

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, OBSTETRICIA Y CIRUGÍA

**UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE
MARCADORES SOLUBLES EN SANGRE Y BILIS
EN PACIENTES CON TRASPLANTE HEPÁTICO
EN EL DIAGNÓSTICO DE RECHAZO Y
COMPLICACIONES POSTRASPLANTE**

TESIS DOCTORAL

M^a DEL CARMEN TEJIDO SÁNCHEZ

2015



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: María del Carmen Tejido Sánchez

 <http://orcid.org/0000-0002-6817-2533>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA**

**UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE
MARCADORES SOLUBLES EN SANGRE Y BILIS EN
PACIENTES CON TRASPLANTE HEPÁTICO EN EL
DIAGNÓSTICO DE RECHAZO Y COMPLICACIONES
POSTRANSPLANTE**

TESIS DOCTORAL

DIRIGIDA POR

**JOSE MARÍA ÁLAMO MARTÍNEZ
GABRIEL ÁNGEL CARRANQUE CHÁVES**

MARÍA DEL CARMEN TEJIDO SÁNCHEZ





2015

FACULTAD DE SEVILLA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. José María Álamo Martínez, Profesor del Departamento de Cirugía, como Director de la Tesis Doctoral titulada “UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES SOLUBLES EN SANGRE Y BILIS EN PACIENTES CON TRASPLANTE HEPÁTICO EN EL DIAGNÓSTICO DE RECHAZO Y COMPLICACIONES POSTRASPLANTE” realizada por Doña M^a del Carmen Tejido Sánchez en dicho Departamento juntamente con la Universidad de Sevilla, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los reales decretos 185/85, 778/98 y 56/05, en Málaga a 31 de Octubre de 2015.

Prof. Dr. José María Álamo Martínez

FACULTAD DE MEDICINA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. Gabriel Ángel Carranque Chaves, Profesor del Departamento de Cirugía, Obstetricia y Ginecología, como Director de la Tesis Doctoral titulada “UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES SOLUBLES EN SANGRE Y BILIS EN PACIENTES CON TRASPLANTE HEPÁTICO EN EL DIAGNÓSTICO DE RECHAZO Y COMPLICACIONES POSTRANSPLANTE” realizada por Doña M^a del Carmen Tejido Sánchez en dicho Departamento juntamente con la Universidad de Sevilla, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los reales decretos 185/85, 778/98 y 56/05, en Málaga a 31 de Octubre de 2015.



Prof. Dr. Gabriel Ángel Carranque Chaves

A mis padres

A mis hijos Marta, Laura y Gonzalo

A mi hermano Ángel



AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Ángel Bernardos Rodríguez, que me enseñó tanto y que inspiró esta tesis.

Al Doctor Jose María Álamo Martínez, porque sin conocerme confió en mí y aceptó la dirección de este proyecto. Gracias Jose María.

Al Doctor Gabriel Ángel Carranque Chaves, mi gran amigo, siempre dispuesto. Sin él no hubiera sido posible esta tesis.

A Paca Fernández Escribano, bióloga del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, por su imprescindible colaboración en el procesamiento de las muestras.

A Juan Manuel Praena Fernández, estadístico del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, por su ayuda en el análisis estadístico.

A la Unidad de Cirugía Hepatobilio-pancreática y Trasplante Hepático del Hospital Virgen del Rocío, Sevilla por su colaboración en la realización de esta tesis en la recogida de muestras y en la obtención de datos.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía del Hospital de La Línea de la Concepción, Cádiz, por su apoyo incondicional y su comprensión durante la realización de la tesis.

A mi hermano Ángel Tejido Sánchez, mi apoyo incondicional. Me ha ayudado tanto en la realización de esta tesis que se merece una mención especial en este apartado. Un beso enorme hermano.

A mi hija Marta Martínez Tejido, fundamental para resolver mis problemas en la confección de este proyecto. Te quiero mucho Marta.

A toda mi familia por apoyarme durante todo este tiempo y permitir los inconvenientes que a veces les ha ocasionado mama y su tesis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 GENERALIDADES DE LA INMUNOLOGÍA.....	11
1.1.1 Referencias históricas de la Inmunología.....	11
1.1.2 Conceptos generales de inmunología.....	12
1.2 INMUNIDAD CELULAR.....	17
1.2.1 Inmunidad mediada por células fagocíticas.....	18
1.2.2 Activación de los macrófagos.....	19
1.2.3 Papel de las células T coadyuvantes (Th).....	20
1.2.4 Citotoxicidad mediada por células.....	22
1.2.5 Hipersensibilidad de tipo retardado.....	27
1.3 RESPUESTA HUMORAL.....	30
1.3.1 Respuesta primaria y respuesta secundaria.....	31
1.3.2 Fases de la inducción de la respuesta.....	32
1.4 LA RESPUESTA INMUNE.....	42
1.4.1 Respuesta de anticuerpos primaria y secundaria.....	42
1.4.2 Respuesta de las células T. Citotoxicidad.....	45
1.5 CITOKINAS.....	47
1.5.1 Interleukina 2.....	54
1.6 ADHESION DE LOS LEUCOCITOS EN LOS PROCESOS DE INFLAMA- CION. ICAM-1.....	57
1.7 INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE.....	62
1.7.1 Mecanismos de rechazo en el trasplante hepático.....	68
1.7.2 Aspectos clínicos y anatomopatológicos del rechazo en el trasplan- te hepático.....	75
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	79

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	83
4. OBJETIVOS.....	87
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	91
5.1 MATERIAL.....	93
5.1.1 Tamaño muestral y grupos de estudio.....	93
5.1.2 Protocolo peritrasplante.....	95
5.1.3 Características comunes a todos los pacientes.....	95
5.2 METODOLOGÍA	97
5.2.1 Variables de estudio.....	97
5.2.1.1 Variables principales.....	97
5.2.1.2 Variables secundarias.....	97
5.2.2 Procesamiento en el Servicio de Inmunología.....	98
5.2.3 Método estadístico.....	103
6. RESULTADOS.....	105
6.1 RESULTADOS EN CUANTO A LA MUESTRA.....	107
6.1.1 Características de los pacientes.....	107
6.1.2 Análisis de la función hepática.....	108
6.2 OTROS PARÁMETROS. DATOS ANALÍTICOS.....	109
6.2.1 Descriptivos.....	109
6.2.2 Diagrama de cajas de la distribución de los tres grupos para inhi- bidores calcineurina y bilirrubina.....	114
6.2.3 Diagrama de cajas de la distribución de los tres grupos para la GOT y la GPT.....	115
6.2.4 Diagrama de cajas de la distribución de los tres grupos para la GGT y ALP.....	116
6.2.5 Diagrama de cajas de la distribución de los tres grupos para la colinesterasa.....	117
6.2.6 Diagramas de barras de los distintos parámetros.....	118
6.2.7 Resumen media de los tres grupos por día.....	119
6.2.8 Pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney).....	120

6.3 RESULTADOS GLOBALES DE IL-2R EN SANGRE.....	121
6.3.1 Descriptivos.....	121
6.3.2 Resumen media de los tres grupos por día.....	124
6.3.3 Representación media de los distintos grupos.....	125
6.3.4 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 1.....	126
6.3.5 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 5.....	127
6.3.6 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 10.....	128
6.3.7 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 15.....	129
6.3.8 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 20.....	130
6.3.9 Pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney).....	131
6.3.10 Curvas de ROC sIL-2R.....	132
 6.4 RESULTADOS GLOBALES DE IL-2R EN BILIS.....	 134
6.4.1 Descriptivos.....	134
6.4.2 Diagrama de cajas de la media de los tres grupos y su curva de ROC día 1.....	137
6.4.3 Diagrama de cajas de la media de los tres grupos y su curva de ROC día 5.....	138
6.4.4 Diagrama de cajas de la media de los tres grupos y su curva de ROC día 10.....	139
6.4.5 Diagrama de cajas de la media de los tres grupos y su curva de ROC día 15.....	140
6.4.6 Diagrama de cajas de la media de los tres grupos y su curva de ROC día 20.....	141
6.4.7 Resumen media en los tres grupos por día.....	142
6.4.8 Pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney).....	143
6.4.9 Curvas de ROC IL-2R en bilis.....	144

6.5 RESULTADOS GLOBALES DE ICAM-1 EN SANGRE.....	146
6.5.1 Descriptivos.....	146
6.5.2 Resumen media en los tres grupos por día.....	149
6.5.3 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 1.....	150
6.5.4 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 5.....	151
6.5.5 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 10.....	152
6.5.6 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 15.....	153
6.5.7 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 20.....	154
6.5.8 Pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney).....	155
6.5.9 Curvas ROC sICAM-1.....	156
6.6 RESULTADOS GLOBALES DE ICAM-1 EN BILIS.....	158
6.6.1 Descriptivos.....	158
6.6.2 Resumen media en los tres grupos por día.....	161
6.6.3 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 1.....	162
6.6.4 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 5.....	163
6.6.5 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 10.....	164
6.6.6 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 15.....	165
6.6.7 Diagrama de cajas de la media en los tres grupos y su curva de ROC día 20.....	166
6.6.8 Pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney).....	167
6.6.9 Curvas de ROC ICAM-1 bilis.....	169
6.7 RESUMEN EVOLUCIÓN NIVELES EN EL TIEMPO DE LOS DISTIN- TOS MARCADORES EN LOS DIFERENTES GRUPOS.....	171

7. DISCUSION.....	173
7.1 DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE INTERLEUKINA-2 EN SUERO.....	177
7.2 DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE INTERLEUKINA-2 EN BILIS.....	182
7.3 DETERMINACIÓN DE ICAM-1 EN SUERO.....	187
7.4 DETERMINACIÓN DE ICAM-1 EN BILIS.....	191
7.5 OTROS PARÁMETROS.....	195
8. CONCLUSIONES.....	199
9. BIBLIOGRAFIA.....	203
10. ABREVIATURAS.....	219

INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE LA INMUNOLOGÍA

Parte de la introducción se basa en el CURSO DE INMUNOLOGÍA GENERAL. Profesor Enrique Iáñez Pareja. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. España.

1.1.1 REFERENCIAS HISTÓRICAS DE LA INMUNOLOGÍA

Las primeras referencias históricas a la Inmunología se encontraron ya en el papiro de Ebers, escrito en 1550 a.c. y que fue descubierto entre los restos de una momia en la tumba de Assasif, en Luxor, por Edwin Smith en 1862, fue comprado a continuación por el egiptólogo alemán Georg Ebers, al que debe su nombre y su traducción. Allí se puede leer un relato en el que habla del ácido salicílico, contenido en las hojas de sauce, como antiinflamatorio. La actual aspirina (ácido acetil salicílico) no es nada más que una modificación química de aquella molécula.

Tucídides (siglo V a.C) ya hablaba en sus escritos de la “inmunidad contra la plaga” si bien no sabemos si entonces se entendía la palabra plaga tal como lo hacemos hoy.

En el año 10 (a.C.) Celsus describió los signos capitales de la inflamación: *rubor et tumor cum calore et dolore* (enrojecimiento, aumento del tamaño, aumento de la temperatura y dolor). Unos 140 años más tarde le agregó Galeno el 5º signo: “*functio laesa*” (alteración de la función).

Los senadores romanos disfrutaron durante 6 siglos (3º a.C a 3º d.C) de protección parlamentaria, llamada entonces “*Inmunitas*”.

Los chinos, 200 años a. C. ya intentaban proteger a los niños de la viruela administrándoles por vía nasal polvo obtenido triturando costras de viruela obtenidas de las lesiones de los enfermos.

El primer abordaje científico a la vacunación lo hizo un médico general inglés, Edward Jenner (1796), tras observar que las ordeñadoras de vacas padecían unas lesiones en las manos pero nunca padecían la viruela. Tomó material de dichas lesiones y se lo inyectó a un niño que posteriormente no padeció la viruela humana incluso inyectándole el virus.

Así, el tratado sobre vacunación escrito por Jenner en 1798 tuvo gran impacto y permitió que la OMS considerara a la viruela erradicada en 1979.

