 en células T $CD4^+$, como alto riesgo de INF cuando los niveles de CD28 son $\geq 38.31\%$ o como bajo riesgo de INF cuando los niveles de CD28 son $< 38.31\%$.

El 53.3% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de expresión de $CD28 < 38.31\%$, de los cuáles el 68.8% no tuvo INF, mientras que el 31.3% tuvo INF, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 46.7% de receptores hepáticos fue clasificado como alto riesgo de INF con niveles de expresión de $CD28 \geq 38.31\%$, de los cuáles el 92.9% tuvo INF, mientras que el

7.1% no tuvo INF, a pesar de ser clasificados como alto riesgo (sensibilidad=72.22%, 95%IC=46.52-90.31; especificidad=91.67%, 95%IC=61.52-99.79; $P=0.001$).

Del mismo modo y según el análisis ROC, un $n^{\circ} \geq 10086$ de moléculas CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺ (Fig.4.38D; AUC=0.838, 95%IC=0.694-0.982, $P=0.002$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos con alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función del n° de moléculas CD28 en células T CD4⁺, como alto riesgo de INF cuando el n° de moléculas de CD28/célula T CD4⁺ son ≥ 10086 o como bajo riesgo de INF cuando el $n^{\circ} < 10086$.

El 60% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un n° de moléculas de CD28/linfocito TCD4⁺ < 10086 , de los cuáles el 66.7% no tuvo INF, y 33.3% tuvo INF, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 40% de receptores hepáticos fue clasificado de alto riesgo de INF con un n° de moléculas de CD28/linfocito TCD4⁺ ≥ 10086 , de los cuáles el 100% tuvo INF (sensibilidad=66.67%, 95%IC=40.99-86.66; especificidad=100%, 95%IC=73.54-100; $P=0.0003$).

➤ Estratificación del riesgo de recidiva de virus de hepatitis C en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ en pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ $\leq 2.78\%$ (Fig.4.38C; AUC=0.828, 95%IC=0.682-0.974, $P=0.003$) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación de los pacientes, en función de los niveles de expresión de la molécula CD154 en linfocitos T CD8⁺, como alto riesgo de VHC cuando los niveles de CD154 son $\leq 2.78\%$ o como bajo riesgo cuando son $> 2.78\%$.

El 40% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de VHC con niveles de expresión de CD154 $> 2.78\%$, de los cuáles el 100% no tuvo VHC. Del mismo modo, el 60% de receptores hepáticos restante fue clasificado como alto riesgo de VHC con niveles de expresión de CD154 $\leq 2.78\%$, de los cuáles el 61.1% tuvo VHC, y el 38.9% restante no tuvo VHC, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=100%, 95%IC=71.51-100; especificidad=63.16%, 95%IC=38.36-83.71; $P=0.001$).

- Estratificación del riesgo de infección oportunista en función de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en situación pre-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ ≥ 25.19% (Fig.4.38D; AUC=0.831, 95%IC=0.689-0.973, P=0.002) en pre-trasplante fue capaz de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles de expresión de la molécula CD25 en linfocitos T CD8⁺, como alto riesgo de INF con niveles de CD25 ≥ 25.19% o como bajo riesgo de INF con CD25 < 25.19%.

El 48.4% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de expresión de CD25 < 25.19%, de los cuáles el 66.7% no tuvo INF, mientras que el 33.3% tuvo INF, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 51.6% de receptores renales fue clasificado como alto riesgo de INF con niveles de expresión de CD25 ≥ 25.19%, de los cuáles el 87.5% tuvo INF, y el 12.5% restante no tuvo INF, a pesar de haber sido clasificados de alto riesgo (sensibilidad=73.68%, 95%IC=48.80-90.85; especificidad=83.33%, 95%IC=51.59-97.91; P=0.003).

Tabla 4.26. Valores de corte (cut-off) en situación pre-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores hepáticos y renales como alto riesgo de INF y recidiva de VHC.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Receptores hepáticos</i>				
Infección oportunista				
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺	29.83	0.801 (0.643-0.958)	66.67 (40.99-86.66)	91.67 (61.52-99.79)
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺	38.22	0.806 (0.643-0.968)	66.67 (40.99-86.66)	100 (73.54-100)
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD28 ⁺	38.31	0.796 (0.634-0.958)	72.22 (46.52-90.31)	91.67 (61.52-99.79)
Nº moléculas CD28/célula T CD4	10086	0.838 (0.694-0.982)	66.67 (40.99-86.66)	100 (73.54-100)
Recidiva de virus de hepatitis C				
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺	2.78	0.828 (0.682-0.974)	100 (71.51-100)	63.16 (38.36-83.71)
<i>Receptores renales</i>				
Infección oportunista				
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺	25.19	0.831 (0.689-0.973)	73.68 (48.80-90.85)	83.33 (51.59-97.91)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de INF y recidiva de VHC en receptores, en función de los niveles de expresión pre-trasplante de las moléculas CD25, CD28, CD69 y CD154 en linfocitos T CD4 y CD8 basado en el logit INF y logit VHC**

Tras haber estudiado qué moléculas de superficie discriminaron a receptores hepáticos y renales como alto riesgo de INF y recidiva de VHC, se obtuvieron los logit INF y logit VHC para cada biomarcador de forma individual. Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron los coeficientes necesarios para poder calcular la probabilidad de INF ($e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$) y recidiva de VHC ($e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$). Para la realización del modelo de regresión logística se usó como variable dependiente INF y VHC y como variable predictiva el nivel de expresión (%) de CD25, CD28, CD69 y CD154 sobre células T CD4⁺ y CD8⁺. Los coeficientes del modelo de regresión usados para calcular los logit de INF y VHC para expresión de CD25, CD28, CD69 y CD154 en células T CD4⁺ y CD8⁺ están en tabla 4.27.

➤ Predicción de infección oportunista en receptores hepáticos basado en los niveles de expresión pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD25⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en pre-trasplante, predijo que del grupo INF, el 72.2% tendrían INF, y el 27.8% restante se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 75% no tendría INF, y en el 25% se pronosticó INF, a pesar de no tenerla (sensibilidad=72.22%, 95%IC=46.52-90.31; especificidad=75%, 95%IC=42.81-94.51; OR=1.084, 95%IC=1.016-1.157; P=0.015).

➤ Predicción de infección oportunista en receptores hepáticos basado en los niveles de expresión pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo INF, el 77.8% tendrían INF, y en el 22.2% restante se predijo NoINF, a pesar de tenerla. Igualmente, el modelo predijo que del grupo NoINF, 66.7% no tendría INF, y 33.3% se pronosticó INF, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=77.78%, 95%IC=52.36-93.59; especificidad=66.67%, 95%IC=34.89-90.08; OR=1.076, 95%IC=1.016-1.141; P=0.013).

➤ Predicción de INF en receptores hepáticos basado en los niveles pre-trasplante de expresión de células T CD4⁺CD28⁺ y número de moléculas CD28/células T CD4⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo INF, el

72.2% desarrollarían INF, y 27.8% se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 91.7% no tendría INF, y el 8.3% se pronosticó INF, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=72.22%, 95%IC=46.52-90.31; especificidad=91.67%, 95%IC=61.52-99.79; OR=1.155, 95%IC=1.026-1.300; $P=0.017$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para el nº de moléculas CD28 sobre membrana de linfocitos T CD4⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo INF, el 83.3% desarrollarían INF, y el 16.7% restante se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 100% no tendría INF (sensibilidad=83.33%, 95%IC=58.58-96.42; especificidad=100%, 95%IC=73.54-100; OR=1.471, 95%IC=1.397-1.544; $P=0.008$).

Tabla 4.28. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de INF y recidiva de VHC en pre-trasplante de receptores hepáticos y renales en función de la expresión (%) de CD25, CD28 CD69 y CD154 en linfocitos T CD4 y CD8, así como número de moléculas CD28 sobre membrana celular de linfocito T CD4.

Biomarcador	Coficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
Receptores hepáticos						
Infección oportunista						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺	0.080	5.876	1.084 (1.016-1.157)	72.22 (46.52-90.31)	75 (42.81-94.51)	0.015
Constante	-1.851					
Logit INF = -1.851 + (%CD8 ⁺ CD25 ⁺ x 0.080)						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺	0.073	6.147	1.076 (1.016-1.141)	77.78 (52.36-93.59)	66.67 (34.89-90.08)	0.013
Constante	-1.927					
Logit INF = -1.927 + (%CD8 ⁺ CD69 ⁺ x 0.073)						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD28 ⁺	3.353	8.221	1.155 (1.026-1.300)	72.22 (46.52-90.31)	91.67 (61.52-99.79)	0.017
Constante	-0.788					
Logit INF = -0.788 + (%CD4 ⁺ CD28 ⁺ x 3.353)						
Nº moléc CD28/célula T CD4 ⁺	1.896	6.980	1.471 (1.397-1.544)	83.33 (58.58-96.42)	100 (73.54-100)	0.008
Constante	-4.146					
Logit INF = -4.146 + (Nº moléculas CD28/célula T CD4 ⁺ x 1.896)						
Recidiva de virus de hepatitis C						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺	-1.202	5.162	1.328 (1.262-1.394)	72.73 (39.03-93.98)	78.95 (54.43-93.95)	0.023
Constante	2.126					
Logit VHC = 2.126 + (%CD8 ⁺ CD154 ⁺ x -1.202)						
Receptores renales						
Infección oportunista						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺	0.106	6.182	1.111 (1.023-1.208)	73.68 (48.80-90.85)	66.67 (34.89-90.08)	0.013
Constante	-2.215					
Logit INF = -2.215 + (%CD8 ⁺ CD25 ⁺ x 0.106)						

Las fórmulas para los logit de RA e INF derivan de los coeficientes del modelo que también se muestra. Los logit de INF y VHC pueden ser usados para predecir la probabilidad de INF y recidiva de VHC con las fórmulas $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$ y $e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$.

➤ Predicción de recidiva de virus de hepatitis C en receptores hepáticos basado en los niveles pre-trasplante de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de células T CD8⁺CD154⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo VHC, el 72.7% la desarrollarían, y el 27.3% restante no, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NVHC, el 78.9% no tendría VHC, y el 21.1% se pronosticó VHC, a pesar de no tenerla (sensibilidad=72.73%, 95%IC=39.03-93.98; especificidad=78.95%, 95%IC=54.43-93.95; OR=1.328, 95%IC=1.262-1.394; $P=0.023$).

➤ Predicción de infección oportunista en receptores renales basado en los niveles pre-trasplante de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en pre-trasplante predijo que del grupo INF, el 73.7% tendrían INF, y el 26.3% se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Igualmente, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 66.7% no tendría INF, y el 33.3% se pronosticó INF, a pesar de no tenerla (sensibilidad=73.68%, 95%IC=48.80-90.85; especificidad=66.67%, 95%IC=34.89-90.08; OR=1.111, 95%IC=1.023-1.208; $P=0.013$).

4.2.3. Expresión intracitoplasmática de citocinas IL-2, IL-17, IFN γ e IL-10 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el periodo post-trasplante hepático y renal

La monitorización de la expresión intracitoplasmática de citocinas tanto en linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ se llevó a cabo a lo largo del primer año post-trasplante, tanto en receptores hepáticos como renales, para las citocinas IFN γ , IL-10, IL-2 e IL-17. Sin embargo, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el período pre-trasplante, únicamente se incluyeron en el análisis post-trasplante aquellas citocinas que mostraron una capacidad predictiva de evento clínico (RA, INF o recidiva VHC) significativa siendo éstas candidatos idóneos para ser establecidos como biomarcadores de la función linfocitaria que mejor monitorizan la alorespuesta inmunitaria contra el injerto. Los resultados obtenidos del análisis de los niveles intracitoplasmáticos de citocinas en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ fueron comparados entre los distintos grupos de estudio [RA vs NRA, presencia de INF vs NoINF y presencia de recidiva VHC vs NVHC].

4.2.3.1. Niveles post-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-17 e IFN γ en células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ de receptores y su relación con rechazo agudo

El análisis de la expresión intracitoplasmática de IL-2, IFN γ e IL-17 en linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ de receptores hepáticos y renales se realizó en el período post-trasplante inmediato, es decir, durante los primeros 30 días después del trasplante ya que la mayor tasa de episodios de RA ocurrieron, para ambos tipos de trasplante, durante el primer mes post-trasplante (Figuras 4.3 y 4.4).

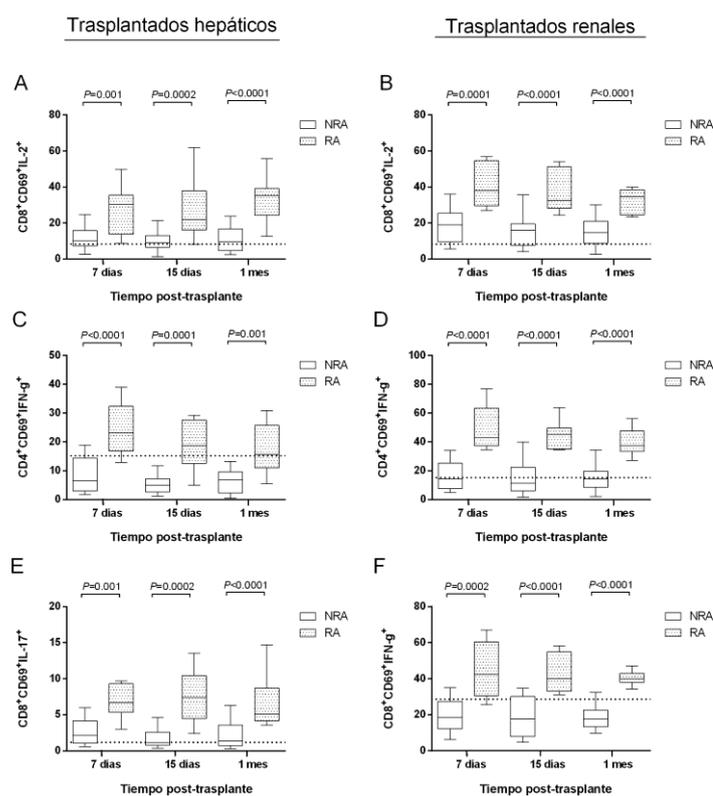


Figura 4.40. Monitorización de la expresión intracitoplasmática de citocinas en el período post-trasplante inmediato de receptores. (A) % de IL-2 en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ en receptores hepáticos, (B) % de IL-2 en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ en receptores renales, (C) % de IFN γ en linfocitos T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ en receptores hepáticos, (D) % de IFN γ en linfocitos T CD4 $^{+}$ CD69 $^{+}$ en receptores renales, (E) % de IL-17 en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ en receptores hepáticos y (F) % de IFN γ en linfocitos T CD8 $^{+}$ CD69 $^{+}$ en receptores renales fueron evaluados a una semana, dos semanas y primer mes post-trasplante. Los 'box plots' en esta figura representan los percentiles 25 $^{\circ}$ y 75 $^{\circ}$, las barras de desviación representan los percentiles 5 y 95 y la línea horizontal representa la mediana del valor para cada grupo. La línea de puntos horizontal representa el valor de la citosina en el grupo control. Los 'box plots' muestran los niveles de citocinas en pacientes RA y NRA.

En la figura 4.40 se muestra el análisis de la expresión intracitoplasmática de IL-2, IFN γ e IL-17 en receptores hepáticos así como de IL-2 e IFN γ en receptores renales a lo largo del primer mes post-trasplante.

Los niveles intracitoplasmáticos de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores con RA fueron significativamente superiores a los niveles del grupo NRA, tanto a los 7 días post-trasplante (Fig.4.40A; 29.48±4.93 vs 11.24±1.39, $P=0.001$ y Fig.4.40B; 42.51±4.68 vs 18.90±1.99, $P=0.0001$ respectivamente), a los 15 días post-trasplante (Fig.4.40A; 28.18±5.04 vs 9.92±1.23, $P=0.0002$ y Fig.4.40B; 36.75±4.37 vs 14.89±1.73, $P=0.00003$ respectivamente) y a los 30 días post-trasplante (Fig.4.40A; 32.81±3.36 vs 9.88±1.87, $P=0.000006$ y Fig.4.40B; 33.13±2.56 vs 14.88±1.49, $P=0.00002$ respectivamente).

Del mismo modo, los niveles intracitoplasmáticos de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ de receptores con RA fueron significativamente superiores a los niveles del grupo NRA, tanto a los 7 días post-trasplante (Fig.4.40C; 24.28±2.58 vs 8.79±1.62, $P=0.00005$ y Fig.4.40D; 50.29±5.86 vs 17.24±2.43, $P=0.00002$ respectivamente), a los 15 días (Fig.4.40C; 18.56±2.44 vs 6.29±1.31, $P=0.0001$ y Fig.4.40D; 44.56±3.89 vs 15.47±2.53, $P=0.00005$ respectivamente) y a los 30 días (Fig.4.40C; 17.42±2.45 vs 7.39±1.57, $P=0.001$ y Fig.4.40D; 39.55±3.69 vs 15.04±1.69, $P=0.00003$ respectivamente).

Los niveles intracitoplasmáticos de IL-17 en células T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos RA fueron también superiores a los del grupo NRA a los 7 días post-trasplante (Fig.4.40E; 10.37±2.81 vs 2.74±0.47, $P=0.00004$), a los 15 días (Fig.4.40E; 8.60±1.56 vs 1.73±0.33, $P=0.000002$) y los 30 días (Fig.4.40E; 6.83±1.13 vs 2.58±0.63, $P=0.0004$).

Por último, los niveles intracitoplasmáticos de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores renales con RA fueron significativamente superiores a los niveles del grupo NRA a los 7 días post-trasplante (Fig.4.40F; 46.09±5.80 vs 20.18±2.06, $P=0.0002$), a los 15 días (Fig.4.40F; 43.24±4.03 vs 18.99±2.34, $P=0.00007$) y a los 30 días (Fig.4.40F; 40.55±1.53 vs 18.83±1.58, $P<0.0001$).

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de expresión de IL-2, IL-17 e IFN γ de células T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ en el periodo post-trasplante inmediato**

El estudio para la estratificación del riesgo de RA en el post-trasplante inmediato se llevó a cabo por el análisis de curvas ROC para las citocinas mencionadas. Así, mediante el AUC para cada citocina se calculó qué porcentaje de expresión intracitoplasmática determinó un incremento en el riesgo de RA de receptores a lo largo del primer mes post-trasplante. Dicho valor pudo ser utilizado como valor corte por el cual se consiguió estratificar a los pacientes como alto o bajo riesgo de RA.

En el estudio de estratificación del riesgo para RA se tuvo en cuenta el nivel medio de expresión intracitoplasmático de citocina durante el primer mes post-trasplante, determinando un único valor de corte, el cual pudo ser utilizado para la monitorización de la alorespuesta inmunitaria en receptores hepáticos y renales.

Los valores de corte que mejor discriminaron a receptores como alto riesgo de RA en el primer mes post-trasplante en función de la expresión (%) intracitoplasmática de IL-2, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se muestran en tabla 4.29.

En la figura 4.41 se han representado las curvas ROC para la determinación de los valores de corte que mejor estratificaron a receptores con y sin RA.

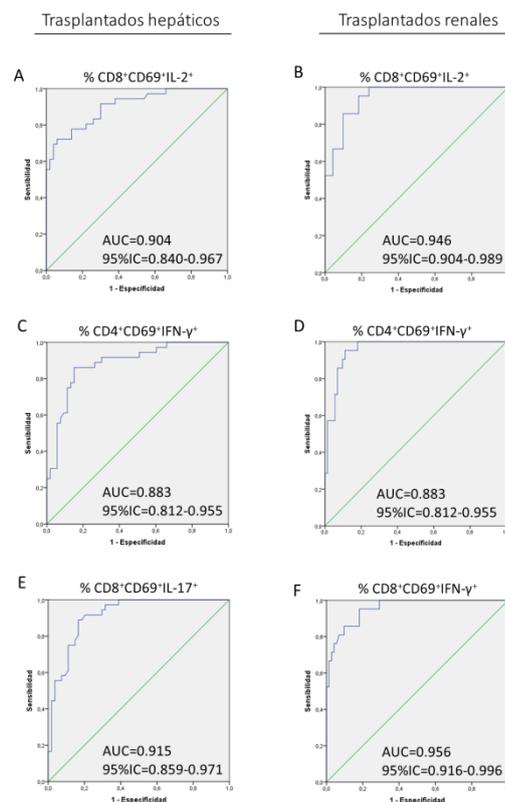


Figura 4.41. Curvas ROC post-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores con RA. Valores de AUC para (A) % de IL-2 en células T CD4⁺CD69⁺ de receptores hepáticos con RA, (B) % de IL-2 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ de receptores renales con RA, (C) % de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ de receptores hepáticos con RA, (D) % de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ de receptores con RA, (E) % de IL-17 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos con RA y (F) % de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores renales RA.

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ durante el primer mes post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺>20.08% (AUC=0.904, 95%IC=0.840-0.967, $P<0.001$) durante el primer mes post-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como

alto riesgo de RA (Fig.4.41A). Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, como bajo riesgo de RA con niveles de IL-2<20.08% o de alto riesgo de RA con IL-2≥20.08%.

El 63.3% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con un %IL-2<20.08%, de los cuáles el 82.5% no tuvo RA, mientras que 17.5% restante tuvo RA, a pesar de clasificarse como de bajo riesgo. Del mismo modo, el 33.7% de receptores hepáticos fue clasificado como alto riesgo de RA con un %IL-2≥20.08%, de los cuáles el 89.7% tuvo RA, mientras que el 10.3% restante no, a pesar de ser clasificados como de alto riesgo (sensibilidad=72.22%, 95%IC=54.81-85.80; especificidad=94%, 95%IC=83.45-98.75; $P<0.001$).

Del mismo modo, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2>24.38% (AUC=0.946, 95%IC=0.904-0.989, $P<0.0001$) durante el primer mes post-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA (Fig.4.41B). Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, como bajo riesgo de RA con niveles de IL-2<24.38% o como alto riesgo de RA con IL-2≥24.38%.

El 64.1% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de RA con un %IL-2<24.38%, de los cuáles el 98.3% no tuvo RA, mientras que el 1.7% restante si tuvo RA, a pesar de ser clasificados como bajo riesgo. Del mismo modo, el 35.7% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de RA con un %IL-2≥24.38%, de los cuáles el 60.6% tuvo RA, mientras que el 39.4% no tuvo RA, a pesar de asignarse alto riesgo (sensibilidad=95.24%, 95%IC=76.18-99.88; especificidad=81.69%, 95%IC=70.73-89.87; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFNγ⁺ durante el primer mes post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFNγ⁺>11.95% (AUC=0.883, 95%IC=0.812-0.955, $P<0.001$) durante el primer mes post-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA (Fig.4.41C). Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IFNγ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺, como bajo riesgo de RA con niveles de IFNγ< 11.95% o como alto riesgo con IFNγ≥11.95%.

El 56.2% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con un $\%IFN\gamma < 11.95\%$, de los cuáles el 90% no tuvo RA, mientras que el 10% restante tuvo RA, a pesar de ser clasificados como de bajo riesgo. Del mismo modo, el 43.8% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de RA con un $\%IFN\gamma \geq 11.95\%$, de los cuáles el 79.5% tuvo RA, mientras que el 20.5% restante no tuvo RA, siendo dados como de alto riesgo (sensibilidad=86.11%, 95%IC=70.50-95.33; especificidad=84.91%, 95%IC=72.41-93.25; $P < 0.001$).

Del mismo modo, niveles de expresión de linfocitos T $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+ > 26.48\%$ (AUC=0.960, 95%IC=0.924-0.995, $P < 0.001$) durante el primer mes post-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA (Fig.4.41D). Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de $IFN\gamma$ en linfocitos T $CD4^+CD69^+$, como bajo riesgo de RA con niveles de $IFN\gamma < 26.48\%$ o como alto riesgo con niveles de $IFN\gamma \geq 26.48\%$.

El 63.4% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de RA con un $\%IFN\gamma < 26.48\%$, de los cuáles el 100% no tuvo RA. Del mismo modo, el 36.6% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de RA con un $\%IFN\gamma \geq 26.48\%$, de los cuáles el 61.8% tuvo RA, mientras que el 38.2% restante no tuvo RA, a pesar de ser clasificados dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=100%, 95%IC=83.89-100; especificidad=81.94%, 95%IC=71.11-90.02; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T $CD8^+CD69^+IL-17^+$ durante el primer mes post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T $CD8^+CD69^+IL-17^+ > 4.14\%$ (AUC=0.915, 95%IC=0.859-0.971, $P < 0.001$) durante el primer mes post-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA (Fig.4.41E). Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de $IL-17$ en linfocitos T $CD8^+CD69^+$, como bajo riesgo de RA con niveles de $IL-17 < 4.14\%$ o como alto riesgo con $IL-17 \geq 4.14\%$.

El 54.4% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con un $\%IL-17 < 4.14\%$, de los cuáles el 91.8% no tuvo RA, mientras que el 8.2% restante si tuvo, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Igualmente, 45.6% de receptores hepáticos restante se clasificó de alto riesgo RA con un $\%IL-17 \geq 4.14\%$, de los cuáles el 78% tuvo

RA, y el 22% restante no, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=88.89%, 95%IC=73.94-96.89; especificidad=83.33%, 95%IC=70.71-92.08; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ durante el primer mes post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺>32.7% (AUC=0.956, 95%IC=0.916-0.996, $P<0.0001$) durante el primer mes post-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA (Fig.4.41F). Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, como bajo riesgo de RA con los niveles de IFN γ <32.7% o como alto riesgo con IFN- γ ≥32.7%.

El 73.1% de receptores renales se clasificaron como bajo riesgo de RA con %IFN γ <32.7%, de los cuáles el 95.6% no tuvo RA; mientras que el 4.4% de los restantes tuvo RA, a pesar de clasificarse como bajo riesgo. Igualmente, 26.9% de receptores renales fue clasificado como alto riesgo de RA con un %IFN γ ≥32.7%, de los cuáles el 72% tuvo RA, y el 28% tuvo RA, a pesar de fijarse alto riesgo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=63.66-96.95; especificidad=90.28%, 95%IC=80.99-96.00; $P<0.001$).

Tabla 4.29. Valores de corte (cut-off) durante el primer mes post-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores hepáticos y renales como alto riesgo de rechazo agudo.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Receptores hepáticos</i>				
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺	20.08	0.904 (0.840-0.967)	72.22 (54.81-85.80)	94.00 (83.45-98.75)
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺	11.95	0.883 (0.812-0.955)	86.11 (70.50-95.33)	84.91 (72.41-93.25)
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	4.14	0.915 (0.859-0.971)	88.89 (73.94-96.89)	83.33 (70.71-92.08)
<i>Receptores renales</i>				
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺	24.38	0.946 (0.904-0.989)	95.24 (76.18-99.88)	81.69 (70.73-89.87)
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺	26.48	0.960 (0.924-0.995)	100 (83.89-100)	81.94 (71.11-90.02)
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺	32.70	0.956 (0.916-0.996)	85.71 (63.66-96.95)	90.28 (80.99-96.00)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

• **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de RA en el primer mes post-trasplante en receptores basado en el logit RA**

Tras haber estudiado que la expresión intracitoplasmática de IL-2, IFN γ e IL-17 durante el primer mes post-trasplante pudo estratificar a receptores en alto riesgo de RA, en este apartado se obtuvo el logit RA para cada una de las citocinas propuestas como biomarcadores para la monitorización de la respuesta inmunitaria contra el injerto.

Aplicando el modelo de regresión logística propuesto por Hosmer y Lemeshow se obtuvieron los coeficientes necesarios para poder calcular la probabilidad de RA aplicando la fórmula $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA y como variable predictiva el nivel de expresión (%) intracitoplasmático de IFN γ , IL-2 e IL-17 en linfocitos T CD4 $^+$ y CD8 $^+$. Los coeficientes del modelo de regresión para el logitRA de expresión intracitoplasmática de IL-2, IL-17 e IFN γ en células T CD4 $^+$ CD69 $^+$ y CD8 $^+$ CD69 $^+$ se muestran en tabla 4.30.

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en la expresión (%) intracitoplasmática de IL-2 en linfocitos T CD8 $^+$ CD69 $^+$

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8 $^+$ CD69 $^+$ IL-2 $^+$ predijo que del grupo RA, el 72.2% tendrían RA durante el primer mes post-trasplante, mientras que en el 27.8% restante se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 90% no tendría RA, mientras que en el 10% restante se pronosticó RA, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=72.22%, 95%IC=54.81-85.80; especificidad=90%, 95%IC=78.19-96.67; OR=1.228, 95%IC=1.124-1.343; $P<0.0001$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en la expresión (%) intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4 $^+$ CD69 $^+$ IFN γ $^+$ predijo que del grupo RA, el 72.2% desarrollarían RA durante el primer mes post-trasplante, mientras que en el 27.8% restante se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 88.7% no tendría RA, y en el 11.3% se pronosticó RA, no teniéndolo (sensibilidad=72.22%, 95%IC=54.81-85.80; especificidad=88.68%, 95%IC=76.97-95.73; OR=1.223, 95%IC=1.127-1.328; $P<0.0001$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos basado en la expresión (%) intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD8 $^+$ CD69 $^+$

El modelo de regresión logística univariante dado para los niveles de expresión de células T CD8 $^+$ CD69 $^+$ IL-17 $^+$ predijo que del grupo RA, el 72.2% tendrían RA al mes post-trasplante, mientras que en el 27.8% se predijo NRA, a pesar de tenerlo. Igualmente,

el modelo predijo que el grupo NRA, 88.9% no tendría RA, y 11.1% se asumió RA, no teniéndolo (sensibilidad=72.22%, 95%IC=54.81-85.80; especificidad=88.89%, 95%IC=77.37-95.81; OR=2.080, 95%IC=1.527-2.833; $P<0.0001$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores renales basado en la expresión (%) intracitoplasmática de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión (%) de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ predijo que del grupo RA (n=7), tendrían RA en el primer mes post-trasplante el 66.7% de los receptores; mientras que en el 33.3% se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA (n=24), el 94.4% de receptores no tendría RA, y en el 5.6% restante se pronosticó RA sin padecerlo (sensibilidad=66.67%, 95%IC=43.03-85.41; especificidad=94.37%, 95%IC=86.20-98.44; OR=1.28, 95%IC=1.141-1.432; $P<0.0001$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores renales basado en la expresión (%) intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ predijo que del grupo RA, el 71.4% tendrían RA en el primer mes post-trasplante, mientras que en el 28.6% restante se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 94.4% no tendría RA, y en el 5.6% restante se pronosticó RA, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=71.43%, 95%IC=47.82-88.72; especificidad=94.44%, 95%IC=86.38-98.47; OR=1.239, 95%IC=1.115-1.377; $P<0.0001$).

Tabla 4.30. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de rechazo agudo durante el primer mes post-trasplante de receptores en función de la expresión (%) intracitoplasmática de IL-2, IFN γ e IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95%IC)	P
Receptores hepáticos						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺	0.206	20.460	1.228 (1.124-1.343)	72.22 (54.81-85.80)	90 (78.19-96.67)	<0.001
Constante	-3.888	-	-	-	-	-
Logit RA = -3.888 + (%CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺ x 0.206)						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	0.202	23.326	1.223 (1.127-1.328)	72.22 (54.81-85.80)	88.68 (76.97-95.73)	<0.001
Constante	-2.963	-	-	-	-	-
Logit RA = -2.963 + (%CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺ x 0.202)						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	0.732	21.558	2.080 (1.527-2.833)	72.22 (54.81-85.80)	88.89 (77.37-95.81)	<0.001
Constante	-3.564	-	-	-	-	-
Logit RA = -3.564 + (%CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺ x 0.732)						
Receptores renales						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺	0.245	17.884	1.278 (1.141-1.432)	66.67 (43.03-85.41)	94.37 (86.20-98.44)	<0.0001
Constante	-7.642	-	-	-	-	-
Logit RA = -7.642 + CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-2 ⁺ (%) x 0.245						

% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	0.215	15.899	1.239 (1.115-1.377)	71.43 (47.82-88.72)	94.44 (86.38-98.47)	<0.0001
Constante	-7.754	-	-	-	-	-
Logit RA = -7.754 + (%CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺ x 0.215)						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	0.279	15.222	1.321 (1.149-1.520)	76.19 (52.83-91.78)	94.44 (86.38-98.47)	0.0001
Constante	-10.048	-	-	-	-	-
Logit RA = -10.048 + (%CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺ x 0.279)						

La fórmula para el logit de RA deriva de los coeficientes del modelo que también se muestra. Los diferentes logit de RA pueden ser utilizados para predecir la probabilidad de rechazo agudo con la fórmula $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$.

Por otro lado, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ predijo que del grupo RA, el 76.2% desarrollarían RA en el primer mes post-trasplante, mientras que en el 23.8% restante se predijo NRA a pesar de desarrollarlo. Igualmente, el modelo predijo que el grupo NRA, el 94.4% no tendría RA, y en el 5.6% restante se pronosticó RA, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=76.19%, 95%IC=52.83-91.78; especificidad=94.44%, 95%IC=86.38-98.47; OR=1.321, 95%IC=1.149-1.520; $P=0.0001$).

4.2.3.2. Niveles intracitoplasmáticos post-trasplante de IL-10, IL-17 e IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ de receptores y su relación con infección oportunista y recidiva de VHC

En el siguiente apartado se analizaron los niveles de expresión intracitoplasmática de citocinas en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ durante el período post-trasplante de mantenimiento, que conlleva desde el 1^{er} al 6^o mes post-trasplante, puesto que fue en este período en donde se observó una mayor incidencia de procesos de INF tanto en receptores hepáticos (Figura 4.2) como renales (Figura 4.6).

En el análisis de expresión de citocinas en el periodo post-trasplante de mantenimiento únicamente se incluyeron aquellas citocinas con capacidad discriminadora para el riesgo de INF en pre-trasplante o con una marcada diferencia entre los grupos. La expresión intracitoplasmática de IL-10, IFN γ e IL-17 en células T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ discriminaron de forma precisa receptores con alto riesgo de INF.

En la figura 4.42 se muestra el análisis para la expresión intracitoplasmática de citocinas de receptores INF y NoINF en el periodo post-trasplante de mantenimiento.

Los niveles de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos con INF (Figura 4.42A) fueron significativamente inferiores a los 60 (7.95 ± 0.77 vs 26.25 ± 2.09 , $P<0.001$), 90 (7.47 ± 1.05 vs 30.34 ± 3.52 , $P<0.001$) y 180 días (15.31 ± 3.24 vs 24.59 ± 3.28 , $P=0.01$) post-trasplante en comparación con los niveles observados en el grupo NoINF. Del mismo modo, los niveles de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ de receptores renales

con INF (Figura 4.42B) fueron significativamente inferiores a los 30 (11.80 ± 1.59 vs 20.64 ± 3.26 , $P=0.035$), 60 (11.19 ± 1.35 vs 15.85 ± 1.58 , $P=0.02$), 90 (11.37 ± 1.42 vs 22.99 ± 4.12 , $P=0.028$) y 180 días (13.63 ± 2.21 vs 21.93 ± 3.88 , $P=0.008$) post-trasplante en comparación con receptores renales sin INF.

Los niveles de IL-17 en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ de receptores hepáticos con INF (Figura 4.42C) fueron significativamente superiores a 30 (4.23 ± 0.56 vs 0.81 ± 0.14 , $P=0.005$), 60 (4.21 ± 0.59 vs 1.43 ± 0.42 , $P=0.03$) y 90 días (3.97 ± 0.43 vs 0.96 ± 0.17 , $P=0.001$) post-trasplante en comparación con los niveles observados en el grupo NoINF.

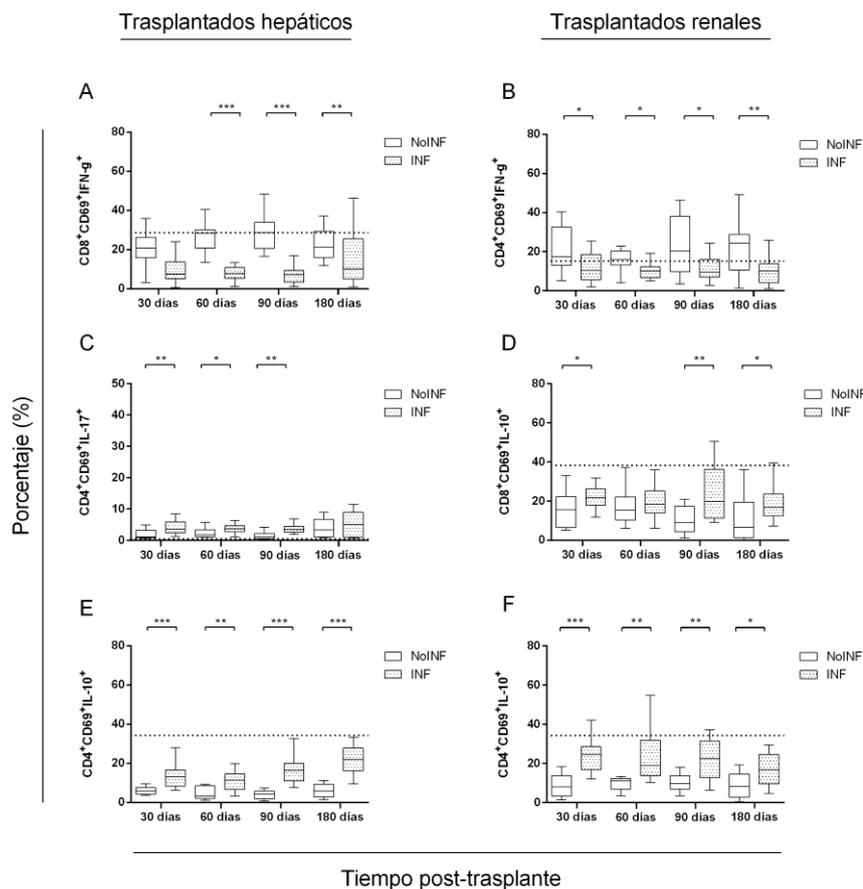


Figura 4.42 Monitorización de la expresión intracitoplasmática de citocinas en el período post-trasplante de mantenimiento. (A) % de linfocitos T $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ en receptores hepáticos con INF y NoINF, (B) % de linfocitos T $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$ en receptores renales con INF y NoINF, (C) % de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-17^+$ en receptores hepáticos con INF y NoINF, (D) % de linfocitos T $CD8^+CD69^+IL-10^+$ en receptores renales con INF y NoINF, (E) % de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-10^+$ en receptores hepáticos INF y NoINF y (F) % de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-10^+$ en receptores renales con INF y NoINF. Los 'box plots' en esta figura representan los percentiles 25 y 75, las barras de desviación representan los percentiles 5 y 95 y la línea horizontal representa la mediana del valor para cada grupo. La línea de puntos horizontal representa el valor de la citocina en el grupo control. Los 'box plots' muestran los niveles de citocinas en los grupos de INF y NoINF. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Los niveles intracitoplasmáticos de IL-10 en linfocitos T $CD8^+CD69^+$ de receptores renales con INF (Figura 4.42D) fueron significativamente superiores a 30 (22.37 ± 1.35 vs 17.18 ± 3.54 , $P=0.032$), 90 (23.06 ± 2.89 vs 10.19 ± 1.98 , $P=0.002$) y 180

días (19.68 ± 2.27 vs 10.59 ± 3.17 , $P=0.016$) post-trasplante en comparación con los receptores renales NoINF. Del mismo modo, los niveles de IL-10 en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ tanto de receptores hepáticos (Figura 4.42E) como renales (Figura 4.42F) con INF fueron significativamente superiores a 30 (14.06 ± 1.65 vs 6.09 ± 0.53 , $P=0.0007$ y 25.21 ± 2.74 vs 8.54 ± 1.64 , $P<0.001$), 60 (11.46 ± 1.42 vs 4.54 ± 0.91 , $P=0.001$ y 22.78 ± 2.74 vs 10.58 ± 1.42 , $P=0.002$), 90 (16.85 ± 1.60 vs 4.07 ± 0.63 , $P<0.001$ y 22.34 ± 2.27 vs 10.51 ± 1.29 , $P=0.001$) y 180 días post-implante (21.81 ± 1.72 vs 6.07 ± 0.98 , $P<0.001$ y 16.71 ± 1.79 vs 8.78 ± 1.90 , $P=0.01$), respectivamente, comparado a receptores NoINF.

En la figura 4.43 se muestra el análisis realizado para los niveles intracitoplasmáticos de IL-17 en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ en receptores hepáticos VHC y NVHC en el periodo post-trasplante de larga duración. Como se muestra en la figura 4.2, la mayoría de eventos de recidiva de VHC se concentraron en el periodo post-trasplante de larga duración. Es por ello que, en el análisis únicamente se tuvieron en cuenta los niveles (%) de $CD4^+CD69^+IL-17^+$ a partir de 90 hasta 365 días post-trasplante.

Inicialmente se observó que la población de linfocitos aumentó significativamente en receptores hepáticos con VHC. Los niveles intracitoplasmáticos de IL-17 en células T $CD4^+CD69^+$ de receptores hepáticos con VHC fueron significativamente superiores a niveles del grupo NVHC a 90 (3.49 ± 2.05 vs 1.40 ± 1.01 , $P=0.002$), 180 días (7.64 ± 1.67 vs 1.61 ± 0.22 , $P<0.001$) y 365 (20.37 ± 4.62 vs 2.05 ± 0.61 , $P<0.001$) post-trasplante.

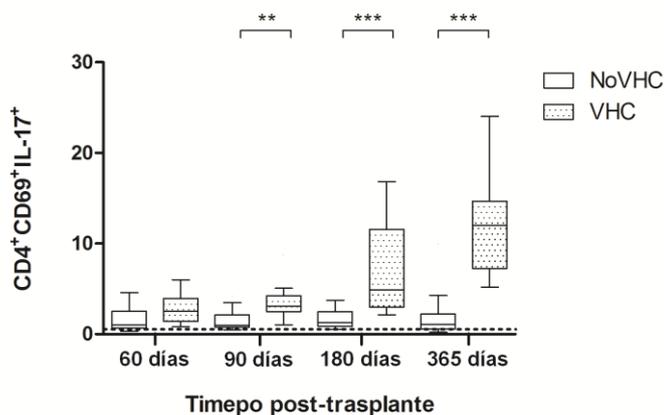


Figura 4.43. Monitorización intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ en el período post-trasplante de larga duración. % de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-17^+$ en receptores hepáticos con recidiva de VHC y NVHC a los 60, 90, 180 días y 1^{er} año post-trasplante. Los 'box plots' en esta figura representan los percentiles 25 y 75, las barras de desviación representan los percentiles 5 y 95 y la línea horizontal representa la mediana del valor para cada grupo. La línea de puntos horizontal representa el valor de IL-17 en el grupo control. Los 'box plots' muestran los niveles de citocina en pacientes con y sin recidiva de virus de hepatitis C. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de expresión de IL-2, IL-10, IL-17 e IFN γ de células T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ en receptores durante el periodo post-trasplante de mantenimiento y de larga duración**

En este apartado se realizó el estudio de estratificación del riesgo de INF y recidiva de VHC en el periodo post-trasplante de mantenimiento y de larga duración, respectivamente, por el cual se obtuvieron los valores de corte que identificaron receptores con mayor susceptibilidad a desarrollar INF y VHC en función de los niveles intracitoplasmáticos de IL-10, IL-17 e IFN γ .

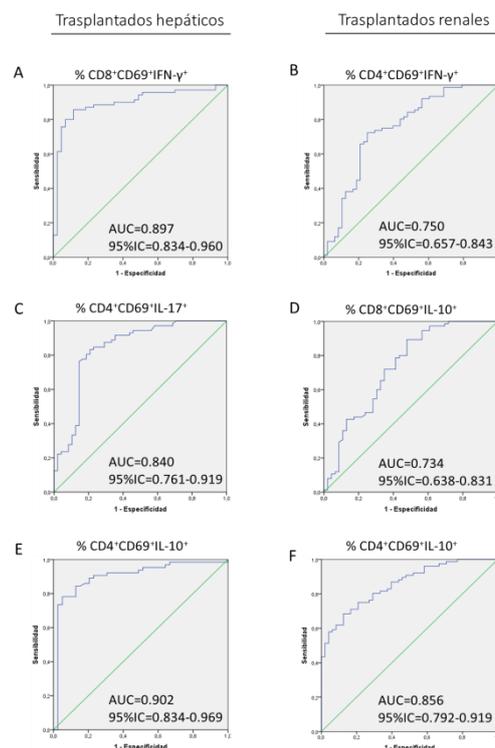


Figura 4.43. Curvas ROC post-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores con INF. Valores de AUC para (A) % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ de receptores hepáticos con INF, (B) % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ de receptores renales con INF, (C) % linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ de receptores hepáticos con INF, (D) % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ de receptores renales con INF, (E) % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ de receptores hepáticos con INF y (F) % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ de receptores renales con INF.

Los puntos de corte que mejor establecieron riesgo de INF, se calcularon por análisis de curvas ROC para las citocinas. De este modo, y por el AUC de cada citocina, se pudo calcular el % de expresión que determinó un incremento en el riesgo de INF. Dicho valor pudo ser utilizado como punto de corte por el cual se estratificó de forma eficaz a los pacientes como alto o bajo riesgo de INF y recidiva de VHC.

En el estudio de estratificación del riesgo de INF, se incluyeron los niveles de expresión intracitoplasmática de IL-10, IL-17 e IFN γ durante el periodo post-trasplante de mantenimiento, es decir desde el primer al sexto mes post-trasplante

Los valores de corte que mejor discriminaron a receptores como alto riesgo de INF en post-trasplante de mantenimiento en función de expresión (%) intracitoplasmática de IL-10, IL-17 e IFN γ en células T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ se dan en la tabla 4.31.

En la figura 4.44 se encuentra representado las curvas ROC para la determinación de los valore de corte que mejor estratificaron a receptores como alto riesgo de INF.

Del mismo modo, se obtuvo el valor de corte para los niveles intracitoplasmáticos de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ de receptores hepáticos durante el periodo post-trasplante de larga duración que mejor estratificó el riesgo de recidiva VHC. El valor de corte que mejor discriminó a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC en el periodo post-trasplante de larga duración en función de la expresión (%) intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ se muestran en la tabla 4.31.

En la figura 4.44 se representa la curva ROC para la determinación del valor de corte que mejor estratificó a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC.

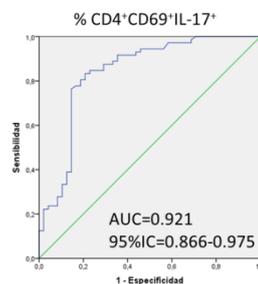


Figura 4.44. Curva ROC post-trasplante para el valor de corte que discriminó de forma precisa a receptores hepáticos con recidiva de VHC. Valor de AUC para la expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ de receptores hepáticos con recidiva de VHC.

- Estratificación del riesgo de INF en función del % de células T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ y CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en el periodo post-trasplante de mantenimiento

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺<14.95% (Fig.4.43A; AUC=0.897, 95%IC=0.834-0.960, $P<0.001$) en el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IFN γ en linfocitos T CD8⁺CD69⁺, como alto riesgo de INF con niveles de IFN γ ≤4.95% o bajo riesgo de INF con IFN γ >14.95%.

El 42.5% receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un $\%IFN\gamma > 14.95\%$, de los cuáles el 79.2% no tuvo INF, y el 20.8% tuvo INF, a pesar clasificarse de bajo riesgo. Igualmente, el 57.5% de receptores hepáticos restante fue clasificado como alto riesgo de INF con un $\%IFN\gamma \leq 14.95\%$, de los cuáles 92.3% tuvieron INF, y el 7.7% restante no tuvo INF, aún siendo de alto riesgo (sensibilidad=85.71%, 95%IC=75.29-92.93; especificidad=88.37%, 95%IC=74.92-96.11; $P < 0.001$).

Del mismo modo, niveles de expresión de linfocitos T $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+ < 13.83\%$ (Fig.4.43B; AUC=0.750, 95%IC=0.657-0.843, $P < 0.001$) en el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de $IFN\gamma$ en linfocitos T $CD4^+CD69^+$, como alto riesgo de INF con niveles de $IFN\gamma \leq 13.83\%$ o como bajo riesgo de INF con niveles de $IFN\gamma > 13.83\%$.

El 46% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un $\%IFN\gamma > 13.83\%$, de los cuáles el 63.2% no tuvo INF, y el 36.8% restante desarrolló INF, a pesar clasificarse como de bajo riesgo. Del mismo modo, el 54% de receptores renales se clasificó de alto riesgo de INF con un $\%IFN\gamma \leq 13.83\%$, de los cuáles 82% tuvo INF, y 18% no tuvo INF, siendo dados como alto riesgo (sensibilidad=72.37%, 95%IC=60.91-82.01; especificidad=75%, 95%IC=60.40-86.36; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-17^+$ en el periodo post-trasplante de mantenimiento

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-17^+ > 2.19\%$ (Fig.4.42C; AUC=0.840, 95%IC=0.761-0.919, $P < 0.001$) en el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-17 en células T $CD4^+CD69^+$, como alto riesgo de INF con niveles de $IL-17 \geq 2.19\%$ o bajo riesgo de INF con $IL-17 < 2.19\%$.

El 44.2% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un $\%IL-17 < 2.19\%$, de los cuáles el 73.6% no tuvo INF, y el 26.4% desarrollaron INF, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 55.8% de receptores hepáticos se clasificó de alto riesgo de INF con un $\%IL-17 \geq 2.19\%$, de los cuáles 86.6% tuvo INF, y 13.4% no tuvo INF, siendo alto riesgo (sensibilidad=80.56%, 95%IC=69.53-88.94; especificidad=81.25%, 95%IC=67.37-91.05; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en el post-trasplante de mantenimiento

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-10⁺>11.15% (Fig.4.43D; AUC=0.734, 95%IC=0.638-0.831, $P<0.001$) en el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-10 en células T CD8⁺CD69⁺, como alto riesgo de infección con niveles de IL-10 \geq 11.5% o como bajo riesgo con IL-10<11.5%.

El 26.4% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un %IL-10<11.5%, de los cuáles el 75% no tuvo INF, y el 25% tuvo INF, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 73.6% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de INF con un %IL-10 \geq 11.5%, de los cuáles el 75.3% tuvo INF, y 24.7% no tuvo INF, siendo clasificado de alto riesgo (sensibilidad=89.33%, 95%IC=80.06-95.28; especificidad=52.17%, 95%IC=36.95-67.11; $P<0.001$).

Del mismo modo, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺>9.35% (Fig.4.43E; AUC=0.902, 95%IC=0.834-0.969, $P<0.001$) y >13.95% (Fig.4.43F; AUC=0.856, 95%IC=0.792-0.919, $P<0.001$) en el post-trasplante de mantenimiento fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos y renales, respectivamente, como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ para receptores hepáticos, como alto riesgo de INF con niveles de IL-10 \geq 9.35% o como bajo riesgo de INF con IL-10<9.35%; y para receptores renales, como alto riesgo de INF, con niveles de IL-10 \geq 13.95% o como bajo riesgo de INF con IL-10<13.95%.

El 49.5% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un %IL-10<9.35%, de los cuáles el 72.5% no tuvo INF, y el 27.5% tuvo INF, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 50.5% de receptores hepáticos restante fue clasificado como alto riesgo de INF con un %IL-10 \geq 9.35%, de los cuáles el 96.2% tuvo INF, y el 3.8% no tuvo INF, siendo clasificados de alto riesgo (sensibilidad=78.12%, 95%IC=66.03-87.49; especificidad=94.87%, 95%IC=82.68-99.37; $P<0.001$).

De igual modo, el 50% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de INF con un %IL-10<13.95%, de los cuáles el 64.5% no tuvo INF, y el 35.5% tuvo INF, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 50% de receptores renales se clasificó como alto riesgo de INF con un %IL-10 \geq 13.95%, de los cuáles el 87.1% tuvo

INF, y el 12.9% no tuvo INF, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=71.05%, 95%IC=59.51-80.89; especificidad=83.33%, 95%IC=69.78-92.52; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de recidiva de virus de hepatitis C en función del % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en el periodo post-trasplante de larga duración

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺>2.48% (Fig.4.44; AUC=0.921, 95%IC=0.866-0.975, $P<0.001$) en el periodo post-trasplante de larga duración fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de la expresión intracitoplasmática de IL-17 en células T CD4⁺CD69⁺, como alto riesgo de VHC con niveles de IL-17 \geq 2.48% o bajo riesgo de VHC con IL-17<2.48%.

El 57.8% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de VHC con un %IL-17<2.48%, de los cuáles el 92.3% no tuvo VHC, y el 7.7% tuvo VHC, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 42.2% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de VHC con un %IL-17 \geq 2.48%, de los cuáles el 76.3% tuvo VHC, y el 23.7% no tuvo VHC, siendo clasificado de alto riesgo (sensibilidad=87.88%, 95%IC=71.80-96.60; especificidad=84.21%, 95%IC=72.13-92.52; $P<0.001$).

Tabla 4.31. Valores de corte (cut-off) durante el periodo post-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores como alto riesgo de INF y de recidiva de VHC.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Receptores hepáticos</i>				
<i>Infección oportunista</i>				
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	14.95	0.897 (0.834-0.960)	85.71 (75.29-92.93)	88.37 (74.92-96.11)
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	2.19	0.840 (0.761-0.919)	80.56 (69.53-88.94)	81.25 (67.37-91.05)
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	9.35	0.902 (0.834-0.969)	78.12 (66.03-87.49)	94.87 (82.68-99.37)
<i>Recidiva de virus de hepatitis C</i>				
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	2.48	0.921 (0.866-0.975)	87.88 (71.80-96.60)	84.21 (72.13-92.52)
<i>Receptores renales</i>				
<i>Infección oportunista</i>				
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	13.83	0.750 (0.657-0.843)	72.37 (60.91-82.01)	75 (60.40-86.36)
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	13.95	0.856 (0.792-0.919)	71.05 (59.51-80.89)	83.33 (69.78-92.52)
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-10	11.15	0.734 (0.638-0.831)	89.33 (80.06-95.28)	52.17 (36.95-67.11)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de INF y recidiva de VHC durante el periodo post-trasplante de mantenimiento y de larga duración en receptores basado en el logit INF y logit VHC**

La expresión intracitoplasmática de $IFN\gamma$, IL-17 e IL-10 en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ y $CD8^+CD69^+$ pudo discriminar de forma precisa a receptores como alto riesgo de INF y recidiva de VHC en el periodo post-trasplante de mantenimiento y de larga duración. En este apartado, se construyeron los modelos de regresión logística basados en el modelo propuesto por Hosmer y Lemeshow por el cual se obtuvieron los coeficientes necesarios para poder calcular los logit INF y logit VHC. Basándonos en el logit INF y logit VHC, se construyeron los modelos de regresión logística univariante que permitieron determinar el riesgo o probabilidad exacta de INF ($e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$) o recidiva de VHC ($e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$) durante el periodo post-trasplante en receptores. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente INF y VHC, y como variable predictiva el nivel de expresión (%) intracitoplasmático de $IFN\gamma$, IL-17 e IL-10 en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ y $CD8^+CD69^+$. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular los logit de INF y recidiva de VHC para la expresión intracitoplasmática de $IFN\gamma$, IL-17 e IL-10 en linfocitos T $CD4^+CD69^+$ y $CD8^+CD69^+$ se muestran en la tabla 4.32.

- Predicción de INF en receptores basado en la expresión de células T $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$ y $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ en post-trasplante de mantenimiento

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ de receptores hepáticos predijo que del grupo INF, el 85.7% tendrían INF en el periodo post-trasplante de mantenimiento, mientras que en el 14.3% restante se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 88.4% no desarrollaría INF, y en el 11.6% se pronosticó INF, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=85.71%, 95%IC=75.29-92.93; especificidad=88.37%, 95%IC=74.92-96.11; OR=1.855, 95%IC=1.808-1.905; $P<0.001$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$ de receptores renales predijo que del grupo INF, tendrían INF en el periodo post-trasplante de mantenimiento el 72.4%, y el 27.6% se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 75% no tendría INF, y en el 25% restante se pronosticó INF, a

pesar de no desarrollarla (sensibilidad=72.37%, 95%IC=60.91-82.01; especificidad=75%, 95%IC=60.40-86.36; OR=1.886, 95%IC=1.841-1.935; $P<0.001$).

➤ Predicción de INF y VHC en receptores hepáticos basado en expresión de células T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en el post-trasplante de mantenimiento y de larga duración

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en receptores hepáticos predijo que del grupo INF, el 80.6% tendría INF en el periodo post-trasplante de mantenimiento, mientras que en el 19.4% restante se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo VHC, el 63.3% tendría recidiva en el periodo post-trasplante de larga duración, y el 36.4% se predijo NVHC, a pesar de desarrollarla. Por otro lado, el modelo predijo que del grupo NoINF, 79.2% no tendría INF, y en el 20.8% se pronosticó INF, a pesar de no tenerla (sensibilidad=80.56%, 95%IC=69.53-88.94; especificidad=79.17%, 95%IC=65.01-89.53; OR=1.69, 95%IC=1.327-2.171; $P<0.001$). Igualmente, en el grupo NVHC, 94.7% no tendría VHC, y en el 5.3% se predijo VHC, a pesar de no tenerla (sensibilidad=63.64%, 95%IC=45.12-79.60; especificidad=94.74%, 95%IC=85.38-98.90; OR=1.86, 95%IC=1.353-2.563; $P=0.0001$).

➤ Predicción de INF en receptores basado en la expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en el post-trasplante de mantenimiento

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ de receptores hepáticos predijo que del grupo INF, el 90.6% tendría INF en el post-trasplante de mantenimiento, mientras que en el 9.4% restante se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 76.9% no tendría INF, y el 23.1% restante se pronosticó INF, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=90.62%, 95%IC=80.70-96.48; especificidad=76.92%, 95%IC=60.67-88.87; OR=1.381, 95%IC=1.206-1.580; $P<0.001$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ de receptores renales predijo que del grupo INF, el 80.3% y 86.7% tendrían INF en el post-trasplante de mantenimiento, respectivamente; mientras que en el 19.7% y 13.3% restante, se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, el 70.8% y 52.2% no tendría INF, respectivamente; y que en 29.2%

y 47.8%, se pronosticó INF, sin desarrollarla (sensibilidad=80.26%, 95%IC=69.54-88.51; especificidad=70.83%, 95%IC=55.94-83.05; OR=1.25, 95%IC=1.147-1.357; $P<0.001$ y sensibilidad=86.67%, 95%IC=76.84-93.42; especificidad=52.17%, 95%IC=36.95-67.11; OR=1.09, 95%IC=1.042-1.146; $P=0.0002$; respectivamente).

Tabla 4.32. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de INF y de recidiva de VHC en el periodo post-trasplante de mantenimiento y de larga duración de receptores en función de la expresión (%) intracitoplasmática de IFN γ , IL-17 e IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
Receptores hepáticos						
Infección oportunista						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺	-0.156	29.501	1.855 (1.808-1.905)	85.71 (75.29-92.93)	88.37 (74.92-96.11)	<0.001
Constante	3.102	-	-	-	-	-
Logit INF = 3.102 + (%CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺ x -0.156)						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	0.529	17.782	1.698 (1.327-2.171)	80.56 (69.53-88.94)	79.17 (65.01-89.53)	<0.001
Constante	-1.087	-	-	-	-	-
Logit INF = -1.087 + (%CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺ x 0.529)						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	0.323	21.952	1.381 (1.206-1.580)	90.62 (80.70-96.48)	76.92 (60.67-88.87)	<0.001
Constante	-2.353	-	-	-	-	-
Logit INF = -2.353 + (%CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺ x 0.323)						
Recidiva de virus de hepatitis C						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺	0.622	14.562	1.862 (1.353-2.563)	63.64 (45.12-79.60)	94.74 (85.38-98.90)	0.0001
Constante	-2.587	-	-	-	-	-
Logit VHC = -2.587 + (%CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-17 ⁺ x 0.622)						
Receptores renales						
Infección oportunista						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺	-0.121	19.881	0.886 (0.841-0.935)	72.37 (60.91-82.01)	75 (60.40-86.36)	<0.001
Constante	2.260	-	-	-	-	-
Logit INF = 2.260 + (%CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN γ ⁺ x -0.121)						
% Linfocitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	0.221	26.640	1.248 (1.147-1.357)	80.26 (69.54-88.51)	70.83 (55.94-83.05)	<0.001
Constante	-2.717	-	-	-	-	-
Logit INF = -2.717 + (%CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺ x 0.221)						
% Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	0.089	13.485	1.093 (1.042-1.146)	86.67 (76.84-93.42)	52.17 (36.95-67.11)	0.0002
Constante	-1.037	-	-	-	-	-
Logit INF = -1.037 + (%CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺ x 0.089)						

Las fórmulas para los logit de INF y Logit VHC derivan de los coeficientes del modelo que también se muestra. Los diferentes logit de INF y VHC pueden ser utilizados para predecir la probabilidad de INF y recidiva de VHC con las fórmulas $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$ y $e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$, respectivamente.

4.2.4. Niveles post-trasplante de IL-17 y TGF β solubles de receptores y su relación con RA, INF y VHC durante el periodo post-trasplante

En este apartado se ha llevado a cabo el estudio de los niveles en sobrenadante de cultivo de las citocinas IL-17 y TGF β de receptores durante el período post-trasplante y su relación con RA, INF y VHC. En un primer análisis, los niveles plasmáticos de IL-17 y TGF β se compararon entre receptores con y sin RA en el periodo post-trasplante inmediato. A continuación se analizaron los niveles de citocinas entre receptores con y sin

INF en el periodo post-trasplante de mantenimiento y en último lugar se analizaron los niveles de citocinas entre receptores hepáticos VHC y NVHC en el periodo post-trasplante de larga duración. En la figura 4.45 se encuentran representados los niveles de IL-17 y TGF β (pg/ml) entre los distintos grupos de estudio.

Los niveles solubles (pg/ml) de IL-17 de receptores hepáticos con RA fueron significativamente superiores en comparación con los niveles del grupo NRA a los 7 (Fig.4.45A; 281.02 ± 63.16 vs 120.91 ± 15.99 , $P=0.013$), 15 (Fig.4.45A; 258.70 ± 30.56 vs 107.34 ± 15.01 $P<0.001$) y 30 días post-trasplante (Fig.4.45A; 339.92 ± 47.42 vs 93.29 ± 15.87 , $P<0.001$). Del mismo modo, los niveles solubles (pg/ml) de IL-17 de receptores hepáticos con VHC fueron superiores comparadas con los niveles de receptores NVHC a los 180 días (Fig.4.45B; 407.03 ± 86.20 vs 129.1 ± 19.56 , $P<0.001$) y 365 días (Fig.4.45B; 346.44 ± 58.29 vs 107.38 ± 20.64 , $P<0.001$) post-trasplante.

Por otro lado, receptores hepáticos INF en el post-trasplante de mantenimiento presentaron niveles solubles (pg/ml) de TGF β superiores a 30 (Fig.4.45C; 703.49 ± 84.39 vs 408.76 , $P=0.004$), 60 (Fig.4.45C; 700.44 ± 62.41 vs 394.49 ± 103.26 , $P=0.013$) y 180 días (Fig.4.45C; 869.46 ± 78.76 vs 245.47 ± 40.62 , $P<0.001$) en comparación con el grupo NoINF. Del mismo modo, niveles solubles (pg/ml) de TGF β de receptores renales en el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron significativamente superiores a los 60 (Fig.4.45D; 999.21 ± 103.29 vs 606.9 ± 136.15 , $P=0.021$), 90 (Fig.4.45D; 1160.07 ± 119.59 vs 645.25 ± 127.97 , $P=0.014$) y 180 días (Fig.4.45D; 1407.95 ± 160.32 vs 512.86 ± 112.92 , $P<0.001$) post-trasplante comparadas con los niveles del grupo NoINF.

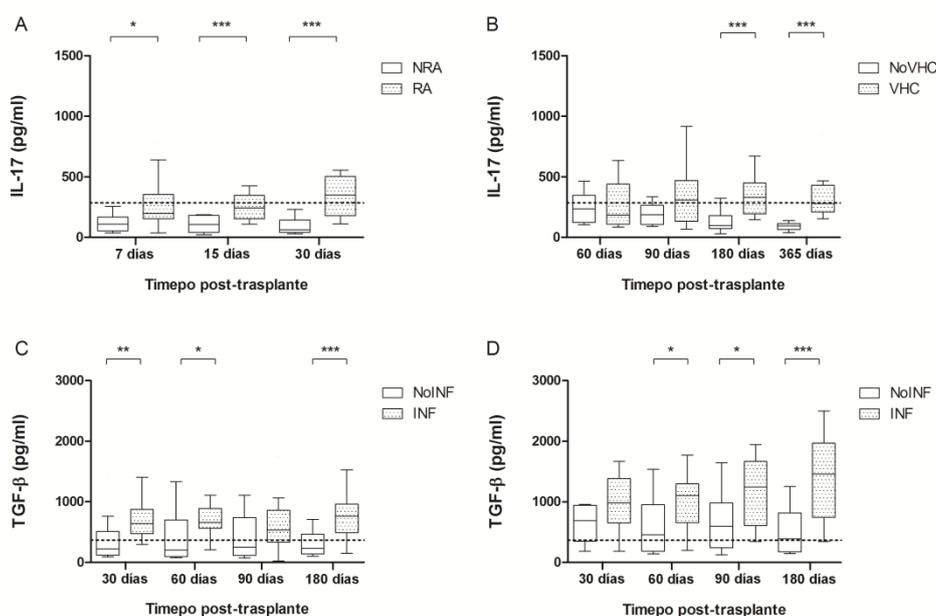


Figura 4.45. Monitorización de los niveles solubles (pg/ml) de citocinas en post-trasplante. (A) concentración de IL-17 en receptores hepáticos RA y NRA, (B) concentración de IL-17 en receptores hepáticos VHC y NVHC, (C) concentración (pg/ml) de TGF β de receptores hepáticos INF y NoINF (D) concentración (pg/ml) de TGF β de receptores renales INF y NoINF. Los 'box plots' en esta figura representan los percentiles 25° y 75°, las barras de desviación representan los percentiles 5 y 95 y la línea horizontal representa la mediana del valor para cada grupo. La línea de puntos horizontal representa el valor de la citocina en el grupo control. * $P=0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

- **Puntos de corte (cut-off) para la concentración soluble *in vitro* de las citocinas IL-17 y TGF β en receptores durante el periodo post-trasplante**

Tras el estudio de estratificación para los niveles solubles post-trasplante de IL-17 y TGF β de receptores se realizó el estudio por el cual se estratificó el nivel de riesgo para RA, VHC e INF en función de los niveles de las citocinas mencionadas por el AUC del análisis de curvas ROC. Mediante este estudio se obtuvieron los puntos de corte que mejor discriminaron a receptores como alto riesgo de desarrollar evento clínico.

De este modo, niveles solubles *in vitro* de IL-17 y TGF β en receptores fueron capaces de discriminar de forma precisa a aquellos pacientes con alto riesgo de RA, INF y VHC. Los valores de corte, así como sensibilidad y especificidad para IL-17 y TGF β obtenidos del análisis ROC se encuentran en la tabla 4.33.

En la figura 4.46 se encuentra representado el AUC para los niveles solubles *in vitro* (pg/ml) de IL-17 y TGF β de receptores con RA, INF y VHC por el cual se obtuvieron los puntos de corte capaces de estratificar dichos pacientes como alto riesgo para el desarrollo de un determinado evento clínico.

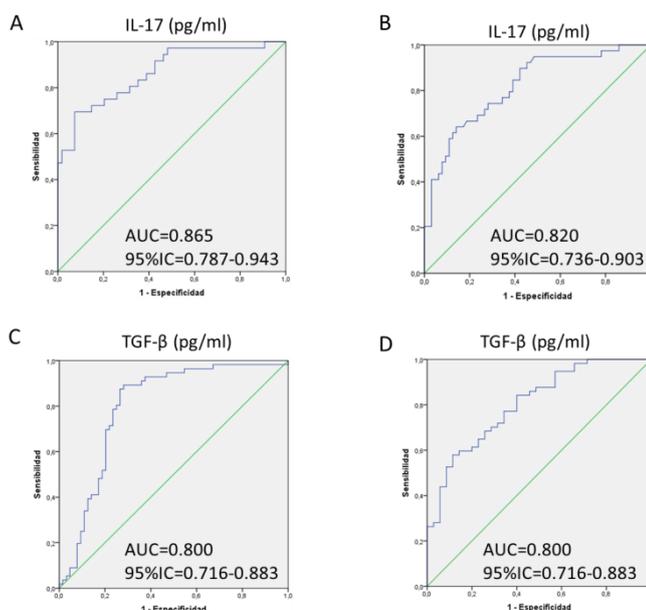


Figura 4.46. Curvas ROC post-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores. Valores de AUC para (A) niveles solubles (pg/ml) de IL-17 en receptores hepáticos con RA en el post-trasplante inmediato, (B)

niveles solubles (pg/ml) de IL-17 en receptores hepáticos con VHC en el periodo post-trasplante de larga duración, (C) niveles solubles (pg/ml) de TGF β en receptores hepáticos con INF en el periodo post-trasplante de mantenimiento y (D) niveles solubles (pg/ml) de TGF β en receptores renales con INF durante el periodo post-trasplante de mantenimiento.

➤ Estratificación del riesgo de RA y VHC en función de los niveles solubles *in vitro* de IL-17 de receptores hepáticos durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles solubles de IL-17 > 195.04 ng/ml (Fig.4.46A; AUC=0.865, 95%IC=0.787-0.943, $P < 0.001$) en receptores hepáticos durante el post-trasplante inmediato fueron capaces de discriminar a receptores como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles plasmáticos de IL-17, como alto riesgo de RA con niveles de IL-17 ≥ 195.04 ng/ml o como bajo riesgo de RA con IL-17 < 195.04 ng/ml.

El 67.8% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con una concentración plasmática de IL-17 < 195.04 ng/ml, de los cuáles el 82% no tuvo RA, y el 18% tuvo RA, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 32.2% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de RA, con una concentración plasmática de IL-17 ≥ 195.04 ng/ml, de los cuáles el 86.2% tuvo RA, y el 13.8% no tuvo RA, a pesar de clasificarlos de alto riesgo (sensibilidad=69.44%, 95%IC=51.89-83.65; especificidad=92.59%, 95%IC=82.11-97.94; $P < 0.001$).

Del mismo modo, según el AUC de análisis ROC, niveles plasmáticos de IL-17 > 186.10 ng/ml (Fig.4.46B; AUC=0.820, 95%IC=0.736-0.903, $P < 0.001$) en el periodo post-trasplante de larga duración fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles plasmáticos de IL-17, como alto riesgo de VHC con niveles de IL-17 ≥ 186.10 ng/ml o como bajo riesgo de VHC con IL-17 < 186.1 ng/ml.

El 53.4% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de VHC con una concentración plasmática de IL-17 < 186.10 ng/ml, de los cuáles el 81.8% no tuvo VHC, y 18.2% desarrollaron VHC, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 46.6% de receptores hepáticos restante fue clasificado como alto riesgo de VHC con una concentración plasmática de IL-17 ≥ 186.1 ng/ml, de los cuáles 60.4% tuvo VHC, y 39.6% no tuvo VHC, siendo clasificados de alto riesgo (sensibilidad=74.36%, 95%IC=57.87-86.96; especificidad=70.31%, 95%IC=57.58-81.09; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función de los niveles solubles *in vitro* de TGFβ de receptores durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles solubles de TGFβ > 363.25 ng/ml (Fig.4.46C; AUC=0.800, 95%IC=0.716-0.883, $P < 0.001$) en receptores hepáticos y TGFβ > 808.51 ng/ml (Fig.4.46D; AUC=0.805, 95%IC=0.716-0.894, $P < 0.001$) en receptores renales en el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron capaces de discriminar a los pacientes como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles solubles de TGFβ, como alto riesgo de INF con niveles de TGFβ ≥ 363.25 ng/ml para receptores hepáticos y TGFβ ≥ 808.51 ng/ml para receptores renales, o como bajo riesgo de INF con niveles de TGFβ < 363.25 ng/ml para receptores hepáticos y TGFβ < 808.51 ng/ml para receptores renales.

El 43.3% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con una concentración de TGFβ < 363.25 ng/ml en el post-trasplante de mantenimiento, de los cuáles el 88.5% no tuvo INF, y el 11.5% desarrolló INF, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 56.7% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de INF con una concentración plasmática de TGFβ ≥ 363.25 ng/ml, de los cuáles el 73.5% tuvo INF, y el 26.5% no tuvo INF, a pesar de darse de alto riesgo (sensibilidad=89.29%, 95%IC=78.12-95.97; especificidad=71.88%, 95%IC=59.24-82.40; $P < 0.001$).

Del mismo modo, el 45.7% de receptores renales se clasificaron como bajo riesgo de INF con una concentración plasmática de TGFβ < 808.51 ng/ml en el post-trasplante de mantenimiento, de los cuáles el 59.5% no tuvo INF, y el 40.5% restante tuvo INF, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Por el contrario, el 54.3% de receptores renales se clasificó como alto riesgo de INF con una concentración de TGFβ ≥ 808.51 ng/ml, de los cuáles el 80% tuvo INF, y el 20% no, a pesar de ser de alto riesgo (sensibilidad=70.18%, 95%IC=56.60-81.57; especificidad=71.43%, 95%IC=53.70-85.36; $P < 0.001$).

Tabla 4.33. Valores de corte (cut-off) durante el periodo post-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores hepáticos y renales como alto riesgo de RA, INF y VHC.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Receptores hepáticos</i>				
<i>Rechazo agudo</i>				
IL-17 (pg/ml)	195.04	0.865 (0.787-0.943)	69.44 (51.89-83.65)	92.59 (82.11-97.94)
<i>Infección oportunista</i>				
TGFβ (pg/ml)	363.25	0.800 (0.716-0.883)	89.29 (78.12-95.97)	71.88 (59.24-82.40)
<i>Recidiva de virus de hepatitis C</i>				
IL-17 (pg/ml)	186.10	0.820 (0.736-0.903)	74.36 (57.87-86.96)	70.31 (57.58-81.09)

<i>Receptores renales</i>				
<i>Infección oportunista</i>				
TGF- β (pg/ml)	808.51	0.805 (0.716-0.894)	70.18 (56.60-81.57)	71.43 (53.70-85.36)

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de RA, INF y VHC en post-trasplante basado en el logit RA, logit INF y logit VHC**

Los niveles solubles (ng/ml) de IL-17 y TGF β pudieron discriminar de forma precisa a receptores como alto riesgo de RA, INF y VHC en post-trasplante. En este apartado, y basado en los logit RA, logit INF y logit VHC, se construyó un modelo de regresión logística univariante que permitió determinar el riesgo de RA ($e^{\text{logit RA}} / 1 + e^{\text{logit RA}}$), INF ($e^{\text{logit INF}} / 1 + e^{\text{logit INF}}$) o VHC ($e^{\text{logit VHC}} / 1 + e^{\text{logit VHC}}$) en receptores en post-trasplante. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA, INF y VHC, y como variable predictiva, niveles solubles *in vitro* de IL-17 y TGF β . Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular los logit de RA, INF y VHC para los niveles solubles de IL-17 y TGF β se muestran en la tabla 4.34.

- Predicción de rechazo agudo y recidiva de virus de hepatitis C en receptores hepáticos basado en los niveles solubles post-trasplante de IL-17

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles solubles de IL-17 de receptores hepáticos, predijo que del grupo RA, el 69.4% tendrían RA en el post-trasplante inmediato, mientras que en el 30.6% se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Igualmente, el modelo predijo que del grupo NRA, 92.6% no tendría RA, y 7.4% se pronosticó RA, a pesar de no tenerlo (sensibilidad=69.44%, 95%IC=51.89-83.65; especificidad=92.59%, 95%IC=82.11-97.94; OR=1.318, 95%IC=1.252-1.384; $P < 0.001$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles solubles post-trasplante de IL-17 de receptores hepáticos predijo que del grupo de VHC, el 74.4% desarrollarían VHC en el post-trasplante de larga duración, mientras que en el 25.6% se predijo NVHC, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NVHC, el 89.1% no tendría VHC, y en el 10.9% se pronosticó VHC, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=74.36%, 95%IC=57.87-86.96; especificidad=89.06%, 95%IC=78.75-95.49; OR=1.847, 95%IC=1.754-1.939; $P < 0.001$).

➤ Predicción de infección oportunista en receptores hepáticos y renales basado en los niveles solubles post-trasplante de TGFβ

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles solubles de TGFβ de receptores hepáticos, predijo que del grupo de INF, 89.3% tendrían INF en el post-trasplante de mantenimiento, y en 10.7% se predijo NoINF, a pesar de sufrirla. Igualmente, el modelo predijo que del grupo NoINF, 71.9% no tendría INF, y en el 28.1% se pronosticó INF, a pesar de no sufrirla (sensibilidad=89.29%, 95%IC=78.12-95.97; especificidad=71.88%, 95%IC=59.24-82.40; OR=1.203, 95%IC=1.142-1.263; $P<0.001$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles solubles de TGFβ de receptores renales, predijo que del grupo de INF, el 75.4% tendrían INF en el post-trasplante de mantenimiento, y en el 24.6% se predijo NoINF, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo de NoINF, el 65.7% no tendría INF, y en el 34.3% se pronosticó INF, a pesar de no tenerla (sensibilidad=75.44%, 95%IC=62.24-85.87; especificidad=65.71%, 95%IC=47.79-80.87; OR=1.976, 95%IC=1.877-2.074; $P<0.001$).

Tabla 4.34. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de rechazo agudo, infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C durante el periodo post-trasplante de receptores en función de los niveles solubles de IL-17 y TGFβ.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
<i>Receptores hepáticos</i>						
Rechazo agudo						
IL-17 (pg/ml)	0.017	19.374	1.318 (1.252-1.384)	69.44 (51.89-83.65)	92.59 (82.11-97.94)	<0.001
Constante	-3.402			-	-	-
Logit RA = -3.402 + (IL-17 (pg/ml) x 0.017)						
Infección oportunista						
TGFβ (pg/ml)	3.059	18.556	1.203 (1.142-1.263)	89.29 (78.12-95.97)	71.88 (59.24-82.40)	<0.001
Constante	-2.037					
Logit INF = -2.037 + (TGFβ (pg/ml) x 3.059)						
Recidiva de virus de hepatitis C						
IL-17 (pg/ml)	1.927	17.737	1.847 (1.754-1.939)	74.36 (57.87-86.96)	89.06 (78.75-95.49)	<0.001
Constante	-1.504					
Logit VHC = -1.504 + (IL-17 (pg/ml) x 1.927)						
<i>Receptores renales</i>						
Infección oportunista						
TGFβ (pg/ml)	2.319	17.467	1.976 (1.877-2.074)	75.44 (62.24-85.87)	65.71 (47.79-80.87)	<0.001
Constante	-1.517					-
Logit INF = -1.517 + (TGFβ (pg/ml) x 2.319)						

Las fórmulas para los logit de RA, Logit INF y Logit VHC derivan de los coeficientes del modelo que también se muestra. Los diferentes logit de RA, INF y VHC pueden ser utilizados para predecir la probabilidad de RA, INF y VHC con las fórmulas $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$, $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$ y $e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$, respectivamente.

4.2.5. Niveles de linfocitos aTreg ($CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$) y nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) de receptores y su relación con RA, INF y recidiva de VHC en el periodo post-trasplante

En este apartado se estudiaron los niveles plasmáticos de linfocitos aTreg y nTreg en receptores y su relación con RA, INF y VHC durante el periodo post-trasplante.

En la figura 4.47 se han representado el porcentaje tanto de linfocitos aTreg como nTreg de receptores hepáticos y renales. Respectivamente, con respecto a linfocitos T totales y linfocitos T $CD4^+$ totales. De este modo, receptores hepáticos con RA presentaron niveles plasmáticos (%) de linfocitos aTreg significativamente superiores con respecto a linfocitos T totales y T $CD4^+$ totales a los 7 (Fig.4.47A; 1.5 ± 0.16 vs 0.89 ± 0.13 , $P=0.005$ y Fig.4.47B; 3.01 ± 0.4 vs 1.64 ± 0.36 , $P=0.013$; respectivamente), 15 (Fig.4.47A; 1.86 ± 0.29 vs 0.91 ± 0.14 , $P=0.007$ y Fig.4.47B; 3.25 ± 0.32 vs 1.84 ± 0.31 , $P=0.004$; respectivamente) y 30 días (Fig.4.47A; 1.85 ± 0.25 vs 0.67 ± 0.08 , $P<0.001$ y Fig.4.47B; 3.98 ± 0.22 vs 2.11 ± 0.46 , $P=0.004$) post-trasplante en comparación con receptores hepáticos NRA.

Del mismo modo, receptores renales con RA presentaron niveles plasmáticos (%) de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T $CD4^+$ totales significativamente superiores a los 7 días (Fig.4.47D; 3.75 ± 1.39 vs 0.19 ± 0.09 , $P=0.033$); y con respecto a linfocitos T totales y T $CD4^+$ a los 15 (Fig.4.47C; 1.93 ± 0.44 vs 0.54 ± 0.16 , $P=0.001$ y Fig.4.47D; 1.66 ± 1.32 vs 0.59 ± 0.39 , $P=0.048$; respectivamente) y 30 días (Fig.4.47C; 0.99 ± 0.08 vs 0.33 ± 0.11 , $P=0.007$ y Fig.4.47D; 1.96 ± 0.54 vs 0.58 ± 0.23 , $P=0.002$) post-trasplante comparados con el grupo NRA.

Con este análisis se puede observar que ambas subpoblaciones de linfocitos T reguladores presentaron una regulación positiva en receptores con RA en el primer mes post-trasplante. Este incremento de linfocitos Treg podría ser utilizado como indicador de riesgo de RA en el post-trasplante inmediato y, por tanto, su validación como biomarcador farmacodinámico predictivo de la alorespuesta inmunitaria.

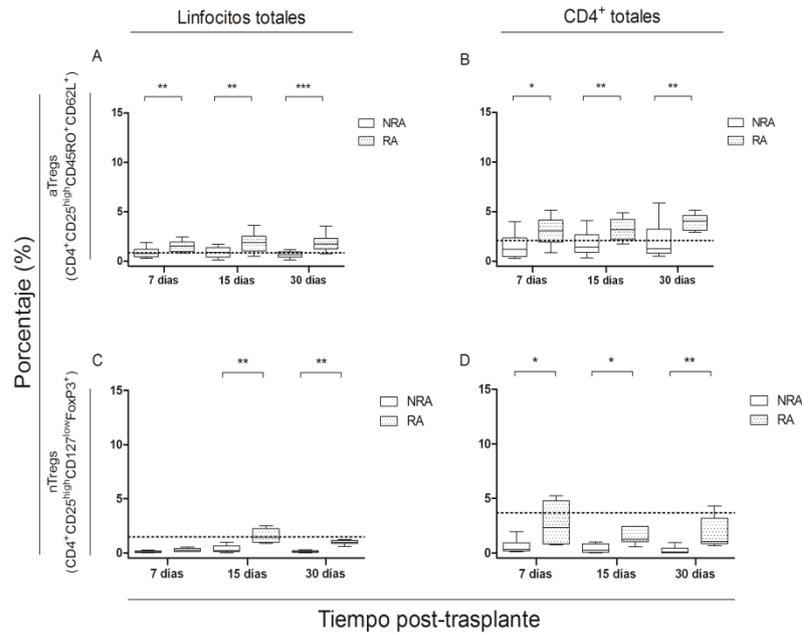


Figura 4.47. Monitorización del porcentaje post-trasplante de linfocitos aTreg y nTreg periféricos. (A) % de linfocitos aTreg de receptores hepáticos con rechazo agudo (RA) y sin rechazo agudo (NRA) respecto a linfocitos T totales en el primer mes post-trasplante, (B) % de linfocitos aTreg de receptores hepáticos con RA y NRA respecto a linfocitos T CD4⁺ totales en el primer mes post-trasplante, (C) % de linfocitos nTreg de receptores renales con RA y NRA respecto a linfocitos T totales en el primer mes post-trasplante y (D) % de linfocitos nTreg de receptores renales con RA y NRA respecto a linfocitos T CD4⁺ totales en el primer mes post-trasplante. * $P=0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Del mismo modo, ambas subpoblaciones de linfocitos Treg fueron estudiadas en receptores como biomarcadores para la predicción del desarrollo de INF y VHC en el periodo post-trasplante de mantenimiento y de larga duración, respectivamente.

En la figura 4.48 se representan los niveles plasmáticos (%) de linfocitos aTreg y nTreg respecto a linfocitos T y T CD4⁺ totales de receptores INF y NoINF, así como con VHC en el post-trasplante de mantenimiento y de larga duración, respectivamente.

Receptores renales con INF presentaron niveles plasmáticos (%) de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T totales significativamente superiores comparados con los del grupo NoINF a los 30 (Fig.4.48A; 1.69 ± 0.21 vs 0.59 ± 0.18 , $P=0.001$), 60 (Fig.4.48A; 2.25 ± 0.23 vs 1.19 ± 0.18 , $P=0.003$) y 90 días (Fig.4.48A; 2.95 ± 0.26 vs 1.41 ± 0.26 , $P=0.001$) post-trasplante. Del mismo modo, receptores hepáticos INF tenían niveles plasmáticos (%) post-trasplante de linfocitos nTreg respecto a células T CD4⁺ totales estadísticamente mayores a los del grupo NoINF a 30 (Fig.4.48B; 5.98 ± 1.28 vs 2.92 ± 0.63 , $P=0.02$) y 60 días (Fig.4.48B; 4.70 ± 0.84 vs 2.03 ± 0.48 , $P=0.007$).

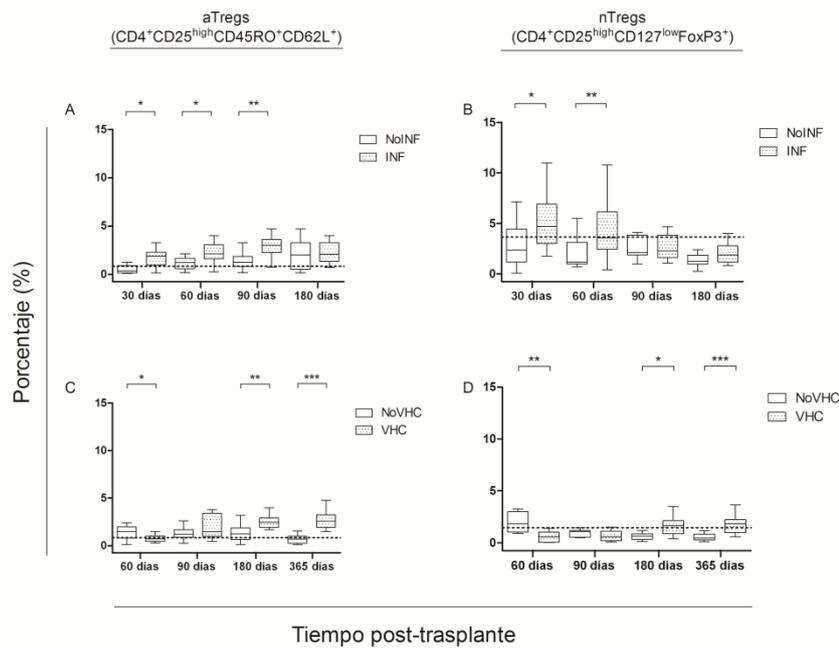


Figura 4.48. Monitorización del porcentaje post-trasplante de linfocitos T aTreg y nTreg periféricos. (A) % de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T totales de receptores renales INF y NoINF en post-trasplante de mantenimiento, (B) % de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ totales de receptores hepáticos INF y NoINF durante post-trasplante de mantenimiento, (C) % de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T totales de receptores hepáticos VHC y NVHC en post-trasplante de larga duración y (D) % de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T totales de receptores hepáticos VHC y NVHC en post-trasplante de larga duración. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Del mismo modo, receptores hepáticos NVHC, inicialmente, durante el post-trasplante de mantenimiento, presentaron niveles significativamente inferiores de linfocitos, tanto aTreg como nTreg, respecto a linfocitos T totales en comparación con el grupo NVHC; sin embargo, durante el periodo post-trasplante de larga duración ambas subpoblaciones celulares presentaron una regulación positiva en el grupo de receptores hepáticos VHC comparados con NVHC. En concreto, los niveles de aTregs respecto a linfocitos T totales del grupo VHC son significativamente superiores a los de receptores hepáticos NVHC a los 180 (Fig.4.48C; 2.56 ± 0.20 vs 1.35 ± 0.21 , $P = 0.001$) y 365 días (Fig.4.48C; 2.72 ± 0.29 vs 0.87 ± 0.19 , $P < 0.001$) post-trasplante. Igualmente, la subpoblación de linfocitos nTreg respecto a T totales del grupo VHC son estadísticamente mayores a los 180 (Fig.4.48D; 1.65 ± 0.26 vs 0.62 ± 0.12 , $P < 0.001$) y 365 días (Fig.4.48D; 1.74 ± 0.27 vs 0.57 ± 0.09 , $P < 0.001$) post-trasplante comparados con NVHC.

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de linfocitos aTreg y nTreg en receptores hepáticos y renales durante el periodo post-trasplante**

Tras el análisis de los niveles post-trasplante de linfocitos aTreg y nTreg de receptores, se realizó el estudio por el cual se estratificó el nivel de riesgo para el RA, VHC e INF en función de los niveles de las subpoblaciones de linfocitos aTreg y nTreg mediante el AUC del análisis de curvas ROC. De este modo, linfocitos aTreg y nTreg en receptores fueron capaces de discriminar de forma precisa a pacientes con alto riesgo de RA, INF y VHC. Los valores de corte, así como sensibilidad y especificidad obtenidos del análisis ROC para los biomarcadores propuestos se encuentran en la tabla 4.35.

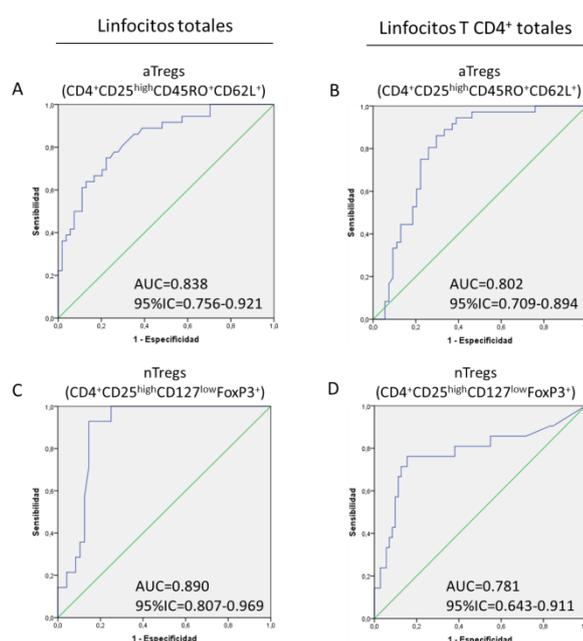


Figura 4.49: Curvas ROC post-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores con rechazo agudo. Valores de AUC para (A) % de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T totales en receptores hepáticos con RA en el periodo post-trasplante inmediato, (B) % de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ en receptores hepáticos con RA en el periodo post-trasplante inmediato, (C) % de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T totales en receptores renales con RA en el periodo post-trasplante inmediato y (D) % de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ en receptores renales con RA durante el periodo post-trasplante inmediato.

En las figuras 4.49 y 4.50 se representan las AUC para los niveles plasmáticos post-trasplante de linfocitos aTreg y nTreg de receptores con RA, INF y VHC.

- Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % linfocitos aTreg de receptores hepáticos durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles plasmáticos de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T totales >1.14% (Fig.4.49A; AUC=0.838, 95%IC=0.756-0.921, $P<0.001$) y niveles plasmáticos de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ >2.07% (Fig.4.49B;

AUC=0.802, 95%IC=0.709-0.894, $P<0.001$) en el post-trasplante inmediato fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles plasmáticos de linfocitos aTreg, como alto riesgo de RA con niveles de aTregs \geq 1.14% con respecto a linfocitos T totales y \geq 2.07% con respecto a linfocitos T CD4⁺; o como bajo riesgo de RA con niveles de aTregs<1.14% respecto a linfocitos T totales y <2.07% respecto a linfocitos T CD4⁺.

El 56.7% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con unos niveles plasmáticos de linfocitos aTreg<1.14% respecto a linfocitos T totales, de los cuáles el 82.4% no tuvo RA; y el 17.6% tuvo RA, a pesar de ser clasificados dentro del grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 43.3% de receptores hepáticos fueron clasificados como alto riesgo de RA con niveles plasmáticos de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T totales \geq 1.14%, de los cuáles el 69.2% tuvo RA, y el 30.8% no tuvo RA, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=75%, 95%IC=57.80-87.88; especificidad=77.78%, 95%IC=64.40-87.96; $P<0.001$).

Del mismo modo, el 47.8% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con niveles plasmáticos de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T CD4⁺<2.07%, de los cuáles el 88.4% no tuvo RA, y el 11.6% tuvo RA, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 52.2% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de RA con unos niveles plasmáticos de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ \geq 2.07%, de los cuáles el 66% tuvo RA, y el 34% no tuvo RA, a pesar de ser clasificados en el grupo de alto riesgo (sensibilidad=86.11%, 95%IC=70.50-95.33; especificidad=70.37%, 95%IC=56.39-82.02; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del % linfocitos nTreg de receptores renales durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles plasmáticos de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T totales>0.83% (Fig.4.49C; AUC=0.890, 95%IC=0.807-0.969, $P<0.001$) y niveles plasmáticos de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T CD4⁺>1.39% (Fig.4.49D; AUC=0.781, 95%IC=0.643-0.911, $P<0.001$) en el post-trasplante inmediato fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles plasmáticos de linfocitos nTreg, como alto riesgo de RA con niveles de nTreg \geq 0.83% respecto a linfocitos T

totales y $\geq 1.39\%$ respecto a linfocitos T CD4⁺; o como bajo riesgo de RA con niveles de nTregs $< 0.83\%$ respecto a linfocitos T totales y $< 1.39\%$ respecto a linfocitos T CD4⁺.

El 67.7% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de RA con niveles plasmáticos de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T totales $< 0.83\%$, de los cuáles el 97.6% no tuvo RA, y el 2.4% tuvo RA, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 32.3% de receptores renales se clasificó como alto riesgo de RA con unos niveles plasmáticos de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T totales $\geq 0.83\%$, de los cuáles el 65% tuvo RA, y el 35% no tuvo RA, a pesar de ser clasificados en el grupo de alto riesgo (sensibilidad=92.86%, 95%IC=66.13-99.82; especificidad=85.42%, 95%IC=72.24-93.93; $P < 0.001$).

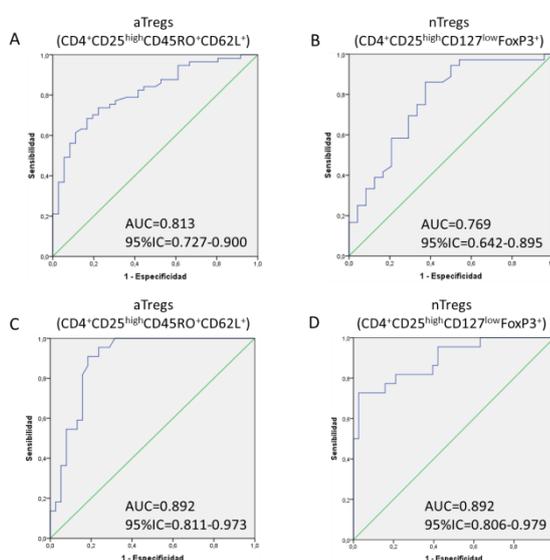


Figura 4.50: Curvas ROC post-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores con infección oportunista y recidiva de virus de hepatitis C. Valores de AUC para (A) % de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T totales en receptores renales con INF en el post-trasplante de mantenimiento, (B) % de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ en receptores hepáticos con INF en el post-trasplante de mantenimiento, (C) % de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T totales en receptores hepáticos con recidiva de VHC en el post-trasplante de larga duración y (D) % de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T totales en receptores hepáticos con recidiva de VHC en el periodo post-trasplante de larga duración.

El 76.3% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de RA con niveles plasmáticos de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ $< 1.39\%$, de los cuáles el 88.7% no tuvo RA, y el 11.3% tuvo RA, a pesar de ser clasificados en el grupo de bajo riesgo. Del mismo modo, el 23.7% se clasificó como alto riesgo de RA con niveles de linfocitos nTreg respecto a células T CD4⁺ $\geq 1.39\%$, de los cuáles el 59.1% tuvo RA, y el 40.9% no tuvo RA, a pesar de ser clasificados como alto riesgo (sensibilidad=61.90%, 95%IC=38.44-81.89; especificidad=87.50%, 95%IC=77.59-94.12; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % linfocitos aTreg de receptores renales durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles plasmáticos de linfocitos aTreg >1.65% respecto a linfocitos T totales (Fig.4.50A; AUC=0.813, 95%IC=0.727-0.900, $P<0.001$) en el post-trasplante de mantenimiento son capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles plasmáticos de células aTreg, como alto riesgo de INF con niveles de aTregs $\geq 1.65\%$; o como bajo riesgo de INF con niveles de aTregs $< 1.65\%$ con respecto a linfocitos T totales en receptores renales.

El 49.5% de receptores renales se clasificaron como bajo riesgo de INF con niveles plasmáticos de linfocitos aTreg $< 1.65\%$ respecto a T totales, de los cuáles el 63% no tuvo INF, y el 37% si tuvo INF, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 50.5% de receptores renales se clasificó como alto riesgo de INF, con niveles plasmáticos de linfocitos aTreg $\geq 1.65\%$ respecto a T totales, de los cuáles el 85.1% tuvo INF, y el 14.8% no tuvo INF, siendo clasificados de alto riesgo (sensibilidad=70.18%, 95%IC=56.60-81.57; especificidad=80.56%, 95%IC=63.98-91.81; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del % linfocitos nTreg de receptores hepáticos durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles plasmáticos de linfocitos nTreg⁺ >1.31% respecto a T CD4 (Fig.4.50B; AUC=0.769, 95%IC=0.642-0.895, $P<0.001$) en el post-trasplante de mantenimiento fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles plasmáticos de linfocitos nTreg, como alto riesgo de INF, con niveles de nTregs $\geq 1.31\%$; o como bajo riesgo de INF con niveles nTregs $< 1.31\%$ respecto a T CD4⁺.

El 50% de receptores hepáticos se clasificaron como bajo riesgo de INF con niveles plasmáticos de linfocitos nTreg $< 1.31\%$ respecto a T CD4⁺, de los cuáles el 63.3% no tuvo INF, y el 36.7% tuvo INF, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 50% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de INF con niveles plasmáticos de linfocitos nTreg $\geq 1.31\%$ respecto a T CD4⁺, de los cuáles el 83.3% tuvo INF, y el 16.7% no tuvo INF, siendo clasificados de alto riesgo (sensibilidad=69.44%, 95%IC=51.89-83.65; especificidad=79.17%, 95%IC=57.85-92.87; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de recidiva de virus de hepatitis C en función del % linfocitos aTreg y nTreg de receptores hepáticos en el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles plasmáticos de linfocitos aTreg >1.7% respecto a T totales (Fig.4.50C; AUC=0.892, 95%IC=0.811-0.973, $P<0.001$) y niveles plasmáticos de linfocitos nTreg >1.23% respecto a T totales (Fig.4.50D; AUC=0.892, 95%IC=0.806-0.979, $P<0.001$) en el post-trasplante de larga duración son capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de VHC. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles plasmáticos de linfocitos aTreg respecto a T totales, como alto riesgo de VHC con niveles de aTreg $\geq 1.7\%$ o con niveles plasmáticos de linfocitos nTreg $\geq 1.23\%$ respecto a linfocitos T totales; o como bajo riesgo de VHC con niveles de aTreg $< 1.7\%$ o con niveles de nTreg $< 1.23\%$ respecto a linfocitos T totales en receptores hepáticos.

El 50% de receptores hepáticos se clasificaron como bajo riesgo de VHC con niveles plasmáticos de linfocitos aTreg $< 1.7\%$ respecto a T totales, de los cuáles el 96.7% no tuvo VHC, y el 3.3% si desarrolló VHC, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 50% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de VHC con niveles plasmáticos de linfocitos aTreg $\geq 1.7\%$ respecto a T totales, de los cuáles el 70% tuvo VHC, y el 30% no, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=95.45%, 95%IC=77.16-99.88; especificidad=76.32%, 95%IC=59.76-88.56; $P<0.001$).

Por otro lado, el 71.7% de los receptores hepáticos se clasificaron como bajo riesgo de VHC con niveles plasmáticos de linfocitos nTreg $< 1.23\%$ respecto a T totales, de los cuales el 86% no tuvo VHC, y el 14% si, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 28.3% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de VHC, con niveles plasmáticos de linfocitos nTreg $\geq 1.23\%$ respecto a T totales, de los cuáles el 94.1% tuvo VHC, y el 5.9% no, a pesar de clasificarse alto riesgo (sensibilidad=72.73%, 95%IC=49.78-89.27; especificidad=97.37%, 95%IC=86.19-99.93; $P<0.001$).

Tabla 4.35. Valores de corte (cut-off) durante el periodo post-trasplante. AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores como alto riesgo de RA, INF y VHC.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Receptores hepáticos</i>				
<i>Rechazo agudo</i>				
Linfocitos aTreg (%)	1.14	0.838 (0.756-0.921)	75% (57.80-87.88)	77.78 (64.40-87.96)
CD4 ⁺ aTregs (%)	2.07	0.802 (0.709-0.894)	86.11 (70.50-95.33)	70.37 (56.39-82.02)
<i>Infección oportunista</i>				

CD4 ⁺ nTregs (%)	1.31	0.769 (0.642-0.895)	69.44 (51.89-83.65)	79.17 (57.85-92.87)
<i>Recidiva de virus de hepatitis C</i>				
Linfocitos aTreg	1.7	0.892 (0.811-0.973)	95.45 (77.16-99.88)	76.32 (59.76-88.56)
Linfocitos nTreg	1.23	0.892 (0.806-0.979)	72.73 (49.78-89.27)	97.37 (86.19-99.93)
<i>Receptores renales</i>				
<i>Rechazo agudo</i>				
Linfocitos nTreg	0.83	0.890 (0.807-0.969)	92.86 (66.13-99.82)	85.42 (72.24-93.93)
CD4 ⁺ nTregs	1.39	0.781 (0.643-0.911)	61.90 (38.44-81.89)	87.50 (77.59-94.12)
<i>Infección oportunista</i>				
Linfocitos aTreg	1.65	0.813 (0.727-0.900)	70.18 (56.60-81.57)	80.56 (63.98-91.81)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de RA, INF y VHC en el periodo post-trasplante en receptores basado en el logit RA, logit INF y logit VHC en función de los niveles de linfocitos aTreg y nTreg**

En el apartado anterior se pudo comprobar como los niveles plasmáticos de las subpoblaciones de linfocitos aTreg y nTreg diferían significativamente en el post-trasplante entre receptores con RA, INF y VHC. Además, se estudió la capacidad de las subpoblaciones de linfocitos aTreg y nTreg como potenciales biomarcadores capaces de discriminar a los receptores en alto y bajo riesgo para el desarrollo de evento clínico a lo largo del primer año post-trasplante.

En este apartado, y basado en los logit RA, logit INF y logit VHC, se construyó un modelo de regresión logística univariante que permitió determinar la probabilidad exacta de desarrollar RA ($e^{\text{logit RA}} / 1 + e^{\text{logit RA}}$), INF ($e^{\text{logit INF}} / 1 + e^{\text{logit INF}}$) o VHC ($e^{\text{logit VHC}} / 1 + e^{\text{logit VHC}}$) en el post-trasplante en función de los niveles plasmáticos de las subpoblaciones de linfocitos aTreg y nTreg. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA, INF y VHC, y como variable predictiva, niveles plasmáticos (%) de aTregs y nTregs. Los coeficientes del modelo de regresión utilizados para calcular los logit de RA, INF y VHC para los niveles plasmáticos (%) de linfocitos aTreg y nTreg se muestran en la tabla 4.36.

- Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos en función del % post-trasplante de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T totales y linfocitos T CD4⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles plasmáticos (%) post-trasplante de linfocitos aTreg respecto a T totales de receptores hepáticos, predijo que del grupo RA, el 75% tendrían RA en el post-trasplante inmediato,

y 25% no, a pesar de tenerlo. Igualmente, el modelo predijo que del grupo NRA, el 83.3% no tendría RA, y 16.7% si, a pesar de ser NRA (sensibilidad=75%, 95%IC=57.80-87.88; especificidad=83.33%, 95%IC=70.71-92.08; OR=1.17, 95%IC=0.433-3.141; $P<0.001$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles plasmáticos (%) post-trasplante de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ de receptores hepáticos, predijo que del grupo RA, el 86.1% tendrían RA en el post-trasplante inmediato, y el 13.9% se predijo NRA, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 70.4% no tendría RA, y el 29.6% se pronosticó RA, a pesar de no tenerlo (sensibilidad=86.11%, 95%IC=70.50-95.33; especificidad=70.37%, 95%IC=56.39-82.02; OR=1.978, 95%IC=1.423-2.749; $P<0.001$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores renales en función del % post-trasplante de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T totales y linfocitos T CD4⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles plasmáticos (%) post-trasplante de linfocitos nTreg respecto a T totales de receptores renales, predijo que del grupo RA, el 92.9% tendrían RA en el post-trasplante inmediato, y el 7.1% no, a pesar de haberlo tenido. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, 85.4% no tendría RA, y 14.6% si, a pesar de no tenerlo (sensibilidad=92.86%, 95%IC=66.13-99.82; especificidad=85.42%, 95%IC=72.24-93.93; OR=4.221, 95%IC=1.696-10.506; $P=0.002$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles plasmáticos (%) de linfocitos nTreg respecto a T CD4⁺ de receptores renales, predijo que del grupo RA, el 76.2% tendrían RA en el post-trasplante inmediato, y 23.8% no, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, 84.5% no tendría RA, y 15.5% si, habiéndolo desarrollado (sensibilidad=76.19%, 95%IC=52.83-91.78; especificidad=84.51%, 95%IC=73.97-92.14; OR=1.589, 95%IC=1.185-2.131; $P=0.001$).

➤ Predicción de INF en receptores hepáticos y renales en función del % post-trasplante de linfocitos aTreg y nTreg respecto a linfocitos T totales y T CD4⁺

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles plasmáticos (%) post-trasplante de linfocitos aTreg respecto a T totales de receptores renales, predijo que del grupo INF, 70.2% tendrían INF en el post-trasplante de

mantenimiento, y el 29.8% no, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, 80.6% no tendría INF, y el 19.4% si, a pesar de no tenerla (sensibilidad=70.18%, 95%IC=56.60-81.57; especificidad=80.56%, 95%IC=63.98-91.81; OR=3.699, 95%IC=2.058-6.650; P=0.018).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles plasmáticos (%) post-trasplante de linfocitos nTreg respecto a T CD4⁺ de receptores hepáticos, predijo que del grupo INF, 86.1% tendrían INF en el post-trasplante de mantenimiento, y 13.9% no, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NpINF, 62.5% no tendrían INF, y el 37.5% si, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=86.11%, 95%IC=70.50-95.33; especificidad=62.50%, 95%IC=40.59-81.20; OR=1.550, 95%IC=1.145-2.098; P=0.005).

➤ Predicción de recidiva de virus de hepatitis C en receptores hepáticos en función del % post-trasplante de linfocitos aTreg y nTreg respecto a T totales

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles plasmáticos (%) post-trasplante de linfocitos aTreg respecto a T totales de receptores hepáticos, predijo que del grupo VHC, 68.2% tendrían VHC en el post-trasplante de larga duración, y 31.8% no, a pesar de desarrollarla. Igualmente, el modelo predijo que del grupo NVHC, 84.2% no tendrían VHC, y 15.8% si, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=68.18%, 95%IC=45.13-86.14; especificidad=84.21%, 95%IC=68.75-93.398; OR=1.295, 95%IC=1.231-1.359; P<0.001).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles plasmáticos (%) post-trasplante de linfocitos nTreg respecto a T totales de receptores hepáticos, predijo que del grupo VHC, 72.7% tendrían recidiva en el post-trasplante de larga duración, y 27.3% no, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NVHC, 94.7% no tendrían VHC, y 5.3% si, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=72.73%, 95%IC=49.78-89.27; especificidad=94.74%, 95%IC=82.25-99.39; OR=3.972, 95%IC=3.773-4.170; P<0.001).

Tabla 4.36. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de RA, INF y recidiva de VHC durante el periodo post-trasplante de receptores hepáticos y renales en función de los niveles plasmáticos (%) de linfocitos aTreg y nTreg.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
<i>Receptores hepáticos</i>						
Rechazo agudo						
Linfocitos aTreg	2.351	21.658	1.167 (0.433-3.141)	75 (57.80-87.88)	83.33 (70.71-92.08)	<0.001
Constante	-1.540					

		Logit RA = -1.540 + (%Linfocitos aTreg x 2.351)				
Linfocitos T CD4 ⁺ aTreg	2.690	16.468	1.978 (1.423-2.749)	86.11 (70.50-95.33)	70.37 (56.39-82.02)	<0.001
Constante	-2.028					
		Logit RA = -2.028 + (%Linfocitos T CD4 ⁺ aTreg x 2.690)				
		Infección oportunista				
Linfocitos T CD4 ⁺ nTreg	2.335	8.064	1.550 (1.145-2.098)	86.11 (70.50-95.33)	62.50(40.59-81.20)	0.005
Constante	-1.099					
		Logit INF = -1.099 + (%Linfocitos T CD4 ⁺ nTreg x 2.335)				
		Recidiva de virus de hepatitis C				
Linfocitos aTreg	1.840	15.586	1.295 (1.231-1.359)	68.18 (45.13-86.14)	84.21(68.75-93.398)	<0.001
Constante	-3.958					
		Logit VHC = -3.958 + (%Linfocitos aTreg x 1.840)				
Linfocitos nTreg	3.177	16.025	3.972 (3.773-4.170)	72.73 (49.78-89.27)	94.74 (82.25-99.39)	0.001
Constante	-3.757					
		Logit VHC = -3.757 + (%Linfocitos nTreg x 3.177)				
<i>Receptores renales</i>						
		Rechazo agudo				
Linfocitos nTreg	1.440	9.581	4.221 (1.696-10.506)	92.86 (66.13-99.82)	85.42 (72.24-93.93)	0.002
Constante	-2.403					
		Logit RA = -2.403 + (%Linfocitos nTreg x 1.440)				
Linfocitos CD4 ⁺ nTreg	2.860	22.096	1.589 (1.185-2.131)	76.19 (52.83-91.78)	84.51 (73.97-92.14)	0.001
Constante	-2.485					
		Logit RA = -2.485 + (%Linfocitos CD4 ⁺ nTreg x 2.860)				
		Infección oportunista				
Linfocitos aTreg	1.308	19.853	3.699 (2.058-6.650)	70.18 (56.60-81.57)	80.56 (63.98-91.81)	0.018
Constante	-1.651					
		Logit INF = -1.651 + (%Linfocitos aTreg x 1.308)				

Fórmulas de logit de RA, Logit INF y Logit VHC derivan de los coeficientes del modelo que se muestra. Los logit de RA, INF y VHC pueden ser usados en predecir probabilidad RA, INF y VHC con fórmulas $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$, $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$ y $e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$, respectivamente

4.2.6. Niveles de expresión (%) *in vitro* de CD38, CD69, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ en post-trasplante y su relación con RA, INF y recidiva de VHC

En este apartado se han estudiado los niveles de expresión (%) post-trasplante de las proteínas de superficie CD38, CD69, CD95 y CD154 sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tras estimulación *in vitro* de receptores y su relación con RA durante el post-trasplante inmediato; INF en el post-trasplante de mantenimiento y VHC en el de larga duración.

En la figura 4.51 se representan los niveles de expresión de CD25, CD38, CD69 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de receptores hepáticos RA y NRA, INF y VHC.