Sorprendentemente los trabajos iniciales de vacunación se hicieron incluso sin saber que las enfermedades de las que se pretendía proteger eran causadas por microorganismos.

Fue Robert Koch, a finales del siglo XIX, el que descubrió que las infecciones eran causadas por microorganismos. Hoy es tan obvio que apenas le damos importancia a estos descubrimientos tan fantásticos.

Louis Pasteur descubrió la vacuna contra la rabia en 1880 y Emil von Behring & Shibasaburu Kitasato descubrieron que los individuos vacunados desarrollaban algo en el suero que les protegía. Resultaron ser anticuerpos.

Elie Metchnikoff, uno de los más grandes inmunólogos de la antigüedad, descubrió la fagocitosis y acuñó los términos macrófago y micrófago (probablemente los conocidos hoy como neutrófilos).

El desarrollo de la inmunología se ha desarrollado en una época relativamente reciente en relación con otras ciencias. Uno de los mayores obstáculos a este desarrollo ha sido la inercia de la mente humana, resistente a abrirse a conceptos nuevos y revolucionarios. Baste como ejemplo que el médico Miguel Servet fue quemado en la hoguera por decir que la sangre no es un líquido estático sino que circula por nuestro cuerpo.

La historia de la inmunología está llena de personajes ilustres y científicos muy brillantes. Muchos de ellos fueron galardonados con el premio Nobel. Quizás también lo merecieron otros que trabajaron en la sombra en sus proyectos.

1.1.2 CONCEPTOS GENERALES DE INMUNOLOGÍA

La Inmunología es la ciencia encargada del estudio del Sistema Inmune y las patologías con él relacionadas. El sistema inmune es el encargado de proteger al individuo de las agresiones de otros seres vivos procedentes del medio ambiente exterior (microorganismos, helmintos, etc.), o del propio medio interno (células neoplásicas).

El sistema inmune, en vez de ser una estructura integrada por órganos y aparatos, es más bien, una red de células distribuidas por todo el organismo, intercomunicadas y perfectamente coordinadas.

Estas células tienen una gran movilidad y pueden localizarse en la sangre o situarse en órganos, como el ganglio, en tejidos, como la pulpa blanca del bazo, o bien encontrarse dispersas en el seno de tejidos pertenecientes a otros órganos o aparatos, como los linfocitos localizados en el tejido conjuntivo.

Funcionalmente, el sistema inmune está integrado por dos grandes sistemas o mecanismos defensivos frente a los agentes extraños virtualmente patógenos: la inmunidad natural y la adaptativa

Inmunidad natural o inespecífica

Sus componentes están siempre presentes y dispuestos para actuar inmediatamente sin requerir tiempo de latencia para el desencadenamiento de las acciones defensivas. La inmunidad natural carece de especificidad y de memoria. En otras palabras, sus respuestas son estereotipadas, con independencia de la naturaleza del antígeno, y no registran un aumento de eficacia en sucesivas exposiciones al mismo. La inmunidad natural está constituida por:

Las barreras epiteliales.

* *Inmunidad natural celular:* fagocitos (monocitos-macrófagos y leucocitos PMN) y células agresoras naturales (células Natural Killer).

**Inmunidad natural humoral:* lisozima, complemento e interferón.

Inmunidad adaptativa

Es mucho más compleja que la inespecífica, se caracteriza por: adaptabilidad al antígeno, especificidad y memoria.

Tras la entrada de un germen, por primera vez, en el organismo se desarrolla una respuesta inmune primaria. Dicha respuesta se puede estructurar en tres etapas:

**Reconocimiento del antígeno.*

**Periodo de latencia:* dura varios días, en los que los linfocitos específicos amplifican su número (expansión clonal), a la vez que se diferencian en células efectoras.

* *Respuesta efectora,* consistente en:

- Secreción de anticuerpos específicos.
- Desarrollo de actividad citolítica específica.
- Liberación de factores que activan las células fagocíticas.
- Adquisición de memoria inmunitaria.

ÓRGANOS DEL SISTEMA INMUNE

Los linfocitos son las principales células responsables de la respuesta inmunitaria, están distribuidos por todo el organismo en órganos bien delimitados, o en forma de acumulaciones difusas; al conjunto de estas estructuras se le denomina sistema linfático y están en intercomunicación continua gracias al tránsito, desde unas a otras, de los linfocitos a través de las circulaciones sanguínea y linfática.

Los órganos linfoides se dividen en dos grandes categorías:

Organos linfoides primarios (centrales)

Se consideran órganos linfoides primarios aquellos en los que se originan y maduran las células del sistema inmune

MEDULA ÓSEA

Los linfocitos proceden de la célula hematopoyética pluripotencial (CHP), las CHP son de origen mesodérmico y aparecen inicialmente en el saco vitelino del embrión para luego trasladarse al hígado (6ª semana) y más tarde (a partir del 5º mes) a la médula ósea, órgano hematopoyético fundamental para el resto de la vida.

Los linfocitos que maduran (se diferencian) en la médula ósea se denominan en linfocitos B y están especializados en la producción de anticuerpos.

El microambiente de la médula ósea que determina la maduración de los linfocitos B no se conoce con precisión, consiste en la liberación de factores solubles (como la IL-17) y estimulaciones yuxtacrinas que llevan a cabo las células del estroma medular. También es muy importante la interacción de las células inmaduras con proteínas de la matriz extracelular.

TIMO

Es un órgano linfoepitelial, de forma bilobulada, imprescindible para la adquisición de la inmunocompetencia de los linfocitos T durante los primeros años de la vida. El periodo clave de este proceso lo constituiría el desarrollo ontogénico, ya que la extirpación del timo a un adulto (o al final de la adolescencia, con el desarrollo del sistema inmunitario completo) no implica un déficit inmunitario.

El órgano deriva de un esbozo epitelial formado a partir de la 3ª y 4ª bolsas faríngeas, y es el primer órgano linfoide que aparece. El tamaño del timo aumenta a lo largo de la vida fetal y postnatal hasta alrededor de la pubertad, momento a partir del

cual empieza a involucionar En el adulto la producción y maduración de los linfocitos T tiene lugar en la médula.

Organos linfoides secundarios

Son los órganos donde los linfocitos ya maduros, e inmunológicamente competentes, toman contacto con los antígenos y donde se producen las respuestas inmunitarias frente a los estímulos antigénicos. Básicamente, existen tres tipos de órganos linfoides secundarios, los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). El funcionamiento de los tres es similar distinguiéndose básicamente por la procedencia de los antígenos que penetran en ellos y que provienen, respectivamente de:

Linfa (medio extracelular de los tejidos) en el caso de los ganglios linfáticos

Sangre en el caso del bazo

Luz intestinal en el caso de las placas de Peyer (tejido MALT del intestino).

GANGLIO LINFATICO

Tienen una forma similar a la del riñón, con una longitud y grosor, respectivamente, inferiores a 1 y 0.5 cm en condiciones fisiológicas. Cuando se desencadena una respuesta, el tamaño aumenta. Histológicamente, se distinguen tres zonas.

* *Corteza*, donde se localizan los linfocitos B formando los folículos linfoides primarios y secundarios (son los que tienen centro germinal)

* *Paracorteza*, poblada por linfocitos T dispuestos de manera difusa.

* *Médula*. Contiene linfocitos B y T. Los cordones medulares, que parten de la paracorteza como prolongaciones de tejido linfoide en la médula, contienen la mayor parte de las células plasmáticas que existen en el ganglio.

Los linfocitos T son la población linfocitaria mayoritaria en el ganglio, considerado en conjunto.

TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LAS MUCOSAS (MALT)

En la submucosa de los principales puntos de posible entrada de microorganismos, se sitúan agregados de tejido linfoide, difusos en la lámina propia y o en nódulos como las amígdalas y adenoides (en la nasofaringe) o en las placas de Peyer (en el intestino).

También existen linfocitos intraepiteliales, situados entre las células del epitelio, por encima de la membrana basal.

El MALT desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria local de la superficie de las mucosas.

BAZO

El bazo es donde se eliminan los hematíes envejecidos (pulpa roja), pero además es un órgano linfoide secundario (pulpa blanca), y en situaciones extremas puede producir hematopoyesis extramedular. El tejido linfoide se organiza alrededor de las arteriolas a modo de manguitos (tejido linfoide periarteriolar), contiene áreas de linfocitos T y B, siendo los linfocitos B los mayoritarios. Además de linfocitos, en el bazo existen células de estirpe macrofágica que fagocitan los hematíes viejos y las bacterias que pudieran llegar por la circulación. El bazo carece de vasos linfáticos, por lo que los linfocitos que circulen por él sólo pueden entrar por la arteria y salir por la vena del mismo a la circulación portal.

1.2 INMUNIDAD CELULAR

En la actualidad se considera como “inmunidad mediada por células” cualquier respuesta contra microorganismos o tumores a la que los anticuerpos juegan un papel subordinado o secundario.

En la respuesta inmune humoral se activan células al principio de dicha respuesta.

En muchas respuestas celulares los anticuerpos juegan papeles esenciales como “puentes” entre células.

Además, cualquier respuesta celular se acompaña a la vez de producción de anticuerpos, que a su vez pudiendo modificar las respuestas celulares de distintas maneras: p. ej., la formación de complejos Ag-Ac activa el complemento, liberando péptidos que funcionan como factores quimiotácticos que inducen la acumulación de mayor número de células inmunes y aumentado la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, no todas las respuestas celulares dependen de linfocitos T: de hecho las primeras líneas defensivas contra microorganismos son inespecíficas, y se centran en la identificación de componentes microbianos comunes por parte de células del sistema de inmunidad natural (macrófagos, granulocitos, neutrófilos, etc...).

Una de las posibles clasificaciones de la inmunidad mediada por células sería la siguiente:

1. Reacciones dependientes de fagocitos del sistema natural:

- * Fagocitosis
- * Producción de citocinas.

2. El papel central de las células Th en la determinación del tipo de mecanismo efector puesto en marcha.

3. La citotoxicidad directa que produce la lisis de la célula diana enferma es realizada por varios tipos celulares:

- * Dentro del sistema específico: linfocitos T citotóxicos, que se denominan linfocitos T citolíticos (CTL) en su fase efectora.
- * Dentro del sistema natural: células agresoras naturales (NK) y macrófagos.
- * Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)
- * Células T CD4+ que median reacciones de hipersensibilidad tipo retardado.

1.2.1 INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS FAGOCITICAS

La actuación de estas células se puede dividir en varias fases:

- * Quimiotaxis.
- * Unión del microorganismo al fagocito.
- * Desencadenamiento de la captación del microorganismo.
- * Fagocitosis y mecanismos matadores.

La **quimiotaxis** se define como la atracción de los fagocitos del sistema de inmunidad natural hacia el foco de infección. Esto se debe a varios factores:

- * Por sustancias de origen propiamente microbiano. Tal es el caso de péptidos cortos derivados de los extremos amino-terminales de proteínas bacterianas.
- * Ciertos componentes microbianos (como la endotoxina de bacterias gram-negativas) activan la ruta alternativa del complemento, liberando los péptidos C3a y C5a, que son muy quimiotácticos sobre los fagocitos.

La **unión del microorganismo al fagocito** es una fase importante, ya que de su éxito depende que ocurra la internalización ulterior y el desencadenamiento de los mecanismos matadores. La unión inespecífica entre bacteria y fagocito se realiza por interacción entre moléculas de superficie del microorganismo y receptores de leucocito (oligosacáridos de superficie, lectinas, CR3 y LFA-1...).

La captación del microorganismo se ve facilitada si está recubierto por el componente C3b del complemento y/o por anticuerpos: esta opsonización potencia poderosamente el mecanismo amebiano del fagocito. El microorganismo, englobado en el fagosoma recibe la descarga de los gránulos (lisosomas) del fagocito. El contenido preformado de estos gránulos, junto con sustancias producidas *de novo*, constituyen una batería de mecanismos encaminados a la muerte del patógeno. Se pueden clasificar en dos grandes tipos: dependientes e independientes de oxígeno.