Los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ de receptores hepáticos RA son significativamente mayores comparados a NRA a 7 y 15 días post-trasplante (Fig.4.51A; 2.39±0.57 vs 0.87±0.09, $P<0.001$ y 2.21±0.43 vs 0.99±0.11, $P=0.01$; respectivamente). Igualmente, los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ de

receptores RA son estadísticamente mayores a NRA a los 7 y 15 días (Fig.4.51B; 1.22 ± 0.24 vs 0.67 ± 0.38 , $P=0.0002$ y 1.17 ± 0.12 vs 0.76 ± 0.34 , $P=0.004$; respectivamente).

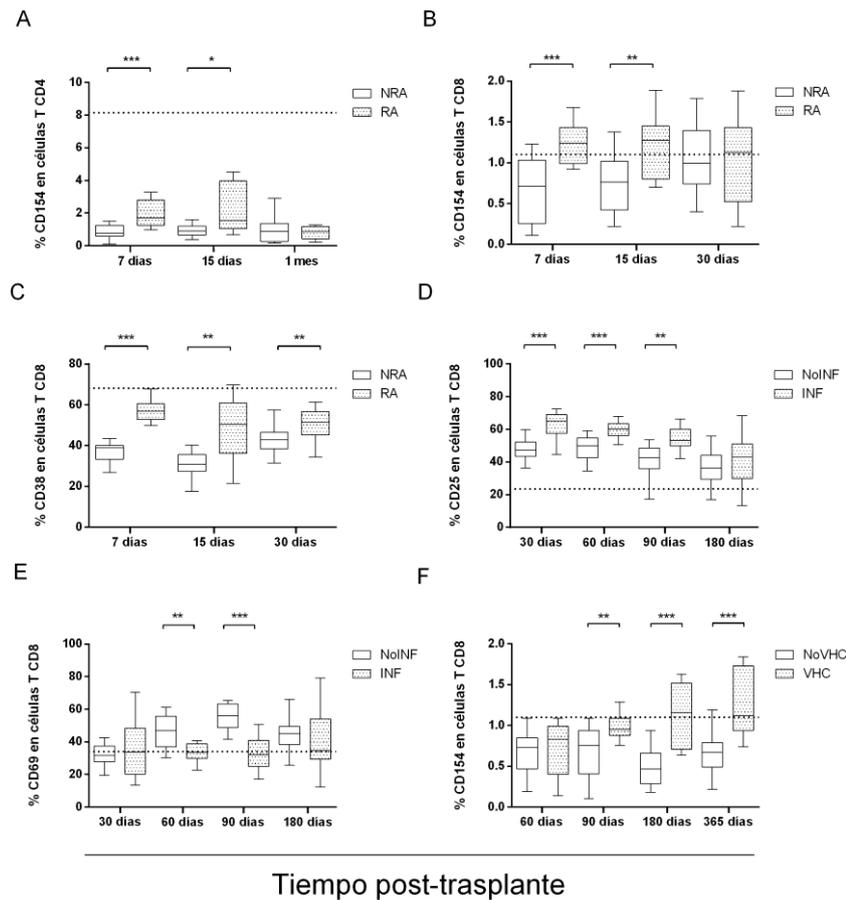


Figura 4.51: Monitorización post-trasplante de los niveles de expresión (%) de Ags de superficie de receptores hepáticos. (A) % de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ de receptores hepáticos RA y NRA en el primer mes post-trasplante, (B) % de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ de receptores hepáticos RA y NRA en el primer mes post-trasplante, (C) % de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ de receptores hepáticos RA y NRA en el primer mes post-trasplante, (D) % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ de receptores hepáticos INF y NoINF en el post-trasplante de mantenimiento, (E) % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos INF y NoINF en el post-trasplante de mantenimiento y (F) % de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ de receptores hepáticos VHC y NVHC en el post-trasplante de larga duración. Los 'box plots' en esta figura representan los percentiles 25° y 75°, las barras de desviación representan los percentiles 5 y 95 y la línea horizontal representa la mediana del valor para cada grupo. La línea de puntos horizontal representa el valor de Ags de superficie en el grupo control. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ de receptores hepáticos RA son significativamente superiores comparados con los de NRA a los 7, 15 y 30 días post-trasplante (Fig.4.51C; 57.23 ± 1.46 vs 36.71 ± 1.19 , $P<0.001$; 48.51 ± 4.18 vs 30.70 ± 1.61 , $P=0.001$ y 50.39 ± 2.18 vs 42.64 ± 1.42 , $P=0.006$; respectivamente).

Por otro lado, los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ de receptores hepáticos con INF son significativamente mayores a los de NoINF a los 30, 60 y 90 días post-trasplante (Fig.4.51D; 62.43 ± 2.04 vs 47.41 ± 1.99 , $P<0.001$; 58.27 ± 3.04 vs 47.13 ± 3.15 , $P<0.001$ y 54.91 ± 2.71 vs 41.24 ± 2.87 , $P=0.001$; respectivamente). Por el

contrario, los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos INF son significativamente menores a los NoINF a 60 y 90 días (Fig.4.51E; 33.59±1.28 vs 46.11±2.96, $P=0.002$ y 36.74±4.50 vs 57.44±3.49, $P<0.001$; respectivamente).

Finalmente, niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ en receptores hepáticos VHC son significativamente mayores comparados con los de NVHC a 90, 180 y 360 días post-trasplante (Fig.4.51F; 0.98±0.05 vs 0.67±0.07, $P=0.007$, 1.11±0.12 vs 0.49±0.04, $P<0.001$ y 1.29±0.12 vs 0.65±0.06, $P<0.001$; respectivamente).

En la figura 4.52 se encuentran representados los niveles de expresión (%) de las moléculas de superficie CD25, CD38 y CD95 sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de receptores renales en post-trasplante con y sin RA e INF.

La niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ de receptores renales con RA son significativamente superiores comparados a los de NRA a los 7 y 15 días post-trasplante (Fig.4.52A; 69.10±2.40 vs 47.58±2.03, $P<0.001$ y 62.89±2.81 vs 48.67±1.73, $P<0.001$; respectivamente). Del mismo modo, los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ en receptores renales RA son significativamente mayores a los NRA a 7, 15 y 30 días (Fig.4.52B; 53.01±1.67 vs 34.22±2.78, $P<0.001$; 55.89±4.29 vs 36.58±3.41, $P=0.003$ y 59.68±4.06 vs 37.74±2.47, $P=0.001$; respectivamente).

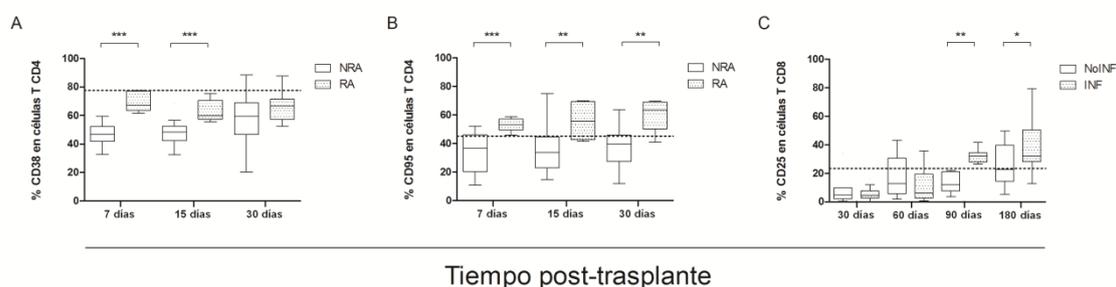


Figura 4.52: Monitorización post-trasplante de los niveles de expresión (%) de Ags de superficie de receptores renales. (A) % de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ de receptores renales RA y NRA en el primer mes, (B) % de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ de receptores renales RA y NRA en el primer mes y (C) % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ de receptores renales INF y NoINF en el post-trasplante de mantenimiento. Los 'box plots' en esta figura representan los percentiles 25° y 75°, las barras de desviación representan los percentiles 5 y 95 y la línea horizontal representa la mediana del valor para cada grupo. La línea de puntos horizontal representa el valor de Ags de superficie en el grupo control. * $P=0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Por último, los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en receptores renales INF son significativamente mayores a los de NoINF a los 90 y 180 días post-trasplante (Fig.4.52C; 31.69±1.64 vs 18.59±4.99, $P=0.003$ y 38.17±3.78 vs 25.14±4.15, $P=0.025$; respectivamente).

En la figura 4.53 se muestran los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ así como también el número de moléculas CD28 por membrana de linfocito

T CD4⁺, en receptores hepáticos NRA y RA en el post-trasplante inmediato, como en receptores hepáticos INF y NoINF en el post-trasplante de mantenimiento.

Como se observa en la figura 4.53A, los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ en receptores hepáticos RA presentaron niveles significativamente inferiores a los de NRA (Fig.4.53A; 24.16±2.91 vs 36.75±2.18, $P=0.01$), sin embargo los niveles de CD28 en ambos grupos de estudio se estabilizaron hasta el 1^{er} primer mes post-trasplante. En cuanto al n° de moléculas CD28/membrana de linfocito T CD4⁺, se observó un incremento significativo en el n° de CD28 en membrana de linfocito T CD4⁺ en el grupo RA frente a NRA a los 15 (Fig.4.53A; 13852±1351 vs 6874±765, $P<0.001$) y 30 días post-trasplante (Fig.4.53; 12229±1281 vs 6426±891, $P=0.001$) independientemente del nivel de expresión (%) de la población CD4⁺CD28⁺ en ambos grupos.

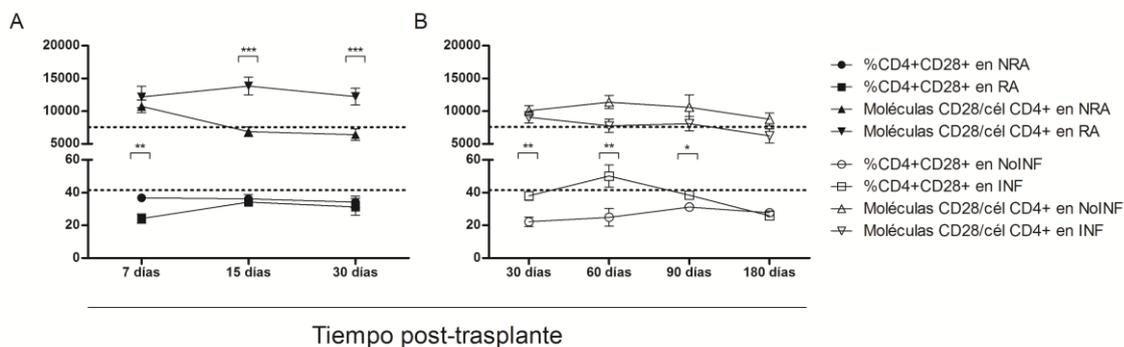


Figura 4.53. Niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ y número de moléculas CD28 por membrana celular de linfocito T CD4⁺ de receptores hepáticos en. (A) receptores RA y NRA en el post-trasplante inmediato y (B) receptores INF y NoINF en el post-trasplante de mantenimiento. Los valores se corresponden con la media del biomarcador estudiado y las barras de error se corresponden con el error estándar de la media. Las líneas de puntos se corresponden con los valores de cada biomarcador en la población control. * $P=0.05$, ** $P=0.01$ y *** $P=0.001$.

Por otro lado, los niveles de expresión (%) pero no el n° de moléculas de CD28 sobre linfocito T CD4⁺ de receptores hepáticos con INF son significativamente mayores a los 30 (Fig.4.53B; 37.97±2.66 vs 22.17±2.83, $P=0.002$), 60 (Fig.4.53B; 50.07±6.83 vs 24.92±5.42, $P=0.001$) y 90 días (Fig.4.53B; 38.45±2.39 vs 31.19±2.25, $P=0.031$) post-trasplante comparados al grupo NRA en el mismo período de tiempo. Posteriormente, desde los 90 hasta 180 días, los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ del grupo INF descendió hasta igualar los niveles del grupo NoINF.

- **Puntos de corte (cut-off) para niveles de expresión de Ags de superficie CD25, CD38, CD69 y CD154 en células T CD4⁺ y CD8⁺ en receptores en postrasplante**

Tras el análisis de los niveles de expresión (%) post-trasplante de los Ags de superficie en receptores hepáticos, se realizó el estudio por el cual se estratificó el nivel

de riesgo de RA, recidiva VHC e INF en función de los niveles de dichos Ags por el AUC del análisis de curvas ROC. Mediante este estudio se obtuvieron los puntos de corte que mejor discriminaron a receptores hepáticos como alto riesgo de desarrollar un determinado evento clínico. De este modo, los niveles de expresión de CD25, CD38, CD69 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en receptores fueron capaces de discriminar de forma precisa a aquéllos pacientes con alto riesgo de RA, INF y VHC. Los valores de corte, así como sensibilidad y especificidad obtenidos del análisis ROC para los biomarcadores propuestos se muestran en la tabla 4.37.

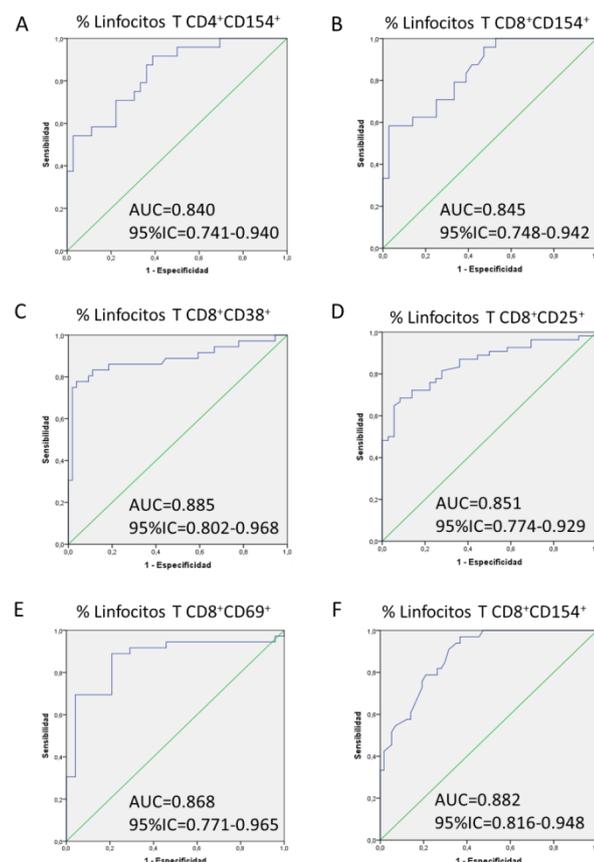


Figura 4.54: Curvas ROC post-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores hepáticos con RA, INF y VHC. Valores de AUC para (A) % de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ de receptores hepáticos con RA en el post-trasplante inmediato, (B) % de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ de receptores hepáticos con RA en el post-trasplante inmediato, (C) % de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ de receptores hepáticos con RA en el post-trasplante inmediato, (D) % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ de receptores hepáticos con INF en el post-trasplante de mantenimiento, (E) % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos con INF en el post-trasplante de mantenimiento y (F) % de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ de receptores hepáticos con recidiva VHC en el post-trasplante de larga duración.

En la figura 4.54 se encuentran representadas las AUC para los niveles de expresión (%) post-trasplante de los mencionados Ags de superficie de receptores hepáticos RA, INF y VHC, por el cual se obtuvieron los puntos de corte capaces de estratificar los pacientes como alto riesgo para tener un determinado evento clínico.

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del nivel de expresión de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ y CD8⁺CD154⁺ en el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD154⁺>0.96% (Fig.4.54A; AUC=0.840, 95%IC=0.741-0.940, $P<0.001$) y de linfocitos T CD8⁺CD154⁺>1.24% (Fig.4.53B; AUC=0.845, 95%IC=0.748-0.942, $P<0.001$) en el post-trasplante inmediato fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles de expresión de CD154 sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, como alto riesgo de RA con niveles de CD154 \geq 0.96% sobre linfocitos T CD4⁺ y \geq 1.24% respecto a T CD8⁺; o como bajo riesgo de RA con niveles de CD154<0.96% sobre linfocitos T CD4⁺ y <1.24% sobre T CD8⁺.

El 40% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD154<0.96% sobre linfocitos T CD4⁺, de los cuáles 91.7% no tuvo RA, y 8.3% restante si, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 60% de receptores se clasificó como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD154<0.96% sobre linfocitos TCD4⁺, de los cuáles 61.1% tuvo RA y 38.9% no, aunque se clasificó de alto riesgo (sensibilidad=91.66%, 95%IC=73-98.97; especificidad=61.11%, 95%IC=43.46-76.86; $P<0.001$).

Por otro lado, el 75% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD154<1.24% sobre linfocitos T CD8⁺, de los cuáles 77.8% no tuvo RA y 22.2% restante si, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 25% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de RA con unos niveles de expresión de CD154 \geq 1.24% sobre linfocitos T CD8⁺, de los cuáles 93.3% tuvo RA y 6.7% no, pesar de clasificarse alto riesgo (sensibilidad=66.7%, 95%IC=44.68-84.37; especificidad=97.22%, 95%IC=85.47-99.93; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del nivel de expresión de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD38⁺>47.64% (Fig.4.53C; AUC=0.885, 95%IC=0.802-0.968, $P<0.001$) en el post-trasplante inmediato son capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles de expresión de CD38 sobre linfocitos T CD8⁺, como alto riesgo de RA con

niveles de $CD38 \geq 47.64\%$ en linfocitos T $CD8^+$; o como bajo riesgo de RA con niveles de $CD38 < 47.64\%$ en linfocitos T $CD8^+$.

El 66.7% de receptores hepáticos se clasificaron como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de $CD38 < 47.64\%$ sobre linfocitos T $CD8^+$, de los cuáles 86.7% no tuvo RA, y 13.3% restante si, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 33.3% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de RA, con niveles de expresión de $CD38 \geq 47.64\%$ sobre linfocitos T $CD8^+$, de los cuáles 93.3% tuvo RA, y 6.7% restante no, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=77.78%, 95%IC=60.85-89.88; especificidad=96.30%, 95%IC=87.25-99.55; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del nivel de expresión de linfocitos T $CD8^+CD25^+$ durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T $CD8^+CD25^+ > 55.36\%$ (Fig.4.53D; AUC=0.851, 95%IC=0.774-0.929, $P < 0.001$) en el post-trasplante de mantenimiento son capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles de expresión de CD25 en linfocitos T $CD8^+$, como alto riesgo de INF con niveles de expresión de $CD25 \geq 55.36\%$; o como bajo riesgo de INF con $CD25 < 55.36\%$.

El 55.6% de receptores hepáticos se clasificaron como bajo riesgo de INF, con niveles de expresión de $CD25 < 55.36\%$ en linfocitos T $CD8^+$, de los cuáles 66% no tuvo INF infección, y 34% restante si, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 44.4% de receptores hepáticos restante se clasificó como alto riesgo de INF, con niveles de expresión de $CD25 \geq 55.36\%$ en linfocitos T $CD8^+$, de los cuáles 92.5% tuvo INF, y 7.5% restante no, a pesar de clasificarse de alto riesgo (sensibilidad=68.52%, 95%IC=54.45-80.48; especificidad=91.67%, 95%IC=77.53-98.25; $P < 0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del nivel de expresión de linfocitos T $CD8^+CD69^+$ durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T $CD8^+CD69^+ < 41.15\%$ (Fig.4.53E; AUC=0.868, 95%IC=0.771-0.965, $P < 0.001$) en el post-trasplante de mantenimiento son capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los

niveles de expresión de CD69 en linfocitos T CD8⁺, como alto riesgo de INF, con niveles de expresión de CD69≤41.15%; o como bajo riesgo de INF con CD69>41.15%.

El 38.3% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de expresión de CD69>41.15% en linfocitos T CD8⁺, de los cuáles 82.6% no tuvo INF, y 17.4% restante si, a pesar de ser clasificados de bajo riesgo. Del mismo modo, el 61.7% de receptores hepáticos restante se clasificó como alto riesgo de INF con niveles de expresión de CD69≤41.15% en linfocitos T CD8⁺, de los cuáles 86.5% tuvo INF, y el 13.5% restante no, aunque se clasificó de alto riesgo (sensibilidad=88.89%, 95%IC=73.94-96.89; especificidad=79.17%, 95%IC=57.85-92.87; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de recidiva de virus de hepatitis C en función del nivel de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺>0.68% (Fig.4.53F; AUC=0.882, 95%IC=0.816-0.948, $P<0.001$) en el post-trasplante de larga duración son capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de desarrollar VHC. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles de expresión de CD154 en células T CD8⁺, como alto riesgo de VHC con niveles de expresión de CD154≥0.68%; o como bajo riesgo con CD154<0.68%.

El 40% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de recidiva VHC con niveles de expresión de CD154< 0.68% en linfocitos T CD8⁺, de los cuáles 97.2% no tuvo VHC, y 2.8% restante si, a pesar de clasificarse de bajo riesgo. Del mismo modo, el 60% de receptores hepáticos restante se clasificó como alto riesgo de VHC, con niveles de expresión de CD154≥ 0.68% en células T CD8⁺, de los cuáles 59.3% tuvo VHC, y 40.7% no, aunque se clasificó de alto riesgo (sensibilidad=96.97%, 95%IC=84.24-99.92; especificidad=61.40%, 95%IC=47.57-74.00; $P<0.001$).

• **Puntos de corte (cut-off) para niveles de expresión post-trasplante de células T CD4⁺CD28⁺ y n° de moléculas CD28 en células T CD4⁺ en receptores hepáticos**

Tras el análisis de los niveles de expresión (%) de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ así como del n° de moléculas CD28/membrana de linfocitos T CD4⁺ en receptores hepáticos RA y NRA e INF, se procedió al análisis de estratificación del riesgo de desarrollar evento clínico en función de los niveles para los biomarcadores propuestos. Mediante el AUC del análisis ROC, se obtuvieron los puntos de corte para los niveles de CD28 que de

forma precisa discriminaron a receptores hepáticos como alto o bajo riesgo de RA e INF en el post-trasplante. Los valores de corte, así como sensibilidad y especificidad obtenidos del análisis ROC para los biomarcadores propuestos se muestran en tabla 4.37. En la figura 4.55 se representan las AUC para los niveles de expresión (%) y n° de moléculas del Ag linfocitario de superficie CD28 de receptores hepáticos con RA e INF en el post-trasplante inmediato y de mantenimiento, respectivamente; por el cual se obtuvieron los puntos de corte capaces de estratificar dichos pacientes como alto riesgo para el desarrollo de un determinado evento clínico.

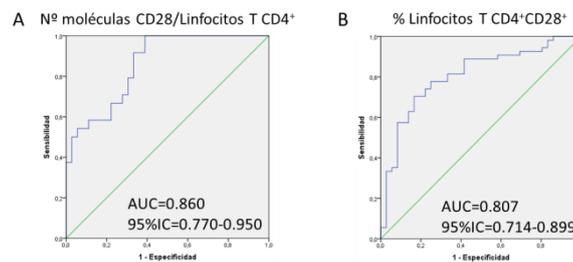


Figura 4.55. Curvas ROC post-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores hepáticos. (A) n° de moléculas CD28/membrana de linfocito T CD4⁺ de receptores hepáticos RA y NRA en post-trasplante inmediato y (B) % de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ de receptores hepáticos INF y NoINF en post-trasplante de mantenimiento.

➤ Estratificación del riesgo post-trasplante de RA e INF en función del nivel de expresión (% y n° de moléculas) de CD28 en linfocitos T CD4⁺

Según el AUC del análisis ROC, valores de la molécula CD28/membrana >7963 sobre linfocito T CD4⁺ (Fig.4.55A; AUC=0.860, 95%IC=0.770-0.950, $P<0.001$) en el post-trasplante inmediato son capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función del n° de moléculas CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺, como alto riesgo de RA con moléculas $CD28 \geq 7963$; o como bajo riesgo de RA con moléculas $CD28 < 7963$.

El 36.7% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de RA con un n° de moléculas $CD28 < 7963$ en linfocitos T CD4⁺, de los cuáles el 100% no tuvo RA. Del mismo modo, el 63.3% de receptores hepáticos restante se clasificó como alto riesgo de RA con un n° de moléculas $CD28 \geq 7963$ en células T CD4⁺, de los cuáles el 63.2% tuvo RA, y 36.8% no, aunque se clasificó de alto riesgo (sensibilidad=100%, 95%IC=85.75-100; especificidad=61.11%, 95%IC=43.46-76.86; $P<0.001$).

Del mismo modo, según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ >34.20% (Fig.4.55B; AUC=0.807, 95%IC=0.714-0.899,

$P < 0.001$) en post-trasplante de mantenimiento son capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de niveles de expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺, como alto riesgo de INF con niveles de CD28 $\geq 34.20\%$; o como bajo riesgo de INF con CD28 $< 34.2\%$.

El 51.1% de receptores hepáticos fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de expresión de CD28 $< 34.2\%$ en linfocitos T CD4⁺, de los cuáles 65.2% no tuvo INF, y 34.8% si, aunque se clasificó de bajo riesgo. Del mismo modo, el 48.9% de receptores hepáticos se clasificó como alto riesgo de INF, con niveles de expresión de CD28 $\geq 34.2\%$ en linfocitos T CD4⁺, de los cuáles 86.4% tuvo INF, y 13.6% no, aunque se clasificó de alto riesgo (sensibilidad=70.37%, 95%IC=56.39-82.02; especificidad=83.33%, 95%IC=67.19-93.63; $P < 0.001$).

- **Puntos de corte (cut-off) para los niveles de expresión de CD25, CD38 y CD95 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en receptores renales en post-trasplante**

Tras el análisis de los niveles de expresión (%) post-trasplante de los Ags de superficie en receptores renales, se realizó el estudio por el cual se estratificó el nivel de riesgo de RA e INF, en función de los niveles de expresión post-trasplante de CD25, CD38 y CD95 por el AUC del análisis de curvas ROC. Mediante este estudio se obtuvieron los puntos de corte que mejor discriminaron a receptores renales como alto riesgo de RA en el 1^{er} mes post-trasplante e INF en el post-trasplante de mantenimiento. De este modo, los niveles de expresión de CD25, CD38 y CD95 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en receptores renales fueron capaces de discriminar de forma precisa a aquellos pacientes con alto riesgo de RA e INF. Los valores de corte, sensibilidad y especificidad del análisis ROC para los biomarcadores propuestos se muestran en la tabla 4.37. En la figura 4.56, se representan las AUC para los niveles de expresión (%) post-trasplante de los Ags linfocitarios de superficie mencionados de receptores renales con RA e INF, por el cual se obtuvieron los puntos de corte capaces de estratificar dichos pacientes como alto riesgo para el desarrollo de un determinado evento clínico.

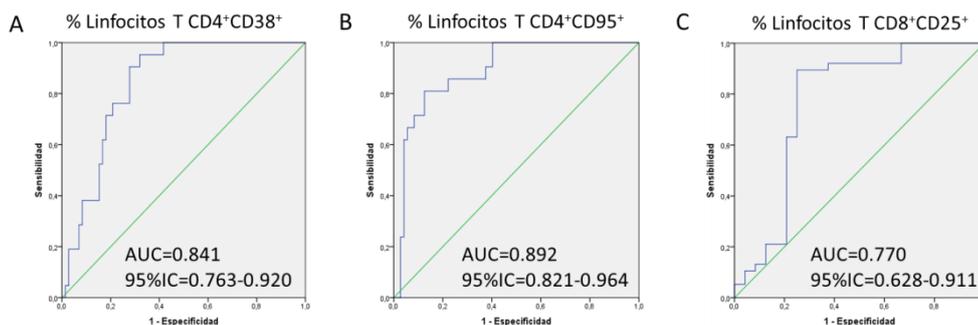


Figura 4.56: Curvas ROC post-trasplante para los valores de corte que mejor discriminaron de forma precisa a receptores renales con RA e INF. Valores de AUC para (A) % de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ de receptores renales con RA en post-trasplante inmediato, (B) % de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ de receptores renales con RA en post-trasplante inmediato y (C) % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ de receptores renales con INF en post-trasplante de mantenimiento.

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del nivel de expresión de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD38⁺>55.25% (Fig.4.56A; AUC=0.841, 95%IC=0.763-0.920, $P<0.001$) en post-trasplante inmediato son capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles de expresión de CD38 en linfocitos T CD4⁺, como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD38 \geq 55.25%; o como bajo riesgo RA con niveles de CD38<55.25%.

El 56.2% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD38<55.25% en linfocitos T CD4⁺, de los cuáles 98% no tuvo RA y 2% restante si, aunque se clasificó de bajo riesgo. Del mismo modo, el 43.8% de receptores renales restante se clasificó como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD38 \geq 55.25% sobre linfocitos T CD4⁺, de los cuáles 69.2% tuvo RA, y 30.8% restante no, aunque se clasificó de alto riesgo (sensibilidad=96.43%, 95%IC=81.65-99.91; especificidad=80.33%, 95%IC=68.16-89.40; $P<0.001$).

➤ Estratificación del riesgo de rechazo agudo en función del nivel de expresión de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD95⁺>49.13% (Fig.4.56B; AUC=0.892, 95%IC=0.821-0.964, $P<0.001$) en post-trasplante inmediato son capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los niveles de

expresión de CD95 en linfocitos T CD4⁺, como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD95 \geq 49.13%; o como bajo riesgo de RA con niveles de CD95 $<$ 49.13%.

El 72% de receptores renales se clasificaron como bajo riesgo de RA con niveles de expresión de CD95 $<$ 49.13% en linfocitos T CD4⁺, de los cuáles 94% no tuvo RA, y 6% restante si, aunque se clasificó de bajo riesgo. Del mismo modo, el 28% de receptores renales restante se clasificó como alto riesgo de RA con niveles de expresión de CD95 \geq 49.13% en linfocitos T CD4⁺, de los cuáles 65.4% tuvo RA, y 34.6% restante no, aunque se clasificó dentro del grupo de alto riesgo (sensibilidad=80.95%, 95%IC=58.09-94.55; especificidad=87.50%, 95%IC=77.59-94.12; $P<0.001$).

Tabla 4.37. Valores de corte (cut-off) durante el periodo post-trasplante, AUC, sensibilidad y especificidad para los biomarcadores propuestos capaces de clasificar a receptores como alto riesgo de RA, INF y de recidiva de VHC.

Biomarcador	Cut-off	AUC (95% IC)	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)
<i>Receptores hepáticos</i>				
<i>Rechazo agudo</i>				
Linfocitos T CD4 ⁺ CD154 ⁺	0.96	0.840 (0.741-0.940)	91.66% (73-98.97)	61.11 (43.46-76.86)
Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺	1.24	0.845 (0.748-0.942)	66.67 (44.68-84.37)	97.22 (85.47-99.93)
Linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺	47.64	0.885 (0.802-0.968)	77.78 (60.85-89.88)	96.30 (87.25-99.55)
Nº moléculas CD28/Linfocito T CD4 ⁺	7963	0.860 (0.770-0.950)	100 (85.75-100)	61.11 (43.46-76.86)
<i>Infección oportunista</i>				
Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺	55.36	0.851 (0.774-0.929)	68.52 (54.45-80.48)	91.67 (77.53-98.25)
Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺	41.15	0.868 (0.771-0.965)	88.89 (73.94-96.89)	79.17 (57.85-92.87)
Linfocitos T CD4 ⁺ CD28 ⁺	34.20	0.807 (0.714-0.899)	70.37 (56.39-82.02)	83.33 (67.19-93.63)
<i>Recidiva de virus de hepatitis C</i>				
Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺	0.68	0.882 (0.816-0.948)	96.97 (84.24-99.92)	61.40 (47.57-74.00)
<i>Receptores renales</i>				
<i>Rechazo agudo</i>				
Linfocitos T CD4 ⁺ CD38 ⁺	55.25	0.841 (0.763-0.920)	96.43 (81.65-99.91)	80.33 (68.16-89.40)
Linfocitos T CD4 ⁺ CD95 ⁺	49.13	0.892 (0.821-0.964)	80.95 (58.09-94.55)	87.50 (77.59-94.12)
<i>Infección oportunista</i>				
Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺	26.31	0.770 (0.628-0.911)	89.47 (75.20-97.06)	75 (53.29-90.23)

AUC, área bajo curva (del inglés 'area under curve'); IC, intervalo de confianza.

➤ Estratificación del riesgo de infección oportunista en función del nivel de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ durante el periodo post-trasplante

Según el AUC del análisis ROC, niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ $>$ 26.31% (Fig.4.56C; AUC=0.770, 95%IC=0.628-0.911, $P<0.001$) en post-trasplante de mantenimiento son capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Posteriormente, se creó un modelo de estratificación, en función de los

niveles de expresión de CD25 en linfocitos T CD8⁺, como alto riesgo de INF con niveles de expresión de CD25 \geq 26.31%; o como bajo riesgo con niveles de CD25 $<$ 26.31%.

El 35.5% de receptores renales fueron clasificados como bajo riesgo de INF con niveles de expresión de CD25 $<$ 26.31% en linfocitos T CD8⁺, de los cuáles 81.8% no tuvo INF, y 18.2% restante si, aunque se clasificó de bajo riesgo. Del mismo modo, el 64.5% de receptores renales restante fue clasificado como alto riesgo de INF con niveles de expresión de CD25 \geq 26.31% en linfocitos T CD8⁺, de los cuáles 85% tuvo INF, y 15% restante no, a pesar de haber sido clasificados de alto riesgo (sensibilidad=89.47%, 95%IC=75.20-97.06; especificidad=75%, 95%IC=53.29-90.23; $P<0.001$).

- **Modelo de regresión logística univariante para el cálculo de la probabilidad de RA, INF y recidiva de VHC en post-trasplante en receptores basado en el logit RA, logit INF y logit VHC en función de los niveles de expresión de CD25, CD28, CD38, CD69, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺**

En el apartado anterior se obtuvieron los valores de corte para los niveles de expresión (%) post-trasplante de los Ags de superficie CD25, CD28, CD38, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ así como también para el n° de moléculas CD28 en células T CD4⁺ que mejor discriminaron a receptores con alto riesgo de RA, INF o VHC.

En este apartado, y basado en los logit RA, logit INF y logit VHC se han obtenido los coeficientes de regresión logística necesarios para el cálculo de la probabilidad de RA ($e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$), INF ($e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$) o recidiva de VHC ($e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$) post-trasplante. Para la realización del modelo de regresión logística se utilizó como variable dependiente RA, INF y VHC, y como variable predictiva, niveles de expresión (%) post-trasplante de CD25, CD28, CD38, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ o n° de moléculas CD28 en linfocitos T CD4⁺. Los coeficientes del modelo de regresión para calcular logit de RA, INF y VHC para niveles de expresión (%) post-trasplante de CD25, CD28, CD38, CD95 y CD154 en células T CD4⁺ y CD8⁺ se dan en tabla 4.38.

- Predicción de RA en receptores hepáticos en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ y CD8⁺CD154⁺ en post-trasplante inmediato

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ de receptores hepáticos durante el 1^{er} mes post-trasplante, predijo que del grupo RA, 91.7% tendrían RA en post-trasplante inmediato, y

el 8.3% restante no, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, 61.1% no tendría RA, y 38.9% restante si, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=91.67%, 95%IC=73.00-98.97; especificidad=61.11%, 95%IC=43.46-76.86; OR=1.836, 95%IC=1.763-2.336; $P=0.001$).

Del mismo modo, el modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ de receptores hepáticos en el 1^{er} mes post-trasplante, predijo que del grupo RA, 79.6% tendrían RA en el post-trasplante inmediato, y el 20.8% restante no, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, 80.6% no tendría RA, y en el 19.4% restante si, a pesar de no haberlo desarrollado (sensibilidad=79.17%, 95%IC=57.85-92.87; especificidad=80.56%, 95%IC=63.98-91.81; OR=1.437, 95%IC=1.365-1.509; $P=0.0003$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ en el periodo post-trasplante inmediato

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ de receptores hepáticos en el 1^{er} mes post-trasplante, predijo que del grupo RA, 89.5% tendrían RA en el post-trasplante inmediato, y el 10.5% restante no, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, el 90.7% no tendría RA, y el 9.3% restante si, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=89.47%, 95%IC=75.20-97.06; especificidad=90.74%, 95%IC=79.70-96.92; OR=1.213, 95%IC=1.122-1.310; $P<0.001$).

➤ Predicción de rechazo agudo en receptores hepáticos en función del número de moléculas CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺ en post-trasplante inmediato

El modelo de regresión logística univariante propuesto para el n° de moléculas CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺ de receptores hepáticos en el 1^{er} mes post-trasplante, predijo que del grupo RA, 62.5% tendrían RA en el post-trasplante inmediato, y el 37.5% restante no, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, 77.8% no tendría RA, y 22.2% restante si, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=62.50%, 95%IC=40.59-81.20; especificidad=77.78%, 95%IC=60.85-89.88; OR=1.659, 95%IC=0.531-5.189; $P<0.001$).

- Predicción de INF en receptores hepáticos en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en post-trasplante de mantenimiento

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ de receptores hepáticos en post-trasplante de mantenimiento predijo, que del grupo INF, 87% tendrían INF en los 6 meses post-trasplante, y el 13% restante no, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, 91.7% no tendría INF en los 6 meses post-trasplante, y el 8.3% restante si, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=87.04%, 95%IC=75.10-94.63; especificidad=91.67%, 95%IC=77.53-98.25; OR=1.141, 95%IC=1.073-1.214; $P<0.001$).

- Predicción de INF en receptores hepáticos en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ en el post-trasplante de mantenimiento

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores hepáticos en el post-trasplante de mantenimiento predijo, que del grupo INF, 91.7% tendrían INF en los 6 meses post-trasplante, y el 8.3% restante no, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, 70.8% no tendría INF en 6 meses post-trasplante, y en el 29.2% restante si, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=91.67%, 95%IC=77.53-98.25; especificidad=70.83%, 95%IC=48.91-87.38; OR=1.906, 95%IC=1.812-2.001; $P=0.001$).

- Predicción de INF en receptores hepáticos en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ en el post-trasplante de mantenimiento

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ de receptores hepáticos en el post-trasplante de mantenimiento predijo, que del grupo INF, 70.4% tendrían INF en los primeros 6 meses post-trasplante, y en el 29.6% restante no, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NoINF, 83.3% no tendría INF a 6 meses post-trasplante, y el 16.7% restante si, a pesar de no tenerla (sensibilidad=70.37%, 95%IC=56.39-82.02; especificidad=83.33%, 95%IC=67.19-93.63; OR=1.087, 95%IC=1.043-1.134; $P<0.001$).

- Predicción de recidiva de VHC en receptores hepáticos en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ en el post-trasplante de larga duración

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ de receptores hepáticos en el post-trasplante de larga duración predijo, que del grupo VHC, 72.7% tendrían recidiva en el 1^{er} primer año post-trasplante, y en el 27.3% restante no, a pesar de desarrollarla. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NVHC, 80.7% no tendría VHC al 1^{er} año post-trasplante, y 19.3% restante si, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=72.73%, 95%IC=54.48-86.7; especificidad=80.7%, 95%IC=68.09-89.95; OR=1.437, 95%IC=1.365-1.509; $P<0.001$).

➤ Predicción de RA en receptores renales en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ en el periodo post-trasplante inmediato

El modelo de regresión logística univariante propuesto para los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ de receptores renales en el 1^{er} mes post-trasplante, predijo que del grupo RA, 72.7% tendrían RA en el periodo post-trasplante inmediato, y el 27.3% restante no, a pesar de desarrollarlo. Del mismo modo, el modelo predijo que del grupo NRA, 91.7% no tendría RA, y en el 8.3% restantes si, a pesar de no desarrollarlo (sensibilidad=72.73%, 95%IC=49.78-89.27; especificidad=91.67%, 95%IC=80.02-97.68; OR=1.210, 95%IC=1.055-1.332; $P<0.001$).

➤ Predicción de RA en receptores renales en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ en el periodo post-trasplante inmediato

El modelo de regresión logística univariante propuesto para niveles de expresión de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ de receptores renales en el 1^{er} mes post-trasplante, predijo que del grupo RA, 81% tendrían RA en el post-trasplante inmediato, y en el 19% restante no, a pesar de desarrollarlo. También, el modelo predijo que del grupo NRA, 87.5% no tendría RA, y 12.5% si, aunque no desarrolló (sensibilidad=80.95%, 95%IC=58.09-94.55; especificidad=87.5%, 95%IC=77.59-94.12; OR=1.131, 95%IC=1.067-1.199; $P<0.001$).

➤ Predicción de INF en receptores renales en función de los niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en el post-trasplante de mantenimiento

El modelo de regresión logística univariante propuesto para niveles de expresión de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ de receptores renales en el post-trasplante de mantenimiento predijo, que del grupo INF, el 90.5% tendrían INF a los 6 meses post-trasplante, y 9.5% restante no, a pesar de haberla desarrollado. Del mismo modo, el modelo predijo que del

grupo NoINF, el 75% no tendría INF en los primeros 6 meses post-trasplante, y el 25% si, a pesar de no desarrollarla (sensibilidad=90.48%, 95%IC=77.38-97.34; especificidad=75%, 95%IC=53.29-90.23; OR=1.074, 95%IC=1.026-1.125; P=0.002).

Tabla 4.38. Modelo de regresión logística univariante para la predicción de RA, INF y recidiva VHC en el post-trasplante inmediato, de mantenimiento y de larga duración de receptores en función de los niveles de expresión de CD25, CD28, CD38, CD69, CD95 y CD154 sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

Biomarcador	Coefficiente	Wald	Exp(B) 95%IC	Sensibilidad (95%IC)	Especificidad (95%IC)	P
<i>Receptores hepáticos</i>						
Rechazo agudo						
Linfocitos T CD4 ⁺ CD154 ⁺	2.850	12.262	1.836 (1.763-2.336)	91.67 (73.00-98.97)	61.11 (43.46-76.86)	0.001
Constante	-2.938					
Logit RA = -2.938 + (%Linfocitos T CD4 ⁺ CD154 ⁺ x 2.850)						
Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺	4.578	13.239	1.437 (1.365-1.509)	79.17 (57.85-92.87)	80.56 (63.98-91.81)	0.0003
Constante	-4.898					
Logit RA = -4.898 + (%Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺ x 4.578)						
Linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺	0.193	23.740	1.213 (1.122-1.310)	89.47 (75.20-97.06)	90.74 (79.70-96.92)	<0.001
Constante	-8.914					
Logit RA = -8.914 + (%Linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ x 0.193)						
Moléculas CD28/Linfocito T CD4 ⁺	1.329	13.742	1.659 (0.531-5.189)	62.50 (40.59-81.20)	77.78 (60.85-89.88)	<0.001
Constante	-4.818					
Logit RA = -4.818 + (Moléculas CD28/Linfocito T CD4 ⁺ x 1.329)						
Infección oportunista						
Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺	0.132	17.521	1.141 (1.073-1.214)	87.04 (75.10-94.63)	91.67 (77.53-98.25)	<0.001
Constante	-6.512					
Logit INF = -6.512 + (%Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺ x 0.132)						
Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺	-0.098	12.072	1.906 (1.812-2.001)	91.67 (77.53-98.25)	70.83 (48.91-87.38)	0.001
Constante	4.541					
Logit INF = 4.541 + (%Linfocitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ x -0.098)						
Linfocitos T CD4 ⁺ CD28 ⁺	0.084	15.417	1.087 (1.043-1.134)	70.37 (56.39-82.02)	83.33 (67.19-93.63)	<0.001
Constante	-2.338					
Logit INF = -2.338 + (%Linfocitos T CD4 ⁺ CD28 ⁺ x 0.084)						
Recidiva de virus de hepatitis C						
Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺	6.108	20.374	1.437 (1.365-1.509)	72.73 (54.48-86.70)	80.70 (68.09-89.95)	<0.001
Constante	-5.696					
Logit VHC = -5.696 + (%Linfocitos T CD8 ⁺ CD154 ⁺ x 6.108)						
<i>Receptores renales</i>						
Rechazo agudo						
Linfocitos T CD4 ⁺ CD38 ⁺	0.106	15.437	1.210 (1.055-1.332)	72.73 (49.78-89.27)	91.67 (80.02-97.68)	<0.001
Constante	-7.424					
Logit RA = -7.424 + (%Linfocitos T CD4 ⁺ CD38 ⁺ x 0.106)						
Linfocitos T CD4 ⁺ CD95 ⁺	0.251	15.316	1.131 (1.067-1.199)	80.95 (58.09-94.55)	87.50 (77.59-94.12)	<0.001
Constante	-2.989					
Logit RA = -2.989 + (%Linfocitos T CD4 ⁺ CD95 ⁺ x 0.251)						
Infección oportunista						
Linfocitos T CD8 ⁺ CD25 ⁺	3.239	20.910	1.074 (1.026-1.125)	90.48 (77.38-97.34)	75.00 (53.29-90.23)	0.002
Constante	-1.504					
(%Logit INF = -1.651 + Linfocitos aTreg (%) x 1.308)						

Las fórmulas para logit RA, Logit INF y Logit VHC derivan de los coeficientes del modelo que se muestra. Los logit de RA, INF y VHC pueden ser usados para predecir probabilidad de RA, INF y VHC con las fórmulas $e^{\text{logit RA}}/1+e^{\text{logit RA}}$, $e^{\text{logit INF}}/1+e^{\text{logit INF}}$ y $e^{\text{logit VHC}}/1+e^{\text{logit VHC}}$, respectivamente.

Discusión

5. DISCUSIÓN

A pesar del aparente estado de “privilegio inmunológico” del trasplante hepático, es cierto que se requiere la aplicación de tratamientos inmunosupresores intensos no exentos de efectos adversos que deben ser controlados (Reyes *et al.*, 1993). Aunque el uso de terapias inmunosupresoras actuales ha aumentado notablemente las expectativas de supervivencia de receptores hepáticos, este éxito no se encuentra exento de problemas. La mortalidad durante el 1^{er} año post-trasplante ocurre mayoritariamente durante los primeros 3 meses con causas que incluyen INF, fallo primario del injerto, rechazo y complicaciones del proceso quirúrgico (Abbasoglu *et al.*, 1997). Entre las causas más comunes de mortalidad encontramos enfermedad cardiovascular (9-22%), tumores *de novo* (16-23%), INFs (6-19%) y fallo renal crónico (5-10%) (Neuberger, 2000; Sudan *et al.*, 1999; Rabkin *et al.*, 2001). Entre 40%-70% de los casos de mortalidad del trasplante se relacionan con la terapia inmunosupresora (Gelson *et al.*, 2011).

Por otro lado, un trasplante renal satisfactorio mejora la calidad de vida de los pacientes reduciendo el riesgo de mortalidad siendo menos costoso que cuando los pacientes son mantenidos en régimen de diálisis (Wolfe *et al.*, 1999; De Pasquale *et al.*, 2014). El avance significativo en el campo del trasplante renal ocurrido durante las dos últimas décadas es debido, principalmente, a la mejora en la supervivencia del injerto a corto plazo. Actualmente, la tasa de supervivencia del injerto así como también la del paciente a un año post-trasplante exceden del 90%. Del mismo modo, la incidencia de RA durante el 1^{er} año post-trasplante se estima por debajo del 15% (Santos y Martins, 2015). Mientras el éxito es marcadamente claro a corto y medio plazo, a largo plazo, sin embargo no ha mejorado en los últimos treinta años [Meier-Kriesche *et al.*, 2004(a)].

La introducción de terapias inmunosupresoras basadas en los inhibidores de la calcineurina ha sido uno de los principales motores del éxito en la supervivencia en el 1^{er} año post-trasplante. En este sentido, aunque el fallo del injerto agudo debido a causas inmunológicas es actualmente un fenómeno poco frecuente, el exceso de inmunosupresión todavía produce en el paciente un aumento de mortalidad a largo plazo debido a los efectos adversos derivados de inmunosupresión (Cooper y Wiseman, 2010). Las terapias a largo plazo basadas en anticalcineurínicos se asocian con la aparición de nefrotoxicidad y otros efectos adversos tales como diabetes *de novo* (TRL), dislipemia (CsA), hipertensión (CsA), INFs, así como procesos tumorales *de novo*. Como

consecuencia, la supervivencia a largo plazo no ha experimentado mejoras en los últimos 20 años (Hardinger y Brennan, 2013; Salvadori y Bertoni, 2013).

Individualizar la terapia inmunosupresora de forma personalizada incrementaría, de este modo, la supervivencia de los pacientes minimizando la exposición al fármaco, reduciendo por tanto su toxicidad, así como también se evitaría la inmunosupresión en exceso del paciente reduciendo los episodios de INFs. Todo ello contribuiría al aumento de la calidad de vida de receptores a largo plazo (Townamchai y Eiam-Ong, 2015).

Por todo lo anteriormente expuesto, de ahí la importancia de profundizar en el estudio de biomarcadores farmacodinámicos que verdaderamente valoren el estado inmunológico real de cada paciente para poder de esta forma ajustar la dosis de fármaco inmunosupresor administrada acorde a cada individuo. Estos biomarcadores deberían ser capaces de discriminar de forma precisa el riesgo de evento clínico asociado a la terapia inmunosupresora y de este modo valorar su relación con eventos que se asocian a la ruptura de tolerancia a corto plazo, como el RA; o de largo plazo, como el rechazo crónico y la probabilidad de supervivencia del injerto; así como también procesos que aumentan la morbilidad, tales como INFs y tumores.

Durante la última década numerosos estudios se han centrado en la búsqueda de biomarcadores farmacodinámicos basados en la respuesta inmunitaria del receptor, de tal modo que su uso pueda predecir la evolución o respuesta que el paciente desarrolla frente al injerto. En este sentido, en esta tesis se han estudiado diferentes subpoblaciones y proteínas de membrana linfocitarias así como también la respuesta funcional basada en la producción *in vitro* de citocinas como potenciales biomarcadores farmacodinámicos y el papel que éstos ejercen en el riesgo de desarrollar un proceso clínico ya sea RA o INF.

5.1. Tasa de rechazo agudo e infección oportunista en trasplante hepático

Según el último informe publicado por el registro español de trasplante hepático (Cuervas-Mons *et al.*, 2016), desde el año 1984 hasta el 2012, el 17% y 0.9% de los TOH realizados precisaron re-trasplante debido a RA e INF, respectivamente; tras el 1^{er} trasplante. El RA se encuentra como 3^a causa más frecuentes de re-trasplante, siendo del 5% en la 1^a semana post-trasplante y aún más importante, del 45% en el 1^{er} mes post-trasplante. Del mismo modo, el RA representa el 10.8% de causa de muerte tras el primer trasplante entre la 1^a semana y 3^{er} mes post-trasplante. Aunque el trasplante hepático presenta generalmente mayor grado de aceptación comparado con otros tipos de injertos,

hasta un 30% de TOH resultan en RA, conduciendo a fallo crónico y descenso de la supervivencia del injerto (Wiesner *et al.*, 1998b). De forma similar, en nuestra serie de estudio, los episodios de RA aparecieron mayoritariamente entre la 1ª semana y 1^{er} mes post-trasplante, concentrándose mayoritariamente entre los primeros 15 días. Estos datos concuerdan con los datos presentados en series más amplias (Ayres y Adams, 1993; Farges *et al.*, 1996; Sugawara *et al.*, 2001), en donde la aparición de RA acontece usualmente en las 2 primeras semanas, concentrándose entre los días 5-15 pos-trasplante.

La incidencia de RA temprano observada en nuestra serie discrepa con la incidencia de RA temprano observado en series más amplias. Mientras Wiesner *et al.*, 1998b describe una tasa de RA temprano del 43% en las primeras 6 semanas post-trasplante, en nuestra serie se observó una tasa de RA de 64% en las primeras 4 semanas.

Es importante destacar que, es durante el 1^{er} mes post-trasplante donde se encontraron las mayores diferencias en los biomarcadores estudiados entre los grupos con y sin RA. Cabe también recalcar que fue durante este periodo donde se encontraron menores concentraciones plasmáticas de inmunosupresor administrado (TRL y MMF), aunque dichas concentraciones no mostraron significación entre receptores con y sin RA.

Del mismo modo que para la incidencia de RA, el último informe publicado por el registro español de trasplante hepático (Cuervas-Mons *et al.*, 2016) refleja que la tasa de INF representa el 0.9% de las causas de re-trasplante tras el 1^{er} trasplante, siendo del 12.5% durante la 1ª semana y del 6.3% entre la 1ª semana y 3^{er} mes post-trasplante. Por otro lado, los episodios de INF representan el 19.3% de las causas de muerte tras el 1^{er} trasplante, de los cuales el 2.8% ocurren durante la 1ª semana, y el 42.5% de causas de muerte debidas a INF ocurren entre la 1ª semana y 3^{er} mes post-trasplante. Más importante son los episodios de INF durante el periodo post-trasplante de mantenimiento y larga duración llegando a acumular hasta el 43.8% como causa de re-trasplante y el 21% de causas de muerte entre el 3^{er} mes y 1^{er} año post-trasplante. Queda de manifiesto pues, que a pesar de las medidas que se toman para evitar una alta tasa de INF post-trasplante, tales como profilaxis antimicrobiana y vacunación, la incidencia de INF todavía representa una importante causa de morbilidad y mortalidad posterior al trasplante hepático (Arnow, 1991; Moreno *et al.*, 2007; Bert *et al.*, 2010). Se estima que hasta el 80% de receptores desarrollarán al menos un episodio de INF en el 1^{er} año post-trasplante y aunque la mayoría serán tratados y resueltos con éxito, algunos resultarán en la muerte (Kawecki *et al.*, 2009). Ciertamente, las INFs son una de las principales causas de muerte durante los primeros 3 años post-trasplante hepático (Watt *et al.*, 2010). Con

frecuencia, el diagnóstico de estas INFs se encuentra enmascarado porque, como parte de las estrategias dirigidas a conservar la función del injerto, las terapias inmunosupresoras disminuyen las respuestas inflamatorias, mitigando o incluso suprimiendo los signos clínicos de infección conduciendo a un retraso en el diagnóstico y, por lo tanto, en la aplicación de tratamiento (Moon y Lee, 2009).

Existen de hecho tres claros periodos, consecutivos y a menudo superpuestos, posteriores al trasplante hepático, asociados con un tipo específico de INF (Romero y Razonable, 2011). Durante la fase inmediata al trasplante, que abarcaría desde el 1^{er} mes, la incidencia de INFs es mayoritariamente de etiología bacteriana debido al propio proceso quirúrgico, estancias hospitalarias prolongadas, ventilación mecánica, cateterismo vascular y urinario e INFs transmitidas por el donante, entre otras. Las INFs bacterianas más frecuentes en esta fase son mayoritariamente causadas por patógenos sanguíneos multi-resistentes, neumonía, infección bacteriana en el lugar de la cirugía, INFs intra-abdominales, abscesos y urosepsis; así como también INFs fúngicas causadas por *Candida* sp. Estos datos concuerdan con los observados en nuestra serie, en donde los principales agentes microbianos y fúngicos hallados durante el 1^{er} mes post-trasplante fueron *Staphylococcus* sp, *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii* y *Candida* sp. La segunda fase descrita abarcaría desde el periodo comprendido entre el 1^{er} y 6^o mes post-trasplante en donde las INFs bacterianas podrían ser recurrentes, pero a su vez aparecerían nuevos agentes oportunista de etiología vírica. La incidencia de INF durante el periodo post-trasplante de mantenimiento es debida principalmente por un exceso de inmunosupresión, episodios de RA, enfermedades transmitidas por el donante y manipulación repetida del tracto biliar. Los agentes víricos principales en esta fase serían CMV, virus Epstein-Barr (VEB), herpes virus humano tipo 6 y 7, distintas especies de *Aspergillus*, *Pneumocystis jirovecii*, especies de *Nocardia*, *Mycobacterium tuberculosis*, micosis endémica y *Toxoplasma*, entre otras. De nuevo, estos datos concuerdan con los observados en nuestra serie, en donde los principales patógenos virales observados fueron virus herpes simple (VHS), VEB e infecciones virales por CMV. Por último, la tercera fase descrita abarcaría el periodo post-trasplante de larga duración (desde el 6^o mes en adelante) en donde los episodios de INF se verían favorecidos por la recurrencia de RA y disfunción del injerto, hechos que requerirían la administración de dosis más intensas de inmunosupresión. En este periodo son frecuentes las INFs virales por VHS y CMV, pero también se observan INFs por virus herpes-zoster (VHZ). Un dato importante es que es durante este periodo de inmunosupresión prolongada donde la infección por VHC se

vuelve crónica. En nuestra serie de pacientes las infecciones virales fueron principalmente causadas por VHS, VHZ, CMV y aunque durante los meses anteriores ya se había detectado recidiva por VHC fue durante el 2º semestre post-trasplante donde se dio el mayor número de casos de ingresos por cirrosis hepática causada por VHC. Cabe destacar que, fue en estos periodos de mayor incidencia de INF donde se observaron mayores diferencias en los biomarcadores estudiados entre los grupos de receptores hepáticos con y sin INF así como entre los grupos de VHC y NVHC.