1. Mecanismos dependientes de oxígeno: se pueden dividir en dos categorías: los que se basan en intermediarios reactivos de oxígeno, y los intermediarios reactivos de nitrógeno:

* **Intermediarios reactivos de oxígeno (ROI):** La unión de partículas a los receptores de la membrana del fagosoma del macrófago provoca el denominado estallido respiratorio (por activación de la ruta de la hexosa monofosfato), produciendo mucho NADH

* Intermediarios reactivos de nitrógeno (NRI)

2. *Mecanismos independientes de oxígeno*: estos mecanismos dependen de proteínas antimicrobianas preformadas y acumuladas en los gránulos:

- Proteínas catiónicas, con actividades de tipo antibiótico: defensinas, catepsina G, azurozidina.

- Lisozima, que actúa rompiendo el peptidoglucano de bacterias (sobre todo Gram negativas).

- Lactoferrina (producida por los neutrófilos): secuestra hierro, indispensable para las bacterias.

1.2.2. ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

Los macrófagos en reposo pueden matar, pero sus capacidades microbicidas mejoran por medio de su activación:

* Productos antimicrobianos que causan activación directa de monocitos y macrófagos.

* Productos antimicrobianos que provocan activación indirecta de macrófagos sin activar y las células NK liberando citocinas que a su vez activan a los macrófagos.

- Posterior activación por citocinas producidas por Th, sobre todo por IFN-gamma. Esto provoca la atracción quimiotáctica de fagocitos y/o activación de los mecanismos dependientes e independientes de oxígeno.

Es importante prestar atención a las diferentes fases de la respuesta inmune en las que participan los macrófagos:

1. En la defensa inicial frente al patógeno: el

patógeno sin activar tiene su capacidad fagocítica basal. Al mismo tiempo secreta citocinas que ayudan a otras células (p. ej., recordar la IL-1 que participa en la activación de los linfocitos B).

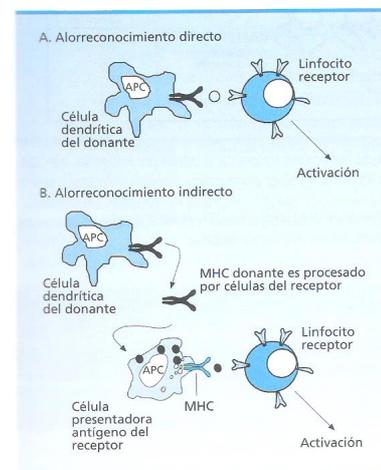


Figura1: En el alorreconocimiento, las células presentadoras de HLA extraño puede ser del donante o del receptor. Inmunología clínica. Bases moleculares y celulares. Jose Peña Martínez. Ed. Arán.

2. En la presentación del antígeno: actúa como célula presentadora para linfocitos Th, que a su vez se activan secretando citokina

3. En la fase efectora el macrófago se activa por citokinas (como el IFN-gamma secretado por los linfocitos Th), lo cual va a potenciar sus actividades antimicrobianas, antitumorales y de secreción de citokinas.

Las citokinas secretadas por macrófagos en respuesta a componentes microbianos cumplen importantes papeles: la IL-12 y el TNF-alfa, en sinergia con otros mediadores, mejoran la actividad antimicrobiana inespecífica:

* El TNF- alfa mejora la capacidad microbicida de PMN neutrófilos y de los propios macrófagos.

* El TNF-alfa junto con la IL-12 provocan que las células NK liberen IFN-gamma, el cual aumenta la actividad de los macrófagos.

* El TNF-alfa induce cambios en las superficies de células endoteliales y de fagocitos, que pueden interaccionar de modo que los fagocitos se extravasan para acceder al lugar de la inflamación, donde se localiza el foco de infección.

1.2.3 PAPEL DE LAS CÉLULAS T COADYUVANTES (Th)

Las células Th desempeñan papeles esenciales en la inmunidad celular:

1. Determinan la especificidad de la respuesta inmune (qué antígenos y qué epitopos son reconocidos)

2. Intervienen en la selección de los mecanismos efectores destinados a eliminar al patógeno.

3. Ayudan a la proliferación de las células efectoras adecuadas.

4. Mejoran las funciones de fagocitos y otras células efectoras.

La interacción del conjunto de receptores TCR-CD3-CD4 con los epítomos en el MHC-II de células presentadoras condiciona la especificidad de la respuesta.

Pero el sistema inmune efectúa una segunda decisión esencial: qué mecanismos efectores se ponen en marcha, que sean los adecuados para la naturaleza de cada infección en particular. Dentro de la inmunidad mediada por células, existen varios mecanismos:

1. Citotoxicidad directa específica, por medio de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL)

2. Degranulación de eosinófilos y mastocitos una vez que han contactado con la célula a eliminar a través de anticuerpos, que sirven de “puentes” moleculares (ADCC).
3. Activación de macrófagos y reacción de hipersensibilidad de tipo retardado.

Entonces, ¿cómo se determina el tipo de acción para cada tipo de situación?. La respuesta radica en buena parte en el patrón local de citocinas producidas al inicio de la respuesta inmune, desencadenada ante cada tipo de patógeno así como en la concentración local de metabolitos esteroideos y de vitamina D3 en el tejido linfoide: estos factores determinan que predomine uno de dos subtipos de células Th, lo que finalmente condicionará el desencadenamiento de uno y otro de los mecanismos efectores

Así pues, los linfocitos Th presentan dos subpoblaciones, denominadas Th1 y Th2. Dichas subpoblaciones se desarrollan a través de una ruta que se bifurca:

- * Th vírgenes: ThP
- * Estimulación inicial: Th0
- * Estimulación crónica: Th1/Th2
- * Memoria largo plazo: ThM

Cada uno de esos tipos de linfocitos Th secreta un patrón característico de citocinas:

- * ThP: IL-2
- * Th0: IFN- gamma, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10
- * Th1: IFN-gamma, IL-2, IL-3, TNF- alfa, GM-CSF
- * Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-3, TNF-alfa, GM-CSF
- * ThM: IL-2

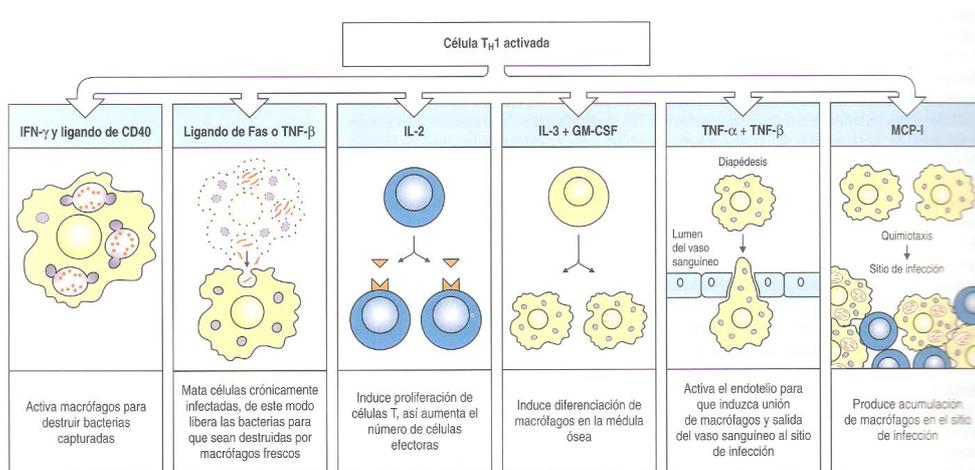


Figura 2 : La respuesta inmunitaria contra bacterias intracelulares está coordinada por células Th1 activadas. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Charles A. Janeway. Ed. Masson.

La diferencia funcional entre las dos subpoblaciones de linfocitos es:

* Las células Th1 tienden a activar los macrófagos y responden bien a estímulos

* Las células Th2 tienden a incrementar la producción de mastocitos y eosinófilos, y mejoran la producción de ciertos isotipos de inmunoglobulinas, incluyendo IgE. Las células Th2 responden bien a antígenos presentados por linfocitos B.

1.2.4. CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CÉLULAS

Se puede dividir en tres tipos:

1. Citotoxicidad directa específica: es la llevada a cabo por los linfocitos citotóxicos (Tc), que están restringidos por el haplotipo propio MHC-I, y que poseen CD8+ como moléculas correceptoras, (aunque algunas son CD4+ y están restringidas por MHC-II).

2. Citotoxicidad directa inespecífica: las células agresoras naturales (NK) reconocen determinantes inespecíficos de células tumorales o infectadas con ciertos virus.

3. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos: es un mecanismo indirecto por el que células matadoras como NK, eosinófilos, etc, interaccionan con el antígeno por medio de puentes de anticuerpos previamente unidos a receptores para Fc de la célula

Citotoxicidad directa específica

El papel más importante de este mecanismo es el de eliminar células propias infectadas por virus. Los linfocitos Tc en reposo, al activarse apropiadamente terminan diferenciándose a los llamados linfocitos T citolíticos (CTL), que son los efectores de la inmunidad celular específica.

El 90% de estos linfocitos son CD8+, y están restringidos por el MHC-I propio. Son capaces de reconocer a la mayoría de las células nucleadas. Pero existe un 10% de linfocitos Tc que fenotípicamente son CD4+ y están restringidos por MHC-II.

La actuación de estas células la podemos considerar en dos fases:

1. Activación y diferenciación de los precursores Tc hasta CTL.
2. Fase efectora: destrucción de la célula diana, a su vez diferenciable en:
 - Adhesión y formación del conjugado entre CTL y la célula diana
 - Golpe letal
 - Disociación del CTL
 - Destrucción de la célula diana

Los linfocitos Tc vírgenes parece que se activan solamente en los órganos linfoides secundarios, únicos sitios en los que reciben las señales necesarias. Requieren 3 señales:

* La señal específica suministrada por la interacción entre su complejo TCR-CD3-CD8 con el MHC-I de una célula presentadora profesional infectada (por ejemplo una célula dendrítica).

* La señal coestimuladora suministrada por la misma célula (unión entre B7 y CD28).

* La interleukina IL-2 (dato importante para nuestro estudio)

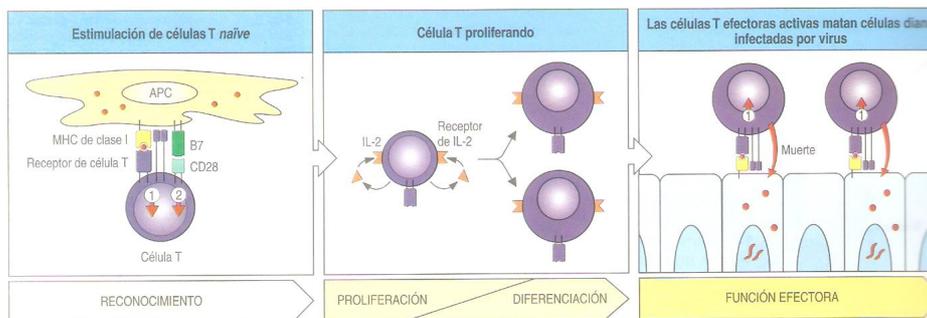


Figura 3: Las células T efectoras armadas responden a sus células diana sin coestimulación. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Charles A. Janeway et al. Ed. Masson

Parece ser que el Tc expresa tras la interacción inicial una pequeña cantidad de IL-2, pero en el caso de estos Tc vírgenes no suele ser suficiente para activarlos. La aportación clave de IL-2 procede de células Th1 cercanas. De hecho, se piensa que tanto el Th como el Tc vírgenes se activan simultáneamente al unirse a la misma célula presentadora.

En cambio, las células Tc de memoria tienen menos requerimientos para su activación. De hecho, como ya sabemos, al tener moléculas de adhesión celular diferentes a las correspondientes Tc vírgenes, pueden encontrarse el antígeno en tejidos extralinfoides.

1. No requieren obligatoriamente la señal coestimuladora.
2. No requieren obligatoriamente la ayuda de Th, ya que al unirse de modo específico a una célula propia infectada que le suministre el péptido adecuado, provoca que el Tc produzca no sólo receptores de IL-2, sino niveles adecuados de IL-2 capaces de auto-activarlas.