Aunque no se observaron diferencias significativas en el efecto que las INFs ejercieron sobre los episodios de RA, debido seguramente al reducido tamaño de la muestra, sí que observó una tendencia de efecto protector por el cual pacientes con mayor incidencia de INF presentaron una menor tasa de episodios de RA. Del mismo modo, la incidencia de RA observada en receptores hepáticos con recidiva de VHC fue menor (12.5%) en comparación con receptores NVHC (Boix-Giner F *et al.*, 2016). En este sentido, está descrito que la incidencia de RA en pacientes con recidiva VHC está infra-estimada ya que las manifestaciones histológicas suelen encontrarse solapadas con las debidas a cirrosis hepática por recurrencia de VHC (Regev *et al.*, 2004).

La observación hecha en nuestra serie en donde reportamos una relación entre la edad y el sexo del receptor con una mayor incidencia de RA en pacientes más jóvenes ha sido también constatada en otras series, que refieren una mayor incidencia de RA en trasplante hepático de niños y jóvenes que en adultos (Höckerstedt, 1993; Wiesner *et al.*, 1998b; Bathgate *et al.*, 1999); todo ello, posiblemente debido a la mayor actividad y capacidad de respuesta del sistema inmunitario.

A pesar de que Wiesner *et al.*, 1998b, en su serie más amplia de estudio, no observó aumento significativo de los niveles séricos de Fosfatasa Alcalina (FA) o gamma glutamil transpeptidasa (GGT); en nuestra serie se pudo observar que receptores hepáticos con incidencia de RA presentaron niveles séricos significativamente superiores de FA y GGT. Similares observaciones a las descritos en nuestra serie, se observaron por Chiu *et al.* (2005), donde se determinó la relación entre el daño del injerto hepático por episodios de RA con el aumento sérico de GGT y FA en receptores hepáticos.

La incidencia de RA temprano observada en la serie que recibió TRL (58.3% de receptores hepáticos) en régimen de monoterapia fue muy semejante a la encontrada en el grupo de receptores que recibió TRL+MMF (41.7% de receptores hepáticos) en terapia doble como tratamiento inmunosupresor durante el 1^{er} mes post-trasplante. Cabe destacar una menor incidencia de RA tanto en el periodo post-trasplante inmediato como de

mantenimiento en aquellos receptores que recibieron TRL en monoterapia en comparación con aquellos pacientes que recibieron TRL+MMF en terapia doble, indicando una mejor aceptación del injerto a largo plazo en receptores tratados únicamente con TRL. Como se ha descrito durante los últimos 20 años, la introducción del uso de TRL de forma rutinaria ha reducido de forma drástica la incidencia de rechazo y fallo agudo del injerto (Johnston y Holt, 1999; Pillai y Levitsky, 2009); sin embargo el uso de éste no se encuentra exento de efectos adversos, tales como nefrotoxicidad o la aparición de INF. En este sentido, a pesar de que pacientes tratados con TRL presentaron menor tasa de RA y, por tanto, mejor aceptación del injerto a largo plazo en comparación con pacientes tratados con TRL+MMF, fue en este grupo tratado con TRL en monoterapia en donde se observó una mayor incidencia de INFs. Además, también se observó que la dosis de TRL (mg/día) suministrada a receptores hepáticos con mayor incidencia de INFs fue significativamente superior a la del grupo NoINF. Este hecho indica que, a pesar de una menor tasa de RA observada en el grupo de receptores hepáticos tratados con TRL, fue sin embargo el grupo que mayor inmunosupresión recibió y, por tanto, experimentó mayor número de eventos infecciosos.

El recuento leucocitario en nuestra serie de receptores hepáticos en el periodo completo del estudio se mantuvo dentro de los rangos de normalidad para el grupo RA, INF y VHC. Sin embargo, en el análisis de estratificación del recuento leucocitario se observó que aquellos pacientes que tuvieron INFs de etiología bacteriana y fúngica presentaron un recuento mayor pre-trasplante en comparación con las cifras observadas en el grupo NoINF, así como en receptores con INF de etiología vírica. De igual modo, también se observó una significada leucopenia previa al trasplante que posteriormente desarrollaron recidiva de VHC en comparación con el grupo de NVHC.

Como se muestra en resultados de esta memoria, receptores hepáticos con RA mostraron mayor recuento de linfocitos totales periféricos durante el periodo de estudio. Tanto la frecuencia como cifras absolutas de linfocitos totales en receptores RA presentaron niveles significativamente superiores comparados con el grupo NRA. Cabe destacar que estas diferencias en el recuento linfocitario ya se observaban en los pacientes pre-trasplante. Es decir, que pacientes con enfermedad hepática terminal en lista de espera con mayor recuento linfocitario se correlacionó posteriormente con una mayor incidencia de RA. El estudio de estratificación del recuento linfocitario reveló que tanto el porcentaje como las cifras absolutas en pacientes con indicación al trasplante de cirrosis biliar primaria, hepatocarcinoma o síndrome de Budd-Chihari presentaron mayores

recuentos linfocitarios pre-trasplante en comparación con pacientes con cirrosis alcohólica. Estos datos concuerdan con los publicados por Matos *et al.*, 2013, en donde pacientes con cirrosis alcohólica presentaron una marcada linfopenia y, a excepción de las células NK, el resto de subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺, CD8⁺ y CD19⁺) eran reducidos, con especial acentuación sobre la subpoblación de linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Por el contrario, el recuento linfocitario tanto en pre-trasplante, así como, durante la monitorización post-trasplante de receptores hepáticos con INF y recidiva de VHC se mantuvo dentro de los rangos de normalidad.

5.2. Tasa de rechazo agudo e infección oportunista en trasplante renal

El campo del trasplante renal ha progresado considerablemente durante los últimos 50 años debido, principalmente a una mayor comprensión del papel que el sistema inmunitario tiene en los procesos de rechazo del injerto, el desenmascaramiento de los mecanismos moleculares que subyacen al fallo del injerto y un mejor manejo de la terapia inmunosupresora (Morris, 2004; Sayegh y Carpenter, 2004). Desde la introducción de los agentes inhibidores de la calcineurina como terapia inmunosupresora, el riesgo de RA durante el 1^{er} año post-trasplante es actualmente del 15%; sin embargo, los episodios de RA suelen ser más severos y, desafortunadamente, la supervivencia a 5 años apenas ha mejorado desde los años 80 (Meier-Kriesche *et al.*, 2004).

La tasa de incidencia de RA en trasplante renal se encuentra en torno al 32.5%, siendo del 27.5% durante el 1^{er} año (Pallardó Mateu *et al.*, 2004). Una edad superior a los 60 años, la sensibilización con un 15% PRA, una función del injerto retardada y presencia de infección por CMV han sido descritos como factores de riesgo que aumentarían el riesgo de RA (Meier-Kriesche *et al.*, 2004; Pallardó Mateu *et al.*, 2004). En series más recientes, el sexo del receptor, tiempo en diálisis previo al trasplante, la administración de timoglobulina como terapia de inducción así como la edad del donante han sido también asociados como factores de riesgo de RA (Jalalzadeh *et al.*, 2015; Segundo *et al.*, 2014). La función del injerto renal parece ser que es el marcador más aceptado actualmente por clínicos e investigadores (Hariharan *et al.*, 2003) así como también para la evaluación de nuevas terapias (Pascual *et al.*, 2002); aunque su uso como marcador para de pérdida del injerto es objeto de controversia (Hariharan *et al.*, 2004). En este sentido, la filtración glomerular (GFR, del inglés “glomerular filtration rate”) está considerada como el mejor

índice para la evaluación general de la función renal (National Kidney Foundation, 2002), así como indicador de supervivencia del injerto a largo plazo (First, 2003).

En nuestra serie de receptores renales la tasa de incidencia de RA fue de 38.7% en el 1^{er} año. De todos los episodios de RA, virtualmente todos (83.3%) ocurrieron durante los primeros 15 días post-trasplante. Precisamente, fue durante el 1^{er} mes post-trasplante donde se observaron mayores diferencias de los biomarcadores estudiados entre los grupos de estudio con y sin RA. De modo similar que en la serie de receptores hepáticos, durante el periodo de mayor incidencia de episodios de RA se registraron menores concentraciones plasmáticas de fármaco inmunosupresor. Precisamente fue durante el 1^{er} mes post-trasplante donde los pacientes que desarrollaron RA presentaron menor exposición a MMF y TRL. De hecho, los niveles de MMF ($\mu\text{g/ml}$) en el 1^{er} mes post-trasplante en el grupo NRA, fueron significativamente superiores a los del grupo RA. Aunque no se observaron diferencias significativas en pacientes RA y NRA tratados con TRL o MMF en régimen de monoterapia como en régimen de doble terapia a lo largo del periodo de estudio, la dosis de MMF de receptores renales RA fue significativamente superior comparado con la dosis observada en grupo NRA.

Es importante destacar que el grupo RA experimentó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de MMF desde el 1^{er} mes alcanzando niveles máximos al año post-trasplante. Este incremento observado en el grupo RA, sin duda es consecuencia del aumento de la terapia para la prevención en la aparición de más episodios de RA. La cinética del fármaco TRL observada en receptores renales en el 1^{er} año post-trasplante presenta patrones similares a la observada para el MMF. De este modo, los menores niveles plasmáticos de TRL observados en los primeros 15 días coinciden con una mayor incidencia de RA, llegando casi a la significación. Es precisamente el grupo RA el que experimentó un aumento significativo en los niveles de TRL a partir del 1^{er} mes post-trasplante coincidiendo con una disminución en la aparición de RA.

De forma similar a lo anteriormente expuesto en lo que a INFs se refiere; éstas representan una importante causa de aumento en la morbilidad/mortalidad durante los años posteriores a la implantación del injerto renal. Según el último informe sobre diálisis y trasplante renal publicado por el Registro Español de Enfermos Renales (2014), la incidencia de INF post-trasplante se encuentra en torno al 22.3% y continua siendo, junto con causas de origen cardiovascular, la principal causa de aumento en la mortalidad. En los últimos años se han descrito diferentes causas que aumentarían la incidencia de INF en receptores renales, tales como determinados perfiles genéticos (Rodrigo *et al.*, 2007),

así como también el estado de inmunosupresión del paciente (Avery, 2010). El uso de esteroides, terapias anti-linfocíticas (timoglobulina) y AcMo (alemtuzumab) incrementan las infecciones por CMV, VBK y VEB. En este sentido, recientes estudios han demostrado la correlación existente entre la administración de MMF y el incremento de infecciones por CMV (Boucher *et al.*, 2003; Sarmiento *et al.*, 2000; Jorge *et al.*, 2008), VHS (Smak Gregoor *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2004) e INF por hongos unicelulares como *Candida* llegando incluso, en raras ocasiones, a producir leucoencefalopatía multifocal progresiva (Neff *et al.*, 2008). Estos datos concuerdan con los observados en nuestra serie de receptores renales, en donde una dosis de MMF próxima a los 2000 mg/ml estuvo directamente relacionada con un aumento en la incidencia de INFs post-trasplante. Del mismo modo, la concentración mínima (Cmin) de MMF se correlacionó también con un aumento en la incidencia de INFs en receptores renales.

Se estima que al menos el 45% de pacientes que reciben un injerto renal desarrollaran al menos un episodio de INF renal en los 3 primeros años de seguimiento (Snyder *et al.*, 2009). La distribución temporal de las INFs post-trasplante, al igual que en receptores hepáticos, presenta un patrón reconocido (Karuthu y Blumberg, 2012). En este sentido, las INFs ocurridas en el 1^{er} mes pos-trasplante fueron resultado de INFs adquiridas de tipo nosocomial, derivadas del proceso quirúrgico e INFs derivadas del donante. Los agentes microbianos más frecuentemente encontrados como causantes de estos procesos infecciosos fueron de origen bacteriano (*Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente y *Enterococ* sp.), así como fúngicos (*Candida* sp. y *Aspergillus* sp). Las INFs debidas a patógenos oportunistas suelen aparecer posteriormente, con frecuencia durante los siguientes 5 meses, reflejando el impacto que la terapia inmunosupresora tiene sobre el paciente. Los patógenos oportunistas más frecuentemente vistos durante el post-trasplante correspondiente entre el 1^{er} y 6^o mes fueron mayoritariamente de origen vírico. Los agentes víricos que mayormente causaron INF fueron CMV y herpes virus, tales como VEB, VEZ y VHS; así como también INFs por Poliomavirus BK. En cuanto a las INFs causadas por agentes bacterianos, los mayormente encontrados en nuestra serie fueron *Clostridium* sp. y *Micobacterium Tuberculosis*. Durante el periodo comprendido entre el 6^o mes y 1^{er} año post-trasplante, las INFs observadas en nuestra serie fueron de origen vírico y bacteriano, siendo CMV, VEB, VEZ, VHS, *Pneumococo* sp. y *Nocardia* sp.

Del mismo modo a lo observado en la serie de receptores hepáticos, de nuevo en la serie de renales, el grupo INF presentó mejor aceptación del injerto. En este sentido, la incidencia de RA en receptores INF fue menor que la del grupo NoINF.

En nuestra serie, la función renal post-trasplante fue monitorizada a lo largo del seguimiento como filtración glomerular, medida en diuresis (ml/día) junto con valores de creatinina sérica (mg/dl). Aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de creatinina sérica a lo largo del periodo de estudio entre receptores renales con y sin RA, debido probablemente por el tamaño de la muestra, se observa una tendencia en donde pacientes con RA tuvieron niveles de creatinina séricos mayores. Del mismo modo, la filtración glomerular de receptores RA presentó niveles significativamente inferiores a los observados en el grupo NRA. Estos datos concuerdan con los observados en series más amplias, en donde una menor tasa de filtración glomerular fue observada en receptores renales con función retrasada del injerto y presencia de RA (Gill *et al.*, 2003; Marcén *et al.*, 2010). Esta disminución mantenida de la tasa de filtración glomerular en pacientes con función retrasada del injerto y RA no presentó un aumento en la tasa de pérdida del injerto por fallo en la función a largo plazo. Estos datos son, sin duda, interesantes si tenemos en cuenta que actualmente en España el número de donaciones que se realizan a partir de donantes añosos o sub-óptimos está aumentando, apoyando el uso de riñones añosos a pesar de una peor tasa de filtración glomerular en comparación con donantes más jóvenes. Por otro lado, la tasa de filtración glomerular registrada en el grupo INF fue significativamente superior a la del grupo NoINF durante el seguimiento, como previamente fue descrito por Nankivell *et al.*, 1995 y Arnello *et al.*, 1999).

En nuestra serie de receptores renales el recuento leucocitario del grupo RA presentó niveles superiores en comparación con los mismos observados en el grupo NRA. Este incremento en el recuento leucocitario ya se encontraba marcadamente aumentado en los pacientes con enfermedad renal terminal en pre-trasplante que, posteriormente, desarrollaron RA. En el estudio de estratificación subsecuente se pudo corroborar el aumento en el recuento leucocitario pre-trasplante de receptores renales con insuficiencia renal y con nefroangiosclerosis, como indicación al trasplante. Nuestros datos concuerdan con los observados en series más amplias, en donde, recientemente, se ha descrito que pacientes con enfermedad crónica renal presentan cifras aumentadas de granulocitos y eosinófilos (Agarwal y Light, 2011). La frecuencia de linfocitos, pero no las cifras absolutas, de receptores renales con RA presentó niveles superiores durante el periodo de seguimiento. Del mismo modo, este incremento en el recuento linfocitario ya

se observó pre-trasplante en pacientes que desarrollaron RA. Estos datos concuerdan con los datos aportados recientemente por Wang *et al.* (2012), en donde la frecuencia de linfocitos T pre-trasplante se asoció con un incremento del riesgo de RA mediado por células. En el posterior análisis de estratificación del recuento linfocitario, de nuevo, pacientes con insuficiencia renal crónica presentaron un recuento superior a pacientes con otras enfermedades renales terminales. Estos datos concuerdan de nuevo con los descritos en relación al recuento leucocitario. Con respecto al recuento linfocitario y la incidencia de INF, el análisis de estratificación realizado en pre-trasplante reveló que pacientes con enfermedad renal terminal en lista de espera libres de INF durante el periodo de seguimiento post-trasplante presentaron mayor frecuencia de linfocitos en comparación con los pacientes que desarrollaron INF de etiología bacteriana, fúngica y vírica. Dentro del grupo INF, tanto la frecuencia como cifras absolutas de linfocitos pre-trasplante de receptores renales con INF de etiología bacteriana fue significativamente menor en comparación con receptores con INF de etiología vírica. De nuevo, nuestros datos concuerdan con los recientemente descritos por Fernández-Ruiz *et al.* (2009), en donde un recuento linfocitario inferior a $1.00 \times 10^3/\mu\text{l}$ en pre-trasplante se correlacionó con un incremento en el riesgo de desarrollar INF durante el periodo post-trasplante.

5.3. Estudio de biomarcadores farmacodinámicos de inmunosupresión en trasplante

El estudio realizado en esta memoria se basa en la validación de biomarcadores capaces de monitorizar la función inmunitaria orquestada durante la respuesta alogénica en el campo del trasplante hepático y renal. Mucho se ha trabajado en esta dirección durante la última década, avanzando en este sentido, en el campo de la función y monitorización inmunitaria, así como en la búsqueda de biomarcadores específicos capaces de ser usados en la práctica clínica para una mejor monitorización del receptor.

A pesar de una clara mejora en la tasa de supervivencia del paciente así como del injerto, todavía hoy en día las principales causas de muerte durante el 1^{er} año post-trasplante son la incidencia de RA, así como la aparición de efectos adversos a la terapia inmunosupresora tales como INFs. En este sentido, es importante destacar que la sensibilidad a la terapia inmunosupresora de los pacientes muestra una gran variabilidad junto con una clara imprecisión de las mediciones plasmáticas de inmunosupresor como marcador predictivo del estado inmunológico del trasplantado (Millán O *et al.*, 2009). Por ello, la monitorización inmunológica cobra una importancia esencial, siendo demostrada

en los últimos años como una aproximación efectiva para la predicción de RA frente a la aceptación del injerto, así como para diferenciar la activación inmune inducida por alo-reactividad de la inducida por las infecciones.

Uno de los estudios pioneros en el campo de la farmacodinamia describió el potencial papel predictivo de los niveles pre-trasplante de células T productoras de IFN γ alo-Ag específicas como herramienta para la estratificación de los pacientes como alto riesgo de RA (Heeger *et al.*, 1999). Pero como se ha mencionado anteriormente, el estudio de la monitorización inmunológica también se centra en distinguir las reacciones inmunitarias desencadenadas por alo-Ags de las inducidas por patógenos oportunistas. En este sentido, estudios recientes correlacionan un incremento en la incidencia de INFs en receptores con hipogammaglobulinemia y con hipocomplementemia del factor C3 (Fernández-Ruiz *et al.*, 2012, 2013).

Otra aproximación muy estudiada en el campo de la farmacodinamia sería la aplicación de estrategias capaces de inducir un efecto protector reduciendo el riesgo de RA. Esta aproximación es lo que hoy en día se conoce como tolerancia inmunológica. La tolerancia inmunológica en el trasplante se define como el estado permanentemente adquirido de ausencia de respuesta inmunológica (Reding *et al.*, 2006). En este sentido, el marcador por excelencia más estudiado como candidato indiscutible de tolerancia inmunológica son los linfocitos Treg. Consecuentemente, algunos estudios han evaluado la frecuencia de linfocitos T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ como biomarcador de tolerancia en receptores que de forma gradual se les retiró la terapia inmunosupresora. En este sentido, SanSegundo *et al.* (2006) evaluaron el efecto que los fármacos inmunosupresores ejercen sobre la frecuencia de linfocitos T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ en una cohorte de receptores renales con función estable del injerto. De tal modo que a diferencia del SRL, los inhibidores de la calcineurina redujeron el número de células Treg periféricas.

A pesar de todos los estudios y pruebas preliminares que apuntan al uso de todos estos marcadores como armas indispensables en la monitorización inmunológica post-trasplante para un mejor manejo de las terapias inmunosupresoras en receptores, apenas hemos mirado a través de una pequeña ventana por la cual podemos ver un sinfín de oportunidades. Por ello, que es necesario profundizar en la identificación de moléculas que participen en los procesos de rechazo y tolerancia, y que puedan tener un papel como marcador diagnóstico o predictivo.

5.3.1. Monitorización de la función inmunitaria pre-trasplante de pacientes con enfermedad terminal hepática y renal y papel en la predicción de RA

Como se describe en el apartado de resultados de esta memoria, receptores hepáticos y renales de nuestra serie de estudio fueron monitorizados durante el 1^{er} año post-trasplante para diversas moléculas y subpoblaciones celulares que juegan un papel importante en el inicio y mantenimiento de las respuestas inmunitarias en RA. En este apartado se van a discutir los resultados para los distintos biomarcadores analizados en receptores y su potencial papel en la predicción de RA en situación pre-trasplante.

- Niveles pre-trasplante aumentados de linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ productores de IL-2, IFN γ e IL-17 son capaces de discriminar a receptores como alto riesgo de desarrollar rechazo agudo

Uno de los datos más relevantes del estudio pre-trasplante se observó en relación con las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺ productoras de las citocinas IL-2, IFN γ e IL-17. Tanto en nuestra serie de receptores hepáticos como renales, los valores porcentuales de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ productores de IL-2, de linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺ productores de IFN γ así como de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ productores de IL-17 previos al trasplante fueron comparables con los observados en trabajos realizados en otras series de receptores hepáticos (Millán *et al.*, 2013; Millán *et al.*, 2014) y reproducían lo descrito previamente en individuos sanos (Ma *et al.*, 2015). El hallazgo más relevante de este estudio lo observamos en relación con la expresión de ciertas citocinas en el grupo de receptores hepáticos y renales con RA.

En nuestra serie de pacientes con enfermedad hepática terminal, niveles de expresión de IL-2 e IL-17 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ así como niveles de expresión de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ en pre-trasplante fueron significativamente más elevados en aquellos receptores hepáticos que desarrollaron RA. Del mismo modo, en nuestra serie de receptores renales, los niveles de expresión de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺, así como también de IL-2 en linfocitos T CD8⁺CD69⁺ de receptores con enfermedad renal terminal, que desarrollaron RA, tuvieron niveles pre-trasplante superiores a los observados en receptores renales con función renal estable.

Durante la última década numerosos estudios realizados sobre modelos murinos, tanto de enfermedades autoinmunes como inflamatorias, han puesto de manifiesto que los linfocitos T_H17 parecen estar implicados en el desarrollo y mantenimiento de procesos

inflamatorios crónicos (Louten *et al.*, 2009). Del mismo modo, numerosos estudios publicados durante la última mitad de siglo XX destacan el papel de las respuestas mediadas por linfocitos T_H1 durante los procesos inflamatorios (Awasthi *et al.*, 2011). Concretamente en el campo del trasplante, estudios relacionados con el desarrollo de RA ponen de manifiesto que hay claras evidencias de que las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ colaboradores de tipo 1 (T_H1) y de tipo 17 (T_H17) están directamente implicadas en las reacciones que ocurren durante el rechazo del injerto (Obata *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2012). Del mismo modo, IL-2 presenta una importante función como factor de crecimiento de células T presentando un papel central durante las respuestas alógenicas de rechazo, especialmente cuando es producida por linfocitos T CD8⁺ (Le Moine *et al.*, 2002). En concordancia con nuestros datos, se ha descrito en grupos de receptores hepáticos con RA niveles incrementados de linfocitos T CD8⁺ productores de IL-2 e IL-17 en pre-trasplante. Del mismo modo, en el mismo estudio, receptores hepáticos y renales con RA presentaron niveles de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de INF γ aumentados en pre-trasplante (Millán *et al.*, 2014). Ya se tenía constancia anterior de la correlación existente entre la frecuencia de linfocitos T_H1 productoras de INF γ en pre-trasplante con un aumento en la incidencia de rechazo agudo (Heeger *et al.*, 1999). En otro estudio, también se describieron niveles incrementados de linfocitos T CD8⁺ productores de IL-2 pre-trasplante en receptores hepáticos que, subsecuentemente, desarrollaron RA durante el periodo post-trasplante (Boleslawski *et al.*, 2004).

En el estudio llevado a cabo en nuestra serie de receptores en relación a las citocinas mencionadas, se pudo establecer que utilizando los niveles pre-trasplante de estas subpoblaciones linfocitarias se podía estratificar el riesgo a que receptores hepáticos y renales desarrollaran RA. En este sentido, un porcentaje superior al 25.99% de linfocitos de T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ pre-trasplante fue capaz de discriminar a nuestros receptores hepáticos como alto riesgo de RA. El análisis univariante estableció que este grupo de pacientes de alto riesgo, basado en la frecuencia de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ en pre-trasplante, tendrían un riesgo 1.242 superior de RA. Del mismo modo, receptores renales con una frecuencia superior a 15.98% de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ pre-trasplante fueron clasificados dentro del grupo de alto riesgo de RA, y que estos pacientes presentaban un riesgo 1.401 veces superior a desarrollar RA. Por otro lado, los niveles intracitoplasmáticos pre-trasplante de INF γ también fueron capaces de discriminar a receptores de forma precisa como alto riesgo de RA. En este sentido, los valores de corte por el cual se clasificaron a receptores hepáticos y renales como alto riesgo de RA

en función de los niveles pre-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ fueron 13.35% y 25.21% respectivamente. El subsecuente análisis, basado en el modelo de regresión logística, estableció que receptores clasificados dentro del grupo de alto riesgo presentaron una probabilidad 1.368 y 1.277 veces aumentada de RA. En el caso del grupo de receptores renales, además niveles pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ superiores a 42.53% también fueron capaces de estratificar a receptores renales dentro del grupo de alto riesgo, presentando una probabilidad 1.171 veces aumentada de RA. Por último, los niveles pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ de receptores hepáticos también fueron buenos candidatos para predecir la probabilidad de RA. En este aspecto, valores superiores al 10% clasificaron a receptores hepáticos de forma precisa como alto riesgo, con una probabilidad aumentada en 1.388 veces de RA.

Nuestros datos basados en los niveles pre-trasplante intracitoplasmáticos de IL-2, IL-17 e IFN γ fueron publicados como parte de un estudio multicéntrico (Millán *et al.*, 2014) en donde proponemos el uso de estas subpoblaciones linfocitarias como biomarcadores predictivos de RA para receptores hepáticos y renales.

➤ Niveles plasmáticos pre-trasplante aumentados de IFN γ e IL-17 son capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA

El análisis de las citocinas solubles en sobrenadante de cultivo tras estimulación *in vitro* de leucocitos totales periféricos en pre-trasplante obtenidos a partir de receptores hepáticos, reflejó que pacientes con concentraciones plasmáticas de IFN γ e IL-17 elevadas se correlacionó con una tasa de RA incrementada. En este sentido, el análisis de estratificación reveló que receptores hepáticos con RA en el seguimiento post-trasplante presentaron niveles superiores de IFN γ e IL-17 en comparación con los niveles del grupo NRA. Asimismo, los niveles de IFN γ de receptores hepáticos con RA, pero no los de IL-17, fueron superiores a los del grupo control. De nuevo, nuestros datos concuerdan con numerosos estudios previos que relacionan la respuesta inmunitaria de tipo T_H1 y T_H17 con el desarrollo de RA, tanto en receptores renales como hepáticos. Desde hace ya más de 20 años que se tiene constancia del papel que IL-17 desempeña, no solo iniciando respuestas pro-inflamatorias sino también manteniéndolas, estimulando a macrófagos para la secreción de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-12 y PGE₂ (Jovanovic *et al.*, 1998). Al mismo tiempo que las células T_H17 se describieron como una nueva subpoblación de linfocitos pro-inflamatorios, enseguida se empezó a estudiar su papel en relación con el trasplante y

su función durante los episodios de RA. Estudios previos han remarcado el papel que IL-17 presenta en RA tanto en trasplante renal (Loong *et al.*, 2002), hepático (Fabrega *et al.*, 2009), pulmón (Vanaudenaerde *et al.*, 2006), así como en cardíaco (Yuan *et al.*, 2008).

La presencia de IFN γ en receptores y su relación con los episodios de RA también se ha descrito desde más de 20 años. En este sentido Obata *et al.*, 2005 describieron la presencia de ARNm de IFN γ característica de linfocitos T_H1 en biopsias de receptores renales con RA como crónico. En este mismo sentido, Karczewski *et al.*, 2010 relacionó la presencia de IFN γ en la orina de receptores renales con RA, de nuevo indicando el papel central que los linfocitos T_H1 presentan en las reacciones inflamatorias del RA.

En nuestra serie, la concentración de IFN γ e IL-17 en sobrenadante de cultivo en pre-trasplante fue capaz de estratificar significativamente a receptores hepáticos como alto o bajo riesgo de RA. De tal modo que una concentración de IFN γ superior a 330.41 pg/ml pre-trasplante en pacientes con enfermedad hepática terminal incrementó el riesgo de RA en 1.011 veces más que pacientes con concentraciones inferiores a dicho valor. Estudios previos han demostrado el impacto de la monitorización de IFN γ en pacientes con alto riesgo de RA. Najafian *et al.*, 2002 determinó que la presencia de células productoras de IFN γ por ELISPOT superiores a 60 por millón en linfocitos de SP de pacientes con incompatibilidad a nivel del locus HLA-DRB1, discriminó a pacientes como alto o bajo riesgo de RA. En otro estudio del grupo de Kim *et al.* (2007) demostró que el n° de células productoras de IFN γ por ELISPOT pre-trasplante podía utilizarse como marcador para la identificación de pacientes de alto riesgo de RA post-trasplante.

Igualmente, el análisis de la curva ROC realizado para la concentración de IL-17 en nuestra serie de receptores hepáticos en pre-trasplante pudo estratificar a dichos pacientes como alto o bajo riesgo de RA post-trasplante. El subsecuente análisis de regresión logística univariante determinó que, pacientes con enfermedad hepática terminal con concentraciones de IL-17 superiores a 198.10 pg/ml pre-trasplante presentaron una probabilidad 1.054 veces mayor de desarrollar RA en el periodo post-trasplante. En un estudio reciente, niveles séricos incrementados de IL-17 e IL-23 (responsable del mantenimiento y expansión clonal de linfocitos T_H17) en receptores hepáticos se correlacionaron con un aumento en la tasa de RA (Fabrega *et al.*, 2009).

Al igual que en los resultados de la expresión intracelular de citocinas dichos previamente, los datos obtenidos de nuestra serie de hepáticos se usaron en un multicéntrico, en donde se propone el uso de niveles de IL-17 pre-trasplante de pacientes con enfermedad hepática terminal como marcador predictivo de RA (Millán *et al.*, 2014).

- Niveles pre-trasplante disminuidos de linfocitos aTreg en receptores hepáticos y linfocitos nTreg en receptores renales fueron capaces de predecir la aparición de RA en el periodo post-trasplante

Receptores hepáticos en pre-trasplante del grupo RA presentaron tanto un porcentaje como cifras absolutas de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ totales significativamente inferiores en comparación con el grupo NRA. Igualmente, receptores renales en pre-trasplante con RA, presentaron tanto niveles porcentuales como cifras absolutas de linfocitos nTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ totales y T totales disminuidos en comparación a receptores renales NRA. Estos resultados reproducen los observados por numerosos estudios llevados a cabo durante los últimos 20 años tanto en series de receptores hepáticos como renales. Stenard *et al.* (2009) monitorizaron la evolución de linfocitos Treg CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ en pacientes pediátricos que recibieron un trasplante hepático. Establecieron que ya desde situación pre-trasplante, el análisis de estratificación demostró que aquellos pacientes que en el periodo post-trasplante tuvieron RA, presentaban porcentajes de nTregs disminuidos en comparación con pacientes NRA. Del mismo modo, en un estudio llevado a cabo por Kim *et al.* (2009), en donde se monitorizó la frecuencia y cifras absolutas de linfocitos Treg CD4⁺CD25^{high} en una población de receptores hepáticos y renales, observaron que tanto el porcentaje como cifras absolutas de linfocitos Treg de pacientes con RA fueron significativamente disminuidos en comparación con el grupo NRA para ambos tipos de trasplante.

En el subsecuente análisis realizado en nuestra serie de receptores se estudió el potencial papel de las subpoblaciones de linfocitos aTregs y nTregs como biomarcadores predictivos de RA. Niveles pre-trasplante de linfocitos aTreg respecto a linfocitos T CD4⁺ totales $\leq 1.5\%$ fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos de nuestra serie como alto riesgo de RA. El porcentaje pre-trasplante de linfocitos aTregs se correlacionó con un aumento en el riesgo de RA en 1.358 veces en comparación con receptores hepáticos que presentaron porcentajes inferiores a dicho valor. De igual modo, receptores hepáticos con cifras absolutas de linfocitos aTregs respecto a los linfocitos T CD4⁺ totales ≤ 21.08 células/mm³ en pre-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. El posterior análisis logístico univariante determinó que, receptores con un valor inferior a 21.08 células aTregs/mm³ pre-trasplante tuvieron un riesgo de RA aumentado en 1.259 veces comparado con receptores hepáticos con cifras absolutas de células aTregs superiores a 21.08 células/mm³. Recientemente, estos datos se publicaron

como parte de un estudio multicéntrico, en donde se propone la utilización de la subpoblación de linfocitos aTreg como biomarcador predictivo de RA (Boix *et al.*, 2015).

Del mismo modo que en el caso anterior, también se estudió el papel de los linfocitos nTregs como biomarcador predictivo de RA en pre-trasplante para receptores renales. En este sentido, según el AUC del análisis ROC, una frecuencia de nTregs $\leq 1.03\%$ respecto a linfocitos T CD4⁺ totales, así como también $\leq 0.7\%$ respecto a linfocitos T totales en pre-trasplante fueron capaces de discriminar a receptores renales como alto riesgo de RA. De nuevo, el análisis logístico univariante reveló que receptores renales con un porcentaje de linfocitos nTregs $\leq 1.03\%$ con respecto a los linfocitos T CD4⁺ totales presentaron un riesgo incrementado en 1.083 veces de RA. De igual modo, receptores renales con un porcentaje de células nTregs $\leq 0.7\%$ respecto a linfocitos T totales presentaron un riesgo incrementado en 1.121 veces a RA. Igualmente, también se valoró el papel de las cifras absolutas pre-trasplante de la subpoblación de nTregs como biomarcador predictivo de RA en receptores renales. Receptores renales en situación basal con cifras absolutas de linfocitos nTregs ≤ 7.32 células/mm³ respecto a los linfocitos T CD4⁺ totales, así como también ≤ 3.69 células/mm³ respecto a linfocitos T totales fueron capaces de discriminar de forma precisa a receptores renales como alto o bajo riesgo de RA. El modelo de regresión logística determinó, que receptores renales con cifras absolutas de linfocitos nTregs inferiores a 7.32 células/mm³ respecto a linfocitos T CD4⁺ totales presentaron un riesgo de RA 1.721 veces aumentado en comparación con aquellos receptores renales con niveles superiores a 7.32 células/mm³. De forma similar, cifras absolutas pre-trasplante de linfocitos nTregs inferiores a 3.69 células/mm³ respecto a linfocitos T totales en receptores renales fue identificado como un factor de riesgo independiente para RA. De este modo, el riesgo de RA se encontró incrementado 1.817 veces en receptores renales con cifras absolutas pre-trasplante de linfocitos nTregs respecto a linfocitos T totales inferiores a 3.69 células/mm³. Los datos pertenecientes a la cohorte de receptores renales de este trabajo de tesis fueron incluidos recientemente como parte de un estudio multicéntrico en donde se propuso el uso de los linfocitos Treg como biomarcador predictivo de RA en pre-trasplante (San Segundo *et al.*, 2014).

➤ Niveles *in vitro* pre-trasplante incrementados de CD38, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ discriminaron a receptores con alto riesgo RA

El análisis de estratificación realizado en nuestra serie de receptores hepáticos pre-trasplante reveló que los niveles de expresión de CD38 en linfocitos T CD8⁺ y CD154 en linfocitos T CD4⁺ de receptores hepáticos con RA presentaron niveles significativamente incrementados en comparación con los niveles en el grupo NRA. Por el contrario, niveles pre-trasplante de expresión de CD154 en linfocitos T CD8⁺ de receptores hepáticos con RA post-trasplante presentaron niveles significativamente disminuidos en comparación con los niveles en el grupo NRA. De igual modo, niveles pre-trasplante de expresión para las proteínas de membrana celular CD38 y CD95 en linfocitos T CD4⁺ de receptores renales que desarrollaron RA presentaron niveles significativamente superiores a los observados en receptores renales NRA. Los valores porcentuales de células CD4⁺CD154⁺, CD8⁺CD154⁺, CD8⁺CD38⁺, CD4⁺CD38⁺ y CD4⁺CD95⁺ fueron comparables a los observados en trabajos realizados en diferentes series de receptores hepáticos y renales (Wang *et al.*, 2005; Boleslawski *et al.*, 2008); reproduciendo también los datos observados en individuos sanos (Stalder *et al.*, 2003; Mancebo *et al.*, 2016).

El subsecuente análisis para la estratificación del riesgo de RA en función de los niveles pre-trasplante de expresión para las diferentes proteínas de membrana en receptores hepáticos y renales de nuestra serie, reveló que receptores hepáticos con niveles de expresión pre-trasplante de CD38 en linfocitos T CD8⁺ superiores a 41.94% presentaron un riesgo de RA 1.089 veces superior. Igualmente, aquellos receptores hepáticos que presentaron niveles de expresión pre-trasplante para CD154 en linfocitos T CD4⁺ superiores a 3.18% presentaron también un riesgo incrementado de RA, 3.363 veces superior en comparación con pacientes receptores con niveles por debajo de ambos puntos de corte. De forma inversa, niveles de expresión pre-trasplante de CD154 sobre linfocitos T CD8⁺ inferiores a 0.80% en receptores hepáticos se correlacionó con un incremento en el riesgo de RA en 1.517. Los resultados observados en nuestra serie de receptores hepáticos con respecto al valor predictivo de la molécula CD154 como biomarcador de RA concuerdan con dos estudios publicados recientemente. Ashokkumar *et al.* (2009) estudiaron el valor de la expresión de CD154 en células aloreactivas como potencial biomarcador para la estratificación del riesgo de RA en una población pediátrica de receptores hepáticos. En su cohorte de pacientes con RA, los niveles de expresión de CD154 se encontraban incrementados en pre-trasplante en comparación con la población

NRA. Además establecieron como punto de corte un valor de 1.33%. Valores pre-trasplante superiores a 1.33% se correlacionaron con un incremento en la incidencia de RA. En el segundo estudio, Sindhi *et al.*, 2012 analizaron el papel de la expresión de CD154 sobre linfocitos T CD8⁺ citotóxicos como biomarcador predictivo de RA en una población pediátrica de receptores hepáticos. En esta serie, los pacientes del grupo RA presentaron niveles de expresión de CD154 superiores a los observados en el grupo NRA. En el subsecuente análisis establecieron que un valor superior a 1.23% predijo la presencia de RA de forma significativa durante los primeros 60 días post-trasplante.

En cuanto a receptores renales de nuestra serie, el análisis de estratificación del riesgo reveló que niveles de expresión pre-trasplante de CD38 sobre linfocitos T CD4⁺ superiores a 75.11% incrementó el riesgo de RA en el periodo post-trasplante en 1.190 veces. Por último, niveles de expresión pre-trasplante de CD95 sobre linfocitos T CD4⁺ superiores a 63.41% incrementó el riesgo de receptores renales a RA en 1.212 veces superior en comparación con pacientes que exhibieron niveles inferiores a dicho punto de corte. Estos datos se han publicado recientemente, como parte de un estudio multicéntrico, en dos trabajos en donde proponemos el uso de la expresión *in vitro* de proteínas linfocitarias sobre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ como biomarcadores predictivos de RA pre-trasplante hepático y renal (Boix *et al.*, 2016 (b); Mancebo *et al.*, 2016).

- Niveles pre-trasplante disminuidos de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ así como también del número de moléculas CD28 en superficie de linfocitos T CD4⁺ discriminaron a receptores hepáticos y renales como alto riesgo de RA

De acuerdo con datos previamente publicados por nuestro grupo (García-Alonso *et al.*, 1997; Blanco-García *et al.*, 2011), los datos en receptores hepáticos en nuestra serie con RA en el post-trasplante presentaron un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ inferior comparado con los niveles de expresión en receptores NRA.

En este trabajo de tesis se ha introducido, de forma novedosa, la cuantificación del número de moléculas CD28 en cifras absolutas sobre linfocitos T CD4⁺, gracias a la utilización del kit comercial *QuantiBRITE™*. Esta aproximación es el resultado directo propuesto por nuestro grupo de investigación a raíz de los primeros trabajos publicados, en donde la IMF de CD28 directamente se correlacionó con la concentración de moléculas CD28 en linfocito T CD4⁺. En este estudio la CD28-IMF se encontraba sobre-expresada en receptores hepáticos que desarrollaron RA (García-Alonso *et al.*, 1997;

Minguela *et al.*, 2000; Blanco-García *et al.*, 2011). Gracias a la utilización de microbolas conjugadas con 4 niveles distintos y conocidos de fluorocromo PE se pudo interpolar el valor de IMF producida por el Ac anti-CD28 de las muestras de receptores. De acuerdo con esta metodología, los receptores hepáticos y renales, que sufrieron RA en post-trasplante presentaron un número de moléculas de CD28 en linfocito T CD4⁺ pre-trasplante significativamente inferior a las cifras absolutas de CD28 en el grupo NRA.

Tanto la expresión porcentual de CD28 como el número de moléculas CD28 sobre linfocito T CD4⁺ fueron introducidos en el subsecuente análisis para la validación de su uso como biomarcadores predictivos de la aparición de RA. En este sentido, el análisis del AUC estableció los puntos de corte por el cual receptores hepáticos y renales fueron estratificados como alto o bajo riesgo de RA. Receptores hepáticos con un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ $\leq 41.94\%$ presentaron un riesgo aumentado de RA 1.286 veces superior en comparación a receptores hepáticos con porcentajes superiores a dicho valor. Del mismo modo, receptores hepáticos con un n° de moléculas CD28 sobre linfocito T CD4⁺ en situación pre-trasplante < 8359 presentaron un riesgo de desarrollar RA 1.152 veces superior a receptores hepáticos con un n° de moléculas CD28 superiores a dicho valor. Igualmente, receptores renales de nuestra serie con un n° de moléculas de CD28 en linfocitos T CD4⁺ pre-trasplante < 7669 presentaron un riesgo de RA aumentado 1.419 veces comparado con receptores con cifras absolutas de CD28 superiores a dicho valor. Estos resultados propios se han publicado recientemente, en donde proponemos el uso de la expresión porcentual y el n° de moléculas de CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ como potencial biomarcador predictivo de RA en pre-trasplante [Boix *et al.*, 2016(c)].

5.3.2. Monitorización de la función inmunitaria pre-trasplante de pacientes con enfermedad hepática y renal terminal y su papel en la predicción de INF

En el siguiente apartado se encuentran descritas las conclusiones obtenidas del análisis de datos con relación a la incidencia de INF en función de los niveles pre-trasplante de los biomarcadores propuestos en este trabajo de tesis. Tanto los receptores hepáticos como renales desarrollaron a lo largo de periodo de estudio episodios de INF debido al tratamiento inmunosupresor administrado. Como se describe en el apartado de resultados y al principio de las conclusiones, la etiología de los procesos infecciosos fue cambiando durante el periodo del estudio. Ya que la mayor frecuencia de episodios de

INF se concentró durante el periodo de mantenimiento post-trasplante, es en este periodo en donde el análisis de biomarcadores fue centralizado.

- Niveles pre-trasplante disminuidos de las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺CD69⁺IL-10⁺, CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ en receptores se asociaron con un mayor riesgo post-trasplante de desarrollar INF

El análisis de estratificación para los grupos de estudio con y sin presencia de INF pre-trasplante reveló que receptores hepáticos que desarrollaron INF en el post-trasplante presentaron, en situación basal, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con una capacidad significativamente disminuida de producir IL-10 e IFN γ en comparación con receptores NoINF. Del mismo modo, receptores renales en pre-trasplante también presentaron menor capacidad productiva de IL-10 en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ y CD8⁺CD69⁺, así como también de IFN γ en linfocitos T CD4⁺CD69⁺ tras estimulación *in vitro*, en comparación con receptores renales NoINF durante el periodo post-trasplante.

Los linfocitos T CD8⁺, a menudo referidos como linfocitos T citotóxicos, tienen un papel importante en el control de infecciones contra virus, así como contra otro tipo de patógenos intracelulares (Williams *et al.*, 2006). Los linfocitos T CD8⁺ se activan vía TCR + señales co-estimuladoras durante la presentación antigénica vía MHC-I. Una vez activados vía TCR o en respuesta a IL-12 e IL-18, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos producen gran cantidad de IFN γ que a su vez incrementa la expresión de moléculas MHC-I haciendo de esta forma que las células infectadas se vuelvan más sensibles a la lisis por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Glimcher *et al.*, 2004). Los linfocitos T CD8⁺ también presentan una función muy importante en la modulación de la respuesta inmunitaria frente a tumores, infecciones virales y patógenos intracelulares. En presencia de un entorno rico en IL-4 o IL-12 se induce una polarización de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺IFN γ ⁺ en CD8⁺IL-10⁺. Esta subpoblación de linfocitos T CD8⁺ secretores de IL-10 se les ha atribuido una función supresora dependiente de contacto inhibiendo la proliferación de otras subpoblaciones linfocitarias (Noble *et al.*, 2006). Estas células CD8⁺ Treg se las ha caracterizado fenotípicamente por presentar marcadores típicos de células más inmaduras, tales como, CD25, CD28, CD38, CD44^{low}, CD45RB^{high} y CD69 (Noble *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2013). Por otro lado, los linfocitos T CD4⁺ pueden adoptar una gran variedad de funciones en función de su fenotipo efector (T_H1, T_H2, T_H17, Treg). En este sentido, linfocitos T_H2 son capaces de secretar IL-10, la cual se

le ha establecido un papel regulador durante los procesos infecciosos producidos por bacterias, virus, protozoos, hongos y helmintos (Couper *et al.*, 2008). Así, linfocitos T CD4⁺ productores de IL-10 regularían dichas respuestas reduciendo una respuesta tipo T_H1 y CD8⁺ citotóxica excesiva modulando la producción de IFN γ y evitando el daño tisular derivado de una excesiva respuesta inmunitaria contra el patógeno (Fiorentino *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 2001).

Debido al crucial papel que estas dos citocinas presentan durante procesos infecciosos, quisimos valorar su función como biomarcador predictivo para la aparición de INF post-trasplante en función de los niveles basales de IL-10 e IFN γ . El análisis de AUC realizado reveló que receptores hepáticos con un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ inferior a 30.66% presentaron mayor susceptibilidad a desarrollar INF y, por ello, se les clasificó dentro del grupo de alto riesgo. El análisis de regresión logística univariado determinó que receptores hepáticos con un porcentaje inferior a 30.66% presentaron un riesgo aumentado en 1.807 veces a desarrollar INF en el subsecuente periodo post-trasplante. Del mismo modo, receptores hepáticos con niveles basales de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ inferiores a 13.58% fueron clasificados como alto riesgo de desarrollar INF post-trasplante. Tras el análisis logístico, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ fue caracterizado como factor independiente en el incremento de la susceptibilidad de desarrollar INF. Receptores hepáticos con niveles pre-trasplante inferiores a 13.58% presentaron un riesgo aumentado en 1.755 veces en comparación con receptores que presentaron niveles superiores a 13.58%. En nuestra serie de receptores renales los resultados fueron similares a los observados en la serie de receptores hepáticos. Porcentajes pre-trasplante de las subpoblaciones CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ por debajo de 18.40% y 11.20%, respectivamente; fueron capaces de discriminar a receptores renales de forma precisa como población susceptible a desarrollar INF post-trasplante. En el posterior análisis, el modelo de regresión logística determinó que estas dos subpoblaciones linfocitarias representaban, de forma independiente, un marcador de riesgo para el desarrollo de INF. De este modo, receptores renales con porcentajes pre-trasplante de células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IL-10 por debajo de 18.40% y 11.20% se correlacionaron con un incremento en el riesgo de desarrollar INF post-trasplante en 1.647 y 1.533, respectivamente. Del mismo modo, receptores renales con porcentajes pre-trasplante de CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ inferiores a 25.12% presentaron mayor susceptibilidad a INF post-trasplante. El análisis de regresión logístico, en concreto, estableció que dichos receptores renales presentaron un riesgo de

INF post-trasplante incrementado en 1.798 veces en comparación con pacientes receptores con porcentajes de CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ superiores a 25.12%.

Los datos observados en nuestras series de pacientes receptores se basan en ensayos funcionales capaces de valorar la capacidad productiva para distintas citocinas. Sin embargo, nuestros resultados van en la misma dirección a los observados por el grupo de Fernández-Ruiz *et al.* (2009), en donde estudiaron el porcentaje de linfocitos T en pre-trasplante en una serie de receptores hepáticos como biomarcador predictivo de INF post-trasplante. En este sentido, un recuento de linfocitos totales, linfocitos T CD3⁺ así como CD4⁺ disminuidos pre-trasplante se correlacionó con el riesgo de INF post-trasplante.

➤ Niveles solubles pre-trasplante de IL-10 en sobrenadante de cultivo de receptores hepáticos se correlacionaron con aumento en el riesgo de INF

En este apartado se discutirán los resultados del análisis de estratificación de receptores hepáticos INF y NoINF respecto a niveles solubles pre-trasplante de IL-10 en sobrenadante de cultivo tras estimulación *in vitro*. De nuevo, leucocitos periféricos totales de receptores hepáticos del grupo INF presentaron, en pre-trasplante, una capacidad productiva y secretora de IL-10 en sobrenadante de cultivo significativamente disminuida a la del grupo NoINF. En el análisis para la estratificación de receptores hepáticos en alto o bajo riesgo de INF se determinó que niveles solubles pre-trasplante de IL-10 en sobrenadante de cultivo inferiores a 50.49 pg/ml fue capaz de discriminar de forma precisa a receptores hepáticos con una mayor susceptibilidad de INF. Posteriormente, se determinó que receptores hepáticos con niveles de IL-10 < 50.49 pg/ml presentaron un riesgo 1.918 veces aumentado de INF post-trasplante en comparación con aquellos receptores hepáticos con niveles de IL-10 superiores a dicho valor. Estos datos concuerdan con los observados en otras series de receptores, en este caso renales, en donde aquellos pacientes que presentaron un mayor riesgo de INF, produjeron menor cantidad de IL-10 en cultivo tras estimulación *in vitro* (Brunet *et al.*, 2007).

➤ Niveles pre-trasplante aumentados de linfocitos nTregs en receptores hepáticos y renales se correlacionó con un incremento en la incidencia de INF post-trasplante

Tanto el porcentaje como cifras absolutas (células/mm³) pre-trasplante de la subpoblación de linfocitos nTregs de receptores hepáticos y renales que desarrollaron INF en el post-trasplante fueron significativamente superiores en comparación con los niveles

de la población NoINF. La subpoblación linfocitaria nTregs juega un papel importante limitando las respuestas inflamatorias y por consiguiente el subsecuente daño tisular derivado de una exacerbada respuesta inmunitaria (Belkaid y Tarbell, 2009). Infecciones de tipo viral y bacteriana inducirían el incremento de la subpoblación de linfocitos nTregs para controlar la respuesta inmune del huésped. En este sentido se piensa que la persistencia y cronificación de determinados estados infecciosos pueden, en cierta medida, deberse al efecto inmunosupresor ejercido por el incremento en la subpoblación de linfocitos nTregs (Belkaid *et al.*, 2002; Suvas *et al.*, 2004). Otro dato que apoyaría esta teoría sería la rápida acumulación de linfocitos CD4⁺ nTregs en el lugar de la infección, además de que se tiene constancia de una migración activa. Recientemente, se ha descrito un aumento de la quimiocina CCR5 tras infección por *Leishmania major*. En este sentido, la subpoblación de linfocitos nTregs preferentemente expresan CCR5 y responden de forma muy eficiente a los ligandos de CCR5, MIP-1 α , MIP-1 β o RANTES *in vitro* (Yurchenko *et al.*, 2006).

El análisis inicial reveló que tanto receptores hepáticos como renales con mayor susceptibilidad a desarrollar INF post-trasplante presentaron niveles basales incrementados de la subpoblación de linfocitos nTreg. En el subsecuente análisis, se valoró el potencial uso del porcentaje basal de linfocitos nTreg como biomarcador predictivo de INF. El análisis de la curva ROC determinó el valor de corte, tanto en receptores hepáticos como renales, que mejor discriminó a éstos como alto o bajo riesgo de INF post-trasplante. En este sentido, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos nTregs con respecto a los linfocitos totales superiores 0.42% en pre-trasplante, así como niveles de linfocitos nTregs superiores a 3.42 células/mm³ respecto a linfocitos totales, discriminaron a los pacientes como alto riesgo de INF. El posterior análisis de regresión logística estableció que receptores hepáticos con un porcentaje pre-trasplante de linfocitos nTregs superior a 0.42% con respecto a linfocitos totales, presentaron un riesgo 1.136 veces mayor de INF que receptores hepáticos con cifras inferiores a dicho valor. Del mismo modo, receptores hepáticos con cifras absolutas pre-trasplante de linfocitos nTregs superiores a 3.42 células/mm³ presentaron un riesgo 1.019 veces aumentado de desarrollar INF post-trasplante. Por otro lado, tanto la frecuencia (%) como las cifras absolutas (nº células/mm³) de linfocitos nTregs con respecto a los linfocitos totales de SP de receptores renales en pre-trasplante se evaluaron para determinar su utilidad como biomarcador predictivo de INF post-trasplante. En este sentido, tanto un porcentaje como cifras absolutas pre-trasplante de linfocitos nTregs > 0.95% y 13.87 células/mm³,

respectivamente; con respecto a linfocitos totales, identificaron a receptores renales con mayor susceptibilidad de INF post-trasplante. El posterior modelo de regresión logística determinó que receptores renales con un porcentaje pre-trasplante de linfocitos nTregs respecto a linfocitos totales superior a 0.95% presentaron un riesgo aumentado en 1.366 veces de INF; mientras que, receptores renales con cifras absolutas pre-trasplante de linfocitos nTregs con respecto a linfocitos totales superiores a 13.87 células/mm³ presentaron una susceptibilidad aumentada en 1.211 veces a desarrollar INF.

- Niveles pre-trasplante aumentados de las proteínas de superficie CD25 y CD69 en linfocitos T CD8⁺ de receptores se correlacionaron con un incremento en la susceptibilidad de INF post-trasplante

En este apartado se discuten los resultados obtenidos del estudio realizado para la validación de las moléculas de superficie celular CD25 y CD69 y su potencial uso como biomarcadores predictivos de INF post-trasplante en trasplante hepático y renal. En este sentido, receptores hepáticos con INF post-trasplante presentaron porcentajes basales de CD25 y CD69 sobre linfocitos T CD8⁺ significativamente aumentados, tras estimulación *in vitro* con ConA, en comparación con el grupo NoINF. Del mismo modo, receptores renales INF, presentaron porcentajes pre-trasplante de CD25 sobre linfocitos T CD8⁺ significativamente incrementados, tras estimulación *in vitro* con ConA, en comparación con el grupo NoINF. Los niveles de expresión basal de CD25 y CD69 de receptores hepáticos y renales fueron significativamente superiores a los niveles observados en la población de control. Estos datos se asemejan a los observados en otras series de receptores hepáticos (Demirkiran *et al.*, 2005), aunque contrarios a los observados en otras series de receptores renales (Stalder *et al.*, 2003). Ejemplos de proteínas de superficie en donde su expresión se encuentra aumentada después de que los linfocitos se hayan activado y se encuentren en fase proliferativa incluirían CD25 y CD69 entre otros (Palutke *et al.*, 1989 y Testi *et al.*, 1989). Los marcadores celulares CD25 y CD69, por tanto, han sido recientemente propuestos como biomarcadores para la evaluación del estado de activación linfocitario en receptores, ya que su expresión varía en función del tratamiento inmunosupresor recibido o del mismo modo por los eventos clínicos acontecidos en post-trasplante (Barten *et al.*, 2007; Brunet *et al.*, 2007; Shipkova *et al.*, 2012). La mayoría de los estudios publicados en este aspecto, se centran principalmente en la utilización de estos marcadores celulares de activación para la evaluación del riesgo

de RA, pero poco hay publicado sobre el uso de marcadores celulares linfocitarios y su papel en la predicción de INF post-trasplante. En este sentido, recientemente se publicaron los resultados de un estudio prospectivo realizado en una población de receptores hepáticos, en donde se monitorizó la expresión de las moléculas CD38 y CD95 en pacientes con enfermedad activa por citomegalovirus (Wang *et al.*, 2010).

En el subsecuente análisis realizado en nuestra serie se evaluaron los niveles pre-trasplante de CD25 y CD69 en receptores hepáticos y CD25 en receptores renales y su papel en la predicción de INF post-trasplante. En este sentido, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ pre-trasplante superior a 29.83% fueron clasificados dentro del grupo con susceptibilidad aumentada a INF post-trasplante. Del mismo modo, receptores hepáticos con un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺>38.22% se clasificaron también en el grupo de alto riesgo de INF post-trasplante. El análisis de regresión logística determinó que receptores hepáticos con porcentajes pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ y CD8⁺CD69⁺ superiores a 29.83% y 38.22%, presentaron un riesgo aumentado de INF post-trasplante en 1.084 y 1.076, respectivamente. Del mismo, según el AUC del análisis ROC, un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ superiores a 25.19% fue capaz de discriminar a receptores renales como alto riesgo de INF. Un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ superior a 25.19% fue caracterizado como factor independiente de riesgo que incrementó la susceptibilidad a INF post-trasplante en 1.111. Recientemente, estos datos se incluyeron en un estudio multicéntrico, en donde receptores renales con INF presentaron porcentajes de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ significativamente incrementados en comparación con NoINF. Aunque estas diferencias fueron significativas durante el 1^{er} mes post-trasplante, ya en situación basal se observó la misma tendencia. En concreto aquellos pacientes que presentaron INF de tipo viral fueron los que experimentaron un mayor incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ (Mancebo *et al.*, 2016).

- Porcentaje y cifras absolutas pre-trasplante aumentados de la molécula CD28 en linfocitos T CD4⁺ periféricos se correlacionan con un incremento en la incidencia de INF post-trasplante en receptores hepáticos

Receptores hepáticos que durante el periodo post-trasplante desarrollaron INF, presentaron, tanto en porcentaje como cifras absolutas pre-trasplante de la molécula CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ de SP, significativamente aumentados en comparación con

el grupo NoINF. Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo con respecto al grado de expresión de CD28 y presencia/ausencia de infección tanto por CMV, VHC, bacteriana y fúngica han puesto de manifiesto la utilidad de la monitorización de la molécula CD28 en pacientes receptores con INF. En este sentido, tanto receptores hepáticos como cardíacos presentaron un incremento en la IMF de CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ en pacientes que presentaron INF post-trasplante de etiología bacteriana, fúngica y/o viral distinta a CMV. Este incremento fue acusado en aquellos pacientes que a su vez desarrollaron RA (Blanco-García *et al.*, 2011). Igualmente, también se correlacionó la reinfección VHC con un incremento en la IMF de CD28 en células T CD4⁺ de receptores hepáticos con RA (Minguela *et al.*, 2006).

Tanto el porcentaje de expresión como las cifras absolutas de moléculas CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ se analizaron en los grupos INF y NoINF, independientemente de si desarrollaron o no RA. En este sentido, después del análisis de estratificación, se valoró el papel del porcentaje pre-trasplante de linfocitos T periféricos CD4⁺CD28⁺, así como también del nº de moléculas CD28 en membrana de linfocito T CD4⁺ como biomarcador predictivo del riesgo de INF. En este sentido, el AUC del análisis ROC determinó que, receptores hepáticos con un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ SP superior a 38.31%, así como con un nº de moléculas CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺ superior a 10086, presentaron una mayor susceptibilidad a INF y, por ello, se clasificaron dentro del grupo de alto riesgo. Posteriormente, tanto el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD28⁺, así como el nº de moléculas CD28 por membrana de linfocitos T CD4⁺, se identificaron como factores independientes de riesgo pre-trasplante de INF. En este sentido, receptores hepáticos con un porcentaje pre-trasplante de células T CD4⁺CD28⁺ mayor a 38.31% presentaron una susceptibilidad aumentada en 1.155 veces comparado con los receptores que presentaron porcentajes de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ inferiores a dicho valor. De forma similar, receptores hepáticos con cifras basales de CD28 en membrana de linfocito T CD4⁺ superiores a 10086 fue asociado con un incremento en el riesgo en 1.471 veces de INF post-trasplante en comparación con receptores hepáticos con una expresión de moléculas CD28 inferior a dicho valor.

5.3.3. Monitorización de la función inmunitaria de receptores hepáticos que en situación basal que desarrollaron recurrencia de VHC

Como se describe en esta memoria de tesis, once de los pacientes que fueron sometidos a trasplante hepático debido a cirrosis hepática por VHC sufrieron recurrencia de VHC en post-trasplante. Se ha estimado que entre un 50% y 80% de receptores hepáticos desarrollan reinfección VHC, causando una progresión acelerada de cirrosis del injerto que finalmente produce pérdida del mismo (König *et al.*, 1992). Uno de los objetivos de este trabajo fue valorar el papel de los biomarcadores propuestos en esta tesis como predictivos de recidiva VHC. En esta sección se discutirán los resultados en relación a que biomarcadores fueron capaces de discriminar a receptores hepáticos pre-trasplante con alto riesgo de recurrencia de VHC.

- Receptores hepáticos con recidiva VHC muestran una mayor capacidad de síntesis intracelular de IL-17 por parte de linfocitos T CD4⁺CD69⁺ así como mayor capacidad secretora de IL-17 tras estimulación *in vitro*

Receptores hepáticos incluidos en nuestra serie de estudio que desarrollaron recidiva VHC presentaron, en situación basal, un porcentaje incrementado de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ en comparación con el porcentaje observado en el grupo control, tras estimulación *in vitro*. Estudios previos corroboran los resultados descritos en nuestra serie. Basha *et al.* (2011) llevaron a cabo un estudio en el cual determinaron que, pacientes con trasplante hepático con recurrencia de VHC presentaron niveles de células T CD4⁺ productoras de IL-17 superiores a los sujetos control. De igual modo, receptores hepáticos de nuestra serie que tuvieron recidiva por VHC presentaron una capacidad secretora de IL-17 en sobrenadante de cultivo significativamente superior en comparación con receptores hepáticos NVHC en pre-trasplante. Estudios recientes han demostrado que la infección por VHC produce un incremento de los niveles de IL-17 a través de varios mecanismos. En concreto, la lipoproteína tímica estromal (TSLP, del inglés *thymic stromal lymphopoietin*) secretada por hepatocitos infectados por el VHC produce un activación de células monocíticas *in vitro*, las cuáles secretan gran cantidad de citocinas que intervienen en la diferenciación de linfocitos T_H17, tales como TGFβ, IL-6 e IL-21 (Lee *et al.*, 2013). Resultados similares se han informado por el grupo de Wang *et al.* (2013), en donde estudiaron el papel de la proteína Tim-3 (del inglés *T cell immunoglobulin and mucin domain*), la cual actúa modulando la respuesta inmunitaria

contra infecciones virales previniendo una activación excesiva por parte de linfocitos y, por lo tanto, evitando el posible daño tisular del tejido infectado. Monocitos humanos de pacientes infectados por VHC presentaron una expresión incrementada de la proteína Tim-3 junto con el gen responsable de la producción de IL-23, necesaria para la diferenciación de linfocitos T_H17 . En otro estudio llevado a cabo por Sousa *et al.* (2012), en pacientes infectados por VHC se demostró que, en comparación con el grupo control, pacientes infectados por VHC presentaron niveles séricos de IL-17A aumentados aunque las diferencias no fueron significativas. Igualmente, pacientes con niveles mayores de la enzima hepática ALT tuvieron una concentración plasmática de IL-17F estadísticamente superior que aquéllos con niveles de ALT dentro de los rangos de normalidad.

En el subsecuente análisis realizado en nuestra serie, se analizó el papel que tanto la expresión de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-17^+$ así como también la concentración de IL-17/IL-17A presentaron como biomarcadores predictivos de recidiva VHC en pre-trasplante. Según el AUC del análisis ROC, un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-17^+ > 2.77\%$ fue capaz de discriminar a receptores hepáticos por VHC como alto riesgo de desarrollar recidiva de VHC post-trasplante. Del mismo modo, una concentración pre-trasplante de IL-17 en sobrenadante de cultivo superior a 178.8 pg/ml estratificó a receptores hepáticos por VHC como alto riesgo de desarrollar recidiva. Posteriormente, el análisis de regresión logística correlacionó tanto el porcentaje pre-trasplante de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-17^+$ como la concentración de IL-17 en sobrenadante de cultivo con un incremento en el riesgo de desarrollar recidiva VHC. En este sentido, receptores hepáticos con un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T $CD4^+CD69^+IL-17^+$ superior a 2.77% presentaron un riesgo de desarrollar recidiva post-trasplante de 3.050 veces superior en comparación con receptores hepáticos con porcentajes inferiores a dicho valor. Del mismo modo, receptores hepáticos por VHC con concentraciones pre-trasplante de IL-17 superiores a 178.8 pg/ml presentaron un riesgo 1.023 veces incrementado de desarrollar recidiva post-trasplante en comparación con receptores hepáticos que presentaron concentraciones inferiores a dicho valor.

- Receptores hepáticos con reinfección por VHC presentaron porcentajes pre-trasplante disminuidos de linfocitos T de memoria efectores $CD8^+CD154^+$ tras estimulación *in vitro*

Tras la estimulación *in vitro* con Con-A de SP total de receptores hepáticos con y sin recurrencia VHC, pacientes receptores VHC presentaron un menor porcentaje de linfocitos T CD8⁺ efectores de memoria, capaces de expresar la molécula CoS de membrana, CD154. Estas diferencias en el porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺ efectores fueron significativas entre ambos grupos de estudio de pacientes VHC y NVHC. Los linfocitos T CD8⁺ de memoria tanto central como efectora que expresan CD154 han sido recientemente descritos como importantes células efectoras modulando la respuesta inmunitaria adaptativa frente a infecciones intracelulares. Esta subpoblación de linfocitos T CD8⁺ se les ha atribuido distintas funciones efectoras, tales como activación de CPAs y exhibir un patrón de expresión de citocinas similares al de linfocitos T CD4⁺, y además no presentaría típicas funciones citotóxicas (Frentsch *et al.*, 2013). Se ha teorizado que linfocitos T CD8⁺CD154⁺ podrían activar directamente linfocitos T CD4⁺CD40⁺ en ausencia de CDs e igualmente, linfocitos T CD8⁺CD154⁺ podrían activar CPAs que expresen la proteína de superficie CD40 en ausencia de linfocitos T CD4⁺; de hecho esta última interacción parece ser necesaria para poder producir una máxima activación de los linfocitos T CD4⁺ colaboradores (Hernandez *et al.*, 2007). En un estudio llevado a cabo por el grupo de Kurokohchi *et al.* (2003) en pacientes infectados por VHC, determinaron que éstos presentaban porcentajes significativamente disminuidos en SP de linfocitos T efectores de memoria CD8⁺CD154⁺ en comparación con los porcentajes de linfocitos T inmaduros CD8⁺CD28⁺. Nuestro siguiente paso fue analizar si un porcentaje pre-trasplante disminuido de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ se correlacionaba con un incremento en el riesgo de reinfección por VHC en nuestra serie de receptores hepáticos. Según el AUC del análisis ROC, un porcentaje pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ inferior a 2.78% fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de reinfección VHC. Posteriormente, el análisis de regresión logística determinó que receptores hepáticos VHC con porcentajes pre-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ inferiores a 2.78% tuvieron un riesgo aumentado en 1.328 veces comparado con receptores NVHC.

5.3.4. Monitorización de la función inmunitaria post-trasplante de receptores hepáticos y renales y su papel en la predicción de rechazo agudo temprano así como también en la monitorización de pacientes de alto riesgo

Como se describe al inicio de la discusión de esta memoria, la mayor frecuencia de episodios de RA ocurrieron durante el 1^{er} mes post-trasplante en ambos grupos de

receptores incluidos. Es por ello que el análisis de validación de biomarcadores farmacodinámicos capaces de monitorizar la función inmunitaria se centró en el periodo de mayor incidencia de RA, en este caso, en el 1^{er} mes post-trasplante. Durante las primeras semanas post-trasplante los receptores fueron monitorizados de forma más exhaustiva, debido precisamente a que el riesgo de RA es mayor. De este modo se pudo obtener datos fiables de los cambios producidos en las diferentes subpoblaciones linfocitarias así como de sus productos de secreción y marcadores de expresión fenotípica inmediatamente después del alo-trasplante.

➤ Linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de receptores que desarrollaron RA temprano presentaron mayor capacidad productiva de IL-2, IL-17 e IFN γ

Receptores hepáticos incluidos en nuestra serie que desarrollaron RA temprano presentaron porcentajes post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ significativamente superiores al grupo NRA a los 7, 15 y 30 días post-trasplante. Del mismo modo, el grupo RA también presentó un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ significativamente superior comparado con el grupo NRA a los 7, 15 y 30 días post-trasplante. Igualmente, receptores hepáticos del grupo RA también presentaron un porcentaje post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ significativamente superior al grupo NRA tanto a los 7, 15 como a los 30 días.

De igual modo, receptores renales con RA temprano presentaron porcentajes de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-2⁺ significativamente incrementados a los 7, 15 y 30 días post-trasplante en comparación con el grupo NRA. De forma similar, receptores renales con RA también presentaron un porcentaje aumentado de la población CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺, así como también CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ a los 7, 15 y 30 días.

Porcentajes incrementados de linfocitos T de memoria efectora productores de IFN γ en receptores de órganos se ha correlacionado con un incremento en el riesgo de desarrollar RA en post-trasplante y con una peor evolución del injerto durante el 1^{er} año del trasplante. Esta subpoblación de linfocitos T CD45RO⁺ productores de IFN γ representan un grupo de células sensibilizadas por los Ags presentes en el injerto que se expanden y activan de forma más acelerada que linfocitos *naïve* CD45RA⁺, la cual ha sido propuesta como potencial biomarcador para la monitorización de la respuesta alogénica contra el injerto (Gebauer *et al.*, 2002). En los últimos años numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la monitorización de linfocitos T productores de IFN γ como marcador de rechazo, pero específicamente qué subpoblación linfocitaria

es responsable de sintetizar y secretarla no está claro. En este sentido, la utilización de citometría de flujo para analizar los cambios en la producción de IFN γ intracelular en células T aloreactivas ha sido propuesto como técnica idónea para el estudio de biomarcadores del riesgo de RA (Okanami *et al.*, 2012).

Uno de los objetivos de esta memoria de tesis es la validación de la producción de IFN γ por parte de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en receptores durante el período post-trasplante como biomarcador predictivo de RA temprano. En este sentido, la capacidad productiva de IFN γ por parte de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tras estimulación *in vitro* fue capaz de discriminar tanto a receptores hepáticos y renales como alto o bajo riesgo de RA temprano, en función del porcentaje de CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ y CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ durante el 1^{er} mes post-trasplante. Un porcentaje medio de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ superior a 11.95% en receptores hepáticos y superior a 26.48% en receptores renales durante el 1^{er} mes post-trasplante fueron capaces de discriminar a pacientes como alto riesgo de RA. Igualmente, pacientes receptores renales con un porcentaje medio de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ superior a 32.7% en el 1^{er} mes post-trasplante fueron estratificados como alto riesgo de RA temprano. Posteriormente, se determinó el riesgo asociado a RA con el incremento en los porcentajes de ambas subpoblaciones de linfocitos T, CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ y CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺. De tal modo que, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ superiores a 11.95% en el 1^{er} mes post-trasplante presentaron un riesgo de RA aumentado en 1.223 veces comparado con receptores hepáticos con niveles inferiores a dicho valor. Del mismo modo, receptores renales que presentaron un porcentaje medio de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ y CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ superiores a 26.48% y 32.7% durante el 1^{er} mes presentaron un riesgo incrementado en 1.239 y 1.321 veces respectivamente, de RA temprano. Estudios recientes en una serie de receptores hepáticos estables con retirada de inmunosupresores, se observó que el porcentaje de CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ y CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ fue identificado como marcador específico para el riesgo de RA (Millán *et al.*, 2010). Este descubrimiento fue posteriormente corroborado en 2 series de estudio independientes de receptores hepáticos, uno unicéntrico (Millán *et al.*, 2013) y otro multicéntrico (Millán *et al.*, 2014), en donde se incluyeron los datos correspondientes a receptores hepáticos y renales de nuestra serie. En este estudio multicéntrico, receptores con RA presentaron un aumento significativo temprano de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN γ en el 1^{er} mes post-trasplante previo al diagnóstico de RA por biopsia. En conclusión y en línea con los resultados del estudio prospectivo multicéntrico, el análisis del porcentaje pre- y post-

trasplante de células T $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$ y $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ puede identificar a receptores hepáticos y renales con alto riesgo de RA. Todos los pacientes que rechazaron el injerto presentaron porcentajes pre-trasplante de linfocitos T $CD4^+CD69^+IFN\gamma^+$ y $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$ por encima del valor de corte considerado como alto riesgo.

De igual modo que con las subpoblaciones de linfocitos T productores de $IFN\gamma$; también hemos validado el porcentaje de linfocitos T productores de IL-2 como biomarcador predictivo de RA temprano. Así, la monitorización de IL-2 intracelular en pre- y post-trasplante puede identificar receptores hepáticos y renales como alto riesgo de RA. Estudios previos han propuesto que el porcentaje de expresión de linfocitos T $CD3^+CD8^+IL-2^+$ podría ser un marcador específico para identificar a pacientes como alto riesgo de RA (Boleslawski *et al.*, 2004). En pacientes receptores estables, un incremento en el porcentaje de linfocitos T $CD8^+IL-2^+$ durante la retirada del tratamiento inmunosupresor fue identificado como preludio de RA (Millán *et al.*, 2010). Recientemente, en una cohorte de receptores hepáticos *de novo*, el porcentaje de linfocitos T $CD3^+CD8^+IL-2^+$ en el grupo de RA fue significativamente superior a los mismos en la población NRA a los 7 días post-trasplante (Millán *et al.*, 2013). En nuestra serie, un porcentaje medio de linfocitos T $CD8^+CD69^+IL-2^+$ superior a 20.08% en receptores hepáticos y superior a 24.38% en receptores renales en el 1^{er} mes post-trasplante fueron capaces de discriminar de forma precisa a receptores hepáticos y renales, respectivamente, como alto riesgo de RA temprano. Posteriormente, el análisis logístico determinó que receptores hepáticos con un porcentaje medio de linfocitos T $CD8^+CD69^+IL-2^+$ superior a 20.08% presentaron un riesgo aumentado de RA temprano en 1.228 veces en comparación con receptores hepáticos NRA. Igualmente, receptores renales con un porcentaje medio de linfocitos T $CD8^+CD69^+IL-2^+$ superior a 24.38% presentaron un riesgo aumentado de RA temprano en 1.278 veces en comparación con los receptores renales con porcentajes inferiores a dicho valor. En la misma línea que con los resultados obtenidos en el estudio multicéntrico prospectivo, en el cual los datos referentes a la subpoblación de linfocitos T $CD8^+CD69^+IL-2^+$ de nuestra serie fueron incluidos; receptores hepáticos y renales con RA presentaron un porcentaje post-trasplante significativamente aumentado de producción de IL-2 por parte de linfocitos T $CD3^+CD8^+CD69^+$. En conclusión y basados en nuestros datos, proponemos la monitorización intracelular de IL-2 de linfocitos T $CD3^+CD8^+CD69^+$ tanto en situación basal como en el 1^{er} mes post-trasplante, de receptores hepáticos y renales para identificar a los pacientes que presentan una mayor capacidad productora de IL-2 y que, por tanto, se

encuentren en una situación de alto riesgo de RA temprano necesitando una mayor vigilancia clínica e inmunológica y posiblemente un ajuste de la terapia inmunosupresora.

El último biomarcador predictivo de RA temprano analizado, en cuanto a la producción intracitoplasmática de citocinas, se corresponde al porcentaje de linfocitos T CD3⁺CD8⁺CD69⁺ productoras de IL-17. Los datos existentes en cuanto al papel de IL-17 como biomarcador para la monitorización de la función inmunitaria en el campo del trasplante todavía hoy en día son limitados; sin embargo cada vez más existen más datos que apoyan el importante papel que esta citocina presenta tanto en el desarrollo de rechazo como en el daño crónico del injerto secretando citocinas pro-inflamatorias como IL-17 e IL-22, proponiendo estrategias de mejora de la supervivencia del injerto a través de terapias inmunosupresoras dirigidas contra linfocitos T_H17 (Sullivan *et al.*, 2014). Recientemente, el grupo de investigación de van Besouw *et al.* (2015) ha demostrado que, particularmente a los pocos días después de un trasplante cardíaco, linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17 migran hacia el injerto cardíaco contribuyendo con el desarrollo de RA. En la misma línea que lo anteriormente expuesto, la citocina IL-17 fue asociada con el desarrollo de RA temprano en receptores renales. En este sentido, niveles elevados de IL-17 fueron detectados en el infiltrado mononuclear dos días después de la cirugía (Crispim *et al.*, 2009). Todos estos resultados obtenidos de estudios unicéntricos sugieren que IL-17 participa de forma activa en el desarrollo de RA temprano post-trasplante. Teniendo en cuenta todas las evidencias notificadas hasta la fecha, y en conjunción con los resultados obtenidos de los pacientes de nuestra serie, el siguiente análisis se centró en la utilidad del porcentaje medio de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ como biomarcador predictivo de RA temprano en receptores hepáticos. En este sentido, receptores con un porcentaje medio de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ superior a 4.14% durante el 1^{er} mes post-trasplante fueron clasificados de forma precisa dentro del grupo de alto riesgo de RA temprano. Posteriormente, un porcentaje medio de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ superior a 4.14% durante el 1^{er} mes post-trasplante se correlacionó con un incremento en el riesgo de RA en 2.080 veces. Es por ello que, nosotros proponemos que la monitorización de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-17⁺ durante el 1^{er} mes post-trasplante de receptores hepáticos puede ser de gran ayuda a la hora de predecir un evento de RA o monitorizar a aquellos pacientes considerados como alto riesgo. Esta estrategia podría ayudar a los clínicos a la hora de ajustar la dosis de inmunosupersión de acuerdo con los niveles de los biomarcadores predictivos de RA propuestos.

- Leucocitos de sangre periférica total cultivados *in vitro* con Con-A de receptores hepáticos que desarrollaron RA temprano post-trasplante presentaron una mayor capacidad secretora de IL-17A

Durante el primer mes post-trasplante se monitorizó la concentración soluble en sobrenadante de cultivo de IL-17 en los receptores hepáticos de nuestra serie. Tras estimular *in vitro* muestras de SP total con Con-A, se calculó la concentración de IL-17A secretada soluble en el sobrenadante. De tal modo que receptores hepáticos que desarrollaron RA temprano presentaron una concentración de IL-17A significativamente superior que la observada en la población con función estable del injerto a los 7, 15 y 30 días post-trasplante. Desde mucho antes de que se describieran los linfocitos T_H17, diferentes investigadores ya habían relacionado IL-17 con el desarrollo de RA (Abadja *et al.*, 2012). Una de las primeras evidencias que se tiene del papel de IL-17 durante los episodios de RA fue en un estudio en donde se describió la presencia de linfocitos T productores de IL-17 en el infiltrado obtenido del injerto de pacientes con RA (Van Kooten *et al.*, 1998). Más recientemente, se ha descrito un incremento de linfocitos T CD4⁺IL-17⁺ en biopsias renales de receptores con RA (Loverre *et al.*, 2011). En la misma línea, niveles séricos aumentados de IL-6, IL-17 e IL-23, junto con un aumento de IL-6, IL-8, IL-17, TGFβ y mieloperoxidasa en el injerto se han informado en receptores hepáticos y renales con RA (Crispim *et al.*, 2009 y Fabrega *et al.*, 2009). Con estos datos previamente notificados, y basándonos en los resultados de nuestra serie de receptores hepáticos, el siguiente paso fue validar si la cuantificación de IL-17A en sobrenadante de cultivo de SP durante 1^{er} mes post-trasplante puede ser utilizado como biomarcador predictivo de RA. De tal modo que receptores hepáticos con una concentración media de IL-17A superior a 195.04 ng/ml fueron clasificados de forma precisa como alto riesgo de RA temprano. Posteriormente se determinó que dichos pacientes presentaron un riesgo aumentado de RA temprano 1.318 veces superior a receptores hepáticos con una concentración media de IL-17A inferior a 195.04 ng/ml en el 1^{er} mes post-trasplante. Recientemente nuestro grupo incluyó estos datos dentro de un estudio multicéntrico, en donde proponemos la monitorización de IL-17A en sobrenadante de cultivo de receptores hepáticos como biomarcador predictivo de la aparición de RA temprano (Millán *et al.*, 2014). En este estudio, receptores hepáticos ya presentaron un aumento en la expresión de IL-17 desde los primeros días post-trasplante, y éste fue más acentuado en la 1^a semana post-trasplante y previo al desarrollo de RA. El incremento en la concentración de dicha

citocina se utilizó entonces como modelo predictivo de la aparición de RA durante el 1^{er} mes post-trasplante así como para estratificar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. En conjunción con los datos del estudio multicéntrico y los datos que en esta memoria se recogen, proponemos la monitorización de la concentración de IL-17A en sobrenadante de cultivo como biomarcador predictivo de RA en el 1^{er} mes post-trasplante.

- Porcentajes post-trasplante aumentados de células aTreg de receptores hepáticos y linfocitos nTreg de receptores renales se asocian con un incremento en el riesgo de RA temprano

En este apartado se exponen los resultados del análisis de los porcentajes de células aTreg y nTreg en receptores hepáticos y renales, respectivamente, y su papel en la monitorización de pacientes de alto riesgo en el 1^{er} mes post-trasplante, así como la utilidad de estas subpoblaciones linfocitarias como biomarcadores predictivos de RA temprano. En apartados anteriores se han discutido los resultados para ambas poblaciones linfocitarias en pre-trasplante. Desde los primeros días post-trasplante, se pudo observar un aumento en el porcentaje de linfocitos aTreg en SP de receptores hepáticos con RA. En concreto, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺CD62L⁺ con respecto a linfocitos y células T CD4⁺ totales de pacientes que tuvieron RA temprano fue significativamente superior a los 7, 15 y 30 días post-trasplante en comparación con receptores hepáticos con función estable del injerto. Este fenotipo de linfocito Treg activado se encuentra principalmente en tejidos periféricos una vez migran desde el timo y enseguida adquieren fenotipo característico efector y/o de memoria (Jonuleit *et al.*, 2001; Valmori *et al.*, 2005; Cambell y Koch, 2011). Recientemente, se ha realizado una clasificación más exhaustiva de las distintas subpoblaciones de linfocitos Treg en función de las características fenotípicas. En este sentido, Finney *et al.*, 2010 caracterizaron a la subpoblación de linfocitos Treg con fenotipo CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺ como efectores activados o aTregs. Sin embargo, esta subpoblación se le ha atribuido también características de células T activadas de memoria, puesto que ya entró en contacto con antígenos. Este compartimento de linfocitos aTregs podría estar compuesto a su vez por dos subgrupos celulares; por un lado células nTregs previamente activadas, y por otro lado células iTregs que se inducen hacia este fenotipo en SP en respuesta a Ags extraños. Recientemente, Sánchez-Rodríguez *et al.* (2014) describieron una subpoblación de linfocito Treg con función efectora y fenotipo de memoria central como

CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺CD62L⁺ residentes en la piel de humanos. Linfocitos T de memoria central expresan en menor grado la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y mayor porcentaje de la proteína de superficie CD95, en comparación con linfocitos nTreg más inmaduros convirtiéndoles más sensibles a la apoptosis. Recientemente, se ha teorizado que las células Tregs son más sensibles a la apoptosis de lo que inicialmente se pensaba, y que el mantenimiento de esta subpoblación de memoria en la periferia, más que a una larga vida, se debería a una alta tasa de recambio de esta subpoblación de células Treg, producidas a partir de otras poblaciones linfocitarias de memoria (Finney *et al.*, 2010). El incremento del porcentaje de linfocitos Treg de memoria central observado en nuestra serie de receptores hepáticos durante el 1^{er} mes concuerda con lo observado en receptores renales *de novo* en un estudio, en donde el porcentaje de linfocitos T de memoria central CD3⁺CD45RO⁺CD62L⁺ (T_{CM}) fue mayor que en pacientes que ya habían recibido un trasplante previo, en donde se observó un mayor número de linfocitos T de memoria efectora. Este incremento en el porcentaje de linfocitos T_{CM} fue acompañado de un incremento en el porcentaje de _{CM}Tregs (San Segundo *et al.*, 2010). El papel de los linfocitos Treg en el campo del trasplante ha sido ampliamente estudiado desde hace más de una década. En los últimos años ha tomado gran interés el uso de éstos como biomarcadores de tolerancia del injerto. En este sentido, San Segundo *et al.*, 2012 describieron que receptores renales con porcentajes de linfocitos Treg incrementados a los 6 y 12 meses post-trasplante mostraron una mejor supervivencia del injerto a los 4 y 5 años post-trasplante. Los datos recogidos en la bibliografía acerca de la monitorización post-trasplante de linfocitos Treg en el período post-trasplante, principalmente en trasplante renal y hepático, son a día de hoy contradictorios y un mayor número de estudios son necesarios para entender mejor la variación del porcentaje de linfocitos aTreg en SP, así como en el infiltrado del injerto (López-Hoyos *et al.*, 2016). Recientemente nuestro grupo publicó los datos de nuestros receptores hepáticos, en donde describimos que el porcentaje de linfocitos Treg CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺CD62L⁺ en el grupo de estudio de RA temprano fue significativamente superior al porcentaje observado en el grupo NRA (Boix *et al.*, 2015). En esta memoria de nuestra serie de receptores hepáticos se estudió el papel de linfocitos Treg CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺CD62L⁺ como biomarcador predictivo de RA temprano. De este modo, un porcentaje medio de linfocitos _{CM}Treg superior 1.14% con respecto a linfocitos T totales, así como también un porcentaje medio de linfocitos _{CM}Tregs superior a 2.07% con respecto a linfocitos T CD4⁺ en el 1^{er} mes post-trasplante fue capaz de diferenciar de forma específica a

receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Posteriormente, se determinó que receptores hepáticos con porcentajes de linfocitos $_{CM}Tregs$ superiores a 1.14% y 2.07% con respecto a linfocitos T totales y $CD4^+$ totales en el 1^{er} mes post-trasplante presentaron un riesgo de RA incrementado en 1.167 y 1.978, respectivamente. Estos datos fueron recogidos como parte de un estudio multicéntrico, en donde se propone el uso de linfocitos Treg $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$ de SP como biomarcador predictivo y de estratificación del riesgo de RA en el 1^{er} mes post-trasplante [Boix F *et al.*, 2016(a)].

Por otro lado, receptores renales de nuestra serie mostraron un porcentaje de linfocitos $nTreg$ $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$ respecto a linfocitos T totales significativamente incrementados a los 15 y 30 días post-trasplante en comparación con el grupo NRA. Igualmente, el porcentaje de linfocitos $nTregs$ con respecto a linfocitos T $CD4^+$ fue significativamente incrementado a los 7, 15 y 30 días post-trasplante en comparación con la población NRA. Recientemente y en un intento de unificar la nomenclatura de los linfocitos Treg, a los linfocitos $nTregs$ también se les ha nombrado como $tTregs$ (del inglés *thymus-derived Tregs*), derivados del Timo (Abbas *et al.*, 2013) y que migran desde el órgano linfático primario hacia órganos linfáticos periféricos. Esta sub-población se ha caracterizado como $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD27^+CD127^{low/-}$ fenotípicamente (Liu *et al.*, 2006; Miyara *et al.*, 2009). Sin embargo, los linfocitos $nTregs$ en cuanto migran hacia la periferia empiezan a expresar marcadores más propios de un fenotipo efector y/o de memoria (Huehn *et al.*, 2004; Cambell y Koch, 2011). Recientemente, ha sido descrito que tanto el % como las cifras absolutas de linfocitos $nTregs$ de receptores renales disminuyen de forma drástica en el 1^{er} mes post-trasplante en comparación con los niveles previos al trasplante (San Segundo *et al.*, 2014), aunque dichas cifras se recuperaron a partir del 2^o mes. Recientemente se ha descrito, en una cohorte de receptores hepáticos, un incremento en el % de linfocitos $nTregs$ en muestras de biopsias de pacientes que desarrollaron RA (Boer *et al.*, 2015). Por todo lo expuesto anteriormente, existen evidencias de que la subpoblación de linfocitos $nTregs$ podría ser utilizada como biomarcador predictivo de RA y, por ello, nos centramos en analizar si dicha subpoblación fue capaz de estratificar a receptores renales de nuestra serie como alto riesgo de RA. En este sentido, receptores renales con un porcentaje medio de linfocitos $nTregs$ respecto a linfocitos T totales superior a 0.83% y un % medio de linfocitos $nTregs$ respecto a linfocitos T $CD4^+$ totales superior a 1.39% en el 1^{er} mes post-trasplante fueron clasificados como alto riesgo de RA. En concreto, un incremento en la población de linfocitos $nTregs$ con respecto a linfocitos T totales superior a 0.83%, así

como también un aumento en la frecuencia de linfocitos nTregs con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales superior a 1.39%, se correlacionó con un aumento en el riesgo de RA en 4.221 y 1.589, respectivamente. Se ha publicado que altos niveles de linfocitos Tregs se correlacionan con mejor supervivencia a largo plazo [Kim *et al.*, 2009; San Segundo *et al.*, 2010(b)]. El uso de inhibidores de mTOR, como terapia de mantenimiento post-trasplante, ha sido asociado con un mantenimiento e incluso incremento de la población en SP de linfocitos Treg. Por el contrario, las terapias inmunosupresoras basadas en inhibidores de la calcineurina han sido asociadas con una disminución de linfocitos Treg en SP de receptores renales (Battaglia *et al.*, 2005; San Segundo *et al.*, 2006). Los resultados descritos en esta memoria indican que la monitorización tanto de la subpoblación de linfocitos nTregs en receptores renales como la subpoblación de linfocitos aTregs en hepáticos en el 1^{er} mes post-trasplante fue capaz de identificar a pacientes con alto riesgo de RA; por tanto proponemos, al igual que en otros estudios (Auchincloss, 2001; Taylor *et al.*, 2001; Graca *et al.*, 2002; Wood y Sakaguchi, 2003; Cottrez y Groux, 2004), el uso de ambas subpoblaciones de células Treg como biomarcador predictivo de RA, que podría ser efectivo en la implementación de un verdadero estado de tolerancia frente al injerto al personalizar terapia inmunosupresora.

- Porcentajes post-trasplante de expresión de linfocitos T CD4⁺CD154⁺, CD8⁺CD154⁺, CD4⁺CD38⁺, CD8⁺CD38⁺ y CD4⁺CD95⁺ tras estimulación *in vitro* de receptores predijeron la incidencia de RA temprano

Los linfocitos T juegan un papel central mediando en los procesos de RA del injerto a lo largo del post-trasplante (Ingulli, 2010; Shipkova y Wieland, 2012). Uno de los objetivos propuestos en esta tesis fue la validación de la expresión de determinadas proteínas de superficie que presentan una función clave en la activación linfocitaria, tales como las moléculas CD38 y CD154, o otras importantes en procesos de muerte celular programada por apoptosis, como CD95. En este sentido y, para poder realizar la validación de este panel de marcadores celulares, se obtuvieron muestras de SP durante el 1^{er} mes post-trasplante, procediendo inmediatamente a su activación *in vitro* con Con-A.

El análisis de la expresión de los marcadores celulares durante el 1^{er} mes post-trasplante demostró que receptores hepáticos con RA temprano presentaron porcentajes significativamente superiores de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ a los 7 y 15 días post-trasplante. Del mismo modo, linfocitos T CD8⁺CD154⁺ fueron significativamente

superiores a los 7 y 15 días post-trasplante en comparación con los porcentajes observados en la población NRA. De igual modo, receptores hepáticos con RA presentaron un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ significativamente superior al observado en el grupo NRA a los 7, 15 y 30 días post-trasplante.

El nivel de expresión de CD154 en linfocitos T citotóxicos de memoria donante-específicos se ha aprobado recientemente por la agencia de alimentación y medicamento americana (FDA, del inglés '*Food and Drug Administration*') mediante un ensayo de función celular *ex vivo* que podría ser utilizado para predecir el riesgo de RA en receptores hepáticos y de intestino menores de 21 años (Brunet *et al.*, 2016). Los datos de nuestra serie de receptores hepáticos adultos concuerdan con los datos publicados por el grupo de Ashokkumar *et al.* (2009) en receptores hepáticos pediátricos para la subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ y CD8⁺CD154⁺. Comparados con la población NRA, receptores hepáticos con RA presentaron cifras significativamente aumentadas de células T CD154 donante específicas distribuidas principalmente en el compartimento de linfocitos de memoria CD45RO⁺ tanto linfocitos colaboradores CD4⁺ como citotóxicos CD8⁺. El porcentaje de expresión de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ fue el marcador que de forma más específica pudo discriminar a pacientes de alto riesgo de RA. En otro estudio independiente realizado en pacientes pediátricos receptores de intestino, el porcentaje de la subpoblación de linfocitos T citotóxicos de memoria CD8⁺CD154⁺ también se correlacionó con el riesgo de desarrollar RA. En el mismo estudio se describió que pacientes tratados con alemtuzumab presentaron un nivel de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ por debajo del nivel de riesgo y se asoció con una menor incidencia de RA durante los primeros 90 días post-trasplante, en comparación con pacientes tratados con anti-timoglobulina humana (Sindhi *et al.*, 2012). En nuestro grupo de receptores hepáticos, un % medio de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ superior a 0.96% en el 1^{er} mes post-trasplante fue capaz de discriminar a receptores hepáticos como alto riesgo de RA. Del mismo modo, un porcentaje medio de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ superior a 1.24% en el 1^{er} mes post-trasplante discriminó de forma precisa a receptores hepáticos con RA. Tanto el porcentaje medio post-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ así como CD8⁺CD154⁺ fueron también, de forma independiente, capaces de predecir el riesgo de RA temprano. En este sentido, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ superior a 0.96% en el 1^{er} mes post-trasplante presentaron un riesgo de RA aumentado en 1.836 veces superior a receptores hepáticos con % inferiores a dicho valor. Del mismo modo, receptores hepáticos con un % de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ superior a 1.24% en el

1^{er} mes presentaron un riesgo de RA aumentado en 1.437 veces comparado a receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ inferior a dicho valor.

Por otro lado, la molécula de superficie CD38 también ha sido estudiada por varios grupos como potencial biomarcador predictivo de RA. En línea con los datos observados en nuestra serie, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ durante el post-trasplante inmediato presentó niveles significativamente incrementados en el grupo de RA frente al grupo NRA en receptores hepáticos (Boleslawski *et al.*, 2008). En el mismo estudio se valoró la expresión de CD28 en linfocitos T CD3⁺ pero estos resultados serán discutidos más adelante. Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ a los 14 días post-trasplante se correlacionó con el desarrollo de subsecuentes episodios de RA. Posteriormente, la frecuencia de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ fue independientemente asociada con RA. En un reciente estudio publicado por nuestro grupo, se informó que receptores hepáticos con RA presentaron un porcentaje post-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ incrementado a los 30 días post-trasplante [(Boix F *et al.*, 2016(b))]. En nuestra serie de receptores hepáticos incluidos en esta memoria de tesis, un porcentaje medio de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ superior a 47.64% durante el 1^{er} mes post-trasplante fue capaz de discriminar de forma precisa a receptores como alto riesgo de RA. El porcentaje post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ en receptores hepáticos también se asoció con aparición de RA temprano. En este sentido, receptores hepáticos con un % de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ superior a 47.64% presentaron mayor riesgo de RA en 1.213 veces más que los receptores con % de linfocitos T CD8⁺CD38⁺ inferiores a dicho valor.

En cuanto a la expresión de marcadores de superficie y su correlación con la aparición de RA temprano en receptores renales incluidos en esta memoria, observamos que pacientes del grupo de RA presentaron un % post-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ significativamente superiores a los 7 y 15 días en comparación con los niveles de expresión de CD38 sobre linfocitos T CD4⁺ observados en el grupo NRA. Del mismo modo, receptores renales con RA presentaron un % de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ significativamente superior a los 7, 15 y 30 días post-trasplante. La expresión de CD38 y CD95 sobre linfocitos T CD3⁺, ha sido ampliamente estudiada como marcadores de detección temprana de infección activa por CMV humano (Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010), así como también en relación con INF post-trasplante (Mancebo *et al.*, 2016). En cuanto el papel de molécula CD38 y su relación con la aparición de episodios de RA, ésta no ha sido ampliamente tan estudiada como en relación a la aparición de INF post-trasplante. Sin embargo, como se comentó para receptores hepáticos de nuestra serie,

recientemente se ha notificado que receptores hepáticos RA presentaron un % post-trasplante significativamente superior a pacientes NRA a los 14 y 30 días post-trasplante (Boleslawski *et al.*, 2008). Por el contrario, el papel de CD95 y su relación con el desarrollo de RA ha sido más ampliamente estudiado. En este sentido, en una serie de receptores hepáticos se observó que el nivel de expresión de CD95 sobre linfocitos T CD3⁺ así como la expresión de CD95 en su forma soluble (sCD95) en pacientes con RA fue significativamente superior en comparación con receptores NRA (Wang *et al.*, 2005). Del mismo modo, los datos referentes a la expresión de CD95 en linfocitos T CD4⁺ de receptores renales de nuestra serie se incluyeron en un estudio multicéntrico, en donde no solo la expresión de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ de la población RA fue significativamente superior en comparación con el grupo NRA, tanto en pre-trasplante como a los 7 días post-trasplante; sino que dicha diferencia pudo utilizarse como biomarcador predictivo de RA (Mancebo *et al.*, 2016). En el subsecuente análisis, nosotros estudiamos el papel de la expresión de las moléculas CD38 y CD95 en receptores renales de nuestra serie y su potencial papel como biomarcador predictivo de RA. En este sentido, un porcentaje medio post-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ superior a 55.25%, así como también un porcentaje medio post-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD95⁺ superior a 49.13% en el 1^{er} mes post-trasplante, fueron capaces de discriminar de forma precisa a receptores renales como alto riesgo de RA. A continuación el análisis de regresión logística univariante determinó que el riesgo de receptores renales de RA cuando % de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ y CD4⁺CD95⁺ fue superior a 55.2% y 49.13%, respectivamente, se incrementó en 1.210 y 1.131. Finalmente y teniendo en cuenta los datos recogidos en esta memoria y en conjunción con los datos publicados en el proyecto multicéntrico en el que nuestro grupo formó parte, proponemos la monitorización de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺CD154⁺, CD8⁺CD154⁺ y CD8⁺CD38⁺ en receptores hepáticos, así como también la monitorización de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺CD38⁺ y CD4⁺CD95⁺ en renales, tras estimulación *in vitro*, para la monitorización de pacientes de alto riesgo así como para la predicción de RA durante el 1^{er} mes post-trasplante.

- El incremento post-trasplante de las cifras absolutas de la molécula CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺ en receptores hepáticos se correlaciona con un mayor riesgo de RA temprano

A pesar de que se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de la molécula CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ de receptores renales en pre-trasplante, en las primeras semanas post-trasplante, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio RA y NRA. Por el contrario, receptores hepáticos que desarrollaron RA en el 1^{er} mes presentaron un % de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ significativamente inferior en comparación con la población NRA a los 7 días post-trasplante. Sin embargo, durante la 2^a y 3^a semana post-trasplante el porcentaje de dicha población de linfocitos T en el grupo RA experimentó un incremento que igualó los niveles de expresión observados en el grupo NRA. Sin embargo, aunque el porcentaje post-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio, RA y NRA, el n° de moléculas CD28 por linfocito T CD4⁺ del grupo de receptores hepáticos con RA experimentó un incremento significativo en el 1^{er} mes post-trasplante. En concreto, desde la primera semana post-trasplante se observó un incremento en la expresión de moléculas CD28 en membrana celular de linfocitos T CD4⁺ de receptores hepáticos que desarrollaron subsecuentemente RA comparadas al grupo NRA, siendo dicha diferencia significativa a los 15 y 30 días post-trasplante. Los datos de nuestra serie concuerdan con los datos publicados por nuestro grupo, en donde se observó que el n° de moléculas CD28 por linfocito T CD4⁺ de receptores hepáticos con RA experimentó un aumento significativo a los 7 días en comparación con los niveles observados en situación basal. Tras el incremento observado en los primeros días post-trasplante, el número de moléculas CD28 por linfocito T CD4⁺ permaneció significativamente incrementado durante las primeras semanas post-trasplante en comparación con los niveles pre-trasplante (Boix *et al.*, 2017). Nuestro grupo de investigación ha publicado numerosos estudios durante casi dos décadas acerca del papel que la molécula CoS CD28 presenta en situación previa y durante los episodios de RA en receptores hepáticos. En uno de los estudios que recientemente fue publicado por nuestro grupo, se monitorizó la población de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ así como la CD28-IMF en donde se observó que tanto receptores hepáticos como cardíacos experimentaron un incremento en la expresión de CD28-MFI en periodos de RA. En el mismo estudio, se estableció que un incremento del 5% en la expresión de

CD28-MFI fue capaz de discriminar de forma precisa a pacientes como alto riesgo de RA en receptores hepáticos y cardíacos (Blanco-García *et al.*, 2011). El incremento en la expresión de la molécula CD28 en linfocitos T periféricos es indicativo de una activación temprana de linfocitos T *naïve* alorreactivos capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria dirigida contra el injerto (Yeung *et al.*, 2014). El grado de diferenciación celular de linfocitos T periféricos ha sido recientemente correlacionado con la estratificación del riesgo de desarrollar RA. En este sentido, la pérdida de expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ periféricos, se ha correlacionado con un descenso del riesgo de RA en receptores renales. Esta subpoblación de linfocitos T, CD4⁺CD28^{null}, fue predominantemente encontrada en el compartimento de células de memoria, en concreto dentro de la población de linfocitos T más diferenciados (Dedeoglu *et al.*, 2016). Hace ya más de una década que nuestro grupo investigó cómo la subpoblación de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ variaba durante el transcurso de las primeras semanas post-trasplante hepático. Receptores hepáticos que desarrollaron RA post-trasplante presentaron un incremento significativo, en comparación con aquéllos NRA, de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ periféricos desde los primeros días después del proceso quirúrgico (García-Alonso *et al.*, 1997). En este sentido, nuestros datos a día de hoy concuerdan con lo informado a finales de los años 90 por nuestro grupo, con la novedad de que esta vez en lugar de monitorizar CD28-MFI, los avances científicos en el campo de la citometría de flujo nos han permitido cuantificar en cifras absolutas el número de moléculas CD28 por membrana de linfocitos T CD4⁺. Es por ello, y basándonos en los resultados preliminares obtenidos del análisis de estratificación, que el número en cifras absolutas de moléculas CD28 sobre linfocito T CD4⁺ periférico fue subsecuentemente evaluado como potencial biomarcador de RA en receptores hepáticos. Pacientes con cifras absolutas de la molécula CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺ superiores a 7963 moléculas fueron clasificados de forma precisa como alto riesgo de RA en el 1^{er} mes post-trasplante. Posteriormente, el análisis logístico univariante correlacionó una alta expresión de moléculas CD28 por membrana de linfocito T CD4⁺ con la aparición de RA temprano. De modo que receptores hepáticos con cifras de CD28>7963 por membrana de linfocito T CD4⁺ tuvieron un riesgo de RA, 1.659 veces mayor que el receptores con linfocitos T CD4⁺ con un nº de moléculas CD28 inferior a dicho valor. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos expuestos en esta memoria, proponemos que la monitorización del nº de moléculas CD28/membrana de linfocito T CD4⁺ en el 1^{er} mes post-trasplante en receptores hepáticos podría ser de

utilidad a la hora de estratificar el riesgo de RA y, por tanto, prevenirlo ajustando la terapia inmunosupresora de forma individualizada.

5.3.5. Monitorización post-trasplante de la función inmunitaria en receptores y su papel en la predicción de INF, y monitorización de pacientes de alto riesgo

La monitorización de pacientes receptores de órgano sólido es primordial, no solo para prevenir la aparición de RA, sino que también para prevenir la aparición de episodios de INF post-trasplante. Hoy en día, la ocurrencia de episodios adversos que incrementan la morbilidad/mortalidad post-trasplante de receptores sometidos a terapia crónica inmunosupresora reduciendo la calidad de vida de los mismos ha sido atribuida a la aparición de INF post-trasplante así como a la aparición de tumores *de novo* [Romero y Razonable, 2011; Fernández-Ruiz *et al.*, 2014(b)]. Estos efectos adversos observados en receptores son debidos a una inadecuada administración de inmunosupresores que conducen a un estado hipo-responder en el cual el paciente se encuentra inmunodeprimido. Aproximadamente, el 80% de trasplantados desarrollaran al menos un episodio de INF en el 1^{er} año post-trasplante, y mientras que en muchos casos son tratados satisfactoriamente, algunos de ellos resultarán en la muerte del paciente (Kawecki *et al.*, 2009). Ciertamente, la aparición de INF post-trasplante es una de las principales causas de muerte durante los primeros 3 años post-trasplante (Fishman, 2007). Por todo ello, uno de los objetivos propuestos en esta memoria fue el de validar biomarcadores de función inmunitaria que permitieran de forma eficaz monitorizar el estado inmunitario de receptores y, de este modo, posibilitar el ajuste de la terapia inmunosupresora y profiláctica de forma adecuada para prevenir la aparición de INF.

- El desequilibrio en el porcentaje post-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺, CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺, CD4⁺CD69⁺IL-17⁺, CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en receptores se correlaciona con aparición de INF

Receptores hepáticos que desarrollaron INF en post-trasplante de mantenimiento presentaron porcentajes de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ significativamente inferiores a los niveles observados en el grupo NoINF a los 60, 90 y 180 días post-trasplante. Por el contrario, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ experimentó aumento significativo en receptores hepáticos con INF en el post-trasplante de mantenimiento. En concreto, receptores hepáticos con INF presentaron un % de linfocitos T_H17

significativamente superior a los 30, 60 y 90 días post-trasplante. De igual modo, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ se mantuvo significativamente superior en receptores hepáticos con INF en todo el periodo de mantenimiento. En concreto, el % de linfocitos T_{H2} en la población INF fue superior a los 30, 60, 90 y 180 días post-trasplante.

Del mismo modo que en receptores hepáticos, receptores renales con INF post-trasplante incluidos en nuestra serie también presentaron un desequilibrio entre las distintas subpoblaciones de linfocitos T productores de citocinas pro- y anti-inflamatorias en el periodo post-trasplante de mantenimiento. En concreto, receptores renales con INF presentaron porcentajes significativamente inferiores de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ a los 30, 60, 90 y 180 días post-trasplante en comparación con receptores renales NoINF. Por el contrario, la capacidad productora de IL-10 por parte de linfocitos T CD3⁺CD4⁺CD69⁺ y CD3⁺CD8⁺CD69⁺ de receptores renales con INF fue significativamente superior a la observada en el grupo NoINF. En concreto, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ de la población renal con INF fue significativamente superior a los 30, 60, 90 y 180 días post-trasplante en comparación con las cifras observadas en receptores renales NoINF durante el mismo periodo. De igual modo, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en receptores renales con INF fue superior al observado en la población NoINF a los 30, 90 y 180 días post-trasplante. Existen evidencias que sugieren que la tasa de INF post-trasplante podría ser debida a un desequilibrio entre la rama protectora del sistema inmunitario mediado por citocinas anti-inflamatorias secretadas por linfocitos Treg y T_{H2} y la rama mediada por citocinas pro-inflamatorias secretadas por linfocitos T_{H1} y T_{H17} (Sun y Singh, 2011). En el subsecuente análisis nos centramos en correlacionar el desequilibrio observado entre las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de SP con la recurrencia de INF post-trasplante. En este sentido, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ inferior a 14.95% durante el periodo post-trasplante de mantenimiento fue capaz de estratificar a receptores hepáticos como alto riesgo de INF. De igual modo, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ y CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ superior 2.19% y superior a 9.35%, respectivamente; se clasificaron en el grupo de alto riesgo de INF en el post-trasplante inmediato. De forma similar, receptores renales con INF que presentaron un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ inferior a 13.83% presentaron un mayor riesgo de INF. Por último, porcentajes de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺>13.95% y 11.15% en el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron capaces de discriminar a receptores

renales como alto riesgo de INF. Calarota *et al.* (2012) monitorizaron de forma regular las cifras de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ durante los primeros 8 meses post-trasplante renal y cardíaco, en donde se observó que pacientes receptores con INF presentaron un desequilibrio entre las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ para ambos tipos de trasplante, renal y cardíaco. En concreto, receptores cardíacos, la incidencia de INF se asoció con un descenso en las cifras absolutas de linfocitos T CD4⁺ incluso en presencia de un incremento de las cifras absolutas de linfocitos T CD8⁺; mientras que en receptores renales la aparición de INF se asoció con un incremento en las cifras de linfocitos T CD4⁺ con cifras de linfocitos T CD8⁺ reducidas. Varios autores consistentemente han mostrado que el riesgo a desarrollar neumonía post-trasplante por *Pneumocystis jiroveci* se incrementó en receptores renales con cifras absolutas de linfocitos T CD4⁺ disminuidas (De Castro *et al.*, 2010; Struijk *et al.*, 2011; Brunot *et al.*, 2012). Del mismo modo, en un estudio prospectivo en receptores hepáticos se mostró que, un recuento de linfocitos T CD4⁺ inferior a 300 células/ μ l durante el 1^{er} mes post-trasplante, incrementaba el riesgo de desarrollar subsecuentemente INF post-trasplante [(Fernández-Ruiz *et al.*, 2014(a))].

Con los datos recogidos en esta memoria y teniendo en cuenta la bibliografía publicada respecto al riesgo de INF post-trasplante, decidimos estudiar si el desequilibrio en las diferentes subpoblaciones linfocitarias observado en receptores hepáticos y renales se correlacionó con un incremento en la susceptibilidad a INF post-trasplante en el periodo de mantenimiento. De este modo, el análisis de regresión logística mostró que en receptores hepáticos, el porcentaje medio post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺, CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ y CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ durante el periodo post-trasplante de mantenimiento se asociaron con la aparición de INF de forma independiente. Del mismo modo, el % medio post-trasplante de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺, CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en receptores renales fue independientemente asociado con una mayor susceptibilidad de INF. En concreto, receptores hepáticos que presentaron un porcentaje post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺ inferior a 14.95% fue asociado con un incremento en el riesgo de INF en 1.855 veces. De igual modo, un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺>2.19% y un % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺>9.35% en receptores hepáticos durante el periodo post-trasplante de mantenimiento incrementó el riesgo de INF en 1.698 veces y 1.381 veces, respectivamente. Del mismo modo, receptores renales con un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺ inferior a 13.83% en el post-trasplante de mantenimiento presentaron una susceptibilidad aumentada en 1.886 veces de INF. Por último, un

porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ > 13.95% y un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ > 11.15% en receptores renales aumentó el riesgo de INF de forma independiente en 1.248 y 1.093 veces, comparado con receptores con cifras inferiores.