Así, se provoca la proliferación y diferenciación del linfocito en reposo (virgen o de memoria) hasta que se convierte en linfocito T citolítico (CTL). Este CTL se caracteriza por poseer algo más de citoplasma que el Tc, y sobre todo por poseer gránulos densos a los electrones, rodeados de unidad de membrana (llamados a veces granulosomas) y un aparato de Golgi.

Se produce una interacción de gran avidez entre moléculas de LFA-1 del CTL y moléculas de ICAM-1 de la célula diana tras el reconocimiento específico. Esta unión dura unos 5-10 minutos, durante los cuales las señales de la unión intercelular se trasducen al interior del CTL por medio de cascadas de proteín-quinasas y proteín-fosfatasas, conduciendo a la activación de una serie de funciones del CTL. Se dice entonces que el linfocito queda programado para la lisis.

El citoesqueleto del CTL se reorganiza, situándose el aparato de Golgi y los granulosomas en el polo celular que queda en contacto con la célula diana. Entonces, los gránulos se fusionan con la membrana citoplásmica, produciéndose la exocitosis de su contenido al estrecho espacio intercelular.

Antes de que se produzca la lisis de la célula diana, el CTL se separa, probablemente ayudado por el hecho de que la LFA-1 vuelve al estado de baja afinidad.

Parece que la destrucción de la célula diana puede ocurrir por varios mecanismos, predominando uno u otro según la naturaleza de la superficie de la célula diana, y del grado de activación que haya alcanzado el linfocito CTL.

* Monómeros de perforina contenida en los granulosomas llegan a la membrana de la célula diana, y en presencia de Ca^{++} se polimerizan para formar cilindros huecos de poliperforina, que atraviesan la bicapa lipídica. Así se forma un

canal que es permeable a iones, y que puede provocar la lisis osmótica de la célula diana.

* Pero no siempre el efecto de la poliperforina es la lisis. En otros casos parece que el papel de los canales es el de permitir la entrada de otras sustancias del granulosoma que inducen la apoptosis de la célula diana. De hecho se ha visto que pueden entrar fragmentinas (granzimas) que inducen la fragmentación de los cromosomas en múltiplos de nucleosomas.

Respecto a la **Granzima B**, se trata de una fragmentina que induce fragmentación del ADN en múltiplos de nucleosomas. Se piensa que la granzima B secretada por el CTL (y que entra a la célula diana a través de los canales de perforina) activa a la ICE (proteasa endógena) o la sustituye para desencadenar el mecanismo de esta ruta apoptósica endógena.

Pero no es el único mecanismo inductor de apoptosis por parte de los CTLs (de hecho, algunos clones de CTLs carecen de perforina y de granzimas, y sin embargo inducen muerte celular de la célula diana). Podemos encontrar otro mecanismo dependiente de la interacción entre el llamado ligando Fas del CTL y el receptor Fas de la célula diana.

* El receptor Fas (también llamado APO-1) es una proteína de membrana que pertenece a la llamada familia TNF de receptores de citoquinas.

* Por su lado, el ligando Fas del CTL es una proteína de membrana que exige homologías de secuencia con TNF, y se une al Fas.

La unión entre el ligando de Fas con el Fas de la célula infectada o enferma induce en ésta una señal que dispara la ruta endógena de apoptosis, con la consiguiente activación de la ICE y subsiguiente fragmentación del ADN.

Las vesículas del CTL pueden contener TNF-a y TNF-b (= linfoxina), que junto con el IFN-g producido por Tc o por otras células, desencadena efectos citotóxicos que tarda más tiempo que los anteriores.

En cuanto a cómo se protege el CTL de sus propios mecanismos matadores. El condroitín sulfato (proteoglucano) del CTL se puede unir a la perforina, inactivándola. Pero puede que haya otros mecanismos: por ejemplo, según la hipótesis de Peters dice que la perforina sale del granulosoma dentro de pequeñas vesículas igualmente membranosas; la membrana de estas sub-vesículas contendrían complejos TCR-CD3-CD8, que encaminarían a las pequeñas vesículas hacia la célula diana, pero no al CTL.

Citotoxicidad directa inespecífica mediada por células NK

Las células NK son un tipo de linfocitos granulares grandes que suponen un 5% de las células linfoides en sangre, y que carecen de los marcadores de linfocitos T y B. Se consideran como linfocitos “inespecíficos”, pertenecientes al sistema de inmunidad natural. El mecanismo citotóxico de las células NK es parecido al de los linfocitos citolíticos (CTL), pero a diferencia de ellos, carecen de especificidad y de memoria, y no están restringidos por el MHC clásico.

Tienen un papel importante en los primeros días de una infección virásica, al eliminar células en las que el virus se esté multiplicando. Constituyen pues un mecanismo efector celular temprano, antes de que lleguen los linfocitos Tc, y especialmente preparado frente a ciertos virus que usan la estrategia de inducir un descenso del nivel de MHC-I.

Se piensa que las NK reciben señales de dos receptores de modo que distinguen entre células sanas y enfermas. De esta manera, el receptor NKR-P1 se une a oligosacáridos de glucoproteínas de superficie de la célula enferma, procedentes de glucosilaciones anómalas. En principio, esta señal le indica a la NK que debe prepararse para matar a la célula con la que ha contactado. Para ello debe de ocurrir simultáneamente una ausencia de señal procedente de otro receptor, el Ly-49.

La actividad matadora de NK se activa por IFN-a e IFN-b (liberado por muchas células enfermas al inicio de la infección), y por IL-12 (producido por macrófagos). A su vez, la IL-12 y el TNF-a (también del macrófago) provocan que la NK secrete grandes cantidades del IFN-g, con lo que se mantienen a raya ciertos patógenos intracelulares hasta que se activen las células T. De hecho rara vez las células NK eliminan efectivamente el virus, pero lo mantienen a raya hasta que llegan las células Tc.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

Existen varios tipos de células potencialmente citotóxicas que poseen receptores para Fc de anticuerpos, y que pueden por lo tanto participar en la destrucción de células diana (enfermas) o de helmintos recubiertos en ambos casos por anticuerpos. Los acontecimientos suelen tener lugar en las siguientes fases

* Formación de inmunocomplejos (la célula enferma o el helminto se recubre de anticuerpos)

* Una célula agresora adecuada interacciona con la célula enferma o el parásito a través de los anticuerpos, que se engarzan con el receptor para Fc de la célula agresora

* Finalmente, dicha célula agresora libera por exocitosis el contenido de sus gránulos, y/o secreta productos tóxicos, que tienden a matar a la célula enferma o parásito.

De este modo, células que son propiamente del sistema inmune natural, y por lo tanto son inespecíficas, pueden llegar a destruir específicamente mediante el puente de anticuerpos. De hecho, actúan como células efectoras finales del sistema humoral específico.

1.2.5 HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO RETARDADO

La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) es una reacción inflamatoria localizada que se induce por citocinas secretadas por ciertas subpoblaciones de linfocitos Th (concretamente Th1) activados previamente por contacto con ciertos tipos de antígenos, y que se caracteriza por el reclutamiento al foco infeccioso de grandes cantidades de células inflamatorias, sobre todo e macrófagos. Se llama retardada porque, al contrario que la inmediata, tarda 2 o 3 días en manifestarse.

Fases de la hipersensibilidad de tipo retardado

En la respuesta hipersensible de tipo retardado podemos distinguir una fase inicial de sensibilización en la que se produce el contacto inicial con el estímulo antigénico, y que no presenta síntomas, y una fase efectora, dependiente de un contacto secundario con el antígeno, en la que se manifiestan tales síntomas y que es la tendente a eliminar el patógeno.

La *fase de sensibilización* dura de una a dos semanas, tiempo durante el cual los linfocitos Th se activan y expanden clonalmente tras el reconocimiento del antígeno presentado por células presentadoras. Dichas células presentadoras pueden ser:

* Células de Langerhans de la piel, que transportan el antígeno desde la epidermis hasta los ganglios linfáticos regionales, donde lo muestran a los linfocitos Th.

* Macrófagos.

* Células del endotelio vascular.

Al final de esta fase se tiene pues una población expandida de linfocitos T CD4+ de memoria, que recirculan constantemente.

La *fase efectora* ocurre en tejido extralinfoide, y es la reacción de hipersensibilidad en sentido estricto, detectándose sus síntomas a las 24 horas del contacto secundario con el antígeno que provocó la sensibilización inicial, pero alcanza su apogeo a las 48-72 horas. En esta fase sale fibrinógeno al tejido, y se convierte en fibrina, que junto con la acumulación de linfocitos T y de macrófagos hace que el tejido se hinche y se vuelva duro (esta es la base de los síntomas de induración y edema). La podemos subdividir en tres etapas: desencadenamiento, inflamación y resolución.

* En el **desencadenamiento** el linfocito T activado, ante el contacto secundario con el antígeno presentado por una APC, secreta ciertas citocinas, cuyas acciones dan paso a la reacción de inflamación.

* La **inflamación** se produce cuando las citocinas secretadas reclutan y activan a macrófagos y otras células inflamatorias hacia el sitio de infección, poniéndose en marcha una compleja serie de interacciones entre células inespecíficas del sistema inmunitario y citocinas, con amplificación de la respuesta. Todo ello va encaminado a destruir al agente patógeno intracelular.

* La **resolución** se produce porque los macrófagos activados aumentan su capacidad de eliminación del patógeno. Estos macrófagos son la principal célula efectora de la hipersensibilidad retardada, pudiendo representar el 90% de la población celular infiltrada.

Interacción entre citocinas y célula en la DTH

La relación de las distintas citocinas que actúan sobre los distintos tipos celulares, responsables de diversos aspectos de esta respuesta.

* La IL-2 del linfocito T_{dh} funciona de modo autocrino, permitiendo la expansión clonal, con lo que aumenta el número de esas células, que siguen produciendo más citocinas. Conforme avanza la respuesta, la IL-2 también ejerce un efecto paracrino, estimulando a otros clones de linfocitos T_{dh}.

* La IL-3 y el GM-CSF inducen hematopoyesis del linaje granulocito-monocito en la médula ósea. Obviamente ello conlleva que mayores cantidades de PMN y macrófagos puedan pasar al foco de infección.

* El IFN-gamma y TNF-beta de las células T, así como el TNF-alfa y la IL-1 de los macrófagos actúan sobre las células endoteliales vasculares cercanas al foco de infección, con los siguientes efectos:

- Aumento de expresión de moléculas de adhesión (ICAM, ELAM, VCAM)
- Cambios de forma, tendentes a que las células endoteliales se separen entre sí, dejando paso para la extravasación de leucocitos.

- Las células endoteliales estimuladas secretan IL-8 y otros factores quimiotácticos que atraen a monocitos circulantes (quimiocinas).

- Como consecuencia los PMN neutrófilos y los monocitos circulantes se adhieren a las células endoteliales de las vénulas postcapilares, pasan por diapédesis y entran al tejido infectado. La entrada de los monocitos da lugar a su diferenciación a macrófagos.

* Los macrófagos son atraídos y activados en el foco de infección debido a la acción de IFN-g y del factor quimiotáctico y activador de los monocitos (MCAF). Otro factor secretado por Th, llamado MIF (factor inhibidor de la migración de los macrófagos) evita que el macrófago “pase de largo” el foco infectivo, afinando su quimiotaxis.

* Por lo tanto, los macrófagos van llegando en grandes cantidades al foco infeccioso, y se van activando (sobre todo por el interferón inmune), experimentando importantes cambios:

- Aumentan su tamaño.
- Aumentan sus niveles de enzimas líticas en sus gránulos.
- Aumentan su capacidad fagocítica.
- Incrementan su efectividad matadora de microorganismos intracelulares.
- Funcionan mejor como células presentadoras de antígeno, debido a que es mayor el número de moléculas MHC de clase II en su membrana, porque secretan mayor cantidad de IL-1 y porque expresan más moléculas de adhesión como la B7 (coestimuladora), ICAM-1 y LFA-3.

El que los macrófagos actúen mejor ahora como APC supone que activan a más linfocitos T_{dh}, con los cual se cierra el ciclo, pero amplificado.

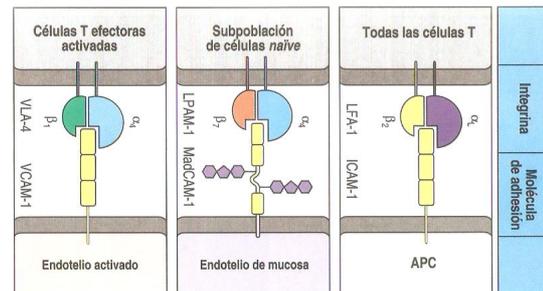


Figura 4: Moléculas de adhesión en interacciones de leucocitos. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Charles A. Janeway et al. Ed. Masson.

1.3 RESPUESTA HUMORAL

La rama humoral del sistema inmune específico está diseñada para eliminar a patógenos extracelulares y evitar la diseminación de los intracelulares aprovechando que estos últimos se transmiten de célula a célula a través de los fluidos extracelulares. Ello se consigue mediante la producción de grandes cantidades de anticuerpos específicos frente a cada agente foráneo.

1. Los anticuerpos, por sí mismos no suelen eliminar más que a ciertos virus o inactivar toxinas bacterianas.

2. En la mayor parte de los casos, la eliminación efectiva del patógeno del patógeno suele deberse a la inducción de las funciones efectoras de los anticuerpos, que depende de la porción constante de las cadenas pesadas:

a. Activación del complemento por la ruta clásica, que puede conducir a

I. Lisis del patógeno

II. Quimiotaxis de fagocitos

III. Oponización de fagocitos

b. Oponización de fagocitos por inmunocomplejos (Ag-Ac)

c. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC): el anticuerpo se une a receptores para Fc en la superficie de células NK y macrófagos.

Por lo tanto, en la respuesta humoral podemos distinguir dos grandes fases: la de inducción de la producción de anticuerpos, y la fase efectora, en la que dichos anticuerpos, directamente, o más a meno indirectamente, eliminan al patógeno. Ahora vamos a centrarnos en la producción de inmunoglobulinas circulantes ante un antígeno.

Respecto a las interacciones celulares y de las señales químicas implicadas en el desencadenamiento de la producción de anticuerpos, se puede resumir el proceso en tres apartados interconectados:

1. El linfocito Th virgen reconoce a su **péptido antigénico (procesado)** enclavado en el surco de MHC-II, en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC). Ello provoca la activación y proliferación clonal de los linfocitos Th.

2. Por otro lado (paralelamente), la célula B reconoce el **antígeno nativo** por medio de su BCR (con mlg), lo que desencadena la endocitosis y procesamiento

endosómico de dicho antígeno. Algunos de los péptidos resultantes se “exportan” y se muestran en el surco de moléculas MHC-II del propio linfocito B.

3. El linfocito Th activado interacciona ahora mediante su TCR con el complejo (epítipo-MHC-II) del linfocito B. En este contacto entre ambas células tiene lugar un intercambio de señales químicas que conduce a la activación, proliferación clonal y diferenciación de las células B en dos subclones hermanos: uno de células plasmáticas secretoras de anticuerpos, y otro de células B cebadas de memoria.

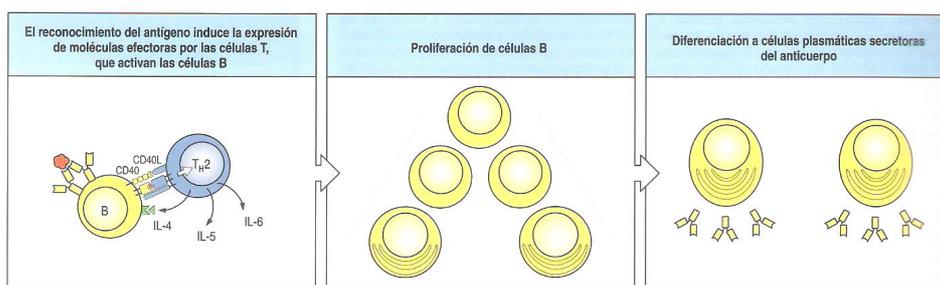


Figura 5: Las células T cooperadoras armadas estimulan la proliferación y luego la diferenciación de las células B que han unido antígeno. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de Salud y enfermedad Charles A. Janeway et al. Ed. Masson

1.3.1 RESPUESTA PRIMARIA Y RESPUESTA SECUNDARIA

Fases de la respuesta:

1. Fase lag (de retardo): es el tiempo que se tarda en la selección de un clon específico de células B y en la producción de células plasmáticas secretoras de Ac y de células B de memoria.
2. Aumento exponencial (hasta un pico máximo).
3. Meseta.
4. Declive.

En total la respuesta puede durar desde unos días a varias semanas, dependiendo de la persistencia del antígeno.

En la respuesta primaria primero se produce IgM, y luego IgG, siendo en ella la contribución global de la IgM más importante. En cambio, en la respuesta secundaria se produce mucha mayor cantidad de IgG que de IgM. Las células B de memoria quedan en reposo (G₀) durante muchos años (incluso persisten durante toda la vida).

La respuesta secundaria posee una serie de importantes diferencias cualitativas y cuantitativas con respecto a la respuesta primaria.

Diferencias cuantitativas:

- * Se inicia más rápidamente (mayor fase lag)
- * Alcanza más intensidad (100 a 1000 veces mayor)
- * Dura más tiempo, como se comprueba por la fase de meseta más prolongada y su declive más lento.

Diferencias cualitativas:

- * Ocurre cambio de clase, produciéndose preferentemente IgG, aunque también IgA e IgE.
- * Tiene lugar la maduración de afinidad por hipermutación somática y selección “darwiniana” de los linfocitos con receptores de mayor afinidad.

1.3.2 FASES DE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL

Antes de entrar en detalles de cómo se activan y proliferan y diferencian los linfocitos B hasta que producen y secretan anticuerpos, dando una idea general de proceso:

1. Un linfocito Th virgen o de memoria entra en contacto con una APC, que le presenta un péptido antigénico enclavado en su MHC-II; ello provoca la activación y proliferación clonal del linfocito Th.

2. Por otro lado, la célula B (virgen o de memoria) reconoce al antígeno nativo, pero interaccionando con otro epítipo diferente al que reconoció el Th. Acto seguido internaliza este Ag y lo procesa, presentando algunos de los péptidos resultantes en las moléculas MHC-II.

3. El linfocito Th cebado del paso #1 reconoce por su TCR a la combinación específica péptido-MHC-II en la superficie del linfocito B del paso #2, formándose el llamado conjuntado Th-B. En dicho conjugado, el linfocito coadyuvante suministra dos tipos de señales químicas al linfocito B:

- * El Th expresa en su membrana la molécula CD40L (CD154)
- * Secreta citocinas

4. Cambios en el patrón de expresión génica. Las proteínas producidas por estos genes inducidos provocan la proliferación clonal del linfocito, y finalmente la

diferenciación hasta células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria. (La célula B que no reciba estas señales del Th quedará anérgica)

En este apartado resumen se pueden ya apreciar algunas de las características clave del proceso:

- * La célula B puede funcionar como célula presentadora de antígeno (APC) para la Th.

- * El linfocito Th y el linfocito B, por medio de sus respectivos receptores específicos, reconocen **determinantes (epítomos) diferentes del mismo antígeno** o complejo antigénico original. (Cada linfocito B reconoce una parte de una proteína, o la porción lipídica o hidrocarbonada de un conjunto con proteína).

- * La inmunoglobulina de membrana (mIg) del linfocito B cumple dos papeles: como parte del complejo BCR (junto con Ig alfa/Ig beta) transmite señales al interior celular, y como receptor específico implicado en la endocitosis, para llevar al Ag nativo a la ruta endocítica para su degradación y procesamiento.

Fase 1ª: Activación y proliferación del linfocitos Th

El antígeno nativo puede viajar por sí solo a un órgano linfoide secundario, o bien puede ser transportado (y eventualmente procesado) por una célula presentadora de antígeno (APC)

- * Células de Langerhans de la piel captan el antígeno, viajan por los vasos linfáticos como células “a vela”, y al llegar al ganglio se convierten en células dendríticas interdigitantes.

- * Células dendríticas intersticiales de los tejidos.

- * Macrófagos/monocitos.

En el órgano linfoide secundario la APC presenta algún epítomo a un linfocito Th en reposo, interaccionando ambas células de la forma estudiada en el tema anterior:

- * Señal #1: unión del TCR al epítomo enclavado en MHC-II de la APC.

- * Señal #2: (coestimuladora): unión del CD28 del Th a la B7 de la APC.

- * Además, la APC secreta citoquinas como la IL-1 y la IL-6.

Todo ello provoca la activación y proliferación de Th, por el mecanismo autocrino dependiente de la IL-2 que el propio linfocito secreta. De esta forma se producen grandes cantidades de células Th, lo cual va a permitir que algunas de ellas tengan posibilidades de interactuar luego con células B que presenten el mismo epítipo enclavado en el mismo tipo MHC-II.

Fase 2ª: el linfocito B reconoce específicamente al antígeno nativo

La célula B es una magnífica presentadora de antígeno, que a diferencia del macrófago posee la capacidad de internalizar y procesar solamente al antígeno específico para el cual está preparada por su mlg. De hecho es capaz de procesar antígeno a concentraciones de 100 a 10.000 veces menores de las requeridas por el macrófago.

Como sabemos, la célula B en reposo posee moléculas mlgM y mlgD asociadas con cadenas Ig alfa e Ig beta, constituyendo el complejo receptor específico BCR.

Aunque la célula B no es una célula fagocítica, puede internalizar antígenos tan grandes como del tamaño de ciertos virus. Ello se produce por endocitosis mediada por receptor (siendo el receptor el BCR). El antígeno entra a la ruta endocítica, donde se degrada hasta péptidos, algunos de los cuales pueden ser colocados en el surco de sus moléculas MHC-II. (Mientras tanto, la célula B está renovando continuamente sus receptores BCR, lo que le permite seguir captando específicamente más moléculas o partículas antigénicas).

Pero al mismo tiempo, el hecho de que se esté produciendo unión del antígeno con BCR (con entrecruzamiento de dos complejos BCR por una misma molécula antigénica) supone el inicio de una ruta de transducción intracelular de señal: las colas citoplásmicas de las cadenas Ig alfa/Ig beta inician una cascada de fosforilaciones y desfosforilaciones, donde están implicadas varias proteínas, tirosinquininas (PTK) como Lyn, Fyn y Blk. Al cabo de unos 30 segundos se han fosforilado muchas proteínas celulares (por rutas en buena parte aún desconocidas), que finalmente conducen a la activación de la fosfolipasa C (PLC). A partir de aquí se activan las rutas ya estudiadas del inositoltrifosfato (IP3) y del diacilglicerol (DAG); la primera conduce a la calcineurina/calmodulina, y la segunda a la activación de la proteínquinasa C (PKC). Ambas colaboran en la activación de una serie de genes tempranos que codifican factores de transcripción (como el AP1, c-Myc, etc.). En la fase siguiente, los productos de estos genes van a tener un papel destacado.

Fase 3ª: formación del conjugado Th-B e intercambio de señales

La célula Th cebada específica reconoce ahora, por medio de su TCR, la configuración peculiar del péptido específico enclavado en el MHC-II, en la superficie del linfocito B; es decir, el linfocito B está actuando como célula presentadora para el Th.

Tras este contacto inicial se forma el conjugado Th-B en el que ambas células dejan entre sí un estrecho espacio intercelular. En esta fase se producen importantes cambios en el linfocito Th:

- * Reorganiza el aparato de Golgi y el centro organizador microtubular, de modo que aparecen microtúbulos del citoesqueleto orientados hacia el lado que mira a la célula B. Ambas características tienen que ver con el hecho de que se van a secretar citocinas en esa dirección.