Teniendo en cuenta los datos de esta memoria, el desequilibrio observado en la producción de citocinas por parte de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ incrementó la susceptibilidad de desarrollar INF, tanto en receptores hepáticos como renales, durante el periodo de mayor tasa de INF post-trasplante. Es por ello que, proponemos la monitorización de linfocitos T CD8⁺CD69⁺IFN γ ⁺, CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ y CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ en trasplante hepático, así como también la monitorización de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IFN γ ⁺, CD4⁺CD69⁺IL-10⁺ y CD8⁺CD69⁺IL-10⁺ en trasplante renal, como biomarcadores predictivos del desarrollo de INF post-trasplante. La información aportada por estos biomarcadores puede ser de utilidad a la hora de ajustar la terapia profiláctica que mejor se adapte a la situación individual de cada receptor.

- Concentraciones solubles post-trasplante de TGF β incrementadas se correlacionan con una susceptibilidad incrementada de desarrollar INF post-trasplante en receptores hepáticos y renales

Receptores hepáticos con INF post-trasplante en el periodo de mantenimiento presentaron una concentración de TGF β en sobrenadante de cultivo significativamente superior en comparación con los niveles observados en el grupo NoINF a los 30, 60 y 180 días post-trasplante. Del mismo modo, receptores renales que desarrollaron INF presentaron una capacidad significativamente incrementada de secretar TGF β en sobrenadante de cultivo en comparación con la población NoINF a los 60, 90 y 180 días post-trasplante. Niveles incrementados de TGF β han sido asociados con un incremento en la susceptibilidad de INF (Letterio y Roberts, 1998). Desde finales del siglo XX que se ya se tenía constancia de la relación existente entre la expresión de TGF β por parte de macrófagos con procesos infecciosos. En este sentido, Falcone *et al.*, 1995 describieron que la infección de macrófagos por parte de parásitos resultaba en la activación y posterior secreción de grandes cantidades de TGF β . Por otro lado, la infección intracelular de macrófagos por parte de bacterias tales como *Mycobacterium avium* también incrementa la secreción de la forma activa de TGF β por parte de este tipo celular (Champsi *et al.*, 1995). Más recientemente, ha sido cuando a TGF β se le han atribuido funciones esenciales en el mantenimiento de tolerancia al injerto después de la realización

de un trasplante. En este sentido, se ha documentado que TGF β es una citocina requerida para la inducción y mantenimiento de la tolerancia al injerto en modelos animales. TGF β se ha visto que presenta efectos anti-inflamatorios actuando sobre una amplia gama de células del sistema inmunitario (Regateiro *et al.*, 2011). Se tiene constancia que la inducción de tolerancia central por parte de TGF β es debida a la inducción de la expresión de FoxP3 y la capacidad reguladora por parte de linfocitos T CD4⁺ *naïve* en ratón (Chen *et al.*, 2003) y humanos (Zheng *et al.*, 2004). Sin embargo, la presencia de TGF β en la periferia no solo induciría la producción de linfocitos iTreg, por parte de células T CD4⁺ *naïve*, sino que también es necesaria para la diferenciación y desarrollo de linfocitos T_H17 (Veldhoen *et al.*, 2006; Bettelli *et al.*, 2006). Por otro lado, la presencia de TGF β ha sido identificada como un factor fibrogénico y un incremento en su expresión ha sido también relacionada con disfunción crónica del injerto renal (Pribylova-Hribova *et al.*, 2006). Por todo ello, TGF β se presenta como una citocina pleiotrópica que afecta a multitud de subtipos celulares del sistema inmunitario y presenta un papel crucial tanto en la generación de tolerancia central, en promover respuestas adaptativas pro-inflamatorias, debido a su participación en la diferenciación de linfocitos T_H17 y por su papel durante los procesos infecciosos así como también en promover daño celular del injerto.

En el subsecuente análisis realizado, nos centramos en el papel de la citocina TGF β como biomarcador capaz de estratificar a receptores hepáticos y renales de nuestra serie de estudio como alto riesgo de desarrollar INF post-trasplante durante el periodo de mantenimiento. En este sentido, receptores hepáticos con una concentración de TGF β superior a 363.25 ng/ml en sobrenadante de cultivo fueron clasificados dentro del grupo de alto riesgo de INF post-trasplante. De igual modo, receptores renales con una concentración de TGF β superior a 808.51 ng/ml en sobrenadante de cultivo fueron también clasificados como alto riesgo de INF post-trasplante en el periodo de mantenimiento. Posteriormente, se calculó el riesgo a desarrollar INF post-trasplante en función de la concentración de TGF β en sobrenadante de cultivo durante el periodo post-trasplante de mantenimiento. De tal modo que receptores hepáticos con una concentración de TGF β superior a 363.25 ng/ml en sobrenadante de cultivo durante el periodo post-trasplante de mantenimiento presentaron un riesgo de INF incrementado en 1.203 veces en comparación con receptores hepáticos con niveles de TGF β inferiores a dicho valor. De forma similar, receptores renales con una concentración de TGF β superior a 808.51 ng/ml en sobrenadante de cultivo durante el periodo post-trasplante de mantenimiento presentaron una susceptibilidad a INF incrementada en 1.976 veces en comparación con

los receptores con niveles de TGF β inferiores a dicho valor. Con los datos obtenidos del análisis de la concentración de la citocina pro-inflamatoria TGF β en receptores de esta memoria, nosotros proponemos que la monitorización de la liberación de la citocina TGF β en sobrenadante de cultivo tras estimulación *in vitro* puede ser de utilidad para la monitorización de receptores en alto riesgo de desarrollar INF post-trasplante en el periodo de mantenimiento. Por todo ello, pensamos que TGF β podría ser un buen candidato como biomarcador predictivo de INF ya que altos niveles de TGF β fueron correlacionados con un aumento en la susceptibilidad de INF en los receptores.

- Porcentajes incrementados de linfocitos nTreg y aTreg en receptores hepáticos y renales, respectivamente, se asociaron con un incremento en la susceptibilidad de desarrollar INF pos-trasplante

Receptores hepáticos con INF post-trasplante presentaron concentraciones significativamente superiores de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales en comparación con receptores hepáticos NoINF a los 30 y 60 días post-trasplante. De igual modo, receptores renales que tuvieron INF post-trasplante presentaron una concentración significativamente superior de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T totales en comparación con el grupo NoINF a los 30, 60 y 90 días post-trasplante. Hoy en día, está bien establecido, que en conjunción con el mantenimiento de la tolerancia periférica dirigida hacia Ags propios, los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ son también responsables de la lucha contra agentes patógenos en la periferia y juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune contra agentes infecciosos (Suvas *et al.*, 2003; Belkaid y Rouse, 2005). En la última década se ha estudiado, en diferentes modelos animales, el papel de los linfocitos Treg y su participación en el control de la respuesta inmunitaria frente *Helicobacter pylori* (Raghavan *et al.*, 2003; Lundgren *et al.*, 2003), *Pneumocystis carinii* (Hori *et al.*, 2002) o *Candida albicans* (Montagnoli *et al.*, 2002). Linfocitos nTreg también parece que tienen un papel importante en pacientes con infección por VHC (Cabrera *et al.*, 2004). Recientemente, se ha descrito que el balance entre linfocitos T efectores y reguladores sería crucial para el desenlace de una infección, aunque los mecanismos específicos por los cuáles linfocitos Treg actuarían para favorecer, en algunos casos, al hospedador y en otros al patógeno todavía no están del todo elucidados (Belkaid y Rouse, 2005). Basándonos en los datos previos existentes y que ponen de manifiesto que los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ participan en los procesos

infecciosos; así como también en los resultados obtenidos tras el análisis de la frecuencia de linfocitos nTregs y aTregs en receptores de nuestra serie con INF post-trasplante nos propusimos, en el subsecuente análisis, tratar de validar las diferencias en la frecuencia de linfocitos Treg observada como potencial biomarcador predictivo de desarrollo de INF. Por lo cual, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales superior a 1.31% en el post-trasplante de mantenimiento fueron clasificados de forma precisa dentro del grupo de alto riesgo de INF. De forma similar, receptores renales con un porcentaje de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T totales superior a 1.65% en el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron también clasificados dentro del grupo de alto riesgo de INF. El análisis de regresión logística univariante subsecuente determinó que el porcentaje de linfocitos nTreg en receptores hepáticos y aTreg en receptores renales fueron, de forma independiente, factores de riesgo para el desarrollo de INF post-trasplante. En concreto, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos nTreg con respecto a linfocitos T CD4⁺ totales superior a 1.31%, y receptores renales con un porcentaje de linfocitos aTreg con respecto a linfocitos T totales superior a 1.65% en el periodo de mantenimiento presentaron una susceptibilidad a INF aumentada en 1.550 y 3.699, respectivamente. De modo que teniendo en cuenta los resultados del análisis de la frecuencia de linfocitos Treg en receptores, proponemos el uso de ambas subpoblaciones linfocitarias como biomarcador para la monitorización de receptores en alto riesgo y predicción de INF.

- Niveles de expresión post-trasplante de las moléculas CD25 y CD69 en linfocitos T CD8⁺ cultivados *in vitro* se asociaron con un incremento en el riesgo de INF en receptores hepáticos y renales

Receptores hepáticos de nuestra serie que presentaron INF presentaron un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ significativamente incrementados tanto a los 30, 60 y 90 días post-trasplante, en comparación con la población NoINF. Sin embargo, receptores hepáticos del grupo INF presentaron niveles significativamente disminuidos de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ a los 60 y 90 días post-trasplante en comparación con el grupo NoINF. De igual modo que en receptores hepáticos, receptores renales que desarrollaron INF también presentaron un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ significativamente incrementado a los 90 y 180 días post-trasplante, en comparación con la frecuencia de esta población linfocitaria en la población NoINF. La expresión de la proteína de

superficie CD25 en linfocitos T CD8⁺ se asocia a un estado madurativo más avanzado (Millán *et al.*, 2009). En este sentido Schwaiger *et al.* (2003) describieron una población de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de memoria central que expresaban CD25 de forma constitutiva, además de secretar IL-2 e IL-4. Esta subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ no reguladores representa un reservorio de células T de memoria efectora en población adulta la cual se ha visto que presenta una capacidad de producir una respuesta rápida y efectiva contra la vacuna del virus *influenza* (Herndler-Brandstetter *et al.*, 2005). La frecuencia de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ se encuentra virtualmente ausente en personas adultas con un incremento de la población efectora de linfocitos T CD8⁺CD25⁻. Del mismo modo, esta población más inmadura de linfocitos T CD8⁺CD25⁻ esta aumentada en individuos jóvenes donde característicamente presentan mayor porcentaje de linfocitos T CD8⁺ *naïve* y un ratio disminuido de células de memoria/efectora (Almanzar *et al.*, 2005). En este mismo estudio, también se determinó que la infección por CMV produce un descenso de la población inmadura de linfocitos T CD8⁺CD25⁻ mientras que, al mismo tiempo, se incrementó la población de linfocitos T de memoria efectora CD8⁺CD25⁺ en pacientes infectados por CMV. No existe mucha información acerca de la expresión de la molécula CD25 sobre linfocitos T CD8⁺ no reguladores en el campo del trasplante; sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio de tesis, van encaminados hacia la misma dirección que los datos ya publicados acerca del papel de esta subpoblación de linfocitos T durante procesos infecciosos. Debido al potencial papel que esta subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ no reguladores presenta durante los procesos infecciosos y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante el análisis univariante de estratificación de receptores, el siguiente análisis se centró en la validación de la monitorización del porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ no reguladores durante el periodo post-trasplante de mantenimiento en ambos tipos de trasplante, hepático y renal, como biomarcador de estratificación y predictivo del riesgo de aparición de INF. En este sentido, receptores hepáticos con un % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ superior a 55.36% y receptores renales con un % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ superior a 26.31% en el periodo de mantenimiento fueron clasificados como alto riesgo de INF post-trasplante. Posteriormente, el análisis de regresión logística univariante determinó de forma independiente para ambos tipos de receptores, que la población de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ se asocia con un incremento en la susceptibilidad de INF. De tal modo que, receptores hepáticos con un % post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ superior a 55.36% y receptores renales con un % de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ superior a 26.31%

presentaron un riesgo de INF en el periodo post-trasplante de mantenimiento incrementado en 1.141 y 1.074 veces, respectivamente, en comparación con poblaciones que presentaron un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ inferior a dichos valores.

Por otro lado, el papel de la expresión de la molécula CD69 en linfocitos T y su relación con los procesos infecciosos ha sido recientemente estudiado. La molécula CD69 se encuentra expresada especialmente en linfocitos T y B en tejido linfático periférico, más que en SP (Sánchez-Mateos *et al.*, 1989); sin embargo el papel biológico de la expresión inducible de la molécula CD69 en linfocitos T activados no se encuentra del todo elucidado. En un estudio realizado por Mori *et al.*, 2011 se investigó el papel de la inducción *in vitro* de la molécula CD69 en linfocitos T CD3⁺ de individuos infectados con *Helicobacter pylori*. Los autores del estudio reportaron una expresión aumentada de la molécula CD69 en los linfocitos T así como también en macrófagos obtenidos de muestras de mucosa gástrica infectadas por *H. pylori*. Dicha sobre-expresión de CD69 fue inducida por un incremento en la expresión de kB1 y kB2 (proteínas de la familia NF-κB), las cuales incrementarían la expresión de ARNm específico de la proteína CD69. En otro estudio realizado por Vega-Ramos *et al.* (2010), se investigó la ausencia de expresión de CD69 en leucocitos activados después de ser infectados por *Listeria monocytogenes* en ratones. La ausencia de expresión de CD69 en linfocitos de ratón se asoció con un aumento en la apoptosis en respuesta a la infección por dicho agente microbiano. Del mismo modo, ratones CD69^{-/-} mostraron un mayor daño hepático y del bazo así como también un incremento a la susceptibilidad de infección por *Listeria monocytogenes* (Vega-Ramos *et al.*, 2010). En el mismo estudio se describió que la respuesta inducida por *Listeria monocytogenes* fue significativamente mayor en la población de linfocitos T CD8⁺ de ratones CD69^{-/-} los cuales produjeron mayor cantidad de la citocina pro-inflamatoria IFNγ desde el primer día post-infección. De nuevo, no existen muchos datos acerca del papel de la expresión de la molécula CD69 en linfocitos T CD8⁺ y su relación con la aparición de INF post-trasplante; sin embargo, la bibliografía existente se centra en el papel que la expresión de la molécula CD69 sobre linfocitos T presenta durante los procesos infecciosos. En este sentido, uno de los objetivos de esta memoria de tesis fue la validación de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ como biomarcador predictivo de la aparición de INF post-trasplante en receptores hepáticos. De este modo, el análisis del AUC reveló que receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ tras estimulación *in vitro* inferior a 41.15% durante el periodo post-trasplante de mantenimiento presentaron un riesgo incrementado en desarrollar INF.

Posteriormente, el análisis de regresión logística determinó que un nivel reducido de CD69 inducible sobre linfocitos T CD8⁺ periféricos cultivados *in vitro* se correlacionó como factor de riesgo independiente de INF post-trasplante. En concreto, receptores hepáticos con un % de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ tras estimulación *in vitro* inferior a 41.15% presentaron un aumento de riesgo de INF en 1.906 veces en comparación con receptores hepáticos con cifras superiores a 41.15%.

Con los resultados obtenidos del análisis de la expresión de las proteínas linfocitarias de superficie CD25 y CD69 sobre linfocitos T CD8⁺ periféricos tras estimulación *in vitro*, nosotros proponemos la expresión post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ y CD8⁺CD69⁺ en receptores hepáticos, así como también la expresión post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en receptores renales como biomarcadores predictivos y para la monitorización del riesgo de INF post-trasplante.

- Un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ durante el periodo post-trasplante de mantenimiento se correlacionó con un aumento en la susceptibilidad a desarrollar INF en receptores hepáticos

En el análisis de estratificación realizado sobre la cohorte de estudio de receptores hepáticos incluidos en esta memoria de tesis se observó que, aquellos pacientes que desarrollaron INF en el periodo post-trasplante de mantenimiento, presentaron un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ periféricos significativamente superior a los 30, 60 y 90 días post-trasplante en comparación con la población NoINF en el mismo periodo. Este incremento en la población de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ periféricos más inmaduros en pacientes infectados se asocia con una mayor actividad linfocitaria de tipo T_H2, ya que esta subpoblación de linfocitos T colaboradores es más dependiente a la activación por CD28 que la respuesta de tipo T_H1 (King *et al.*, 1996). Estos resultados concuerdan con lo observado en receptores hepáticos con INF post-trasplante incluidos en esta memoria, en donde se observó un mayor porcentaje de linfocitos T CD3⁺CD4⁺CD69⁺IL-10⁺. Ya desde 1990 se ha estudiado el papel de la molécula coestimuladora CD28 durante los procesos infecciosos de etiología bacteriana, parasítica y vírica y parece ser que dependiendo del tipo de microorganismo la modulación de su expresión varía. En el mismo estudio, King *et al.* (1996) observaron que ratones modificados genéticamente CD28^{-/-} inoculados con el parásito *Schistosoma mansoni* presentaron una respuesta de tipo T_H2 deficiente, pero no de tipo T_H1, en comparación con la cepa silvestre CD28^{+/+}, en donde la producción de

las citocinas IL-4 e IL-5 no se vio alterada. En otro estudio llevado a cabo por el grupo de Honstetter *et al.* (2006) en ratones modificados genéticamente para la expresión de CD28 infectados con *Coxiella burnetii* observaron que la respuesta humoral en las cepas de ratones CD28^{-/-} se encontró significativamente reducida. Por otro lado, la producción de IL-10 por parte de leucocitos peritoneales fue significativamente disminuida. En cuanto a la expresión de CD28 en linfocitos T y su expresión durante infecciones de tipo viral, Choremi-Papadopoulou *et al.* (1994) mostraron que disminuía tanto en linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ en pacientes infectados con el VIH-1. La pérdida de expresión de CD28 se acompañó de un incremento en la expresión de moléculas típicas de fenotipo más maduro como CD38, CD45RO y HLA-DR durante el transcurso de la infección. En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo en receptores cardíacos y hepáticos, la expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ se vio incrementada en pacientes con INF de tipo bacteriana, fúngica y viral por agentes distintos a CMV; mientras que en pacientes infectados por CMV no se observó dicho incremento (Blanco-García *et al.*, 2011). Según los datos publicados, los procesos infecciosos principalmente de tipo bacteriano y fúngico inducirían un aumento en la expresión de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ favoreciendo una respuesta humoral tipo T_H2, mientras que en infecciones por VIH-1 o CMV, la ausencia de expresión de CD28 favorecería una respuesta de tipo celular T_H1 de memoria efectora. No existe en la bibliografía datos publicados acerca del potencial uso de la expresión de CD28 sobre linfocitos T CD4⁺ como biomarcador predictivo de la aparición de INF post-trasplante; por ello y según los resultados obtenidos del análisis de estratificación de la población de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ en los grupos INF y NoINF, el subsecuente análisis se centró en el uso de esta población como marcador de susceptibilidad de infección post-trasplante. En este sentido, receptores hepáticos con un porcentaje medio de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ superior a 34.2% durante el periodo post-trasplante de mantenimiento fueron discriminados de forma precisa como alto riesgo de INF. Posteriormente, el análisis de regresión logística univariante determinó que el porcentaje medio de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ durante el periodo post-trasplante de mantenimiento fue independientemente asociado con un incremento en el riesgo de INF. De tal modo que receptores hepáticos que presentaron un porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD28⁺ superior a 34.2% en el periodo post-trasplante de mantenimiento presentaron una susceptibilidad a desarrollar INF aumentada en 1.087 veces en comparación con NoINF. Teniendo en cuenta los resultados sobre el papel de la monitorización post-trasplante del porcentaje de

linfocitos T CD4⁺CD28⁺, nosotros proponemos éstos como potencial biomarcador para la monitorización y predicción de la aparición de INF en receptores hepáticos.

5.3.6. Monitorización de la función inmunitaria en situación post-trasplante de receptores hepáticos con infección activa de VHC y su papel en la predicción de cirrosis hepática por VHC

El VHC no se elimina del huésped con el trasplante hepático, re-infectando el injerto en todos los casos y originando grados variables de lesión del injerto (McCaughan y Zekry, 2004). Esta recidiva de la infección por el VHC tras el trasplante hepático provoca una progresión de hepatitis C acelerada y más grave que en pacientes inmunocompetentes [Berenguer *et al.*, 2000(a)] y hasta un 30% de los pacientes desarrollan una nueva cirrosis hepática a los 5 años tras el trasplante, ocasionando una importante morbimortalidad [(Berenguer *et al.*, 2000(b)]. Además, la recidiva de VHC se ha convertido en la primera causa de mortalidad a partir del 1^{er} año del trasplante en receptores por cirrosis por VHC. Así, la supervivencia de estos pacientes a los 5 años del trasplante es del 60-70% frente al 80% en receptores por otras etiologías (Berenguer *et al.*, 2001; Narang *et al.*, 2010). En la actualidad, no existen medidas eficaces para evitar la recidiva considerándose uno de los principales problemas del trasplante hepático. Así, conocer la fisiopatología del proceso y algún marcador predictivo que ayuden a tomar medidas preventivas es de vital importancia. En este sentido, uno de los objetivos de este trabajo de tesis es la validación de biomarcadores predictivos de recidiva VHC.

- Receptores hepáticos con enfermedad viral activa post-trasplante por VHC presentaron una capacidad productiva y secretora incrementada de IL-17 por parte de linfocitos T CD3⁺CD4⁺CD69⁺ tras estimulación *in vitro*

Receptores hepáticos con enfermedad viral activa durante el periodo post-trasplante presentaron un porcentaje de linfocitos T CD3⁺CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ significativamente superior a los 90, 180 y 365 días post-trasplante comparado con receptores NVHC. Los resultados observados con respecto a la capacidad productiva intracitoplasmática de IL-17 por parte de linfocitos T CD3⁺CD4⁺CD69⁺ estimulados *in vitro* del grupo de recidiva VHC concuerdan con los resultados observados tras el análisis de estratificación en receptores hepáticos en relación con la capacidad secretora de IL-17

por parte de leucocitos estimulados *in vitro*. En este sentido, receptores hepáticos con recidiva VHC presentaron concentraciones de IL-17 soluble en sobrenadante de cultivo significativamente superior a los 180 y 365 días post-trasplante en comparación con la población NVHC. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos realizados en series de pacientes infectados por VHC. Kondo *et al.*, 2014 reportaron que pacientes infectados crónicos por VHC presentaron niveles séricos de IL-6 y TGFβ significativamente incrementados en comparación con pacientes con diferente enfermedad hepática. Estas citocinas son claves para la diferenciación de linfocitos T_H17. En el mismo estudio, pacientes con infección crónica por VHC presentaron niveles séricos de IL-1β, IL-17A, IL-21 e IL-23 significativamente aumentados comparados con pacientes con diferente enfermedad hepática. De forma similar, en otro estudio llevado a cabo por Sousa *et al.* (2012) en pacientes crónicos por VHC presentaron niveles séricos de IL-17F e IL-8 significativamente disminuidos comparados con controles. La secreción de IL-17F se correlacionó con un peor progreso de la cirrosis hepática y con niveles incrementados de la enzima hepática ALT, así como también con la producción de IL-22. La infección por el VHC, además induce la activación de CDs, las cuales contribuirían con la diferenciación de linfocitos T_H17 debido a la secreción de citocinas clave para su diferenciación, tales como TGFβ e IL-6 (Lee *et al.*, 2013). Queda claro, pues, que la infección por el VHC induce un aumento en aquellos factores necesarios para la diferenciación de linfocitos T_H17, tales como TGFβ e IL-6. Nosotros pensamos que esta subpoblación presenta un papel importante en el desarrollo de cirrosis hepática post-trasplante debido a la reactivación del VHC, por eso en el siguiente análisis y tras los resultados iniciales, nos centramos en la validación de ambos, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ así como también la concentración de IL-17A soluble en sobrenadante de cultivo como potenciales biomarcadores predictivos de recidiva VHC. En este sentido, el análisis ROC determinó los valores de corte de linfocitos T_H17 e IL-17A por el cual se pudo estratificar a receptores hepáticos de nuestra serie como alto o bajo riesgo de recidiva VHC. Un porcentaje medio de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ superior a 2.48% en el periodo post-trasplante de larga duración fue capaz discriminar de forma eficaz a receptores hepáticos de alto riesgo de recidiva VHC. De igual modo, una concentración de IL-17A soluble en sobrenadante de cultivo superior a 186.10 ng/ml en el periodo post-trasplante de larga duración fue el valor de corte por el cual receptores hepáticos por encima de dicho valor se clasificaron como alto riesgo de desarrollar recidiva VHC. Posteriormente, tanto % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ como la

concentración de IL-17A en el post-trasplante de larga duración se caracterizaron como factores de riesgo independientes de recidiva VHC. Receptores hepáticos con un porcentaje medio de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ superior a 2.48% durante el periodo post-trasplante de larga duración incrementó el riesgo de desarrollar cirrosis hepática, debido a reactivación del VHC, 1.862 veces más que receptores hepáticos con niveles de linfocitos T_H17 inferiores a dicho valor. Igualmente, receptores hepáticos con una concentración de IL-17A soluble en sobrenadante de cultivo superior a 186.10 ng/ml presentaron un riesgo aumentado, de recidiva VHC, 1.847 veces en comparación con receptores hepáticos con concentraciones de IL-17A inferiores a dicho valor. Basados en los resultados obtenidos, nosotros proponemos que la monitorización de linfocitos T_H17 en el periodo post-trasplante de larga duración podría ser de utilidad para la estratificación de receptores hepáticos como alto o bajo riesgo de recidiva VHC. Del mismo modo y basándonos en los datos publicados por otros grupos de investigación así como en los datos expuestos en esta memoria, los linfocitos T_H17, y en especial sus productos secretados, tales como IL-17A, juegan un papel clave en la iniciación y mantenimiento de las reacciones pro-inflamatorias que producen una fibrosis hepática acelerada; es por ello que proponemos el % de linfocitos T CD4⁺CD69⁺IL-17⁺ e IL-17A como biomarcadores predictivos de recidiva VHC, los cuales podrían ser puntos diana de nuevos fármacos inmunosupresores, afectando a la producción de IL-17A o a la diferenciación de linfocitos T_H17 reduciendo así el riesgo de cirrosis hepática por VHC.

➤ Porcentaje incrementado de linfocitos aTreg y nTreg durante el periodo post-trasplante de larga duración se correlaciona con recidiva de VHC

El análisis inicial de estratificación realizado sobre los grupos de estudio con y sin recidiva de VHC mostró que receptores hepáticos con recidiva VHC presentaron porcentajes de linfocitos T aTreg y nTreg superiores en comparación con la población NVHC a los 180 y 365 días post-trasplante. Durante los últimos años, una cantidad creciente de trabajos han demostrado que las células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ juegan un papel crítico en el mantenimiento de la respuesta inmunitaria anti-viral, entre los procesos inmunopatológicos que afectarían al hígado y la resolución del proceso viral. Es bastante probable que tanto la activación como la expansión de linfocitos nTreg y la inducción de linfocitos aTreg antígeno-específicos contribuirían con la inhibición de la respuesta de linfocitos T efectores en pacientes con infección por VHC establecida, pero el grado de

contribución de estos dos subtipos de linfocitos Treg todavía no se ha elucidado por completo. En un estudio llevado a cabo por el grupo de Sugimoto *et al.* (2003), tanto el número como la actividad supresora de linfocitos Treg en pacientes con infección crónica por VHC fue significativamente superior a los observados en controles. En otro estudio, la respuesta citotóxica específica contra el VHC mediada por linfocitos T CD8⁺ productores de IFN γ se incrementó tras la depleción de la población de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ y, por el contrario, la producción de IFN γ específica en respuesta al VHC se disminuyó en presencia de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ (Cabrera *et al.*, 2004). En el mismo estudio, se observó una correlación entre el número de linfocitos Treg y la carga sérica de ARN de VHC. En otro estudio llevado a cabo por Bolacchi *et al.* (2006) se observó que el incremento en el número de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ específicos contra el VHC se asoció con una reducción en la respuesta efectora de linfocitos T CD4⁺ Ag específico en pacientes infectados con VHC. Un dato importante sobre la cinética de los linfocitos Treg recientemente publicado por el grupo de Smyk-Pearson *et al.* (2008) ha revelado que la expresión de FoxP3 y la actividad supresora de linfocitos Treg no presenta diferencias sustanciales durante el estado temprano de la infección por VHC entre pacientes que desarrollaron persistencia o resolución espontánea de la infección de VHC. Sin embargo, a los 6 meses post-infección, la resolución de la infección fue asociada con una pérdida relativa de la función supresora de linfocitos Treg indicando, potencialmente, que el cambio en dicha función supresora, durante el transcurso de la enfermedad, ocurriría únicamente en pacientes con infección crónica por VHC en comparación con aquellos pacientes que resolvieron de forma espontánea la infección.

Según los resultados preliminares tras el análisis inicial entre ambos grupos de nuestra serie de receptores hepáticos, y en concordancia con los datos publicados por otros grupos queda pues de manifiesto que la cronificación de la infección por VHC parece estar influenciada por un incremento en el número de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺. Es por ello que, en el análisis nos centramos en la validación del porcentaje de linfocitos aTreg y nTreg en el periodo post-trasplante de larga duración como potencial biomarcador predictivo de cirrosis hepática por VHC en receptores con enfermedad viral activa. En este sentido, receptores hepáticos cuya indicación al trasplante fue por cirrosis hepática por infección crónica VHC con un porcentaje medio de linfocitos aTreg superior a 1.7% y un porcentaje medio de linfocitos nTreg superior a 1.23% en el periodo post-trasplante de larga duración fueron estratificados de forma eficaz dentro del grupo de alto riesgo de recidiva VHC. El análisis de regresión logística asoció el porcentaje post-

trasplante de linfocitos aTreg y linfocitos T nTreg en receptores hepáticos como factores de riesgo independientes para el desarrollo de cirrosis hepática post-trasplante debido a reactivación del VHC. Un porcentaje medio de linfocitos aTreg en el periodo post-trasplante de larga duración superior a 1.7% se asoció con un incremento del riesgo de desarrollar recidiva VHC en 1.295 veces, en comparación con receptores hepáticos con un porcentaje inferior a dicho valor. De forma similar, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos nTreg durante el periodo post-trasplante de larga duración superior a 1.23% presentaron un riesgo de desarrollar recidiva VHC aumentado en 3.972 veces, en comparación con receptores hepáticos con un recuento inferior a dicho valor. La monitorización post-trasplante de linfocitos aTreg ($CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$) y nTreg ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$) son, hoy en día, un punto clave en la investigación en el campo del trasplante. Numerosos estudios resaltan el papel protector y beneficioso que el aumento en estas subpoblaciones de linfocitos Treg presenta en la supervivencia del paciente y del injerto a medio- y potencialmente a largo-plazo. Sin embargo, el papel que el número de linfocitos Treg tiene con respecto a la supervivencia del injerto debería tenerse en cuenta desde un punto de vista en el cual la terapia inmunosupresora y la enfermedad de base estuvieran presentes. Numerosos estudios resaltan el efecto beneficioso del uso de inhibidores de la enzima mTOR, tales como la rapamicina, en la expansión de linfocitos Treg humanos y de ratón (Battaglia *et al.*, 2005 y 2012); sin embargo el incremento de esta población en receptores hepáticos podría conducir a una situación de riesgo en donde la incidencia de INFs post-trasplante llevaran a un incremento en la morbilidad del paciente. En un estudio prospectivo randomizado en 21 receptores renales, el tratamiento con SRL fue asociado con una peor función del injerto comparado con pacientes tratados con CsA, a pesar del incremento en el número de linfocitos Treg periféricos (Ruggenenti *et al.*, 2007). Es por ello que, basándonos en los resultados del análisis de la monitorización del número de linfocitos aTreg $CD4^+CD25^{high}CD45RO^+CD62L^+$ y linfocitos nTreg $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^{high}$ post-trasplante, proponemos que el aumento en estas poblaciones en SP se utilicen como biomarcadores para estratificar el riesgo de receptores hepáticos con enfermedad viral activa de VHC, para así poder predecir una cirrosis post-trasplante acelerada del injerto y con ello incrementar la supervivencia del mismo.

- El incremento en el porcentaje de linfocitos T citotóxicos de memoria CD8⁺CD154⁺ se correlaciona con un incremento en el riesgo de desarrollar recidiva de VHC en receptores en el post-trasplante de larga duración

En este apartado se discuten los resultados obtenidos tras el análisis del recuento de la población de linfocitos T citotóxicos periféricos de memoria CD8⁺CD154⁺ en receptores hepáticos con y sin recidiva de VHC. En nuestra serie, receptores hepáticos con enfermedad viral activa durante el periodo de seguimiento y que desarrollaron recidiva de VHC al año post-trasplante presentaron porcentajes de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ significativamente superiores a los 90, 180 y 365 días post-trasplante en comparación con las cifras observadas en el grupo NVHC. Nosotros proponemos el uso del ensayo *in vitro* descrito en esta memoria de tesis para la determinación de la expresión de CD154 sobre linfocitos T CD8⁺ como ensayo para la monitorización de la respuesta contra el VHC. Otros ensayos han sido propuestos para la identificación de linfocitos T específicos de VHC. En concreto, se ha propuesto la monitorización de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ vía tinción de superficie, a partir de SP, y posterior análisis por CF (Mueller *et al.*, 2010) o tinción intracelular de CD154 tras estimulación *in vitro* (Frentsch *et al.*, 2005) como ensayos para medir la respuesta específica contra el VHC. Estudios recientes han puesto de manifiesto la presencia de linfocitos T CD4⁺CD154⁺ activados VHC Ag-específicos, no solo en individuos que resolvieron la infección por VHC de forma espontánea, sino también en individuos con infección crónica de VHC (Mueller *et al.*, 2010). Otros estudios recientemente llevados a cabo por Bes *et al.* (2012) y Lokhande *et al.* (2015) demostraron que infectados crónicos por el VHC presentan en SP linfocitos T virus específicos y que éstos pueden ser detectados gracias a la expresión en superficie de la molécula CD154. No hay estudios centrados en el uso de estos ensayos en receptores hepáticos con riesgo de desarrollar una cirrosis hepática acelerada debido a reactivación del VHC. En este sentido y basándonos en los resultados preliminares obtenidos del análisis de la expresión de CD154 en linfocitos T CD8⁺ de receptores hepáticos de nuestra serie con y sin recidiva VHC, nosotros nos centramos en la validación de la monitorización *in vitro* de linfocitos T citotóxicos de memoria CD8⁺CD154⁺ como biomarcador predictivo del riesgo de desarrollar recidiva VHC. Según el análisis ROC, un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ superior a 0.68% durante el post-trasplante de larga duración estratificó a receptores hepáticos como alto riesgo de desarrollar recidiva de VHC. Subsecuentemente, el análisis de regresión

logística confirmó el porcentaje post-trasplante de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ como factor de riesgo independiente para el desarrollo de recidiva VHC. En este sentido, receptores hepáticos con un porcentaje de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ superior a 0.68% durante el periodo post-trasplante de larga duración presentaron un riesgo aumentado en 1.437 veces a desarrollar cirrosis hepática acelerada debido a reactivación del VHC en comparación con receptores hepáticos con enfermedad activa viral y cifras de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ inferiores a dicho valor. Con los resultados expuestos en esta memoria de tesis, nosotros proponemos la utilización del ensayo *in vitro* para la cuantificación de la población de linfocitos T CD8⁺CD154⁺ como herramienta para la monitorización del riesgo de recidiva por VHC y, potencialmente, predecir una cirrosis hepática post-trasplante ajustando la terapia anti-viral de forma individualizada.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Los trasplantados hepáticos y renales con porcentajes de linfocitos T productores de IL-2, IL-17 e IFN γ elevados en situación previa al trasplante, desarrollaron rechazo agudo temprano durante el primer mes post-trasplante. Estas diferencias pre-trasplante pueden ser utilizadas como biomarcador predictivo de rechazo agudo. Dichas poblaciones linfocitarias se mantuvieron incrementadas durante el periodo de mayor incidencia de rechazo tanto en trasplantados hepáticos como renales. La capacidad productora y secretora de las citoquinas pro-inflamatorias IL-2, IL-17 e IFN γ por parte de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ como medida para la monitorización de subpoblaciones linfocitarias mediadoras de la alo-respuesta inmunitaria permite estratificar a receptores hepáticos y renales con alto riesgo de rechazo agudo durante el primer mes post-trasplante, lo cual puede ayudar a la individualización de la terapia inmunosupresora.
2. Las cifras disminuidas de linfocitos aTreg y linfocitos nTreg en situación pre-trasplante de receptores hepáticos y renales predicen el desarrollo de rechazo agudo durante el primer mes post-trasplante. Ambas poblaciones de linfocitos Treg experimentan un incremento significativo en trasplantados hepáticos y renales que desarrollaron rechazo agudo temprano. Esta regulación positiva de linfocitos Treg en trasplantados hepáticos y renales puede ser utilizada para la monitorización y estratificación del riesgo de rechazo agudo temprano.
3. La expresión de marcadores linfocitarios de membrana celular, tales como CD38, CD95 y CD154 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tras estimulación *in vitro* en situación pre-trasplante se correlacionaron con la aparición de rechazo agudo temprano en trasplantados hepáticos y renales. Las poblaciones T CD4⁺ y CD8⁺ que expresaban dichos marcadores se mantuvieron significativamente incrementadas durante el periodo de mayor tasa de rechazo agudo después del trasplante hepático y renal, por lo que su determinación puede ser útil para monitorizar los grupos de alto riesgo, que posteriormente desarrollan rechazo agudo temprano.
4. El nivel de expresión de CD28 en la membrana celular de linfocitos T CD4⁺ de receptores hepáticos y renales en situación basal pre-trasplante mostró niveles inferiores en los grupos de estudio que tras el trasplante desarrolló rechazo agudo.

Dicha diferencia se puede utilizar como biomarcador predictivo de la aparición de rechazo agudo temprano. El nivel de expresión de CD28 en la membrana de linfocitos T CD4⁺ presentó un incremento durante el periodo de mayor incidencia de rechazo agudo. Receptores con expresión de CD28 elevada presentaban un riesgo mayor de desarrollo de rechazo agudo durante el periodo post-trasplante inmediato.

5. Los trasplantados hepáticos y renales con una capacidad productora reducida de IL-10 e IFN γ por parte de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en situación previa al trasplante presentaban mayor susceptibilidad a infecciones oportunistas post-trasplante. Estas diferencias podrán aplicarse para la estratificación del riesgo de infección y para así poder ajustar el tratamiento profiláctico de forma individualizada. Durante el periodo de mayor tasa de infección las poblaciones de linfocitos T productoras de IFN γ se mantuvieron disminuidas en pacientes con infección oportunista, mientras que la población de linfocitos T productores de IL-17 e IL-10 experimentaron un incremento asociado con la aparición de la infección oportunista post-trasplante. Este desequilibrio en las subpoblaciones linfocitarias se pudo utilizar para la monitorización post-trasplante del riesgo de desarrollar infección oportunista.
6. Del mismo modo, la citoquina TGF β de trasplantados hepáticos y renales con infección post-trasplante experimentó una elevación durante el periodo de mantenimiento que permitió estratificar a las poblaciones trasplantadas con mayor susceptibilidad de desarrollar una infección oportunista.
7. Los niveles pre-trasplante de linfocitos nTreg elevados en trasplantados hepáticos y renales se asociaron con un incremento en la susceptibilidad de desarrollar infección oportunista post-trasplante. Esta población de linfocitos nTreg se mantuvo incrementada durante el periodo de mayor incidencia de infección oportunista en trasplantados hepáticos con mayor susceptibilidad de infección, mientras que fue la población de linfocitos aTreg la que, en trasplantados renales experimentó un incremento asociado con un mayor riesgo para desarrollar infección oportunista durante el periodo de mantenimiento.
8. Los trasplantados hepáticos y renales con niveles elevados de expresión pre-trasplante de las moléculas CD25 y CD69 en linfocitos T CD8⁺ se correlacionan con un mayor

riesgo de desarrollar infección oportunista post-trasplante. La monitorización de linfocitos T $CD8^+CD25^+$ y $CD8^+CD69^+$ durante el periodo de mantenimiento sirvió para estratificar de forma eficaz a trasplantados hepáticos y renales con una susceptibilidad incrementada a la infección.

9. La elevación de los porcentajes y cifras absolutas pre-trasplante de la molécula CD28 en linfocitos T $CD4^+$ periféricos se correlacionaron con un incremento en la incidencia de infección oportunista post-trasplante en receptores hepáticos. Este incremento en la expresión de CD28 sobre linfocitos T $CD4^+$ se mantuvo significativamente elevado en trasplantados hepáticos que desarrollaron infección oportunista durante el periodo post-trasplante de mantenimiento. Estas diferencias en la expresión post-trasplante de la molécula CD28 se utilizó para la monitorización y predicción de la aparición de infección oportunista en trasplantados hepáticos.
10. Los trasplantados hepáticos con recidiva por virus de hepatitis C presentaron una mayor capacidad de síntesis y secreción de IL-17 por parte de linfocitos T $CD4^+CD69^+$ en situación pre-trasplante, lo que permitió predecir de forma precisa la aparición de cirrosis hepática acelerada del injerto al año post-trasplante. Los trasplantados hepáticos que desarrollaron recidiva de virus de hepatitis C mantuvieron incrementada la capacidad productora y secretora de IL-17 durante el primer año post-trasplante. Estas diferencias en la población de linfocitos T_H17 se podrían utilizar como biomarcador predictivo de cirrosis hepática acelerada post-trasplante ajustando la terapia anti-viral e inmunosupresora de forma individualizada.
11. Los trasplantados hepáticos con enfermedad viral activa post-trasplante habían presentado cifras elevadas de linfocitos T $CD8^+CD154^+$ previas al trasplante, cifras que también aumentaban durante el periodo post-trasplante. La monitorización de la población de linfocitos T $CD8^+CD154^+$ podría aplicarse como biomarcador predictivo de cirrosis hepática acelerada post-trasplante en receptores hepáticos con alto riesgo debido a la presencia de enfermedad viral activa durante el periodo post-trasplante.
12. Los niveles incrementados de las poblaciones de linfocitos aTreg y nTreg periféricos durante el periodo post-trasplante se utilizaron para la estratificación del riesgo de recidiva de virus C en receptores hepáticos. El incremento en la proliferación de

ambas subpoblaciones de linfocitos Treg, podría utilizarse para monitorizar y estratificar el riesgo de desarrollar cirrosis hepática en aquellos grupos de receptores con enfermedad viral activa, para así poder ajustar la terapia viral e inmunosupresora de forma individualizada.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abadja F, Videcoq C, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C. Differential effect of cyclosporine and mycophenolic acid on the human regulatory T cells and TH-17 cells balance. *Transplant Proc* 2009;41:3367–3370.
- Abadja F, Atemkeng S, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C. Impact of mycophenolic acid and tacrolimus on th17-related immune response. *Transplantation* 2011;92:396–403.
- Abadja F, Sarraj B, Ansari MJ. Significance of T helper 17 immunity in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17(1):8-14.
- Abbas AK y Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*, 5ª edición. Ed: Elsevier España, 2004.
- Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA, Ziegler SF. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013;14(4):307-8.
- Abbasoglu O, Levy MF, Brkic BB, Testa G, Jeyarajah DR, Goldstein RM, Husberg BS, Gonwa TA, Klintmalm GB. Ten years of liver transplantation: an evolving understanding of late graft loss. *Transplantation* 1997;64:1801-1807.
- Abu-Elmagd KM, Wu G, Costa G, Lunz J, Martin L, Koritsky DA, Murase N, Irish W, Zeevi A. Preformed and de novo donor specific antibodies in visceral transplantation: longterm outcome with special reference to the liver. *Am J Transplant*. 2012;12, 3047-3060.
- Ackermann JR, Snell ME. Cadaveric renal transplantation: a technique for donor kidney removal. *British Journal of Urology* 1968;40:(5);515–521.
- Adams DH, Wang LF, Burnett D, Stockley RA, Neuberger JM. Neutrophil activation: an important cause of tissue damage during liver allograft rejection?. *Transplantation* 1990;50:86-91.
- Adams DH and Neuberger JM. Patterns of graft rejection following liver transplantation. *J. Hepatol*. 1990;10:113-119.
- Adams DH, Hubscher SG, Shaw J, Rothlein R, Neuberger JM. Intercellular adhesion molecule-1 on liver allograft during rejection. *Lancet* 1989;II:1122-1124.
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat. Immunol*. 2002; 3, 549–557.
- Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2010 Feb;159(2):120-30.

- Akoglu B, Kriener S, Martens S, Herrmann E, Hofmann WP, Milovic V, Zeuzem S, Faust D. Interleukin-2 in CD8⁺ T cells correlates with Banff score during organ rejection in liver transplant recipients. *Clin Exp Med*. 2009 Dec;9(4):259-62.
- Alevizopoulos A and Mermod N. Transforming growth factor-beta: the breaking open of a black box. *Bioessays*. 1997 Jul;19(7):581-91.
- Ali S, Ormsby A, Shah V, Segovia MC, Kantz KL, Skorupski S, Eisenbrey AB, Mahan M, Huang MA. Significance of complement split product C4d in ABO-compatible liver allograft: diagnosing utility in acute antibody mediated rejection. *Transplant Immunol*, 2012 Jan;26(1):62-9.
- Allen J. E., Maizels R. M. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma?. *Immunol Today* 1997;18:387-392.
- Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Würzner R, Schönitzer D, Grubeck-Loebenstein B. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8⁺ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol*. 2005 Mar;79(6):3675-83.
- Andus T, Geiger T, Hirano T, Northoff H, Ganter U, Bauer J, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett*. 1987 Aug 31;221(1):18-22.
- Antonyamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, Thomson AW. Evidence for a role of IL-17 in alloimmunity: a novel IL-17 antagonist promotes heart graft survival. *Transplant Proc* 1999 Feb-Mar;31(1-2):93.
- Agarwal R, Light RP. Patterns and prognostic value of total and differential leukocyte count in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Jun;6(6):1393-9.
- de Araujo EG, da Silva GM, Dos Santos AA. Neuronal cell survival: the role of interleukins. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Feb;1153:57-64.
- Arévalo M. El riñón normal. Embriología, anatomía e histología. En: Hernando Avendaño L. (ed.). *Nefrología clínica*. Panamericana, 1997; 3-10.
- Arnello F, Ham HR, Tondeur M, Piepsz A. Evolution of single kidney glomerular filtration rate in urinary tract infection. *Pediatr Nephrol*. 1999 Feb;13(2):121-4.
- Arnett KL and Parham P. HLA class I nucleotide sequences. *Tissue Antigens* 1995; 45: 217-257.
- Arnow PM. Infections following orthotopic liver transplantation. *HPB Surg* 1991; 3: 221-232; discussion 232-233.
- Arns W and Weber M. From acute to chronic rejection after kidney transplantation. *Med Klin (Munich)*. 2002 Oct 15;97(10):609-13.

- Asea A, Hansson M, Czerkinsky C, Houze T, Hermodsson S, Strannegard O, Hellstrand K. Histaminergic regulation of interferon-gamma (IFN-gamma) production by human natural killer (NK) cells. *Clin Exp Immunol*. 1996 Aug;105(2):376-82.
- Ashokkumar C, Talukdar A, Sun Q, Higgs BW, Janosky J, Wilson P, Mazariegos G, Jaffe R, Demetris A, Dobberstein J, Soltys K, Bond G, Thomson AW, Zeevi A, Sindhi R. Allospecific CD154⁺ T cells associate with rejection risk after pediatric liver transplantation. *Am J Transplant*. 2009 Jan;9(1):179-91.
- Ascher NL, Hoffman RA, Hanto DW, Simmons RL. Cellular basis of allograft rejection. *Immunol. Rev*. 1984; 77: 217-232.
- Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for IL-10 In the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med* 1999; 190: 995-1004.
- Athie-Morales V, Smits HH, Cantrell DA, Hilkens CM. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J. Immunol* 2004 Jan 1;172(1):61-9.
- Auchincloss H Jr, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Apr 15;90(8):3373-7.
- Auchincloss H Jr. In search of the elusive Holy Grail: the mechanisms and prospects for achieving clinical transplantation tolerance. *Am J Transplant*. 2001;1:6-12.
- Awasthi A, Kuchroo VK, Jiang S. Th17 cells in health and disease. Editors: Shuiping Jiang (1st Ed) 2011 Springer-Verlag New York ISBN 978-1-4419-9370-0
- Ayres R and Adams D. Acute rejection of human liver allograft. En: *Immunology of Liver Transplantation*. Neuberger J, Adams D. (eds), Edward Arnold. Boston. 1993;197-209.
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:563-91.
- Bach FH, Bach ML, Sondel PM. Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature* 1976 Jan 29;259(5541):273-81.
- Bachmann MF and Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep*. 2007 Dec;8(12):1142–1148.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*. 1999 Jan 8;274(2):584-94.
- Barbatis C, Woods J, Morton JA, Fleming KA, McMichael A, McGhee JOD. Immunohistochemical analysis of HLA (A,B,C) antigens in liver disease using a monoclonal antibody. *Gut* 1981; 22: 985-991.

- Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, DeWaal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin10 producing regulatory CD4 (+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type1 (Th1) and Th2 inducing cytokines. *J. Exp. Med.* 2002;195,603–616.
- Barten MJ, Gummert JF, van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro. *J Immunol Methods.* 2001 Jul 1;253(1-2):95-112.
- Barten MJ, Rahmel A, Bocsi J, Boldt A, Garbade J, Dhein S, Mohr FW, Gummert JF. Cytokine analysis to predict immunosuppression. *Cytometry A.* 2006 Mar;69(3):155-7.
- Barten MJ, Tarnok A, Garbade J, Bittner HB, Dhein S, Mohr FW, Gummert JF. Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression. *Cell Prolif.* 2007 Feb;40(1):50-63.
- Basha HI, Subramanian V, Seetharam A, Nath DS, Ramachandran S, Anderson CD, Shenoy S, Chapman WC, Crippin JS, Mohanakumar T. Characterization of HCV-specific CD4+Th17 immunity in recurrent hepatitis C-induced liver allograft fibrosis. *Am J Transplant.* 2011 Apr;11(4):775-85.
- Bathgate AJ, Hynd P, Sommerville D, Hayes PC. The prediction of acute rejection in orthotopic liver transplantation. *Liver Transplant. Surg.* 1999; 5 (6): 475-479.
- Battaglia M, Gianfrani C, Gregori S, Roncarolo MG. IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1029:142-53.
- Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood.* 2005 Jun 15;105(12):4743-8.
- Battaglia M, Stabilini A, Tresoldi E. Expanding human T regulatory cells with the mTOR-inhibitor rapamycin. *Methods Mol Biol.* 2012;821:279-93.
- Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* 2006 Sep;7(9):929-36.
- Battistini L, Borsellino G, Sawicki G, Poccia F, Salvetti M, Ristori G, Brosnan CF. Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *J Immunol.* 1997 Oct 15;159(8):3723-30.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature.* 2002 Dec 5;420(6915):502-7.
- Belkaid Y and Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005 Apr;6(4):353-60.

- Belkaid Y and Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:551-89.
- Belz GT and Kallies A. Effector and memory CD8+ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination. *Current Opinion in Immunology* 2010, 22:279-285.
- Belzer FO. Clinical organ preservation with UW solution. *Transplantation* 1989; 47: 1097-1103.
- Benet LZ. Relevance of pharmacokinetics in narrow therapeutic index drugs. *Transplant Proc.* 1999 May;31(3):1642-4; discussion 1675-84.
- Benham A, Tulp A, Neefjes J. Synthesis and assembly of MHC-peptide complexes. *Immunol. Today* 1995; 16 (7): 359-362.
- Benítez F, Najafian N. Novel noninvasive assays to predict transplantation rejection and tolerance: enumeration of cytokine-producing alloreactive T cells. *Clin Lab Med.* 2008;28:365-73.
- Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayon M, Córdoba J, Herola A, Ascher N, Mir J, Berenguer J, Wright TL. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol.* 2000a;32(4):673-84.
- Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, Carrasco D, San Juan F, Burgueño MD, Mir J, Berenguer J. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology.* 2000b;32(4 Pt 1):852-8.
- Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol.* 2001;35(5):666-78.
- Berenson LS, Gavrieli M, Farrar JD, Murphy TL, Murphy KM. Distinct characteristics of murine STAT4 activation in response to IL-12 and IFN-alpha. *J. Immunol.* 2006(a) Oct 15;177(8):5195-203.
- Berenson LS, Yang J, Sleckman BP, Murphy TL, Murphy KM. Selective requirement of p38alpha MAPK in cytokine-dependent, but not antigen receptor-dependent, Th1 responses. *J. Immunol.* 2006(b) Apr 15;176(8):4616-21.
- Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, Hafler DA. IL-17 producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 2009; 113:4240-9.
- Bermejo J and Ontañón J. Rechazo en trasplante hepático: Histopatología e inmunobiología. En: *Inmunología del Trasplante Hepático.* Alvarez MR. (ed.). Ed. Síntesis. Madrid, 1997: 261-270.
- Bert F, Larroque B, Paugam-Burtz C, Janny S, Durand F, Dondero F, Valla DC, Belghiti J, Moreau R, Nicolas-Chanoine MH. Microbial epidemiology and outcome of bloodstream infections in liver transplant recipients: an analysis of 259 episodes. *Liver Transpl* 2010; 16: 393-401.

- Bes M, Sauleda S, Casamitjana N, Piron M, Campos-Varela I, Quer J, Cubero M, Puig L, Guardia J, Esteban JI. Reversal of nonstructural protein 3-specific CD4(+) T cell dysfunction in patients with persistent hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2012 Apr;19(4):283-94.
- van Besouw NM, Caliskan K, Peeters AM, Klepper M, Dieterich M, Maat LP, Weimar W, Manintveld OC, Baan CC. Interleukin-17-producing CD4(+) cells home to the graft early after human heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2015 Jul;34(7):933-40.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006. 441: 235–238.
- Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Apr;20(2):97-113.
- Blanco-García RM, López-Álvarez MR, Garrido IP, Salgado-Cecilia G, Campillo JA, Bolarín JM, Legaz I, Muro M, García-Alonso AM, Martínez-Sánchez MV, Moral JM, Pascual-Figal DA, Alvarez-López MR, Miras M, Minguela A. CD28 and KIR2D receptors as sensors of the immune status in heart and liver transplantation. *Hum Immunol.* 2011 Oct;72(10):841-8.
- Blanco-García RM, López-Álvarez MR, Garrido IP, Salgado-Cecilia G, Campillo JA, Bolarín JM, Gimeno L, Muro M, García-Alonso AM, Martínez-Sánchez MV, Bernardo Pisa MV, Soriano-Díaz S, Pascual-Figal DA, Alvarez-López MR, Minguela A. Post-transplant increase in soluble human leukocyte antigen-G associated with non-severe cardiac allograft vasculopathy. *Hum Immunol.* 2013 Mar;74(3):318-24.
- Bloemena E, Roos MT, Van Heijst JL, Vossen JM, Schellekens PT. Whole-blood lymphocyte cultures. *J Immunol Methods.* 1989 Sep 1;122(2):161-7.
- Bloom W, Fawcett DW. El hígado y la vesícula biliar. En: *Tratado de Histología*. Bloom W and Fawcett DW. (eds.). Ed. Labor, Barcelona, 1975: 690-727.
- Bluestone JA, Lecher RI. Transplantation. Editorial overview. *Curr. Opin. Immunol* 1995; 7: 617-619.
- Boden EK and Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 Nov; 24(6):733-41.
- Bodmer JG. HLA: what's in a name? A commentary on HLA nomenclature development over the years. *Tissue Antigens* 1997a; 46: 293-296.
- Bodmer JG, Parham P, Albert ED, Marsh SG. Putting a hold on "HLA-H". The WHO nomenclature Committee for Factors of the HLA system (Letter; Comment). Nomenclature for factors of the HLA system, update June 1996. *Nat. Genet.* 1997b; 15: 234-235.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-95.

- Boer K, Caliskan K, Peeters AM, van Groningen MC, Samsom JN, Maat AP, Betjes MG, Weimar W, Baan CC. Thymus-Derived Regulatory T Cells Infiltrate the Cardiac Allograft Before Rejection. *Transplantation*. 2015 Sep;99(9):1839-46.
- Böhler T, Nolting J, Kamar N, Gurragchaa P, Reisener K, Glander P, Neumayer HH, Budde K, Klupp J. Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans. *Ther Drug Monit*. 2007 Feb;29(1):77-86.
- Boix F, Millan O, San Segundo D, Mancebo E, Miras M, Rimola A, Fábrega E, Allende L, Minguela A, Paz-Artal E, López-Hoyos M, Brunet M, Muro M. Activated Regulatory T Cells Expressing CD4(+)CD25(high)CD45RO(+)CD62L(+) Biomarkers Could Be a Risk Factor in Liver Allograft Rejection. *Transplant Proc*. 2015 Oct;47(8):2380-1.
- Boix-Giner F, Millan O, San Segundo D, Muñoz-Cacho P, Mancebo E, Llorente S, Rafael-Valdivia L, Rimola A, Fábrega E, Mrowiec A, Allende L, Minguela A, Bolarín JM, Paz-Artal E, López-Hoyos M, Brunet M, Muro M. High frequency of central memory regulatory T cells allows detection of liver recipients at risk of early acute rejection within the first month after transplantation. *Int Immunol*. 2016(a) Feb;28(2):55-64.
- Boix F, Millan O, San Segundo D, Mancebo E, Rimola A, Fabrega E, Fortuna V, Mrowiec A, Castro-Panete MJ, Peña Jde L, Llorente S, Minguela A, Bolarin JM, Paz-Artal E, Lopez-Hoyos M, Brunet M, Muro M. High expression of CD38, CD69, CD95 and CD154 biomarkers in cultured peripheral T lymphocytes correlates with an increased risk of acute rejection in liver allograft recipients. *Immunobiology*. 2016(b) May;221(5):595-603.
- Boix F, Bolarín JM, Eguía J, Gonzalez-Martinez G, De La Peña J, Galian JA, Hernández-Martínez AM, Moya-Quiles MR, Legaz I, Campillo JA, Ramirez P, Sanchez-Bueno F, García-Alonso AM, Pons JA, Minguela A, Llorente S, Muro M. Pretransplant CD28 Biomarker (Levels of Expression and Quantification of Molecules per Cell) in Peripheral CD4+ T Cells Predicts Acute Rejection Episodes in Liver and Kidney Recipients. *Transplant Proc*. 2016(c) Nov;48(9):2987-2989.
- Boix F, Muro M. CD28 molecules/cell quantification and expression levels in CD4+T-cells in solid organ transplantation. *Transpl Immunol*. 2017
- Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, Drapeau CM, Rocchi G, Bergamini A. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol*. 2006 May;144(2):188-96.
- Boleslawski E, Conti F, Sanquer S, Podevin P, Chouzenoux S, Batteux F, Houssin D, Weill B, Calmus Y. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection. *Transplantation*. 2004 Jun 27;77(12):1815-20.

- Boleslawski E, BenOthman S, Grabar S, Correia L, Podevin P, Chouzenoux S, Soubrane O, Calmus Y, Conti F. CD25, CD28 and CD38 expression in peripheral blood lymphocytes as a tool to predict acute rejection after liver transplantation. *Clin Transplant*. 2008 Jul-Aug;22(4):494-501.
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 y FoXP3+ Treg cells. *Blood* 2007; 110: 1225-1232.
- Boucher A, Lord H, Collette S, Morin M, Dandavino R. Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients: Evolution of approach through three eras. *Transplant Proc* 2006; 38: 3506-3508
- Braet F, Luo D, Spector I, Vermijlen D, Wisse E. Endothelial and pit cells. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:437-453.
- Brams P, Black A, Padlan EA, Hariharan K, Leonard J, Chambers-Slater K, Noelle RJ, Newman R. A humanized anti-human CD154 monoclonal antibody blocks CD154-CD40 mediated human B cell activation. *Int Immunopharmacol* 2001;1(2): 277-94.
- Braudeau C, Racape M, Giral M, Louis S, Moreau A, Berthelot L, Heslan M, Ashton-Chess J, Soullillou JP, Brouard S. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int*. 2007 Oct;20(10):845-55.
- Braun RK, Molitor-Dart M, Wigfield C, Xiang Z, Fain SB, Jankowska-Gan E, Seroogy CM, Burlingham WJ, Wilkes DS, Brand DD, Torrealba J, Love RB. Transfer of tolerance to collagen type V suppresses T-helper-cell-17 lymphocyte-mediated acute lung transplant rejection. *Transplantation*. 2009 Dec 27;88(12):1341-8.
- Brière F, Bridon JM, Chevet D, Souillet G, Bienvenu F, Guret C, Martinez-Valdez H, Banchereau J. Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J Clin Invest*. 1994 Jul;94(1):97-104.
- Brière F, Servet-Delprat C, Bridon JM, Saint-Remy JM, Banchereau J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med*. 1994 Feb 1;179(2):757-62.
- Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J. Exp. Med*. 1993; 178, 1655-1663.
- Briscoe DM, Henault LE, Geehan C, Alexander SI, Lichtman AH. Human endothelial cell costimulation of T cell IFN-gamma production. *J Immunol*.1997;159:3247
- Bromberg JS. IL-10 immunosuppression in transplantation. *Curr. Opin. Immunol*. 1995; 7: 639-643.
- Brunet M, Campistol JM, Millán O, Vidal E, Esforzado N, Rojo I, Jiménez O, Oppenheimer F, Corbella J, Martorell J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic

- correlations of cyclosporine therapy in stable renal transplant patients: evaluation of long-term target C(2). *Int Immunopharmacol*. 2003 Jul;3(7):987-99.
- Brunet M, Campistol JM, Diekmann F, Guillen D, Millán O. T-cell function monitoring in stable renal transplant patients treated with sirolimus monotherapy. *Mol Diagn Ther*. 2007;11(4):247-56.
- Brunet M, Shipkova M, van Gelder T, Wieland E, Sommerer C, Budde K, Haufroid V, Christians U, López-Hoyos M, Barten MJ, Bergan S, Picard N, Millán López O, Marquet P, Hesselink DA, Noceti O, Pawinski T, Wallemacq P, Oellerich M. Barcelona Consensus on Biomarker-Based Immunosuppressive Drugs Management in Solid Organ Transplantation. *Ther Drug Monit*. 2016 Apr;38 Suppl 1:S1-20.
- Brunot V, Pernin V, Chartier C, Garrigue V, Vetromile F, Szwarc I, Delmas S, Portalès P, Basset D, Mourad G. An epidemic of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a renal transplantation center: role of T-cell lymphopenia. *Transplant Proc*. 2012 Nov;44(9):2818-20.
- Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):958-66.
- Burkhart C, Heusser C, Morris RE, Raulf F, Weckbecker G, Weitz-Schmidt G, Welzenbach K. Pharmacodynamics in the development of new immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit*. 2004 Dec;26(6):588-92.
- Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004 Nov;40(5):1062-71.
- Cachofeiro V, Lahera V, Tresguerres JAF. Aspectos anatómicos y funcionales del riñón. En: J. A. F. Tresguerres (3ª ed). *Fisiología humana*. McGraw-Hill, 2005; 374-379.
- Calarota SA, Zelini P, De Silvestri A, Chiesa A, Comolli G, Sarchi E, Migotto C, Pellegrini C, Esposito P, Minoli L, Tinelli C, Marone P, Baldanti F. Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2012 Jan 15;93(1):112-9.
- Calne RY. Liver transplantation: the recent Cambridge-King's College hospital experience. *Clin. Transplant*. 1987; 2: 51-54.
- Cambell DJ and Koch MA. Phenotypic and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011 February ; 11(2): 119–130.
- Carter LL and Murphy KM. Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4+ versus CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1999;189, 1355–1360.
- Carter V, Shenton BK, Jaques B, Turner D, Talbot D, Gupta A, Chapman CE, Matthews CJ, Cavanagh G. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37:654–657.

- Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2207-11.
- Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, Calzetti F, Bonora S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med*. 1994 May 1;179(5):1695-9.
- Castro De N, Xu F, Porcher R, Pavie J, Molina JM, Peraldi MN. Pneumocystis jirovecii pneumonia in renal transplant recipients occurring after discontinuation of prophylaxis: a case-control study. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Sep;16(9):1375-7.
- Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. From pharmacokinetics to pharmacogenomics: a new approach to tailor immunosuppressive therapy. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):299-310.
- Champsi J, Young LS, Bermudez LE. Production of TNF-alpha, IL-6 and TGF-beta, and expression of receptors for TNF-alpha and IL-6, during murine Mycobacterium avium infection. *Immunology*. 1995; 84:549-54
- Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res*. 2007 May;17(5):435-40.
- Chang DM, Ding YA, Kuo SY, Chang ML, Wei J. Cytokines and cell surface markers in prediction of cardiac allograft rejection. *Immunol Invest*. 1996 Jan-Mar;25(1-2):13-21.
- Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol*. 1989, 143:1283-89.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM, Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-1886.
- Chen WJ and Konkel JE. TGF-beta and 'Adaptive' Foxp3+ Regulatory T cells. *J Mol Cell Biol* 2010;Feb, 2(1): 30-36.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003, 198:1875-1886
- Chen BP, Madrigal A, Parham P. Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule. *J. Exp. Med*. 1990; 72: 779-788.
- Chen X, Zhao S, Tang X, Ge H, Liu P. Neutralization of mouse interleukin-17 bioactivity inhibits corneal allograft rejection. *Mol Vis* 2011; 17:2148-2156.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265:1237-1240.

- Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, Strominger JL. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 27-47.
- Chiu KW, Chen YS, de Villa VH, Wang CC, Eng HL, Wang SH, Liu PP, Jawan B, Huang TL, Cheng YF, Chen CL. Characterization of liver enzymes on living related liver transplantation patients with acute rejection. *Hepatogastroenterology*. 2005 Nov-Dec;52(66):1825-7.
- Cho SS, Bacon CM, Sudarshan C, Rees RC, Finbloom D, Pine R, O'Shea JJ. Activation of STAT4 by IL-12 and IFN- α : Evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *J Immunol* 1996; 157, 4781–4789.
- Choremi-Papadopoulou H, Viglis V, Gargalianos P, Kordossis T, Iniotaki-Theodoraki A, Kosmidis J. Downregulation of CD28 surface antigen on CD4+ and CD8+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1994 Mar;7(3):245-53.
- Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 2009; 30:576–87.
- Cifone MG, De Maria R, Roncaioli P, Rippo MR, Azuma M, Lanier LL, Santoni A, Testi R. Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med*. 1994; 180(4):1547-52.
- Ciobotariu R, Liu Z, Colovai AI, Ho E, Itescu S, Ravalli S, Hardy MA, Cortesini R, Rose EA, Suciuc-Foca N. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J Clin Invest*. 1998, 101:398–405.
- Clark DA and Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Mar;30(3):293-8.
- Clerici M and Shearer GM. Differential sensitivity of human T helper cell pathways by *in vitro* exposure to cyclosporin A. *J. Immunol*. 1990; 144: 2480-2485.
- Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB, Colvin RB. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection. Diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2208-14.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T cells function. *Nature* 2007. 450: 566-569.
- Colovai AY, Molajoni ER, Cortesini R, Suciuc-Foca N. New approaches to specific immunomodulation in transplantation. *Int. Rev. Immunol*. 1996; 13: 161-172.
- Conti F, Morelon E, Calmus Y. Immunosuppressive therapy in liver transplantation. *J Hepatol* 2003; 39:664-678.

- Conlon K, Osborne J, Morimoto C, Ortaldo JR, Young HA. Comparison of lymphokine secretion and mRNA expression in the CD45RA+ and CD45RO+ subsets of human peripheral blood CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1995 Mar;25(3):644-8.
- Cooper JE, Wiseman AC. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. *Clin Nephrol*. 2010 May;73(5):333-43.
- Corradin SB, Fasel N, Buchmüller-Rouiller Y, Ransijn A, Smith J, Mauël J. Induction of macrophage nitric oxide production by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha is enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol*. 1993 Aug;23(8):2045-8.
- Cottrez F and Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 2004;77(1 Suppl.):S12-S15.
- Counce S, Smith P, Barth R, Snell GD. Strong and Weak Histocompatibility Gene Differences in Mice and Their Role in the Rejection of Homografts of Tumors and Skin. *Ann Surg*. 1956 Aug; 144(2):198-204.
- Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5771-7.
- Cox DA and Maurer T. Transforming growth factor-beta. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Apr;83(1):25-30.
- Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, Farrell ML, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB, Saidman SL. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001;71(5):652-8.
- Crispim JC, Grespan R, Martelli-Palomino G, Rassi DM, Costa RS, Saber LT, Cunha FQ, Donadi EA. Interleukin-17 and kidney allograft outcome. *Transplant Proc* 2009; 41:1562-1564.
- Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 159:109-119.
- Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG, Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J. Immunol*. 2006. 177: 1416-1420.
- Cua DJ and Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):479-89. Epub 2010 Jun 18.
- Cuervas-Mons V, de la Rosa G, Pardo F, San Juan F, Valdivieso A; en representación del Registro Español de Trasplante Hepático. Activity and results of liver transplantation in Spain during 1984-2012. Analysis of the Spanish Liver Transplant Registry. *Med Clin (Barc)*. 2015 Apr 20;144(8):337-47.

- Cunnusamy K, Chen PW, Niederkorn JY. IL-17A-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells promote immune privilege of corneal allografts. *J Immunol.* 2011; 186(12): 6737–6745.
- Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009 May;30(5):626-35.
- Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 2005; 174, 4465–4469.
- Dagher L and Burroughs AK. Liver transplantation: prevention and treatment of rejection. In: *Evidence Based Gastroenterology and Hepatology*. McDonald J, Burroughs A, Feagan B (Ed.). Editorial BMJ Books London; 1999, p. 491–511.
- Dambrin C, Klupp J, Morris RE. Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Curr Opin Immunol.* 2000 Oct;12(5):557-62.
- Dantal J and Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005; 352:1371-1373.
- Deteix C, Attuil-Audenis V, Duthey A, Patey N, McGregor B, Dubois V, Caligiuri G, Graff-Dubois S, Morelon E, Thauinat O. Intra-graft Th17 infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection. *J Immunol* 2010; 184:5344–5351.
- Dedeoglu B, Meijers RW, Klepper M, Hesselink DA, Baan CC, Litjens NH, Betjes MG. Loss of CD28 on Peripheral T Cells Decreases the Risk for Early Acute Rejection after Kidney Transplantation. *PLoS One.* 2016 Mar 7;11(3):e0150826.
- De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I, *et al.* Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine.* 1992 May;4(3):239-48.
- Dejuco N, Dugast I, Ruffault A, van der Meide PH, Jégou B. Interferon-alpha and -gamma expression in the rat testis. *Endocrinology.* 1995 Nov;136(11):4925-31.
- De Koster S, Anderson DC, Termijtelen A. T cells sensitized to synthetic HLA-DR3 peptide give evidence of continuous presentation of denatured HLA-DR3 molecules by HLA-DP. *J. Exp. Med.* 1989; 169: 1191-1196.
- Deknuydt F, Bioley G, Valmori D, Ayyoub M. IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol* 2009; 131:298–367.
- Del Castillo-Olivares JL and Álvarez-Ayuso L. Introducción a los trasplantes. Aspectos históricos, técnicos y jurídicos. In: Cuervas-Mons V, del Castillo-Olivares JL, Arán SA, eds. *Introducción al Trasplante de órganos y Tejidos. 2ª Edición*, Madrid, 1999:21-56.
- Demetris AJ, Markus BH, Burnham J, Nalesnik M, Gordon RD, Makowka L, Starzl TE. Antibody deposition in liver allografts with chronic rejection. *Transplant Proc* 1987;19(suppl 5):121-125.

- Demetris AJ, Jaffe R, Tzakis A, Ramsey G, Todo S, Belle S, Esquivel C, Shapiro R, Zjako A, Markus B. Antibody mediated rejection of human liver allografts: transplantation across ABO blood group barriers. *Transplant. Proc.* 1989; 21: 2217-2220.
- Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJ. Decrease of CD4+CD25+ T cells in peripheral blood after liver transplantation: association with immunosuppression. *Transplant Proc.* 2005 Mar;37(2):1194-6.
- De Pasquale C, Veroux M, Indelicato L, Sinagra N, Giaquinta A, Fornaro M, Veroux P, Pistorio ML. Psychopathological aspects of kidney transplantation: Efficacy of a multidisciplinary team. *World J Transplant.* 2014 Dec 24;4(4):267-75.
- Derynck R and Feng XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Oct 24;1333(2):F105-50.
- Deteix C, Attuil-Audenis V, Duthey A, Patey N, McGregor B, Dubois V, Caligiuri G, Graff-Dubois S, Morelon E, Thauinat O. Intra-graft Th17 infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection. *J Immunol* 2010; 184:5344–5351.
- De Waal MR, Haanen J, Yssel H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Spits H, de Vries JE. IL-10 and v-IL-10 strongly reduce antigen specific human T cell responses by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II MHC expression. *J Exp Med.* 1991(a);174: 915.
- De Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin-10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991(b);174: 1209.
- Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce- Shaikh B, Chen Y, Tato CM, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Hunter CA, Cua DJ, Kastelein RA IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J. Immunol.* 2009. 182: 5748–5756.
- Djamali A, Samaniego M, Muth B, Muehrer R, Hofmann RM, Pirsch J, Howard A, Mourad G, Becker BN. Medical care of kidney transplant recipients after the first posttransplant year. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;1(4):623-40.
- Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 2007;8, 145–153.
- Donaldson PT, O'Grady J, Portmann B, Thick M, Davis H, Calne RY, Williams R. Evidence for an immune response to HLA class I antigens in the vanishing-bileduct syndrome after liver transplantation. *Lancet* 1987; I: 945-951.
- Doreau A, Belot A, Bastid J. Interleukin 17 acts in synergy with B cellactivating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 2009; 10:778–785.

- Duan L, Wang CY, Chen J, Gong Q, Zhu P, Zheng F, Tan Z, Gong F, Fang M. High-mobility group box 1 promotes early acute allograft rejection by enhancing IL-6-dependent Th17 alloreactive response. *Lab Invest* 2011; 91:43–53.
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*. 1995 May 5;270(18):10618-24.
- Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur J Immunol* 2003; 33:2069–2073.
- Eguizabal C, Boyano MD, Díez-Torre A, Andrade R, Andollo N, De Felici M, Aréchaga J. Interleukin-2 induces the proliferation of mouse primordial germ cells in vitro. *Int J Dev Biol*. 2007;51(8):731-8.
- Ely LK, Fischer S, Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol*. 2009 Dec;10(12):1245-51. Epub 2009 Oct 18.
- Essaket S, Fabron J, De Preval C, Thomsen M. Corecognition of HLA-A1 and HLA-DPw3 by human CD4+ alloreactive T lymphocyte clone. *J. Exp. Med*. 1990; 172: 387-390.
- Fabrega E, Lopez-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Pons-Romero F. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15:629–633.
- Falcone DJ, McCaffrey TA, Mathew J, McAdam K, Borth W. THP-1 macrophage membrane-bound plasmin activity is up-regulated by transforming growth factor-beta 1 via increased expression of urokinase and the urokinase receptor. *J. Cell Physiol*. 1995; 164:334–43
- Fan H, Li LX, Han DD, Kou JT, Li P, He Q. Increase of peripheral Th17 lymphocytes during acute cellular rejection in liver transplant recipients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2012 Dec 15;11(6):606-11.
- Fan L, Benson HL, Vittal R, Mickler EA, Presson R, Fisher AJ, Cummings OW, Heidler KM, Keller MR, Burlingham WJ, Wilkesb DS. Neutralizing IL-17 prevents obliterative bronchiolitis in murine orthotopic lung transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11:911–922.
- Farges O, Saliba F, Farhamant H, Samuel D, Bismuth A, Reynes M, Bismuth H. Incidence of rejection and infection after liver transplantation as a function of the primary disease: possible influence of alcohol and polyclonal immunoglobulins. *Hepatology* 1996; 23: 240-248.
- Farhan S, Lee DA, Champlin RE, Ciurea SO. NK cell therapy: targeting disease relapse after hematopoietic stem cell transplantation. *Immunotherapy*. 2012 Mar; 4(3):305-13.
- Fellstrom B. Nonimmune risk factors for chronic renal allograft dysfunction [Review]. *Transplantation* 2001;71(11 Suppl):SS10-6.

- Feng L, Tang WW, Chang JC, Wilson CB. Molecular cloning of rat cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) cDNA and expression in spleen and macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Apr 30;192(2):452-8.
- Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Romo EM, Allende LM, Meneu JC, Fundora-Suárez Y, San-Juan R, Lizasoain M, Paz-Artal E, Aguado JM. Pretransplant lymphocyte count predicts the incidence of infection during the first two years after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2009 Oct;15(10):1209-16.
- Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, Lora-Pablos D, García-Reyne A, González E, Morales JM, San Juan R, Lumbreras C, Paz-Artal E, Andrés A, Aguado JM. Monitoring of immunoglobulin levels identifies kidney transplant recipients at high risk of infection. *Am J Transplant*. 2012 Oct;12(10):2763-73.
- Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, Morales JM, García-Reyne A, San Juan R, Lumbreras C, Lora-Pablos D, Polanco N, Andrés A, Paz-Artal E, Aguado JM. Hypocomplementemia in kidney transplant recipients: impact on the risk of infectious complications. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13(3):685-94.
- Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, Andrés A, García-Reyne A, Lumbreras C, San-Juan R, Morales JM, Paz-Artal E, Aguado JM. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014(a) Jul;27(7):674-85.
- Fernández-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clinical & Translational Immunology* 2014(b) Feb 28;3(2):e12.
- Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, Land W, Albert E. Capillary deposition of C4d complement fragment and early graft loss. *Kidney Int* 1993;43:1333-8.
- Finney OC, Riley EM, Walther M. Phenotypic analysis of human peripheral blood regulatory T cells (CD41FOXP31CD127lo/-) ex vivo and after in vitro restimulation with malaria antigens. *Eur. J. Immunol*. 2010. 40: 47-60
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR.. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989 Dec 1;170(6):2081-95.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 1991(a) May 15;146(10):3444-51.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991(b) Dec 1;147(11):3815-22.
- First MR. Renal function as a predictor of long-term graft survival in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 May;18 Suppl 1:i3-6.
- Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2601-2614

- Fluckiger AC, Garrone P, Durand I, Galizzi JP, Banchereau J. Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J Exp Med.* 1993 Nov 1;178(5):1473-81.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 2003; 4(4): 330-336.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996 Jun 1;183(6):2593-603.
- Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med.* 2005 Oct;11(10):1118-24.
- Frentsch M, Stark R, Matzmohr N, Meier S, Durlanik S, Schulz AR, Stervbo U, Jürchott K, Gebhardt F, Heine G, Reuter MA, Betts MR, Busch D, Thiel A. CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood.* 2013 Jul 18;122(3):405-12.
- Fung JJ, Zeevi A, Starzl TE, Iwatsuki S, Duquesnoy RJ. Functional characterization of infiltrating T lymphocytes in human hepatic allografts. *Human Immunol.* 1986; 16: 182-199.
- Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. TGF- β induces FOXP3+ Treg cells from CD4+CD25- precursors. *Am. J. Transplant.* 2004; 4: 1614-1627.
- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003. 52: 65–70.
- Fukami N, Ramachandran S, Saini D, Walter M, Chapman W, Patterson GA, Mohanakumar T. Antibodies to MHC class I induce autoimmunity: role in the pathogenesis of chronic rejection. *J Immunol* 2009; 182:309–318.
- Fung JJ, Zeevi A, Starzl TE, Iwatsuki S, Duquesnoy RJ. Functional characterization of infiltrating T lymphocytes in human hepatic allografts. *Human Immunol.* 1986; 16: 182-199.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):556-67. Epub 2009 Jul 3.
- Ganji MR, Broumand B. Acute cellular rejection. *Iran J Kidney Dis.* 2007 Oct;1(2):54-6.
- García-Alonso A, Minguela A, Muro M, Ontañón J, Torío A, Marín L, López-Segura P, Álvarez-López MR. CD28 expression on peripheral blood T lymphocytes after orthotopic liver transplant: upregulation in acute rejection. *Human Immunol.* 1997; 53: 64-72.

- Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987;84:7251–7255.
- Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells *in vivo*. *Nat. Immunol* 2002; 3, 33–41.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* 1992 Mar 15;148(6):1792-6.
- Gebauer BS, Hricik DE, Atallah A, Bryan K, Riley J, Tary-Lehmann M, Greenspan NS, Dejeo C, Boehm BO, Hering BJ, Heeger PS. Evolution of the enzyme-linked immunosorbent spot assay for post-transplant alloreactivity as a potentially useful immune monitoring tool. *Am J Transplant.* 2002 Oct;2(9):857-66.
- Gelson W, Hoare M, Dawwas MF, Vowler S, Gibbs P, Alexander G. The pattern of late mortality in liver transplant recipients in the United Kingdom. *Transplantation* 2011; 91: 1240-1244
- Gill R, Hao L, Lafferty K. Antigen presentation and allo-immunity. En: *Immunology of liver transplantation*. Neuberger J. y Adams D. (eds). Edward Arnold. Boston, 1993: 115-126.
- Gill JS, Tonelli M, Mix CH, Pereira BJ. The change in allograft function among long-term kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jun;14(6):1636-42.
- Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazzieri R, Noguera I, Rifkin DB. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells.* 1997;15(3):190-7.
- Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat Rev Immunol.* 2004 Nov;4(11):900-11.
- Goldstein IJ, Hollerman CE, Smith EE. Protein-carbohydrate interaction II: Inhibition studies on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides. *Biochemistry.* 1965 May;4:876-83.
- Godoy-Ramirez K, Franck K, Mahdavi S, Andersson L, Gaines H. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2004 Sep;292(1-2):1-15.
- Goh A, Scalapogna M, De Feo T, Poli F, Terasaki PI. Human leukocyte antigen crossmatch testing is important for liver retransplantation. *Liver Transpl.* 2010 Mar;16(3):308-13.
- Goodfellow PN, Jones EA, Van Heyningen V, Solomon E, Bobrow M, Miggiano V, Bodmer WF. The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature.* 1975 Mar 20;254(5497):267-9.

- Gordon RD, Esquivel CO, Iwatsuki S, Starzl TE. Liver transplantation across ABO blood groups. *Surgery* 1986a; 100: 342-348.
- Gordon RD, Fung JJ, Markus B, Fox I, Iwatsuki S, Esquivel CO, Tzakis A, Todo S, Starzl TE. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery* 1986b; 100: 705-715.
- Gordon R. D., Iwatsuki S., Esquire C. O., et al. Experience with primary liver transplantation across ABO blood groups. *Transplant. Proc.* 1987; 19: 4575.
- Gouw ASH, Houthoff HJ, Huitema S, Beelen JM, Gips CH, Poppema S. Expression of major histocompatibility complex antigens and replacement of donor cells by recipient ones in human liver grafts. *Transplantation* 1987; 43: 291-296.
- Gouw ASH, Huitema S, Grond J, et al. MHC antigen expression in human liver grafts: its role in rejection. *Hepatology* 1990; 11 (4): 704-711.
- Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4 (+) CD25 (+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J. Immunol.* 2002; 168:5558–5565.
- Gray P.W. and Goeddel D.V. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; 298, 859 – 863.
- Gregori S, Bacchetta R, Passerini L, Levings MK, Roncarolo MG. Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells. *Methods Mol Biol.* 2007;380:83-105.
- Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatoryT cells. *Front Immunol.* 2012;3(30):1-12.
- Grewal IS and Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-35.
- Grewal IS and Flavell RA. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol Today.* 1996 Sep;17(9):410-4.
- Grogan JL and Locksley RM. T helper cell differentiation: On again, off again. *Curr. Opin. Immunol.* 2002;14, 366–372.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, De Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389, 737–742.
- Guillouche P and Feray C. Systematic review: anti-viral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(2):163-74.
- Gupta AA, Leal-Berumen I, Croitoru K, Marshall JS. Rat peritoneal mast cells produce IFN-gamma following IL-12 treatment but not in response to IgE-mediated activation. *J Immunol.* 1996 Sep 1;157(5):2123-8.

- Haider AS, Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Zaba LC, Cardinale I, Khatcherian A, Novitskaya I, Wittkowski KM, Krueger JG. Identification of cellular pathways of 'type 1,' Th17 T cells, and TNF- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J Immunol* 2008; 180:1913–1920.
- Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2004 Dec 23;351(26):2715-29.
- Halloran PF, Wadgymer A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I mediated rejection. *Transplantation* 1990;49:85-91.
- Ham AW and Cormack DH. *Tratado de Histología*. Ed. Interamericana. Madrid, 1984.
- Hammer J, Valsasnini P, Tolba K, Bolin D, Higelin J, Takacs B, Sinigaglia F. Promiscuous and allele specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 1993; 74: 197-203.
- Hanley JA and McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982; 143:29.
- Halloran PF, Wadgymer A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation*. 1990 Jan;49(1):85-91.
- Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation*. 1999 Nov 15;68(9):1356-61.
- 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; 166:3789–3796.
- Hardinger KL and Brennan DC. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. *World J Transplant* 2013 December 24; 3(4): 68-77.
- Hariharan S, McBride MA, Cohen EP. Evolution of endpoints for renal transplant outcome. *Am J Transplant*. 2003 Aug;3(8):933-41.
- Hariharan S, Kasiske B, Matas A, Cohen A, Harmon W, Rabb H. Surrogate markers for long-term renal allograft survival. *Am J Transplant*. 2004 Jul;4(7):1179-83.
- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18:275-308.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005. 6: 1123–1132.
- Hassan R, Gheith O. Chronic antibody-mediated rejection: review of literature. *Iran J Kidney Dis*. 2014 Mar;8(2):93-103.

- Haudenschild D, Moseley T, Rose L, Reddi AH. Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2002 Feb 8;277(6):4309-16.
- Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, Dejelo C, Hricik DE, Schulak JA, Tary-Lehmann M. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol*. 1999 Aug 15;163(4):2267-75.
- Heidecke CD, Kupiec-Weglinski JW, Lear DA, *et al*. Interactions between T lymphocyte subsets supported by IL2 rich lymphokines produce acute rejection of vascularised cardiac allograft in T cell deprived rats. *J Immunol*. 1984; 133: 582-588.
- Hernandez MG, Shen L, Rock KL. CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8+ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4+ T cell help. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2844-52.
- Herndler-Brandstetter D, Schwaiger S, Veel E, Fehrer C, Cioca DP, Almanzar G, Keller M, Pfister G, Parson W, Würzner R, Schönitzer D, Henson SM, Aspinall R, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstein B. CD25-Expressing CD8 T Cells Are Potent Memory Cells in Old Age. *J Immunol* 2005; 175:1566-1574
- Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, Pardo F, Rotellar F, Alvarez-Cienfuegos J, Prieto J. Herpes zoster after liver transplantation: incidence, risk factors, and complications. *Liver Transpl* 2004; 10: 1140-1143
- Hester J, Mills N, Shankar S, Carvalho-Gaspar M, Friend P, Wood KJ. Th17 cells in alemtuzumab-treated patients: the effect of long-term maintenance immunosuppressive therapy. *Transplantation* 2011; 91:744–750.
- Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T., Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990. 63: 1149–1157.
- Hilbe J. Model development. In: Hilbe J, (ed). Logistic regression models. Boca Raton: Chapman & Hall / CRC Press, 2009: 73-187.
- Hildemann WH and Medawar PB. Relationship between Skin Transplantation Immunity and the Formation of Humoral Isoantibodies in Mice. *Immunology* 1959;2(1): 44–52.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, *et al*. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324:73–76.
- Ho IC and Glimcher LH. Transcription: Tantalizing times for T cells. *Cell* 2002;109 (Suppl.), S109–S120.
- Höckerstedt K. Treatment and prevention of liver allograft rejection with OKT3. *Clin. Transplant*. 1993; 7: 403-413.
- Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, Edinger M. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 2006; 108, 4260–4267.

- 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; 196:389–399.
- Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2005. 237: 123–130.
- Höidén I and Möller G. CD8+ cells are the main producers of IL10 and IFN gamma after superantigen stimulation. *Scand J Immunol.* 1996 Nov;44(5):501-5.
- Holzknacht ZE, Platt JL. The fine cytokine line between graft acceptance and rejection. *Nat Med.* 2000 May;6(5):497-8.
- Honstetter A, Meghari S, Nunès JA, Lepidi H, Raoult D, Olive D, Mege JL. Role for the CD28 molecule in the control of *Coxiella burnetii* infection. *Infect Immun.* 2006 Mar;74(3):1800-8.
- Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32, 1282–1291.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299, 1057–1061.
- Hosmer D and Lemeshow S. Model-building strategies and methods for logistic regression. In: Hosmer D, Lemeshow S, (eds). *Applied logistic regression*. 2nd ed. New York: Wiley, 2000: 91-142.
- Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol.* 1992 Jul;12(4):239-47.
- Howie SEM, Aldridge RD, McVittie E, Forsey RJ, Sands C, Hunter JA. Epidermal keratinocyte production of interferon-gamma immunoreactive protein and mRNA is an early event in allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 1996. 106: 1218-2.
- Hsuaury P, Von Willebrand E, Parthenais E, Nemlander A, Soots A, Lautenschlager I, Alföldy P, Renkonen R. The inflammatory mechanisms of allograft rejection. *Immunol. Rev.* 1984; 77: 85-99.
- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD41T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993. 260: 547–549.
- Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, Yi J, Guentert T, Tousson A, Stanus AL, Le TV, Lorenz RG, Xu H, Kolls JK, Carter RH, Chaplin DD, Williams RW, Mountz JD. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008; 9:166–175.
- Hu Y, Ota N, Peng I, Refino CJ, Danilenko DM, Caplazi P, Ouyang W. IL-17RC is required for IL-17A- and IL-17F-dependent signaling and the pathogenesis of

- experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2010 Apr 15;184(8):4307-16.
- Hubscher S and Neuberger J. Chronic rejection of the liver allograft. En: *Immunology of liver transplantation.* Neuberger J. y Adams D. (eds.). E. Arnold ed. Boston. 1993: 216-229.
- Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Bräuer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2004 Feb 2;199(3):303-13.
- Hughes VF, Trull AK, Gimson A, Friend PJ, Jamieson N, Duncan A et al. Randomised trial to evaluate the clinical benefits of serum alpha-glutathione S-transferase concentration monitoring after Liver transplantation. *Transplantation* 1997; 64: 1446-52.
- Huter EN, Stummvoll GH, DiPaolo RJ, Glass DD, Shevach EM. Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease. *J. Immunol.* 2008 Dec 15;181(12):8209-13.
- Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2006 Oct 30;203(11):2473-83.
- Hwang K, Yoo KY, Kim DW, Lee HJ, Kang HY, Lee HY, Kang TC, Choi SY, Kim YS, Won MH. Transient ischemia-induced changes of interleukin-2 and its receptor immunoreactivity and level in the gerbil hippocampal CA1 region. *Brain Res* 2006. 1106, 197–204.
- Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM, Starovasnik MA. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* 2001 Oct 1;20(19):5332-41.
- Iacob S, Cicinnati VR, Lindemann M, Heinemann FM, Radtke A, Kaiser GM, Kabar I, Schmidt HH, Baba HA, Beckebaum S. Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Endothelial C4d Deposition-Association With Chronic Liver Allograft Failure. *Transplantation.* 2015 Sep;99(9):1869-75.
- Ihle JN and Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 1995. 11: 69–74.
- Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2010 Jan; 25(1): 61–74.
- Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura E, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, Nakae S, Fischbein MP. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. *Circulation* 2011; 124 (11 Suppl):S187–S196.

- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 1999; 162:5317–5326.
- Itoh S, Nakae S, Axtell RC, Velotta JB, Kimura N, Kajiwara N, Iwakura Y, Saito H, Adachi H, Steinman L, Robbins RC, Fischbein MP. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model. *J Clin Immunol* 2010; 30:235–240.
- Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura E, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, Nakae S, Fischbein MP. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. *Circulation.* 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S187-96.
- Ivanyi D, Sasseportes M, Dausset J. Evaluation of Mixed Lymphocyte cultures according to changes in the Lymphocyte nucleoli. *Folia Biol (Praha).* 1968; 14(1):21-5.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 2006. 126: 1121–1133.
- Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:57-79.
- Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):559-70.
- Jacobs SC and McLaughlin AP. (3rd) Halasz NH, Gittes RF. Live donor nephrectomy. *Urology.* 1975 Feb;5(2):175-7.
- Jalalzadeh M, Mousavinasab N, Peyrovi S, Ghadiani MH. The impact of acute rejection in kidney transplantation on long-term allograft and patient outcome. *Nephrourol Mon.* 2015 Jan 20;7(1):e24439.
- Jamieson NV. Immunosuppression and the management of rejection. In: Klinck JR, Lindop MJ (eds). *Anaesthesia and intensive care for organ transplantation.* London: Chapman and Hall Medical: 25-41, 1998.
- Janitz M, Mitchison A, Reiners-Schramm L, Lauster R. Polymorphic MHC class II exhibit distinct expression pattern in various antigen-presenting cells. *Tissue Antigens* 1997; 49: 99-106.
- Janke M, Peine M, Nass A, Morawietz L, Hamann A. and Scheffold A, In vitro-induced Th17 cells fail to induce inflammation in vivo and show an impaired migration into inflamed sites. *Eur. J. Immunol.* 2010. 40: 1089–1098.
- Jiang H, Canfield SM, Gallagher MP, Jiang HH, Jiang Y, Zheng Z, Chess L. HLA-E-restricted regulatory CD8⁺ T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J. Clin. Invest* 2010; 120, 3641–3650.

- Johnston A and Holt DW. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Br J Clin Pharmacol.* 1999 Apr; 47(4): 339–350.
- Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J and Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, non proliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp.Med.* 2000; 192:1213–1222.
- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and Functional Characterization of Human CD4 CD25 T Cells with Regulatory Properties Isolated from Peripheral Blood. *J. Exp. Med.*2001; 11:1285–1294.
- Joosten SA, Sijkens YW, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 2005 Jul;68(1):1-13.
- Jordan F, McWhinnie AJ, Turner S, Gavira N, Calvert AA, Cleaver SA, Holman RH, Golman JM, Madrigal JA. Comparison of HLA-DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR-SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. *Tissue Antigens* 1995; 45:103-110.
- Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Najj A, Caton AJ. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2001;2:301–306.
- Jorge S, Guerra J, Santana A, Mil-Homens C, Prata MM. Mycophenolate mofetil: ten years' experience of a renal transplant unit. *Transplant Proc* 2008; 40: 700-704
- Jorgensen PF, Wang JE, Almlöf M, Solberg R, Okkenhaug C, Scholz T, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO. Sirolimus interferes with the innate response to bacterial products in human whole blood by attenuation of IL-10 production. *Scand J Immunol.* 2001 Feb;53(2):184-91.
- Josien R, Douillard P, Guillot C, Müschen M, Anegon I, Chetritt J, Menoret S, Vignes C, Soulillou JP, Cuturi MC. A critical role for transforming growth factor- β in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J. Clin. Invest.* 1998; 102:1920–1926.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998 Apr 1;160(7):3513-21.
- Kaech SM and Ahmed R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat Immunol.* 2001 May;2(5):415-22.
- Kahan BD. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat Rev Immunol.* 2003 Oct;3(10):831-8.
- Kaneku H, O'Leary JG, Banuelos N, Jennings LW, Susskind BM, Klintmalm GB, Terasaki PI. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant.* 2013 Jun;13(6):1541-8.

- Karuthu S, Blumberg EA. Common infections in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Dec;7(12):2058-70.
- Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol*. 1994 Apr 1;152(7):3559-69.
- Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988. 332: 83–85.
- Kawecki D, Chmura A, Pacholczyk M, Lagiewska B, Adadynski L, Wasiak D, Czerwinski J, Malkowski P, Sawicka-Grzelak A, Kot K, Wroblewska M, Rowinski W, Durlik M, Paczek L, Luczak M. Bacterial infections in the early period after liver transplantation: etiological agents and their susceptibility. *Med Sci Monit* 2009; 15: CR628-CR637
- Kaye PM. Costimulation and the regulation of antimicrobial immunity. *Immunol. Today* 1995; 16 (9): 423-427.
- Kelchtermans H, Billiau A, Matthys P. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol*. 2008 Oct;29(10):479-86.
- Kenneth GN, Jason TJ, Sanabria JR, Kercher KW. Living Related Donor Nephrectomy, Right Side. In: *The SAGES Manual of Strategic Decision Making*; 2008, pp 433-445.
- Khader SA and Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence*. 2010 Sep-Oct;1(5):423-7.
- Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect*. 1999 Dec;1(15):1255-63.
- Kievits F and Ivanyi PA. Subpopulation of mouse cytotoxic T lymphocytes recognize allogeneic H-2 class I antigens in the context of other H-2 class I molecules. *J. Exp. Med*. 1991; 174:15-19.
- Kim JR, Lim HW, Kang SG, Hillsamer P, Kim CH. Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination. *BMC Immunol*. 2005 Feb 4;6:3.
- Kim SH, Oh EJ, Kim MJ, Park YJ, Han K, Yang HJ, Kim JY, Choi BS, Yang CW, Kim YS, Bang BK. Pretransplant donor-specific interferon-gamma ELISPOT assay predicts acute rejection episodes in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2007 Dec;39(10):3057-60.
- Kim SH, Oh EJ, Ghee JY, Song HK, Han DH, Yoon HE, Choi BS, Yoon SK, Choi JY, Moon IS, Kim DG, Yang CW. Clinical significance of monitoring circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in kidney transplantation during the early posttransplant period. *J Korean Med Sci*. 2009 Jan;24 Suppl:S135-42.
- Kimura A and Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010 Jul;40(7):1830-5.

- Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2008. 105: 9721–9726.
- King CL, Xianli J, June CH, Abe R, Lee KP. CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection. *Eur J Immunol*. 1996 Oct;26(10):2448-55.
- Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*. 1994 Jan;8(2):133-46.
- Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, Von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by resting MHC molecules. *Nature* 1988; 335: 730-733.
- Kishimoto T, Akira S, Taga T., Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 1992. 258: 593–597.
- Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGK *et al.*, eds. (1997) Leucocyte typing VI: white cell differentiation antigens. *Garland Publishing Inc.*, London.
- Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allograft, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; II: 662.
- Kitao T and Hattori K. Concanavalin A as a carrier of daunomycin. *Nature*. 1977 Jan 6;265(5589):81-2.
- Klein J, Geib R, Chiang C, Hauptfeld V. Histocompatibility antigens controlled by the I region of the murine H-2 complex I. Mapping of H-2A and H-2C Loci. *J Exp Med*. 1976; 143(6):1439-52.
- Klein J and Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343:702-709.
- Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, Borsellino G, Battistini L, Rotzschke O, Falk K. CD49d provides access to “untouched” human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 2009; 113, 827–836.
- Klntmalm GMB, Nery JR, Husberg BS, Gonwa TA, Tillery GW. Rejection in liver transplantation. *Hepatology* 1989; 10: 978-985.
- Klupp J, Dambrin C, Regieli J, van Gelder T, Shorthouse R, Morris RE. New approach in drug development: whole blood pharmacodynamic assays reflect biological activities of tacrolimus. *Transplant Proc*. 2001 May;33(3):2172.
- Knapp W, Dorken B, Gilks W, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGK, eds. (1989) Leucocyte typing IV: white cell differentiation antigens. *Oxford University Press*, Oxford.
- Koo DH, Roberts I, Quiroga I, Procter J, Barnardo MC, Sutton M, Cerundolo L, Davies DR, Friend PJ, Morris PJ, Fuggle SV. C4d deposition in early renal allograft biopsies. *Transplantation* 2004;78(3):398-403.

- Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van RE, Boots AM, Joosten I. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008; 112:2340–52.
- Koli K, Saharinen J, Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Tech*. 2001 Feb 15;52(4):354-62.
- Kolls JK and Linden A, Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004. 21: 467–476.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*. 2006. 177: 566–573.
- Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PLoS One*. 2014 Jun 6;9(6):e98521.
- König V, Bauditz J, Lobeck H, Lüsebrink R, Neuhaus P, Blumhardt G, Bechstein WO, Neuhaus R, Steffen R, Hopf U. Hepatitis C virus reinfection in allografts after orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1992 Nov;16(5):1137-43.
- Kopf H, de la Rosa GM, Howard OM, Chen X. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. *Int Immunopharmacol* 2007; 7:1819–1824.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007. 448: 484–487.
- Kowalski J, Labuzek K, Herman ZS. Flupentixol and trifluoperidol reduce interleukin-1 beta and interleukin-2 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *Pol J Pharmacol*. 2004 Sep-Oct;56(5):563-70.
- Kozłowski T, Rubinas T, Nিকেleit V, Woosley J, Schmitz J, Collins D, Hayashi P, Passannante A, Andreoni K. Liver allograft antibody-mediated rejection with demonstration of sinusoidal C4d staining and circulating donor specific antibodies. *Liver Transplant*. 2011, 17, 357-368.
- Kozłowski T, Andreoni K, Schmitz J, Hayashi PH, Nিকেlei V. Sinusoidal C4d deposits in liver allografts indicate an antibody-mediated response: diagnostic considerations in the evaluation of liver allografts. *Liver Transplant*. 2012, 18, 641-658.
- Krause CD, Lunn CA, Izotova LS, Mirochnitchenko O, Kotenko SV, Lundell DJ, Narula SK, Pestka S. Signaling by covalent heterodimers of interferon-gamma. Evidence for one-sided signaling in the active tetrameric receptor complex. *J Biol Chem*. 2000 Jul 28;275(30):22995-3004.
- Kreis HA and Ponticelli C. Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death, and other factors. *Transplantation* 2001;71(11 Supl):SS5-9.

- Kurokohchi K, Masaki T, Arima K, Miyauchi Y, Funaki T, Yoneyama H, Yoshida S, Deguchi A, Nakai S, Watanabe S, Kuriyama S. CD28-negative CD8-positive cytotoxic T lymphocytes mediate hepatocellular damage in hepatitis C virus infection. *J Clin Immunol*. 2003 Nov;23(6):518-27.
- Knechtle SJ, Kolbeck PC, Tsuchimoto S, Coundouriotis A, Sanfilippo F, Bollinger RR. Hepatic transplantation into sensitised recipients. Demonstration of hyperacute rejection. *Transplantation* 1987; 43: 8-12.
- Lafferty KJ, Prowse SJ, Simeonovic CJ. Immunology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Ann. Rev. Immunol*. 1983; 1: 143-173.
- Langman LJ, LeGatt DF, Halloran PF, Yatscoff RW. Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation*. 1996 Sep 15;62(5):666-72.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med*. 2005. 201: 233–240.
- Laurence A1, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007 Mar;26(3):371-81.
- Lautenschlager I and Häyry P. Expression of major histocompatibility complex antigens on different liver cellular component in rat and man. *Scand. J. Immunol*. 1981; 14: 241-246.
- Lautenschlager I, Höckerstedt K, Hayry P. Activation markers in acute liver allograft rejection. *Transplant. Proc*. 1988; 20: 646-647.
- Lawler S, Candia AF, Ebner R, Shum L, Lopez AR, Moses HL, Wright CV, Derynck R. The murine type II TGF-beta receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF-beta 1. *Development*. 1994 Jan;120(1):165-75.
- Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw*. 1996 Sep;7(3):363-74.
- Lechler RY, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol. Today* 1990; 11: 83-88.
- Lee HC, Sung SS, Krueger PD, Jo YA, Rosen HR, Ziegler SF, Hahn YS. Hepatitis C virus promotes T-helper (Th)17 responses through thymic stromal lymphopietin production by infected hepatocytes. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1314-24.
- Leeuwenberg JF, Jeunhomme TM, Buurman WA. Slow release of soluble TNF receptors by monocytes in vitro. *J. Immunol*. 1994;152:4036.
- Le Gros G and Erard F. Non-cytotoxic, IL-4, IL-5, IL-10 producing CD8+ T cells: their activation and effector functions. *Curr Opin Immunol*. 1994 Jun;6(3):453-7.

- Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation*. 2002 May 15;73(9):1373-81.
- Le Moine O, Marchant A, Durand F, Ickx B, Pradier O, Belghiti J, Abramowicz D, Gelin M, Goldman M, Deviere J. Systemic release of interleukin-10 during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 889-892.
- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:137-61.
- Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 2005;105, 1162–1169.
- Levy Y and Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest*. 1994 Jan;93(1):424-8.
- Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M, Goldman SJ, Dunussi-Joannopoulos K, Williams CM, Wright JF, Fouser LA. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol*. 2007 Dec 1;179(11):7791-9.
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2001, USA 98, 15137–15142.
- Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D, Tufveson G, Persson H, Persson NH. The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation*. 1993 Aug;56(2):307-15.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell*. 1991 Nov 1;67(3):601-16.
- Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol*. 1994 Feb 15;152(4):1821-9.
- Liu Z, Braunstein NS, Suciufoca N. T cell recognition of allopeptides in context of syngeneic MHC. *J Immunol*. 1992; 148: 35-40.
- Liu Z, Yuan X, Luo Y, He Y, Jiang Y, Chen ZK, Sun E. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. *Cytokine* 2009; 45:141–147.
- 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+ Treg cells. *J. Exp. Med*. 2006; 203, 1701–1711.
- Lokhande MU, Thimme R, Klenerman P, Semmo N. Methodologies for the Analysis of HCV-Specific CD4(+) T Cells. *Front Immunol*. 2015 Feb 25;6:57.

- Lombardi G, Sidhu S, Lamb JR, Batchelor JR, Lechler RY. Endogenous peptides contribute to the ligand recognized by anti-DR1 human alloreactive T cells. *Transplant. Proc.* 1989; 21: 142-144.
- Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 2002; 197:322-332.
- López-Alvarez MR, Moya-Quiles MR, Minguela A, Gil J, Miras M, Campillo JA, Díaz-Alderete MA, García-Alonso AM, Sánchez-Bueno F, Vicario JL, Muro M, Alvarez-López MR. HLA-C matching and liver transplants: donor-recipient genotypes influence early outcome and CD8+KIR2D+ T-cells recuperation. *Transplantation.* 2009 Aug 15;88
- López-Álvarez MR, Campillo JA, Legaz I, Blanco-García RM, Salgado-Cecilia G, Bolarín JM, Gimeno L, Gil J, García-Alonso AM, Muro M, Alvarez-López MR, Miras M, Minguela A. Divergences in KIR2D+ natural killer and KIR2D+CD8+ T-cell reconstitution following liver transplantation. *Hum Immunol.* 2011 Mar; 72(3):229-37.
- Lóez-Hoyos M, Segundo DS, Arias M. Cellular immunotolerance in the transplant. *Adv Exp Med Biol.* 2012;741:44-59.
- López-Hoyos M, San Segundo D, Brunet M. Regulatory T Cells as Biomarkers for Rejection and Immunosuppression Tailoring in Solid Organ Transplantation. *Ther Drug Monit.* 2016 Apr;38 Suppl 1:S36-42.
- López-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massagué J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites.
- Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 May;123(5):1004-11.
- Loverre A, Tataranni T, Castellano G, Divella C, Battaglia M, Ditunno P, Corcelli M, Mangino M, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G. IL-17 expression by tubular epithelial cells in renal transplant recipients with acute antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2011; 11:1248-1259.
- Ludwig J, Weisner RH, Butts KP, *et al.* The acute vanishing bile ducts syndrome. *Hepatology* 1987; 7: 467-474.
- Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, Svennerholm AM, Lundin BS. Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infect Immun.* 2003 Apr;71(4):1755-62.
- Lunz J, Ruppert KM, Cajaiba MM, Isse K, Bentlejewski CA, Minervini M, Nalesnik MA, Randhawa P, Rubin E, Sasatomi E, de Vera ME, Fontes P, Humar A, Zeevi A, Demetris AJ. Re-examination of the lymphocytotoxic crossmatch in liver transplantation: can C4d stains help in monitoring? *Am J Transplant.* 2012 Jan;12(1):171-82.

- Lux A, Attisano L, Marchuk DA. Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):9984-92.
- Ma L, Zhang H, Hu K, Lv G, Fu Y, Ayana DA, Zhao P, Jiang Y. The imbalance between Tregs, Th17 cells and inflammatory cytokines among renal transplant recipients. *BMC Immunol*. 2015; 16: 56.
- Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M, O'Brien E. Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Dec;20(12):2546-52.
- Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W. Regulation of MHC class II genes: Lesson from a disease. *Ann. Rev. Immunol*. 1996; 14: 301-331.
- McCaughan GW, Davies JS, Waugh JA, Bishop GA, Hall BM, Gallagher ND, Thompson JF, Sheil AG, Painter DM. A quantitative analysis of T lymphocyte populations in human liver allografts undergoing rejection: the use of monoclonal antibodies and double immunolabelling. *Hepatology* 1990 Dec;12(6):1305-13.
- Mahalati K and Kahan BD. Advancing the art of immunosuppression with the science of pharmacology. *Curr Opin in Organ Trans* 2000; 5:(3), 255-262.
- Malek TR and Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 2010; 33, 153–165.
- Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:453-79.
- Malheiro J, Martins LS, Tafulo S, Dias L, Fonseca I, Beirão I, Castro-Henriques A, Cabrita A. Impact of de novo donor-specific anti-HLA antibodies on grafts outcomes in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transpl Int*. 2016 Feb;29(2):173-83.
- Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ Treg cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanism. *J Exp Med* 2003; 197: 111-119.
- Mancebo E, Castro MJ, Allende LM, Talayero P, Brunet M, Millán O, Guirado L, López-Hoyos M, San Segundo D, Rodrigo E, Muñoz P, Boix Giner F, Llorente Viñas S, Muro-Amador M, Paz-Artal E. High proportion of CD95(+) and CD38(+) in cultured CD8(+) T cells predicts acute rejection and infection, respectively, in kidney recipients. *Transpl Immunol*. 2016 Feb;34:33-41.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006. 441: 231–234.
- Mangasser-Stephan K and Gressner AM. Molecular and functional aspects of latent transforming growth factor-beta binding protein: just a masking protein? *Cell Tissue Res*. 1999 Sep;297(3):363-70.