- * Las moléculas de membrana de la célula T se concentran en la zona de contacto intercelular:

TCR + CD3+ CD4 van a participar en contactos con MHC-II + péptido de B

LFA-1 hará contacto con ICAM-1 de B

CD28 se ligará con la B7 del linfocito B (pero esto no es imprescindible si el linfocito Th está ya “armado”)

- * Esta reorientación implicará una mayor avidéz en la unión entre a

- * Ambas células, permitiendo que este contacto dure más tiempo, lo cual facilitará las señales que necesita el linfocito B: CD40L y citocinas.

Fase 4ª: efecto de las señales del linfocitos Th sobre la célula B

Los dos tipos de señales del linfocito Th (CD40L y citocinas) van a provocar que el linfocito B sufra una serie de notables cambios. Algunas de estas moléculas químicas provocan que el linfocito B salga de reposo y entre a ciclo celular (señales de competencia); otras moléculas hacen que el linfocito B progrese a lo largo del ciclo celular (señales de progresión) y/o que se diferencie.

Las moléculas CD40L que el linfocito Th expresa en su superficie se unen a las de CD40 del linfocito B (que ya estaban preformadas). Esto provoca una señal para que el linfocito B sintetice y ensamble en membrana receptores para diversas citocinas (lo cual ocurre a las 12 horas del contacto inicial del Ag con la mlg). Entonces, el linfocito B, que hasta este momento estaba en reposo (G0, puede entrar por fin en el

ciclo celular (G1). Estamos pues, ante una señal de **competencia**, que participa en la **activación** de linfocito B.

Las citocinas secretadas direccionalmente por el linfocito Th se concentran en bolsas distribuidas en la zona de estrecho contacto intercelular. Cada citocina va a unirse a su receptor correspondiente situado en la superficie de la célula B, provocando una serie de respuestas en dicha célula:

* La IL-4 (junto con la IL-1 secretada por macrófagos) actúan como señales de competencia. (favorecen la transición G0----G1).

* Posteriormente, la misma IL-4 sirve ya como **señal de progresión** (que favorece el avance del ciclo celular: G1----S----M), con lo que empieza la **proliferación clonal**. Otras citocinas que colaboran en la proliferación son la IL-2 y la IL-5 (esta última en ratón, no en humanos).

* La **diferenciación** requiere IL-6, así como de nuevo IL-4, IL-5, IL-10 e IFN-gamma. En esta diferenciación se producen dos subclones: uno de células plasmáticas secretoras de anticuerpos, y otro de células B memoria.

Esta respuesta de los linfocitos B frente a antígenos timo-dependientes se caracteriza por:

- * Tener memoria inmunológica,
- * Poseer maduración de la afinidad conforme pasa el tiempo,
- * Experimentar cambio de isotipo.

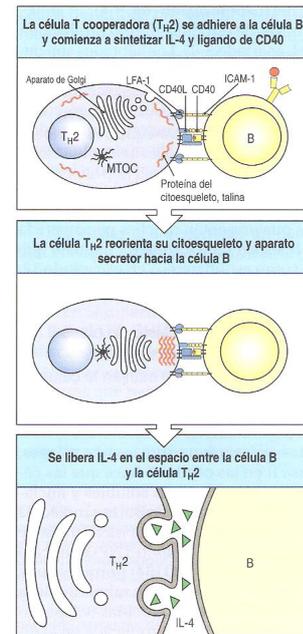


Figura 6: Las células T efectoras y sus dianas están estrechamente unidas. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud enfermedad. Charles A. Janeway Jr et. Ed. Masson

RESPUESTA PRIMARIA

A) *Interacciones iniciales: tienen lugar en la paracorteza.*

* Las células dendríticas interdigitales, con sus largos procesos de membrana, interaccionan simultáneamente cada una con unos 200 linfocitos Th, presentándoles péptidos procesados en el surco MHC-II, con lo que se provoca una gran activación y proliferación clonal de esos linfocitos.

* Por su parte, los linfocitos B en reposo internalizan antígeno específico, y lo procesan.

* Las células Th activadas interactúan con las células B, induciendo en éstas las primeras fases de la activación.

* Algunas de estas células B de la paracorteza siguen su activación, proliferación y diferenciación hasta células plasmáticas secretoras de IgM e IgG, con lo que se suministra una primera descarga de anticuerpos circulantes. Luego migran a la médula ósea.

* Pero otras células B se quedan a mitad de su activación, y emigran a la corteza, a los folículos primarios, donde van a seguir una ruta especial que da origen a los centros germinales de los folículos secundarios.

B)Eventos en el folículo secundario.

El folículo secundario suministra un microambiente especial en el que las interacciones entre células B y células dendríticas foliculares van a conducir a la generación de grandes cantidades de células B y células plasmáticas son anticuerpos de alta afinidad (por maduración de afinidad tras hipermutación somática).

* Cuando la célula B “a medio activar” (procedente de la paracorteza) entra en el folículo primario comienza a dividirse activamente: estas células B en rápida proliferación se denominan **centroblastos**, y son ellas las que dan lugar al centro germinal del folículo, que ahora se llama folículos secundario. Los centroblastos se caracterizan por su rápida división (una vez cada 6 horas) y porque carecen de inmunoglobulinas de membrana (mlg).

* La **zona basal oscura** del centro germinal está llena de centroblastos, todos ellos descendientes de un solo linfocito B (o unos pocos). Es decir, se están produciendo grandes cantidades de centroblastos todos descendientes de una célula B, por lo tanto tienen la misma especificidad antigénica que el linfocito B “fundador” que originalmente internalizó el Ag que ha dado origen a la respuesta. Es en esta fase de centroblastos donde ocurre la **hipermutación somática** de las porciones variables de los genes reordenados de cadenas pesadas y ligeras.

* Al cabo de unos 4 días los centroblastos dan origen a los **centrocitos**, células más pequeñas que no se dividen, y que vuelven a tener mlg en sus membranas. Estos centrocitos ocupan la **zona basal clara** del centro germinal. Debido a la previa hipermutación somática, cada centrocito, aunque miembro del mismo clon, tendrá una

variante aleatoria distinta de la inmunoglobulina original. Lógicamente, dentro de esta población habrá centrocitos con mlg de menor afinidad.

* Es ahora cuando tiene lugar el proceso de **selección darwiniana** de esa población de centrocitos: aquellos que tengan mlg de mayor afinidad serán seleccionados para sobrevivir en base a su capacidad de interactuar con mayor afinidad con el antígeno nativo dispuesto en la superficie de las células dendríticas foliculares.

Parece que las dendríticas foliculares retienen antígeno nativo (sólo o formando parte de inmunocomplejos) en las “perlas” (engrosamientos) de sus largos procesos de membrana. Ello lo hace a través de sus moléculas CD23. Ello permite que varios centrocitos interactúen simultáneamente con una misma célula dendrítica.

En principio los centrocitos están programados para morir por apoptosis al cabo de unos pocos días, a menos que sean rescatados por el hecho de que su mlg interactúe con el antígeno retenido en la superficie de las células dendríticas foliculares.

Los centrocitos con receptores (mlg) de baja afinidad tienen que competir en desventaja con sus “hermanos” de mayor afinidad e incluso con anticuerpos libres de alta afinidad: estos centrocitos con mlg de baja afinidad pueden encontrarse con el hecho de que los determinantes del antígeno estén ya ocupados por receptores de centrocitos de alta afinidad o por anticuerpos.

De hecho, conforme pasa el tiempo, la situación es cada vez peor para estos centrocitos: en una respuesta primaria, el nivel de Ac circulantes al principio es bajo, pero conforme pasan los días sube esta concentración, de modo que cada vez hay más anticuerpos que se pueden unir al antígeno desplegado en las membranas de las células dendríticas. Esto significa que el “listón” para que un centrocito se una al antígeno se pone cada vez más alto: sólo lo lograrán los que en la “lotería” de la hipermutación somática hayan resultado “agraciados” con mlg de mayor afinidad.

El resultado es que todo centrocito que al cabo de unos días no se haya unido por su mlg al Ag en la superficie de la célula dendrítica folicular, al no recibir la señal “rescatadora”, muere por apoptosis, y sus restos son destruidos por los macrófagos de cuerpos tingibles. Este es el destino de la mayoría de los centrocitos (90%).

* Los centrocitos que tienen mlg de alta afinidad que logran unirse a la célula dendrítica tienen una señal que induce en ellos la expresión del gen bcl-2, y esto es lo que les salva de la apoptosis. Parece que en este rescate también interviene la unión

del CD23 de la célula dendrítica folicular con el CD21 del complejo correceptor del centrocito.

* Los centrocitos con mlg de baja afinidad, al no unirse con la célula dendrítica, sigue programación a la muerte, ya que al no inducirse el gen bcl-2 no producen la señal que interrumpa dicha programación letal.

* Tras la selección darwiniana, los centrocitos Bcl-2+ se diferencian en la **zona apical clara** en dos subclones celulares: células B memoria y plasmablastos.

* Los **plasmablastos** abandonan el centro germinal y **pasan a médula**, donde terminan su diferenciación hasta **células plasmáticas** secretoras de anticuerpos. Las células plasmáticas carecen de inmunoglobulinas de membrana, y son células a término, que mueren a las dos semanas (el hecho de que tengan una vida limitada es un factor que contribuye a que la respuesta inmune esté autolimitada). Secretan grandes cantidades de anticuerpos que tienen la misma especificidad que el centrocito correspondiente del que proceden. Los anticuerpos sale por los linfáticos eferentes y entran luego en circulación sanguínea, de donde son distribuidos a todo el organismo. Se cree igualmente que la diferenciación a células plasmáticas requiere la interacción del CD23 de la célula dendrítica folicular con el correceptor de la célula B (formado por CD19, CD21 y CD81).

* Las **células B memoria** son células en reposo (G0), pero no son iguales que las B vírgenes: expresan más isótopos en sus membranas (mlgG, mlgM, mlgA, mlgE), que además son de mayor afinidad que la mlg original; esto implica que ante una segunda entrada del Ag se van a activar a menores dosis, y la respuesta secundaria será más rápida. Algunas de ellas se quedan en el folículo, formando parte del manto que rodea al centro germinal; otras abandonan el ganglio por el único linfático eferente, y recirculan. Poseen una gran esperanza de vida (incluso más de 40 años), aunque se desconoce la base de esta notable longevidad (existen indicios de que la diferenciación a célula de memoria también necesita nuevos contactos entre el CD40 del linfocito B y el CD40L de la célula Th).

RESPUESTA SECUNDARIA

La respuesta secundaria tiene lugar *in vivo* de una forma parecida a lo que acabamos de ver, pero existen algunas diferencias que pasamos a comentar:

* Cuando entra al antígeno por 2ª vez (o ulterior) parte de las moléculas pueden unirse a anticuerpos persistentes procedentes de a respuesta primaria, de modo que se forman complejos Ag-Ac.

* Cuando los inmunocomplejos entran a ganglio, se unen a las células dendríticas foliculares. Estas células “empaquetan” parte de los complejos Ag-Ac en vesículas membranosas denominadas **iccosomas**, que se van desprendiendo por gemación a partir de los engrosamientos (“perlas”) de los largos procesos de membrana.

* Las células B memoria generadas durante la respuesta primaria que tengan mlg de alta afinidad compiten eficazmente con los anticuerpos circulantes para unirse con el Ag que forma parte de los inmunocomplejos de los iccosomas: se unen a estos iccosomas, los engullen enteros, procesan el antígeno y se lo presentan (en surco de MHC-II) a linfocitos Th específicos. Se forma el conjugado Th-B, con lo que la célula B se activa y prolifera (como centroblastos) en el centro germinal, hasta que al 4º o 5º día se diferencia a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.

Al igual que en la respuesta primaria, la proliferación de centroblastos va acompañada de hipermutación somática seguida de selección darwiniana sobre los centrocitos resultantes en base a su capacidad de unión al antígeno atrapado en las células dendríticas.

Como se puede ver, el centro germinal durante la respuesta secundaria difiere en dos aspectos importantes del de la respuesta primaria:

1. La previa disponibilidad de anticuerpo circulante incrementa la eficacia de las células dendríticas foliculares para atrapar antígeno, lo cual supone una amplificación de la el señal a las células B.