- Mangus RS and Haag BW. Stented versus nonstented extravesical ureteroneocystostomy in renal transplantation: a metaanalysis. *Am J Transplant.* 2004 Nov;4(11):1889-96.
- Maloy KJ and Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol* 2001; 2, 816–822.
- Marcén R, Morales JM, Fernández-Rodríguez A, Capdevila L, Pallardó L, Plaza JJ, Cubero JJ, Puig JM, Sanchez-Fructuoso A, Arias M, Alperovich G, Serón D. Long-term graft function changes in kidney transplant recipients. *NDT Plus.* 2010 Jun;3(Suppl_2):ii2-ii8.
- Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G et al. “Multiparameter Immune profiling of operational tolerance in liver transplantation” *Am J Transplan* 2007; 7:309-319.
- Marsh SGE and Bodmer JG. HLA class II region nucleotide sequences, 1995. *Tissue Antigens* 1995; 45: 258-280.
- Marsters SA, Pennica D, Bach E, Schreiber RD, Ashkenazi A. Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Jun 6;92(12):5401-5.
- Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernández-Fuentes M, Soullillou JP, Sánchez-Fueyo A. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007 Feb;7(2):309-19.
- Matesanz R. Los inicios de los trasplantes en España y en el mundo. En: *El modelo Español de Coordinación y Trasplantes.* Matesanz R, ed. 2ª Edición, Madrid, Aula Médica Ediciones, 2008:1-8.
- Matos LC, Batista P, Monteiro N, Ribeiro J, Cipriano MA, Henriques P, Girão F, Carvalho A. Lymphocyte subsets in alcoholic liver disease. *World J Hepatol.* 2013 Feb 27;5(2):46-55.
- Maiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology and pathology clasification. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:779-87.
- Mayer CT, Floess S, Baru AM, Lahl K, Huehn J, Sparwasser T. CD8+ Foxp3+ T cells share developmental and phenotypic features with classical CD4+ Foxp3+ regulatory T cells but lack potent suppressive activity. *Eur J Immunol.* 2011 Mar;41(3):716-25.
- McCaughan GW and Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol.* 2004;40(3):368-74.
- McLaren JE and Ramji DP. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Apr;20(2):125-35.
- McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, et al. eds. (1987) Leucocyte typing III: white cell differentiation antigens. *Oxford University Press, Oxford.*

- Medawar PB and Russell PS. Adrenal Homografts in Mice, with special reference to 'Immunological Adrenalectomy'. *Immunology* 1958; 1(1): 1–12.
- Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant*. 2004(a) Aug;4(8):1289-95.
- Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004(b);4:378-83.
- Millán O, Brunet M, Campistol JM, Faura A, Rojo I, Vidal E, Jiménez O, Vives J, Oppenheimer F, Martorell J. Pharmacodynamic approach to immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil. *Clin Chem*. 2003 Nov;49(11):1891-9.
- Millán O, Urtasun N, Brunet M. Biomarkers of the immunomodulatory effect of immunosuppressive drugs in transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando)*. 2009 Apr;23(2):120-8.
- Millán O, Benitez C, Guillén D, López A, Rimola A, Sánchez-Fueyo A, Brunet M. Biomarkers of immunoregulatory status in stable liver transplant recipients undergoing weaning of immunosuppressive therapy. *Clin Immunol*. 2010 Dec;137(3):337-46.
- Millán O, Rafael-Valdivia L, Torrademé E, López A, Fortuna V, Sánchez-Cabus S, López-Púa Y, Rimola A, Brunet M. Intracellular IFN- γ and IL-2 expression monitoring as surrogate markers of the risk of acute rejection and personal drug response in de novo liver transplant recipients. *Cytokine*. 2013 Feb;61(2):556-64.
- Millán O, Rafael-Valdivia L, San Segundo D, Boix F, Castro-Panete MJ, López-Hoyos M, Muro M, Valero-Hervás D, Rimola A, Navasa M, Muñoz P, Miras M, Andrés A, Guirado L, Pascual J, Brunet M. Should IFN- γ , IL-17 and IL-2 be considered predictive biomarkers of acute rejection in liver and kidney transplant? Results of a multicentric study. *Clin Immunol*. 2014 Oct;154(2):141-54.
- Miller DA, Lee A, Matsui Y, Chen EY, Moses HL, Derynck R. Complementary DNA cloning of the murine transforming growth factor-beta 3 (TGF beta 3) precursor and the comparative expression of TGF beta 3 and TGF beta 1 messenger RNA in murine embryos and adult tissues. *Mol Endocrinol*. 1989 Dec;3(12):1926-34.
- Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 89, 421–425.
- Miljkovic DJ, Cvetkovic I, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V. The role of interleukin-17 in inducible nitric oxide synthase-mediated nitric oxide production in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Mar;60(3):518-25.
- Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland

- SM, Paul WE, Douek DC. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008. 452:773–776.
- Milovanovic M, Drozdenko G, Weise C, Babina M, Worm M. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J Invest Dermatol*. 2010 Nov;130(11):2621-8.
- Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, Urban JF Jr, Dvorak AM, Finkelman FD, LeGros G, Paul WE. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J. Exp. Med.* 2004. 200: 507–517.
- Min SI, Ha J, Park CG, et al. Sequential evolution of IL-17 responses in the early period of allograft rejection. *Exp Mol Med* 2009; 41:707–716.
- Minguela A, Torío A, Marín L, Muro M, Villar LM, Pons JA, Díaz J, Parrilla P, García-Alonso AM, Álvarez-López MR. Implication of soluble and membrane HLA class-I and serum IL-10 in liver graft acceptance. *Human Immunol*. 1999; 60: 500-509
- Minguela A, Marín L, Torío A, Muro M, García-Alonso AM, Moya-Quiles MR, Sánchez-Bueno F, Parrilla P, Alvarez-López MR. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 costimulatory molecules are mainly involved in acceptance or rejection of human liver transplant. *Human Immunol*. 2000; 61: 658-669.
- Minguela A, Miras M, Bermejo J, Sánchez-Bueno F, López-Alvarez MR, Moya-Quiles MR, Muro M, Ontañón J, Garía-Alonso AM, Parrilla P, Alvarez-López MR. HBV and HCV infections and acute rejection differentially modulate CD95 and CD28 expression on peripheral blood lymphocytes after liver transplantation. *Hum Immunol*. 2006 Nov;67(11):884-93.
- Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1986 Aug 25;261(24):11398-403.
- Miyagawa-Hayashino A, Yoshizawa A, Uchida Y, Egawa H, Yurugi K, Masuda S, Minamiguchi S, Maekawa T, Uemoto S, Haga H. Progressive graft fibrosis and donor-specific human leukocyte antigen antibodies in pediatric late liver allografts. *Liver Transpl*. 2012 Nov;18(11):1333-42.
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30, 899–911.
- Molajoni ER, Cinti P, Orlandini A, Molajoni J, Tugulea S, Ho E, Liu Z, Suciú-Foca N, Cortesini R. Mechanism of liver allograft rejection: the indirect recognition pathway. *Human Immunol*. 1997; 53: 57-63.
- Monga G, Mazzucco G, Novara R, Reale L. Intertubular capillary changes in kidney allografts: an ultrastructural study in patients with transplant glomerulopathy. *Ultrastruct Pathol* 1990;14:201-9.

- Monga G, Mazzucco G, Messina M, Motta M, Wuaranta S, Novara R. Intertubular capillary changes in kidney allografts: a morphologic investigation on 61 renal specimens. *Mod Pathol* 1992;5:125-30.
- Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH, Romani L. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6298-308.
- Moon DB, Lee SG. *Liver transplantation*. *Gut Liver* 2009; 3: 145-165.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
- Mor MD, Solomon H, Gibbs JF, Holman MJ, Goldstein RM, Husberg BS, Gonwa TA, Klintmalm GB. Acute cellular rejection following liver transplant: clinical pathologic features and effect on outcome. *Sem. Liver Dis*. 1992; 12: 28-39.
- Moreno A, Cervera C, Gavaldá J, Rovira M, de la Cámara R, Jarque I, Montejo M, de la Torre-Cisneros J, Miguel Cisneros J, Fortún J, López-Medrano F, Gurguá M, Muñoz P, Ramos A, Carratalá J. Bloodstream infections among transplant recipients: results of a nationwide surveillance in Spain. *Am J Transplant* 2007; 7: 2579-2586.
- Morris RE. Vascular and cellular mechanisms of chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation* 2001;71(Suppl):37-41.
- Morris PJ. Transplantation--a medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med*. 2004 Dec 23;351(26):2678-80.
- Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003. 14: 155-174.
- Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007. 317: 256-260.
- Mucida D and Cheroutre H. The many face-lifts of CD4 T helper cells. *Adv Immunol* 2010; 107:139-152.
- Mueller M, Spangenberg HC, Kersting N, Altay T, Blum HE, Klenerman P, Thimme R, Semmo N. Virus-specific CD4+ T cell responses in chronic HCV infection in blood and liver identified by antigen-specific upregulation of CD154. *J Hepatol*. 2010 Jun;52(6):800-11.
- Mullen AC, Hutchins AS, High FA, Lee HW, Sykes KJ, Chodosh LA, Reiner SL. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol*. 2002 Jul;3(7):652-8.
- Muro M and Marín L. Las células de la respuesta inmune (I). En: *Rinitis alérgica. Mecanismos y tratamiento*. Negro Alvarez J. M. (ed.). Implitec, S.A. Barcelona, 1996: 71-83.

- Muro M, Alvarez-López MR, Moya-Quiles MR. Sistemas de histocompatibilidad: Estructura, organización génica y funciones. En: *Manual sobre donación y trasplante de órganos*. Aran Ediciones, 1997(a): 603-616.
- Muro M, Álvarez-López MR, Torío A, Ontañón J, Minguela A, Marín L, García-Calatayud MC, Bermejo J, García-Alonso AM. HLA-DRB1 and -DQB1 polymorphism in liver recipients: Relationship between HLA-DQB1*0302 allele frequency and acute rejection. *Human Immunol.* 1997(b); 56 (2): 70-76.
- Muro M. Caucasian Spanish Normal. En: *HLA Terasaki PI, Gjertson DW.* (eds.). Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Lenexa, Kansas, 1998: 186-187.
- Muro M, Marín L, Torío A, Moya-Quiles MR, Minguela A, Rosique-Roman J, Sanchis MJ, Garcia-Calatayud MC, García-Alonso AM, Alvarez-López MR. HLA polymorphism in Murcia population (Spain) in the cradle of the archaeological Iberians. *Human Immunol.* 2001(a); 56: 910-921.
- Muro M, Herrero N, Torío A, Marín L, Minguela A, Sánchez-Bueno F, García-Alonso AM, Álvarez-López MR. Polymorphism of the upstream regulatory region of the HLA-DQB1 gene in liver transplant recipients. *Human Biol.* 2001(b); 73 (6): 845-854.
- Muro M, Llorente S, Marín L, Moya-Quiles MR, Gonzalez-Soriano MJ, Prieto A, Gimeno L, Álvarez-López MR. Acute vascular rejection mediated by HLA antibodies in a cadaveric kidney recipient: discrepancies between FlowPRATM, ELISA and CDC vs luminex screening. *Nephrol Dial Transplant.* 2005(a) 20: 223-226.
- Muro M, Marín L, Miras M, Moya-Quiles R, Minguela A, Sánchez-Bueno F, Bermejo J, Robles R, Ramírez P, García-Alonso A, Parrilla P, Alvarez-López MR. Liver recipients harbouring anti-donor preformed lymphocytotoxic antibodies exhibit a poor allograft survival at the first year after transplantation: experience of one centre. *Transpl Immunol.* 2005(b) Jun;14(2):91-7.
- Muro M, González-Soriano MJ, Salgado G, López R, Boix F, López M, Campillo JA, Martínez P, Botella C, Gimeno L, Minguela A, Alvarez-López MR, Llorente S. Specific "intra-allele" and "intra-broad antigen" human leukocyte antigen alloantibodies in kidney graft transplantation. *Hum Immunol.* 2010 Sep;71(9):857-60.
- Muro M, López-Alvarez MR, Campillo JA, Marín L, Moya-Quiles MR, Bolarin JM, Sánchez-Bueno F, Salgado G, Botella C, López-Hernández R, Boix F, Bosch A, Martínez H, de la Peña-Moral JM, Minguela A, Pérez-López N, García-Alonso AM, Robles R, Miras M, Álvarez-López MR. Influence of HLA mismatching on rejection development and graft survival in liver transplant. Is HLA-A locus matching being underestimated?. *Transplant Immunol.* 2012, 26, 88-93.
- Muro M, Llorente S, Galian JA, Boix F, Eguía J, Gonzalez-Martinez G, Moya-Quiles MR, Minguela A. B-Cell Targets to Treat Antibody-Mediated Rejection in Transplantation. *Int J Transplant Res Med* 2016(a), 2:023.

- Muro M, Moya-Quiles MR, Mrowiec A. Humoral Response in Liver Allograft Transplantation: A Review of the Role of Anti-Human Leukocyte Antigen (HLA) Antibodies. *Curr Protein Pept Sci*. 2016(b);17(8):776-784.
- Murphy KM and Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2002; 2, 933–944.
- Musat AI, Agni RM, Wai PY, Pirsch JD, Lorentzen DF, Powell A, Levenson GE, Bellingham JM, Fernandez LA, Foley DP, Mezrich JD, D'Alessandro AM, Lucey MR. The significance of donor-specific HLA antibodies in rejection and ductopenia development in ABO compatible liver transplantation. *Am J Transplant*. 2011 Mar;11(3):500-10.
- Mori N, Ishikawa C, Senba M. Induction of CD69 expression by cagPAI-positive *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2011 Aug 28;17(32):3691-9.
- Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jan;13(1):252-9.
- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002. 17: 375–387.
- Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. *Transplantation*. 1995 Jun 27;59(12):1683-9.
- Nankivell BJ and Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363:1451–1462.
- Narang TK, Ahrens W, Russo MW. Post-liver transplant cholestatic hepatitis C: a systematic review of clinical and pathological findings and application of consensus criteria. *Liver Transpl*. 2010;16(11):1228-35.
- Nath DS, Ilias-Basha H, Tiriveedhi V, Alur C, Phelan D, Ewald GA, Moazami N, Mohanakumar T. Characterization of immune responses to cardiac self-antigens myosin and vimentin in human cardiac allograft recipients with antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29:1277–1285.
- Nath DS, Tiriveedhi V, Basha HI, Phelan D, Moazami N, Ewald GA, Mohanakumar T. A role for antibodies to human leukocyte antigens, collagen-V, and K-alpha1-tubulin in antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* 2011; 91:1036–1043.
- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.

- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.* 2003. 171:6173–6177.
- Neff RT, Hurst FP, Falta EM, Bohlen EM, Lentine KL, Dharnidharka VR, Agodoa LY, Jindal RM, Yuan CM, Abbott KC. Progressive multifocal leukoencephalopathy and use of mycophenolate mofetil after kidney transplantation. *Transplantation* 2008; 86: 1474-1478.
- Nepom GT, Chung J, West KA. Differential expression of HLA-DQB1 alleles in a heterozygous cell line. *Immunogenetics* 1995; 42 (2): 143-148.
- Neuberger J. Incidence, timing, and risk factors for acute and chronic rejection. *Liver Transpl Surg* 1999; 5:S30-S36.
- Neuberger J. Liver transplantation. *J Hepatol* 2000; 32: 198-207 [PMID: 10728805]
- Neuberger J. Immunosuppressive drugs. In: Transplantation of the liver. Maddrey W.C., Schiff E.R., Sorrell M.F. (Ed.). Philadelphia: Editorial Lippincott, Williams & Wilkins; 2001, p:199-209.
- Neumann H, Schmidt H, Wilharm E, Behrens L, Wekerle H. Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J Exp Med.* 1997 Dec 15;186(12):2023-31.
- Nihiro H, Otsuka T, Kuga S, Nemoto Y, Abe M, Hara N, Nakano T, Ogo T, Niho Y. IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *Int Immunol.* 1994 Apr;6(4):661-4.
- Nihiro H, Otsuka T, Abe M, Satoh H, Ogo T, Nakano T, Furukawa Y, Niho Y. Epstein-Barr virus BCRF1 gene product (viral interleukin 10) inhibits superoxide anion production by human monocytes. *Lymphokine Cytokine Res.* 1992 Oct;11(5):209-14.
- Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 2008. 112: 3959–3964.
- Nishioka Y and Lipsky PE. The role of CD40-CD40 ligand interaction in human T cell-B cell collaboration. *J Immunol.* 1994; 153(3):1027-1036.
- Noble A, Giorgini A, Leggat JA. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood.* 2006 Jun 1;107(11):4475-83.
- Nomura LE, Walker JM, Maecker HT. Optimization of antigen-specific cytokine assays for CD4+ T cells. *Cytometry.* 2000 May 1;40(1):60-8.
- Notario L, Alari-Pahissa E, de Molina A, Lauzurica P. CD69 Deficiency Enhances the Host Response to Vaccinia Virus Infection through Altered NK Cell Homeostasis. *J Virol.* 2016 Jun 24;90(14):6464-74.

- Numasaki M, Takahashi H, Tomioka Y, Sasaki H. Regulatory roles of IL-17 and IL-17F in G-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha. *Immunol Lett.* 2004 Aug 15;95(1):97-104.
- Obata F, Yoshida K, Ohkubo M, Ikeda Y, Taoka Y, Takeuchi Y, Shinohara N, Endo T, Baba S. Contribution of CD4+ and CD8+ T cells and interferon-gamma to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. *Transpl Immunol.* 2005 Mar;14(1):21-5.
- O'Garra A and Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 2004; 10 (8): 801-805.
- O'Grady JG, Sutherland S, Harvey F, et al. CMV infection and donor/recipient HLA antigens: Interdependent cofactors in pathogenesis of vanishing bileduct syndrome after liver transplantation. *Lancet* 1988; 6: 302-305.
- O'Leary JG, Kaneku H, Susskind BM, Jennings LW, Neri MA, Davis GL, Klintmalm GB, Terasaki PI. High mean fluorescence intensity donor-specific anti-HLA antibodies associated with chronic rejection Postliver transplant. *Am J Transplant.* 2011 Sep;11(9):1868-76.
- O'Leary JG, Demetris AJ, Friedman LS, Gebel HM, Halloran PF, Kirk AD, Knechtle SJ, McDiarmid SV, Shaked A, Terasaki PI, Tinckam KJ, Tomlanovich SJ, Wood KJ, Woodle ES, Zachary AA, Klintmalm GB. The Role of Donor-Specific HLA Alloantibodies in Liver Transplantation *Am J Transplant.* 2014 Apr; 14(4): 779–787.
- Oguma S, Belle S, Starzl TE, Demetris AJ. A histometric analysis of chronically rejected human liver allografts: insights into the mechanisms of bile duct loss: direct immunologic and ischaemic factors. *Hepatology* 1989; 9: 204-209.
- Ohe H, Uchida Y, Yoshizawa A, Hirao H, Taniguchi M, Maruya E, Yurugi K, Hishida R, Maekawa T, Uemoto S, Terasaki PI. Association of Anti-Human Leukocyte Antigen and Anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies with liver allograft fibrosis after immunosuppression withdrawal. *Transplantation.* 2014, 98, 1105-1111.
- Okanami Y, Tsujimura K, Mizuno S, Tabata M, Isaji S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Takahashi T, Uemoto S. Intracellular interferon- γ staining analysis of donor-specific T-cell responses in liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2012 Mar;44(2):548-54.
- Olson MO and Liener IE. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. *Biochemistry.* 1967 Jan;6(1):105-11.
- Oluwole SF, Chowdhury NC, Ingram M, Garrovillo M, Jin MX, Agrawal S. Mechanism of acquired thymic tolerance induced by a single major histocompatibility complex class I peptide with the dominant epitope: differential analysis of regulatory cytokines in the lymphoid and intragraft compartments. *Transplantation.* 1999; 68:418-29.
- Ontañón J. Inmunidad a aloinjertos: Papel de los antígenos HLA de clase I y II en el trasplante hepático. En: *Inmunología del trasplante hepático.* Alvarez-López M. R. (eds.). Madrid, 1997: 345-356.

- Ontañón J, Muro M, García-Alonso AM, Minguela A, Rosique J, Pons JA, Bermejo J, Álvarez-López MR. Effect of partial HLA-class I match on acute rejection in viral pre-infected human liver allograft recipients. *Transplantation* 1998; 65: 1047-1053.
- Opelz G. Effect of HLA matching in 10,000 cyclosporine-treated cadaver kidney transplants. *Transplant Proc* 1987; 19:641-646.
- Opelz G. Strength of HLA-A, HLA-B, and HLA-DR mismatches in relation to short- and long-term kidney graft survival. Collaborative Transplant Study. *Transpl Int* 1992; 5 Suppl 1:621-624.
- Opelz G and Wujciak T. The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330: 816-825.
- Opelz G and Wujciak T. Cadaveric kidneys should be allocated according to the HLA match. *Tranplant. Proc.* 1995; 36: 93-99.
- Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, Maino V, Davis K, Murphy K, O'Garra A. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J Exp Med.* 1995;182:1357-1367.
- Ortega F. Organ transplantation in the 21st century. *Stem cell transplantation: Advances in Experimental Medicine and Biology*; 2012, Volume 741, Section I, 13-26.
- Osorio F, LeibundGut-Landmann S, Lochner M, Lahl K, Sparwasser T, Eberl G, Reis e Sousa C. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur J Immunol* 2008; 38:3274–81.
- Padgett RW and Patterson GI. New developments for TGFbeta. *Dev Cell.* 2001 Sep;1(3):343-9.
- Pallardó Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L, Franco Esteve A. Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Jun;19 Suppl 3:iii38-42.
- Palutke M, Tabaczka PM, Kukuruga DL, Kantor NL. A method for measuring lymphocyte proliferation in mixed lymphocyte cultures using a nuclear proliferation antigen, Ki-67, and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1989;91:417–21.
- Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 1353-1362.
- Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* 2002. 168: 5699–5708.
- Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6:1133–1141.

- Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolckoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med.* 2002 Feb 21;346(8):580-90.
- Paterno F, Shiller SM, Tillery GW, O'Leary JG, Susskind B, Trotter J, Klintmalm GB. Bortezomib for acute antibody-mediated rejection in liver transplantation. *Am J Transplant*, 2012, 12, 2526-2531.
- Paul LC. Immunologic risk factors for chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation* 2001;71(11 Suppl):SS17-23.
- Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, Banica M, DiCioccio CB, Gross DA, Mao CA, Shen H, Cereb H, Yang SY, Lindsten T, Rossant J, Hunter CA, Reiner SL. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* 2003 Nov 7;302(5647):1041-3.
- Perkins JD, Rakela J, Sterioff S, Banks PM, Weisner RH, Krom RAF. Results of treatment in hepatic allograft rejection depend on the immunohistologic pattern of the portal T-lymphocyte infiltrate. *Transplant. Proc.* 1988; 20: 223-225.
- Perkins JD, Wiesner RH, Banks DM, LaRusso NF. Immunohistologic labelling as an indication of liver allograft rejection. *Transplantation* 1987; 43: 105-114.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:8-32.
- Piazza A, Adorno D, Torlone N, Valeri M, Poggi E, Monaco PI, Pisani F, Tisone G, Casciani CU. Flow cytometric analysis of antidonor-specific antibodies in liver transplant. *Transplant Proc* 1997; 29: 2975-2976
- Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR, Maino VC. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood.* 1995;86:1408-1419.
- Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest.* 2000;106:1003-10.
- Pillai AA, Levitsky J. Overview of immunosuppression in liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2009 Sep 14; 15(34): 4225–4233.
- Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol.* 1993 Nov;23(11):3043-9.
- Pribylova-Hribova P, Kotsch K, Lodererova A, Viklicky O, Vitko S, Volk HD, Lacha J. TGF-beta1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int.* 2006;69:1872-9.
- Prickett TCR, McKenzie JL, Hart DNJ. Characterisation of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* 1988; 46: 754-761.

- Puddu P, Fantuzzi L, Borghi P, Varano B, Rainaldi G, Guillemard E, Malorni W, Nicaise P, Wolf SF, Belardelli F, Gessani S. IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol.* 1997 Oct 1;159(7):3490-7.
- Pulendran B and Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: Implications for vaccine development. *Cell* 2006;124, 849–863.
- Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008 May 1;453(7191):65-71.
- Rabkin JM, de La Melena V, Orloff SL, Corless CL, Rosen HR, Olyaei AJ. Late mortality after orthotopic liver transplantation. *Am J Surg* 2001; 181: 475-479
- Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004;4(10):1562-6.
- Raghavan S, Fredriksson M, Svennerholm AM, Holmgren J, Suri-Payer E. Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in Helicobacter pylori-infected mice. *Clin. Exp. Immunol* 2003; 132, 393–400.
- Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, Penninger JM, Eriksson U. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 2009–2019.
- Reding R, Gras J, Truong DQ, Wieërs G, Latinne D. The immunological monitoring of alloreactive responses in liver transplant recipients: a review. *Liver Transpl.* 2006 Mar;12(3):373-83.
- Regateiro FS, Howie D, Cobbold SP, Waldmann H. TGF- β in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol.* 2011 Oct;23(5):660-9.
- Regev A, Molina E, Moura R, Bejarano PA, Khaled A, Ruiz P, Arheart K, Berho M, Drachenberg CB, Mendez P, O'Brien C, Jeffers L, Tzakis A, Schiff ER. Reliability of histopathologic assessment for the differentiation of recurrent hepatitis C from acute rejection after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004 Oct;10(10):1233-9.
- Reiner SL. Helper T cell differentiation, inside and out. *Curr. Opin. Immunol.* 2001;13, 351–355.
- Rennick D, Berg D, Holland G. Interleukin 10: an overview. *Prog Growth Factor Res.* 1992;4(3):207-27.
- Rennick D, Hunte B, Dang W, Thompson-Snipes L, Hudak S. Interleukin-10 promotes the growth of megakaryocyte, mast cell, and multilineage colonies: analysis with committed progenitors and Thy1loSca1+ stem cells. *Exp Hematol.* 1994 Feb;22(2):136-41.
- Reiner SL and Seder RA. Dealing from the evolutionary pawnshop: How lymphocytes make decisions. *Immunity* 1999;11, 1–10.

- Roche B and Samuel D. Risk factors for hepatitis C recurrence after liver transplantation. *J Viral Hepat.* 2007;14 Suppl 1:89-96.
- Rodrigo E, Sánchez-Velasco P, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, López-Hoyos M, Piñera C, Palomar R, Gómez-Alamillo C, González-Cotorruelo J, Leyba-Cobián F, Arias M. Cytokine polymorphisms and risk of infection after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2219-21.
- Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* 1997;185, 825–831.
- Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol.* 2009 Nov;47(1):3-7. Epub 2009 Feb 3.
- Romero FA, Razonable RR. Infections in liver transplant recipients. *World J Hepatol.* 2011 Apr 27;3(4):83-92.
- Roncarolo MG and Levings MK. The role of different sub-sets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr.Opin. Immunol* 2000;12, 676–683.
- Rosenberg SA, Grimm EA, McGrogan M, Doyle M, Kawasaki E, Koths K, Mark DF. Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science.* 1984 Mar 30;223(4643):1412-4.
- Rosen HR. Transplantation immunology: what the clinician needs to know for immunotherapy. *Gastroenterology* 2008; 134:1789-1801.
- Rosloniec EF, Vitez LJ, Buus S, Freed JH. MHC class II-derived peptides can bind to class II molecules, including self molecules, and prevent antigen presentation. *J. Exp. Med.* 1990; 171: 1419-1430.
- Rostaing L, Puyoo O, Tkaczuk J, Peres C, Rouzaud A, Cisterne JM, de Preval C, Ohayon E, Durand D, Abbal M. Differences in Type 1 and Type 2 intracytoplasmic cytokines, detected by flow cytometry, according to immunosuppression (cyclosporine A vs. tacrolimus) in stable renal allograft recipients. *Clin Transplant.* 1999a Oct;13(5):400-9.
- Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, Peres C, Durand D, de Préval C, Ohayon E, Abbal M. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry.* 1999b Apr 1;35(4):318-28.
- Ruggenti 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.
- Ruiz R, Tomiyama K, Campsen J, Goldstein RM, Levy MF, McKenna GJ, Onaca N, Susskind B, Tillery GW, Klintmalm GB. Implications of a positive crossmatch in liver transplantation: a 20-year review. *Liver Transpl.* 2012 Apr;18(4):455-60.

- Ruscetti FW and Bartelmez SH. Transforming growth factor beta, pleiotropic regulator of hematopoietic stem cells: potential physiological and clinical relevance. *Int J Hematol.* 2001 Jul;74(1):18-25.
- Russell JH and Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:323-70.
- Reyes J, Zeevi A, Ramos H, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Nour B, Nalesnik M, Trucco M, Abu-Elmagad K, Fung JJ, Starzl TE. Frequent achievement of a drug-free state after orthopic liver transplantation. *Transplant. Proc.* 1993; 25: 3315-3319.
- Saini D, Weber J, Ramachandran S, Phelan D, Tiriveedhi V, Liu M, Steward N, Aloush A, Hachem R, Trulock E, Meyers B, Patterson GA, Mohanakumar T. Alloimmunity-induced autoimmunity as a potential mechanism in the pathogenesis of chronic rejection of human lung allografts. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30:624–631.
- Saitoh T and Dobkins KR. Protein kinase C in human brain and its inhibition by calmodulin. *Brain Res.* 1986 Jul 30;379(1):196-9.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133, 775–787.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006 Aug; 212:8-27.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3 expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol* 2005; 6, 345–352.
- Sakaguchi S. The origin of *FOXP3*-expressing CD4⁺ regulatory T cells: thymus or periphery. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:1310–1312.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, 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, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev* 2001; 182, 18–32
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol* 1995;155, 1151–1164.
- Saliba F, Gugenheim J, Samuel J, Ciardullo M, Reynes M, Bismuth H. Orthotopic liver transplantation in humans: monitoring by serial graft biopsies. *Transplant. Proc.* 1987; 19: 2454-2456.
- Salvadori M and Bertoni E. Is it time to give up with calcineurin inhibitors in kidney transplantation? *World J Transplant.* 2013 Jun 24; 3(2): 7–25.
- Sánchez-Mateos P, Cebrián M, Acevedo A, López-Botet M, De Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Expression of a gp33/27,000 MW activation inducer molecule (AIM) on

- human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies. *Immunology* 1989; 68: 72-79.
- Sankary S, Foster P, Hart M, Ashmann M, Schwartz M, Williams D, James W. An Analysis of the determinants of hepatic allograft rejection using step-wise logistic regression. *Transplantation* 1989; 47: 74-77.
- Santos J and Martins LS. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation: Still searching for the best marker. *World J Nephrol.* 2015 Jul 6;4(3):345-53.
- Santos JP, Burgos-Revilla FJ, Delgado P. Técnicas quirúrgicas en donante vivo y fallecido. Complicaciones. Indicaciones de embolización y nefroctomía del injerto. En: *Nefrología al día* 2010; Ed. Gr. Ed. Nefr.; Sociedad Española de Nefrología; 1: 717-30.
- San Segundo D, Ruiz J.C., Izquierdo M., Fernández-Fresnedo G., Gómez-Alamillo C., Merino R., Benito M.J., Cacho E., Rodrigo E., Palomar R., López-Hoyos M., Arias M. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2006 Aug 27;82(4):550-7.
- San Segundo D, Fernández-Fresnedo G, Gago M, Beares I, Ruiz-Criado J, González M, Ruiz JC, Gómez-Alamillo C, López-Hoyos M, Arias M. Kidney Transplant recipients show an increase in the ratio of T-cell effector memory/central memory as compared to nontransplant recipients on the waiting list. *Transplant Proc.* 2010(a); 42, 2877–2879.
- San Segundo D, Fernández-Fresnedo G, Ruiz JC, Rodrigo E, Benito MJ, Arias M, López-Hoyos M. Two-year follow-up of a prospective study of circulating regulatory T cells in renal transplant patients. *Clin Transplant.* 2010(b) May-Jun;24(3):386-93.
- San Segundo D, Brunet M, Ballesteros MA, Millán O, Muro M, Castro MJ, Miñambres E, López-Hoyos M. Prospective study of biomarkers of immune response in lung transplant recipients. *Transplant Proc.* 2012, (article in press).
- San Segundo D, Millán O, Muñoz-Cacho P, Boix F, Paz-Artal E, Talayero P, Morales JM, Muro M, De Cos MÁ, Guirado L, Llorente S, Pascual J, Arias M, Brunet M, López-Hoyos M. High proportion of pretransplantation activated regulatory T cells (CD4⁺CD25^{high}CD62L⁺CD45RO⁺) predicts acute rejection in kidney transplantation: results of a multicenter study. *Transplantation.* 2014 Dec 15;98(11):1213-8.
- Sánchez-Bueno F, Ramírez P, Robles R, Parrilla P. Cirugía del donante. Extracción multiorgánica. En: *Trasplante hepático.* Berenguer J. y Parrilla P. (eds.). Elba SA. Madrid, 1999(a): 115-122.
- Sánchez-Bueno F, Parrilla P, Mir J, de Juan M, *et al.* Técnicas quirúrgicas estándar con y sin preservación cava. En: *Trasplante hepático.* Berenguer J. y Parrilla P. (eds.). Elba SA. Madrid, 1999(b): 123-130.
- Sanchez-Rodriguez R, Pauli ML, Neuhaus IM. *et al.* Memory regulatory T cells reside in human skin. *J. Clin. Invest.* 2014; 124:1027.

- Sanquer S, Breil M, Baron C, Dhamane D, Astier A, Lang P. Induction of inosine monophosphate dehydrogenase activity after long-term treatment with mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacol Ther.* 1999 Jun;65(6):640-8.
- Sarmiento JM, Dockrell DH, Schwab TR, Munn SR, Paya CV. Mycophenolate mofetil increases cytomegalovirus invasive organ disease in renal transplant patients. *Clin Transplant* 2000; 14: 136-138
- Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. TGF-beta 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. *J Immunol.* 2000 Mar 1;164(5):2285-95.
- Sawitzki B, Bushell A, Steger U, Jones N, Risch K, Siepert A, Lehmann M, Schmitt-Knosalla I, Vogt K, Gebuhr I, Wood K, Volk HD. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant.* 2007 May;7(5):1091-102.
- Sayegh MH, Perico N, Gallon L, Imberti O, Hancock WW, Remuzzi G, Carpenter CB. Mechanisms of acquired thymic unresponsiveness to renal allografts. Thymic recognition of immunodominant allo-MHC peptides induces peripheral T cell anergy. *Transplantation.* 1994;58:125-32
- Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later: progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004; 351:2761–2766.
- Scharton TM and Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that derives differentiation of CD41T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* 1993. 178:567–577.
- Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W et al., eds. (1995) Leucocyte typing V: white cell differentiation antigens. *Oxford University Press, Oxford.*
- Schoenborn JR and Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101.
- Schwartz BJ. The human major histocompatibility human leukocyte antigen complex. En: *Basic and Clinical Immunology.* Stites D. P., Terr A. I., (eds.). Appleton & Lange. Connecticut. 1991: 45-60.
- Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S, Kolls JK. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol.* 2000 May 1;164(9):4783-9.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas De St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203, 1693–1700.
- Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2, 389–400.

- Shin M, Moon HH, Kim JM, Park JB, Kwon CH, Kim SJ, Lee SK, Joh JW. Significance of true-positive and false-positive pretransplantation lymphocytotoxic crossmatch in primary liver allograft outcomes. *Transplantation*. 2013 Jun 15;95(11):1410-7.
- Shin HC, Benbernou N, Fekkar H, Esnault S, Guenounou M. Regulation of IL-17, IFN-gamma and IL-10 in human CD8(+) T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Cytokine*. 1998 Nov;10(11):841-50.
- Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature* 2002. 420: 825–829.
- Shipkova M and Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta*. 2012 Sep 8;413(17-18):1338-49.
- Shirwan H, Barwari L, Khan NS. Predominant expression of T helper 2 cytokines and altered expression of T helper 1 cytokines in long-term allograft survival induced by intrathymic immune modulation with donor class I major histocompatibility complex peptides. *Transplantation*. 1998, 66:1802–9.
- Shoskes DA and Wood KJ. Indirect presentation of MHC antigen transplantation. *Immunol. Today* 1994; 15 (1): 32-38.
- Simpson MA, Madras PN, Coraby AJ, *et al*. Sequential determinants of urinary cytology and plasma and urinary lymphokines in the management of renal allograft recipients. *Transplantation* 1989; 47:218-227.
- Sindhi R, Ashokkumar C, Higgs BW, Gilbert PB, Sun Q, Ranganathan S, Jaffe R, Snyder S, Ningappa M, Soltys KA, Bond GJ, Mazariegos GV, Abu-Elmagd K, Zeevi A. Allospecific CD154+ T-cytotoxic memory cells as potential surrogate for rejection risk in pediatric intestine transplantation. *Pediatr Transplant*. 2012 Feb;16(1):83-91.
- Singer A, Kruisbeek AM, Andrysiak PM. T cell-accessory cell interactions that initiate allospecific cytotoxic T lymphocyte responses: existence of both Ia-restricted and unrestricted cellular interaction pathways. *J. Immunol*. 1984; 132: 2199-2209.
- Sironi M, Muñoz C, Pollicino T, Siboni A, Sciacca FL, Bernasconi S, Vecchi A, Colotta F, Mantovani A. Divergent effects of interleukin-10 on cytokine production by mononuclear phagocytes and endothelial cells. *Eur J Immunol*. 1993 Oct;23(10):2692-5.
- Smak Gregoor PJ, van Gelder T, van Riemsdijk-van Overbeeke IC, Vossen AC, IJzermans JN, Weimar W. Unusual presentation of herpes virus infections in renal transplant recipients exposed to high mycophenolic acid plasma concentrations. *Transpl Infect Dis* 2003; 5: 79-83
- Smith KA. Interleukin 2. *Annu Rev Immunol*. 1984;2:319-33.
- Smith DR, Kunkel SL, Burdick MD, Wilke CA, Orringer MB, Whyte RI, Strieter RM. Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am J Pathol*. 1994 Jul;145(1):18-25.

- Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, Burton JR Jr, Tester IA, Wang CC, Culbertson N, Vandenbark AA, Rosen HR. Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 Jan 1;197(1):46-57.
- Snyder JJ, Israni AK, Peng Y, Zhang L, Simon TA, Kasiske BL. Rates of first infection following kidney transplant in the United States. *Kidney Int.* 2009 Feb;75(3):317-26.
- Snover DC, Sibley RK, Freise DK, Sharp HL, Bloomer JR, Najarian JS, Ascher NL. Orthotopic liver transplantation: A pathological study. *Hepatology* 1984; 4: 1212-1245.
- So SKS, Platt J, Ascher NL, Snover DC. Increased expression of class I major histocompatibility complex antigens on hepatocytes in rejecting human liver allografts. *Transplantation* 1987; 43: 79-89.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy («CAN»). *Am J Transplant* 2007;7(3):518-26.
- Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF, *et al.* International standarization of criteria for histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993;44:411-22.
- Song ES, Links R, Olson CA, McMillan M, Goodenow R. Allospecific cytotoxic T lymphocytes recognize an H-2 peptide in the context of a murine major histocompatibility complex class I molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 1927-1931.
- Sousa GM, Oliveira IS, Andrade LJ, Sousa-Atta ML, Paraná R, Atta AM. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. *Cytokine.* 2012 Oct;60(1):138-42.
- Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 2005;435, 637–645.
- Stavnezer J. Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. *J Immunol.* 1995 Aug 15;155(4):1647-51.

- Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Trucco M, Thomson AW, Rao AS. The lost chord: microchimerism and allograft survival. *Immunol. Today* 1996; 17 (12): 577-584.
- Starzl TE, Lener RA, Dixon FS, Groth CG, Brettschneider L, Terasaki PI. Schwartzmann reaction after human renal transplantation. *N. Eng. J. Med.* 1968; 278: 642-648.
- Stassen M, Schmitt E, Bopp T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jan;1247:56-68.
- Stassen M, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD4+CD25+ regulatory T cells and infectious tolerance. *Transplantation* 2004; 77(1 Suppl.):S23-S25.
- Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, *et al.* Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 1994. 263: 92-95.
- Stalder M, Bîrsan T, Holm B, Haririfar M, Scandling J, Morris RE. Quantification of immunosuppression by flow cytometry in stable renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2003 Feb;25(1):22-7.
- Stauber DJ, Debler EW, Horton PA, Smith KA, Wilson IA. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Feb 21;103(8):2788-93.
- Steinhoff G. Major histocompatibility complex antigens in human liver transplants. *J. Hepatol.* 1990; 11: 9-15.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev.Immunol* 2003; 21:685-711.
- Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J. Exp. Med.* 1983; 157: 613-627.
- Stenard F, Nguyen C, Cox K, Kambham N, Umetsu DT, Krams SM, Esquivel CO, Martinez OM. Decreases in circulating CD4+CD25hiFOXP3+ cells and increases in intragraft FOXP3+ cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. *Pediatr Transplant.* 2009 Feb;13(1):70-80.
- Stingl G and Bergstresser PR. Dendritic cells: a major story unfolds. *Immunol. Today* 1995; 16 (7): 330-333.
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology.* 1994 Jun;134(6):2645-57.
- Stock PG, Ascher NL, Chen S, Field J, Bach FH, Sutherland DER. Evidence for direct and indirect pathways in the generation of the alloimmune response against pancreatic islets. *Transplantation* 1991; 52: 704-709.

- Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB.¶
Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:695–700.
- Struijk GH, Gijsen AF, Yong SL, Zwinderman AH, Geerlings SE, Lettinga KD, van Donselaar-van der Pant KA, ten Berge IJ, Bemelman FJ. Risk of Pneumocystis jiroveci pneumonia in patients long after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Oct;26(10):3391-8.
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol*. 2006. 7: 937–945.
- Stummvoll GH, DiPaolo RJ, Huter EN, Davidson TS, Glass D, Ward JM, Shevach EM. Th1, Th2 and Th17 Effector T Cell-Induced Autoimmune Gastritis Differs in Pathological Pattern and in Susceptibility to Suppression by Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2008 August 1; 181(3): 1908–1916.
- Soutohard JH. Advances in organ preservation. *Transplant. Proc.* 1989; 21: 1195-1196.
- Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):973-81.
- Suda T, O'Garra A, MacNeil I, Fischer M, Bond MW, Zlotnik A. Identification of a novel thymocyte growth-promoting factor derived from B cell lymphomas. *Cell Immunol*. 1990 Aug;129(1):228-40.
- Sudan DL, Venkataramani A, Lynch J, Lynch JC, Fox IJ, Jr. Shaw BW, Langnas AN. Causes of late mortality in survivors of liver transplantation. *Transplantation* 1999; 67:S564
- Suematsu S, Matsusaka T, Matsuda T, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, Hirano T, Kishimoto T. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992;89: 232–235.
- Sugawara Y, Mizuta K, Kawarasaki H, Takayama T, Imamura H, Makuuchi M. Risk factors for acute rejection in pediatric living related liver transplantation: the impact of HLA matching. *Liver Transplant*. 2001; 7(9): 769-773.
- Sugaya M, Nakamura K, Tamaki K. Interleukins 18 and 12 synergistically upregulate interferon-gamma production by murine dendritic epidermal T cells. *J Invest Dermatol*. 1999 Sep;113(3):350-4.
- Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology*. 2003 Dec;38(6):1437-48.

- Suh KS, Kim SB, Chang SH, Kim SH, Minn KW, Park MH, Han KS, Lee KU. Significance of positive cytotoxic crossmatch in adult-to adult living donor liver transplantation using small graft volume. *Liver Transplant*, 2002, 8, 1109-1113.
- Sullivan JA, Adams AB, Burlingham WJ. The emerging role of TH17 cells in organ transplantation. *Transplantation*. 2014 Mar 15;97(5):483-9.
- Sumner JB and Howell SF. The role of divalent metals in the reversible inactivation of jack bean hemagglutinin. *J Biol Chem* 1936; 115:583-583
- Sun HY and Singh N. Opportunistic Infection-Associated Immune Reconstitution Syndrome in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2011; 53 (2): 168-176.
- Suni MA, Picker LJ, Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1998;212:89-98.
- Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2003 Sep 15;198(6):889-901.
- Suvas S, Azkur AK, Kim BS, Kumaraguru U, Rouse BT. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4123-32.
- Sykes M. *Fundamental Immunology: Transplantation Immunology 5th edition*. 2003, by William E., Md. Paul (Editor) By Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med*. 1994 Aug 1;180(2):711-5.
- Takaya S, Jain A, Yagihashi A, Nakamura K, Kobayashi M, Takeuchi K, Suzuki S, Iwaki Y, Demetris AJ, Todo S, Fung JJ, Starzl TE. Increased bile duct complications and/or chronic rejection in crossmatch positive human liver allografts. *Transplant Proc*. 1999 Aug;31(5):2028-31.
- Tan C and Gery I. The unique features of Th9 cells and their products. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):1-10.
- Taner T, Gandhi MJ, Sanderson SO, Poterucha CR, De Goey SR, Stegall MD, Heimbach JK. Prevalence, course and impact of HLA donor-specific antibodies in liver transplantation in the first year. *Am J Transplant*. 2012, 12, 1504-1510.
- Tang JL, Subbotin VM, Antonysamy MA, Troutt AB, Rao AS, Thomson AW. Interleukin-17 antagonism inhibits acute but not chronic vascular rejection. *Transplantation* 2001; 72:348–350.
- Tang Q and Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008 Mar;9(3):239-44.

- Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*. 1983 Mar 24-30;302(5906):305-10.
- Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J. Exp. Med.* 2001; 193:1311–1318.
- Ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Apr;8(2):139-45.
- Terasaki PI. History of transplantation: Thirty-Five Recollections. Los Angeles, UCLA. Tissue Typing Laboratory, 1991.
- Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant.* 2007;7:408-15.
- Testi R, Phillips JH, Lanier LL. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol.* 1989 Aug 15;143(4):1123-8.
- Thomas E. Starzl. History of Clinical Transplantation. *World J. Surg.* 24, 759–782, 2000
- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med.* 1991 Feb 1;173(2):507-10.
- Tisher CC and Madsen KM. Anatomy of the kidney. En: Brenner B.M. (5^a ed.). *The kidney*. Saunders, 1996; 3-71.
- Tong JY, Hsia S, Parris GL, Nghiem DD, Cottingham EM, Rudert WA, Trucco M. Molecular compatibility and renal graft survival-The HLA-DQB1 genotyping. *Transplantation* 1993; 55 (2): 390-395.
- Townamchai N and Eiam-Ong S. Biomarkers in kidney transplantation: From bench to bedside. *World J Nephrol.* 2015 Nov 6;4(5):487-91.
- Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, Tocker J, Peschon J. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol.* 2006 Jul 1;177(1):36-9.
- Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naïve human CD4+ FOXP3 T cells by T cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007; 110, 2983–2990.
- Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J. Immunol.* 2000. 164: 2759–2768.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003;19, 641–644.

- Trpkov K, Campbell P, Pardezca F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. *Transplantation* 1996;61:1586-92.
- Tsukaguchi K, Balaji KN, Boom WH. CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J Immunol.* 1995 Feb 15;154(4):1786-96.
- Tyler DR, Persky ME, Matthews LA, Chan S, Farrar JD. Pre-assembly of STAT4 with the human IFN-alpha/beta receptor-2 subunit is mediated by the STAT4 N-domain. *Mol. Immunol.* 2007;44, 1864–1872.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 2008. 172: 146–155.
- Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of FoxP3+CD4+CD25+ and IL-10 secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006; 177: 5852-5860.
- Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:1953.
- Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Dupont LJ, et al. Interleukin-17 stimulates release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells in vitro: a potential role for interleukin-17 and airway smooth muscle cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22:1280–1283.
- Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Wuyts WA, Verbeken EK, Meyts I, Bullens DM, Dilissen E, Luyts L, Van Raemdonck DE, Verleden GM. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *Eur Respir J* 2006 27, 779–787.
- VanBuskirk AM, Wakely ME, Orosz CG: Transfusion of polarized TH2-like cell populations into SCID mouse cardiac allograft recipients results in acute allograft rejection. *Transplantation.* 1996, 62:229–38.
- Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, Fossiez F, Banchereau J, Lebecque S, Bruijn JA, De Fijter JW, Van Es LA, Daha MR. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1526–1534.
- Vega-Ramos J, Alari-Pahissa E, Valle JD, Carrasco-Marín E, Esplugues E, Borràs M, Martínez-A C, Lauzurica P. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to Listeria monocytogenes infection. *Immunol Cell Biol.* 2010 Oct;88(7):707-15.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CL, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006. 24: 179–189.

- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, Stockinger B. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008. 453: 106–109.
- Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, Sayegh MH. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*. 1997, 64:795–800.
- Verland JW. Normal Ultrastructure of the Kidney and Lower Urinary Tract. *Toxicologic pathology* 1998, vol.26, no.1, pp 1-17.
- Via CS, Shanley JD, Shearer GM. Synergistic effect of murine cytomegalovirus on the induction of acute graft-vs-host disease involving MHC class I differences. Analysis of *in vitro* T cell function. *J. Immunol.* 1990; 145: 3283-3289.
- Vokaer B, Van Rompaey N, Lemaître PH, Lhommé F, Kubjak C, Benghiat FS, Iwakura Y, Petein M, Field KA, Goldman M, Le Moine A, Charbonnier LM. Critical role of regulatory T cells in Th17-mediated minor antigen-disparate rejection. *J Immunol.* 2010 Sep 15;185(6):3417-25
- von Vietinghoff S, Ouyang H, Ley K. Mycophenolic acid suppresses granulopoiesis by inhibition of interleukin-17 production. *Kidney Int* 2010; 78:79–88.
- Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR, Liu YJ. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:4793–8.
- Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breitmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. *Immunity* 2003; 18:605–617.
- Wakabayashi T, Onoda H, Sugimoto H, Beck Y, Mita K, Tomikawa S, Watanabe K, Meigata K, Nagao T, Uchida H. Not donor but recipient dendritic cells are involved in human renal rejection. *Transplant. Proc.* 1993; 25: 856-858.
- Waldmann H and Cobbold S. Regulating the immune response to transplants: a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 2001; 14:399–406.
- Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2006 Aug;6(8):595-601.
- Wahl SM, Orenstein JM, Chen W. TGF-beta influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000 Mar-Jun;11(1-2):71-9.
- Wan YY and Flavell RA. “Yin Yang” functions of TGF-B and Treg cells in immune regulation. *Immunol Rev* 2007; 220: 199-213.
- Waanders MM, Heidt S, Koekkoek KM, Zoet YM, Doxiadis II, Amir A, Heemskerk MH, Mulder A, Brand A, Roelen DL, Claas FH. Claas. Monitoring of indirect allorecognition: wishful thinking or solid data?. *Tissue Antigens* 2008; 71(1): 1-15.

- Wang JM, Shi L, Ma CJ, Ji XJ, Ying RS, Wu XY, Wang KS, Li G, Moorman JP, Yao ZQ. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12)/IL-23 by Tim-3 drives T(H)17 cell development during hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2013 Apr;87(8):4372-83.
- Wang Y, Liu Y, Zhang Y, Peng L, Ma J, Tang Z, Gao W, Zhu Z, Yao Z. The role of the CD95, CD38 and TGFbeta1 during active human cytomegalovirus infection in liver transplantation. *Cytokine* 2006, 35(3-4):193-199.
- Wang Y, Liu Y, Han R, Li Q, Yao Z, Niu W, Yuan Y, Tang Z, Zhu Z, Shen Z. Monitoring of CD95 and CD38 expression in peripheral blood T lymphocytes during active human cytomegalovirus infection after orthotopic liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jan;25(1):138-42.
- Wang YC, Wu TJ, Wu TH, Lee CF, Chou HS, Chan KM, Lee WC. The risk factors to predict acute rejection in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2012 Mar;44(2):526-8.
- Wang YL, Zhang YY, Li G, Tang ZQ, Zhou YL, Zhu ZJ, Yao Z. Correlation of CD95 and soluble CD95 expression with acute rejection status of liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2005 Mar 21;11(11):1700-4.
- Ware RE, Hart MK, Haynes BF. Induction of T cell CD7 gene transcription by nonmitogenic ionomycin-induced transmembrane calcium flux. *J Immunol*. 1991, 147:2787-94.
- Wardel EN. Kupffer cells and their function. *Liver* 1987; 7: 63-75.
- Watt KD, Pedersen RA, Kremers WK, Heimbach JK, Charlton MR. Evolution of causes and risk factors for mortality postliver transplant: results of the NIDDK long-term follow-up study. *Am J Transplant* 2010; 10: 1420-1427
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:821-852.
- Weigel G, Griesmacher A, Zuckermann AO, Laufer G, Mueller MM. Effect of mycophenolate mofetil therapy on inosine monophosphate dehydrogenase induction in red blood cells of heart transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):137-44.
- Weimert NA, Derotte M, Alloway RR, Woodle ES, Vinks AA. Monitoring of inosine monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker for mycophenolic acid effect: potential clinical implications. *Ther Drug Monit*. 2007 Apr;29(2):141-9.
- Wiesner RH, Ludwig J, Van Hoek B, Krom RA. Current concepts in cell-mediated hepatic allograft rejection leading to ductopenia and graft failure. *Hepatology* 1991; 14: 721-729.
- Wiesner RH, Goldstein RM, Donovan JP, Miller CM, Lake JR, Lucey MR. The impact of cyclosporine dose and level on acute rejection and patient and graft survival in liver transplant recipients. *Liver Transpl Surg*. 1998a Jan;4(1):34-41.

- Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK, Everhart J, Detre KM. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology*. 1998b Sep;28(3):638-45.
- Willems F, Marchant A, Delville JP, Gérard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M, Goldman M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol*. 1994 Apr;24(4):1007-9.
- Williams MA, Holmes BJ, Sun JC, Bevan MJ.. Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol. Rev* 2006. 211, 146–153.
- Wing, K and Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol*. 2010. 11: 7–13.
- Witowski J, Ksiazek K, Jörres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Mar;61(5):567-79.
- Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999 Dec 2;341(23):1725-30.
- Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000. 9: 589–593.
- Wood KJ and Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol*. 2003; 3:199–210.
- Wood KJ, Bushell A, Jones ND. Immunologic unresponsiveness to alloantigen in vivo: a role for regulatory T cells. *Immunological Review* 2011; 241(1):119–132.
- Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem*. 2007 May 4;282(18):13447-55. Epub 2007 Mar 13.
- Xie XJ, Ye YF, Zhou L, Xie HY, Jiang GP, Feng XW, He Y, Xie QF, Zheng SS. Th17 promotes acute rejection following liver transplantation in rats. *J Zhejiang Univ Sci* 2010; 11:819–827.
- Xie A., Wang S., Zhang K., Wang G., Ye P., Li J., Chen W., Xia J. Treatment with interleukin-12/23p40 antibody attenuates acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2011; 91:27–34.
- Xu L., Kitani A., Fuss I., Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25- Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007; 178:6725–9.
- Yang X.O., Nurieva R., Martinez G.J., Kang H.S., Chung Y., Pappu B.P., Shah B., Chang S.H., Schluns K.S., Watowich S.S., Feng X.H., Jetten A.M., Dong C. Molecular

- antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008; **29**:44–56.
- Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol* 2004; **16**, 1643–1656.
- Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*. 1995 Dec 15; **155**(12):5483-6.
- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *J Immunol*. 2011 Nov 1; **187**(9):4392-402.
- Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, Zappone JD, Painter SL, Armitage RJ. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine*. 1997 Nov; **9**(11):794-800.
- Yapici U, Kers J, Bemelman FJ, Roelofs JJ, Groothoff JW, van der Loos CM, van Donselaar-van der Pant KA, Idu MM, Claessen N, ten Berge IJ, Florquin S. Interleukin-17 positive cells accumulate in renal allografts during acute rejection and are independent predictors of worse graft outcome. *Transpl Int* 2011; **24**:1008–1017.
- Yatscoff RW and Aspeslet LJ. The monitoring of immunosuppressive drugs: a pharmacodynamic approach. *Ther Drug Monit*. 1998 Oct; **20**(5):459-63.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med*. 2001. **194**: 519–527.
- Yeaman GR, Collins JE, Currie JK, Guyre PM, Wira CR, Fanger MW. IFN-gamma is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*. 1998 May 15; **160**(10):5145-53.
- Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006 May; **116**(5):1310-6.
- Yeung MY, Najafian N, Sayegh MH. Targeting CD28 to prevent transplant rejection. *Expert Opin Ther Targets*. 2014 Feb; **18**(2):225-42.
- Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, Iwata N, Umebayashi H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet* 2008. **371**: 998–1006.

- Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Apr 15;94(8):3948-53.
- Yssel H, Shanafelt MC, Soderberg C, Schneider PV, Anzola J, Peltz G. *Borrelia burgdorferi* activates a T helper type 1-like T cell subset in Lyme arthritis. *J Exp Med*. 1991 Sep 1;174(3):593-601.
- Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, D'Addio F, Mfarrej B, Donnarumma M, Habicht A, Clarkson MR, Iacomini J, Glimcher LH, Sayegh MH, Ansari MJ. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J Exp Med*. 2008 Dec 22;205(13):3133-44.
- Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med*. 2006 Oct 30;203(11):2451-60.
- Zhai Y, Meng L, Gao F, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Allograft rejection by primed/memory CD8⁺ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients. *J Immunol*. 2002 Oct 15;169(8):4667-73.
- Zhang X, Angkasekwinai P, Dong C, Tang H. Structure and function of interleukin-17 family cytokines. *Protein Cell*. 2011 Jan;2(1):26-40.
- Zhao Y, Zhao H, Sun Y, Hao J, Qi X, Zhou X, Wu Z, Wang P, Kaech SM, Weaver CT, Flavell RA, Zhao L, Yao Z, Yin Z. IL-4 induces a suppressive IL-10-producing CD8⁺ T cell population via a Cdkn2a-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*. 2013; Dec;94(6):1103-12.
- Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004; 172:5213-5221.
- Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. Cutting edge: Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol* 2008; 180:7112-6.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 2008; 453:236-240.