2. El anticuerpo preexistente compite con los centrocitos para unirse con el antígeno en la superficie de las células dendrítica. Ello asegura que en la respuesta secundaria sólo van a contribuir a la producción de anticuerpos células plasmáticas procedentes de células B dotadas de receptores de mayor afinidad que los de la respuesta primaria. Conforme avanza la respuesta, aumenta la concentración de anticuerpos al tiempo que disminuye la del antígeno, por lo que se seleccionan

centrocitos con afinidades cada vez más altas, capaces de funcionar con concentraciones de antígeno cada vez más bajas.

Algunas aplicaciones

En las vacunaciones se suele recurrir a la administración de varias dosis del antígeno inmunizantes. Con ello se logra no sólo una mejor respuesta secundaria por el hecho de aumentar las células B memoria, sino que se provoca que las célula B memoria se diferencien a plasmáticas secretoras de anticuerpos de alta afinidad.

Si esta estrategia se aplica en inmunizaciones experimentales de animales de laboratorio, de ellos se pueden extraer antisueros de gran avidéz, que se usan en ensayos *in vitro* para pruebas que requieren gran sensibilida

1.4 LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune abarca el conjunto de procesos que desarrollan las células del sistema inmune cuando penetra una sustancia inmunogénica en el organismo invadido. En la elaboración de esta respuesta hay una serie de fases:

- * Reconocimiento del antígeno extraño.
- * Identificación, activación y expansión de los escasos linfocitos específicos para dicho antígeno formando clones.
- * Diferenciación: desarrollo del fenotipo efector de las células del Sistema Inmune.
- * Desarrollo de la respuesta: acción de las células, o sus productos (anticuerpos), sobre el antígeno.

Clásicamente se distinguen dos grandes tipos de respuesta efectora:

- RESPUESTA HUMORAL, desarrollada por los linfocitos B y coordinada por los Th2
- RESPUESTA CELULAR, desarrollada, fundamentalmente, por los linfocitos Th1; puede ser heterogénea.

1.4.1. RESPUESTA DE ANTICUERPOS PRIMARIA Y SECUNDARIA

La respuesta de anticuerpos (AC) juega un gran papel en la defensa frente a bacterias, antígenos solubles (toxinas), virus, protozoos y gusanos (IgE).

La **respuesta primaria** ocurre cuando es la primera vez que el sistema inmune entra en contacto con el antígeno en cuestión. Se caracteriza porque después de la exposición al antígeno hay:

- * Fase de latencia de 5-7 días. En esta fase todavía no aparecen anticuerpos
- * Fase de incremento. La concentración de anticuerpos séricos aumenta en progresión geométrica hasta alcanzar la:
- * Fase de meseta. La secreción se mantiene durante unos días (3-5) y luego desciende lenta, pero progresivamente, en los siguientes 10-15 días.

En la respuesta primaria, los anticuerpos son siempre de la clase IgM y con baja afinidad por el antígeno.

La **respuesta secundaria** tiene lugar cuando el sistema inmune encuentra a un antígeno por segunda vez o en subsiguientes ocasiones. Se distingue de la primaria en:

- a) Mayor rapidez en instaurarse, es decir presenta una fase de latencia más corta.
- b) Los anticuerpos duran más tiempo en el suero (fase de meseta más prolongada).
- c) El título de anticuerpos alcanza un valor mucho más alto (mayor potencia)
- d) Cambio de clase: Los anticuerpos, en vez de IgM son IgG, IgA o IgE.
- e) La afinidad de los anticuerpos por el antígeno es mayor.

Las características de mayor potencia y rapidez de la respuesta secundaria se deben a:

* Un mayor número de linfocitos B y T, seleccionados para el Ag, que el la respuesta primaria (células de memoria). Las estrategias de vacunación se basan en generar linfocitos de memoria por exposición a antígenos atemperados, de modo que, en caso de infección por el patógeno, se pueda establecer rápidamente una respuesta secundaria.

* Las células B memoria generadas han experimentado hipermutaciones somáticas puntuales en la zona de unión al antígeno que les confieren mayor afinidad por éste.

ANTIGENOS T-DEPENDIENTES

La mayoría de los linfocitos B específicos necesitan la ayuda de linfocitos T colaboradores para activarse, proliferar y diferenciarse hacia células secretoras de anticuerpos. Estos linfocitos B productores de la respuesta de anticuerpos T-dependientes se localizan en los folículos linfoides de los ganglios y en médula ósea.

La cooperación T-B se establece merced al papel de los linfocitos B como células presentadoras de Ag. Los linfocitos B, específicos para un epítipo, tras reconocer el Ag con su IG de superficie, endocitan todo el antígeno, lo procesa (degradación y desnaturalización) y pasan a expresar péptidos del antígeno en su membrana unidos a las moléculas CPH clase II.

Los linfocitos Th2, con un RCT capaz de reconocer el antígeno único al CPH de clase II, se unen a él y se activan, transmitiendo a su vez señales de activación al linfocito B:

- * IL-4 promueve la proliferación de los linfocitos B activados, así como la diferenciación de los linfocitos B que están proliferando.

- * IL-6 actúa promoviendo la diferenciación.

- * Interacción CD40 (célula B) con CD40L (CD154) de la célula T helper.

Como resultado final de la respuesta T dependiente se genera un gran número de células secretoras de anticuerpos específicos que permitirán la respuesta secundaria tras subsiguientes contactos con el mismo antígeno.

ANTÍGENOS T-INDEPENDIENTES

Hay un pequeño número de sustancias, conocidas como antígenos T-independientes, que son capaces de inducir la respuesta de anticuerpos sin necesidad de la cooperación de los linfocitos T, entre ellos están.

- * Lipopolisacárido de la endotoxina bacteriana de Gram (-).

- * Flagelina polimérica microbiana.

- * Polisacáridos: dextrano, levano, etc.

- * Polímeros de D-aminoácidos.

Se caracterizan por ser estructuras poliméricas en las que los determinantes antigénicos que repiten muchas veces y por ser resistentes a la degradación metabólica. Es posible incrementar la inmunogenicidad de los antígenos polisacáridos conjugándose con un carrier proteico de modo que se consiga una respuesta T-dependiente, esta estrategia es la que siguen las nuevas vacunas contra los meningococos. Frente a estos antígenos, la respuesta siempre tiene características de respuesta primaria, aunque se hayan tenido contactos previos con el antígeno: se producen sólo anticuerpos IgM y no existe memoria inmune. La mayor parte de los linfocitos B productores de anticuerpos contra antígenos T independientes se encuentran en el bazo, tras una esplenectomía se producen respuestas deficientes frente a ese tipo de antígenos.

1.4.2 RESPUESTA DE LAS CÉLULAS T. CITOTOXICIDAD

Este tipo de respuestas son esenciales en la defensa contra virus y en la eliminación de otros microorganismos intracelulares: candida, pneumocystis...

En la respuesta de citotoxicidad específica, los linfocitos T juegan un papel fundamental como células cooperadoras (Th1), la función cooperadora depende, en su mayor parte, de la acción de las interleukinas (IL-2, INF- gamma, etc.) que actúan sobre las células efectoras y sobre los macrófagos, dando lugar a las reacciones de hipersensibilidad retardada

En cuanto a *la citotoxicidad celular restringida por las moléculas CPH de clase I*, los linfocitos T citotóxicos reconocen al antígeno en asociación con las moléculas CPH de clase I en la membrana celular de otras células y, una vez activadas, lisan dichas células (células diana).

El principal papel biológico de los linfocitos citotóxicos es intervenir en la eliminación de las células infectadas por virus y células no infectadas, pero que son detectadas como extrañas, tales como las tumorales o las de los órganos trasplantados. La mayor parte de los linfocitos T citotóxicos son CD8+, pero también existe cierta proporción de linfocitos T CD4+ citotóxicos con especificidad restringida a moléculas CPH de clase II.

Respecto a la *generación de linfocitos T citotóxicos*, al igual que la respuesta de anticuerpos obedece a los siguientes principios:

- * Selección por el Ag de los escasos linfocitos específicos existentes antes del estímulo antigénico.

- * Amplificación clonal de los linfocitos seleccionados mediante un proceso de proliferación selectiva. El número incrementado de linfocitos T CD8+ específicos garantiza que la respuesta secundaria sea más potente y rápida.

La *respuesta citotóxica*, se desarrolla en tres etapas:

- * Reconocimiento del antígeno: Los linfocitos T CD8 citotóxicos, reconocen al Ag unido a moléculas CPH tipo I propias o bien reconocen exclusivamente moléculas CPH de clase I presentes en células alogénicas.

- * Activación. Se activan y expresan receptores de IL-2. Para que puedan proliferan y manifestar su función citolítica, requieren que otras células los estimulen con IL-2 (suelen ser linfocitos Th1).

* Destrucción de las células diana. Como respuesta a la IL-2, los linfocitos citotóxicos proliferan y se activan de modo que, cuando entran en contacto con las células diana que expresan el antígeno, las lisan. Una vez han destruido la célula, pueden seguir ejerciendo su efecto citotóxico sobre otras ya que la acción lítica es específica contra la diana y no existe daño contra la propia célula efectora de la respuesta.

La actividad citotóxica K (Killer) requiere la unión de un anticuerpo IgG a la célula diana. La fijación del anticuerpo sobre las células es reconocida por el receptor para la Fc de la IgG de la célula LGL.

1.5 CITOKINAS. INTERLEUKINA-2

Las citokinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones complejas entre células de linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas.

Son funciones muy variadas, pero se pueden clasificar en unas pocas categorías:

- * Diferenciación y maduración de células del sistema inmunitario.
- * Comunicación entre células del sistema inmunitario.
- * En algunos casos, ejercen funciones efectoras directas.

En el pasado reciente hubo un cierto galimatías con la cuestión de su denominación. Así, muchas de las primeras citokinas se descubrieron como señalizadoras entre leucocitos, por lo que se denominaron interleukinas; otras eran secretadas por monocitos/macrófagos, por lo que se llamaron monokinas. Sin embargo, muchas de esas sustancias son producidas por otros tipos celulares, por lo que se desaconseja el uso de esas denominaciones, para agruparlas a todas bajo el concepto de citokinas. Las quimiokinas (o quimiocinas) son un tipo de citokinas de pequeño tamaño, con papeles en la respuesta inflamatoria y la quimiotaxis de fagocitos.

PROPIEDADES GENERALES DE LAS CITOKINAS

Las citokinas son un grupo de proteínas secretadas de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa), producidas durante las respuestas inmunes natural y específica. Se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica.

* Las citokinas son producidas por múltiples tipos celulares, principalmente del sistema inmune. Dentro del sistema inmune natural, los macrófagos son de las células

más productoras de citokinas, mientras que en el sistema específico lo son las células T colaboradoras.

* La producción de las citokinas suele ser breve (transitoria), limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo (es decir, el agente extraño). En muchos casos ello se debe a que los correspondientes ARNm tienen una corta vida media, que a su vez depende de que las zonas 3' no traducibles son ricas en A y U.

* Considerando las diversas citokinas, éstas pueden exhibir una o varias de las siguientes cualidades:

- Pleiotropía (múltiples efectos al actuar sobre diferentes células).
- Redundancia (varias citokinas pueden ejercer el mismo efecto).
- Sinergismo (dos o más citokinas producen un efecto que se potencia mutuamente).

- Antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos).

* Las citokinas ejercen su acción al unirse a receptores específicos para cada citokina en la superficie de la célula en la que ejercen el efecto. La afinidad de cada receptor hacia su citokina correspondiente suele ser bastante alta, del orden de lo femtomolar (10^{-15} M) a lo picomolar (10^{-12} M).

* Utilizando a analogía de lo que ocurre con las hormonas del sistema endocrino, la acción de las citokinas se puede clasificar en:

- De tipo autocrino.
- De tipo paracrino.
- (en pocas ocasiones) de tipo endocrino.

Las citokinas “controlan” el sistema inmune de varias maneras, que podemos agrupar de la siguiente manera:

* Regulando (activando o inhibiendo) la activación, proliferación y diferenciación de varios tipos de células;

* Regulando la secreción de anticuerpos y de otras citokinas.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS CITOKINAS

Las citokinas son proteínas o glucoproteínas de menos de 30 kDa. Muchas de ellas pertenecen a la llamada familia de las hematopoyetinas, y tienen estructuras terciarias parecidas: una configuración a base de un conjunto de cuatro hélices alfa, con poca estructura en lámina beta.

Generalmente actúan como mensajeros intercelulares que suelen intervenir en la maduración y amplificación de la respuesta inmune, provocando múltiples actividades biológicas una vez que se unen a los receptores específicos de las células diana adecuadas.

Aunque existen muchos tipos de células productoras de citokinas, los más importantes son los linfocitos Th y los macrófagos, ya que sus citokinas son esenciales para que se produzca la respuesta inmune una vez que se activan las células T y B por el contacto con las correspondientes células presentadoras de antígeno.

Principales tipos de respuesta mediatizados por la acción de las citokinas

1. Activación de los mecanismos de inmunidad natural:
 - a. Activación de los macrófagos y otros fagocitos
 - b. Activación de las células NK
 - c. Activación de los eosinófilos.
 - d. Inducción de las proteínas de fase aguda en el hígado
2. Activación y proliferación de células B, hasta su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.
3. Intervención en la respuesta celular específica
4. Intervención en la reacción de inflamación, tanto aguda como crónica.
5. Control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea
6. Inducción de la curación de las heridas.

Hay una aparente paradoja de las citokinas que debemos explicar: ¿Por qué la citokinas, que son inespecíficas respecto al antígeno, pueden ejercer acciones de modo específico? Varios mecanismos:

* **Regulación muy fina de los receptores de cada citokina:** los receptores celulares indispensables para que una citokina ejerza su papel sólo se expresan en tipos celulares concretos una vez que éstos han interactuado con el antígeno.

* **Requerimientos de contactos estrechos célula a célula:** la citokina sólo alcanza concentraciones adecuadas para actuar en el estrecho espacio que queda entre dos células interactuantes; recordar por ejemplo las “bolsas” que se forman en el conjugado Th-B, donde se alcanzan mejor esos niveles de citokinas.

* **Corta vida media de las citoquinas en sangre y fluídos:** esto asegura que sólo van a actuar en un estrecho margen de tiempo, en las cercanías de la zona donde se produjeron.

RECEPTORES DE CITOKINAS

Estructura general de las familias de receptores de citokinas

Hay diversos tipos de receptores de membrana para citokinas, pero se pueden agrupar en cinco familias:

* Familia de receptores de citokinas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que poseen varios dominios extracelulares de tipo Ig. Como ejemplo, el receptor específico para la IL-1.

* Familia de clase I de receptores de citokinas (=familia de receptores de hematopoyetinas).

* Familia de clase II de receptores de citokinas (=familia de receptores de interferones). Ejemplos de ligandos son los interferones in inmunes (IFN-alfa y beta) Y el IFN-gamma.

* Familia de receptores de TNF: sus miembros se caracterizan por un dominio extracelular rico en cisteínas: ejemplos de ligandos: TNF-alfa, TNF-beta, CD40.

* Familia de receptores de quimiokinas: son proteínas integrales de membrana, con 7 hélices alfa inmersas en la bicapa lipídica. Interaccionan, por el lado que da al citoplasma con proteínas de señalización trimérica que unen GTP. Ejemplos de quimiokinas que se unen a miembros de esta familia: IL-8.

La mayor parte de los receptores de citokinas del sistema inmune pertenecen a la familia de clase I (de receptores de hematopoyetinas). Todos sus miembros tienen en común poseer una proteína anclada a membrana, con un dominio extracelular en el que hay al menos un motivo característico llamado CCCC (cuatro cisteínas cercanas en posiciones equivalentes) y el llamado motivo WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser).

Adicionalmente algunos miembros poseen dominios de tipo Ig y/o dominios de tipo fibronectina. Tras su porción transmembrana se encuentra una larga cola citoplásmica con ciertas tirosinas susceptibles de fosforilación.

La mayor parte de los receptores de clase I poseen dos proteínas de membrana.

* Cadena alfa, que es la subunidad específica de la citokina, sin capacidad de enviar señales al citoplasma.

* Cadena beta, una subunidad transdutora de señal, que a menudo no es específica de citokina, sino que es compartida por receptores de otras citokinas. Esta cadena beta es del tipo que hemos descrito más arriba (motivos CCCC y WSXWS)

La subunidad trasdutora de señal se necesita para formar el receptor de alta afinidad, y para transducir la señal al interior. Ello se logra porque tras la unión, se fosforilan ciertas tirosinas de la larga cola citoplásmica de la cadena trasdutora de señal.

La subfamilia de receptores a la que pertenece el receptor de IL-2, objetivo de nuestro estudio, (el llamado IL2-R) consta de tres subunidades:

* Cadena alfa específica de cada citokina.

* Dos subunidades (cadena beta y cadena común gamma) transdutoras de señal.

Esta versión trimérica de IL-2R es la que une IL-2 con mayor afinidad, pero en realidad, el receptor para IL-2 no siempre aparece en esta forma, sino que existe una forma monomérica (IL-2R alfa) de baja afinidad, sin cadenas transdutoras, y por lo tanto, incapaz de reenviar la señal, y una forma de afinidad intermedia (IL-2Rbeta-gamma).

Transducción de señal

Recientemente se han producido avances importantes en el desentrañamiento de la ruta que conduce desde la unión de la citokina con el receptor de la célula diana hasta la activación de la transcripción de los genes cuyos productos son los responsables de los efectos de dichas citokinas. He aquí un modelo general que se puede aplicar a muchos receptores de las clases I y II.

1. La citokina provoca la dimerización de las dos subunidades del receptor (cadenas alfa y beta), lo que coloca cercanas a sus respectivas colas citoplásmicas.

2. Una serie de proteín-quinazas de la familia de JAK (quinazas Jano) se unen a las colas agrupadas de las subunidades del receptor, con lo que esas kinazas se activan.

3. Las JAK se autofosforilan.

4. Las JAK fosforilan a su vez determinadas tirosinas de las colas del receptor, transductor.

5. Entonces proteínas de otra familia, llamada STAT (iniciales inglesas de transductoras de señal y activadores de transcripción) se unen a algunas de las tirosinas fosforiladas de las colas del receptor, quedando cerca de las JAK.

6. Las JAK fosforilan a las STAT unidas a las colas del receptor.

7. En cambio tienden a formar dímeros entre sí. (Las tirosinas fosforiladas que han quedado libres en las colas del receptor sirven para unir nuevos monómeros de STATs)

8. Los dímeros de STAT fosforilados emigran al núcleo de la célula, donde actúan ahora como activadores de la transcripción de ciertos genes, al unirse a secuencias especiales en la parte 5' respecto de las respectivamente porciones codificadoras.

ANTAGONISTAS DE CITOKINAS

La actividad biológica de las citokinas está reguladas fisiológicamente por dos tipos de antagonistas:

* Los que provocan el bloqueo del receptor al unirse a éste.

* Los que inhiben la acción de la citokina al unirse a ésta.

Como ejemplo de **bloqueador de receptor** tenemos el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), que bloquea la unión de IL-1 alfa o IL-1 beta. Desempeña un papel en la regulación de la intensidad de la respuesta inflamatoria. En la actualidad se está investigando su potencial clínico en el tratamiento de enfermedades que cursan con inflamación crónica.

Los **inhibidores de citokinas** suelen ser versiones solubles de los respectivos receptores (y se suelen denominar anteponiendo una "s" al nombre del receptor): la rotura enzimática de la porción extracelular libera un fragmento soluble que retiene su

capacidad de unirse a la citokina. Existen ejemplos de versiones solubles de los receptores IL-2R, IL-4R, IL-7R, IFN-gamma R, TNF-alfa R, TNF-beta R.

El mejor caracterizado es el sIL-2R (versión soluble del receptor de la interleuquina-2), que se libera durante la activación crónica de los linfocitos T, y que corresponde a los 192 aminoácidos N-terminales de la subunidad alfa. Este sIL-2R se puede unir a la IL-2, impidiendo su interacción con el auténtico receptor de membrana, con lo que esto supone un control sobre el exceso de activación de los linfocitos T. Este inhibidor se usa de hecho en clínica como un marcador de la existencia de activación crónica.

CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA SECRECIÓN DE CITOKINAS POR PARTE DE LOS LINFOCITOS Th1 Y Th2

Las células Th1 producen IL-2, IFN-gamma y TNF- beta. Son responsables de funciones de inmunidad celular (activación de linfocitos Tc e hipersensibilidad de tipo retardado), destinadas a responder a parásitos intracelulares (virus, protozoos, algunas bacterias).

Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Actúan como colaboradoras en la activación de las células B, y son más apropiadas para responder a bacterias extracelulares y helmintos. También están implicadas en reacciones alérgicas (ya que la IL-4 activa la producción de IgE y la IL-5 activa a los eosinófilos).

En los años recientes está cada vez más claro que el resultado de la respuesta inmune depende en buena medida de los niveles relativos de células Th1 y Th2: en una respuesta a patógenos intracelulares existe un aumento de citoquinas de Th1, mientras que en respuestas alérgicas y ante helmintos es superior el nivel de las de Th2.

Un punto importante en todo esto es la existencia de una **regulación cruzada entre Th1 y Th2:**

* El IFN-gamma secretado por las Th1 inhibe la proliferación de la Th2

* Por su lado, la IL-10 secretada por las Th2 inhibe la secreción de IL-2 e IFN-gamma por parte de las Th1. Esta inhibición en realidad no es directa: la IL-10 produce un descenso marcado de la cantidad de MHC-II de las células presentadoras de antígeno, que por lo tanto ya no pueden ejercer bien su papel de activar a las Th1.

Además, las Th2 inhiben por sus citokinas la producción en macrófagos del óxido nítrico (NO) y otros bactericidas, así como la secreción por estos macrófagos de IL-1, IL-6, IL-8 y otras citokinas.

Este fenómeno de regulación negativa cruzada explica las ya antiguas observaciones de que existe una relación inversa entre la producción de anticuerpos y la hipersensibilidad de tipo retardado.

Obsérvese que los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos también producen citokinas (como la IL-12, descubierta hace relativamente poco tiempo) que regulan a su vez funciones inmunes efectoras. La IL-12 se produce en macrófagos activados en respuesta a infecciones bacterianas o de protozoos. Esta citokina provoca la proliferación de células NK y Th1, que aumentan la producción de IFN-gamma. Este interferón inmune ayuda en la mayor activación de macrófagos. De esta forma se cierra este circuito de retroregulación positiva entre macrófagos y Th1, destinado a potenciar funciones efectoras de la rama celular de la inmunidad.

Por otro lado, los macrófagos se ven inhibidos por IL-4 e IL-10 secretadas por los Th2 (de nuevo una manifestación de la inhibición cruzada entre la rama especializada en la respuesta humoral y la centrada en la respuesta celular ante parásitos intracelulares).

Otro aspecto que va quedando claro igualmente es que la predominancia de una y otra de las dos subpoblaciones de linfocitos Th depende a su vez del microambiente de citokinas en que ocurriera la activación y maduración inicial a partir de linfocitos en reposo: por ejemplo, *in vitro* se ha visto que si un Th se activa por antígeno en presencia de IL-4, se desarrolla hasta Th2 mientras que si el entorno de activación es rico en IFN-gamma, se desarrolla hasta Th1.

1.5.1 INTERLEUKINA-2

En 1976, Morgan, Ruscetti y Gallo observaron que el líquido sobrenadante de los cultivos *in vitro* de leucocitos humanos en sangre periférica con activación de la mitosis, tenía actividad. Denominaron a esta actividad factor de crecimiento celular (TCGF), el cual era capaz de mantener los linfocitos T humanos derivados de la médula ósea en crecimiento exponencial *in vitro*. Tras esta observación, Gillis y Smith describieron un método para potenciar la proliferación de linfocitos T citolíticos, dependiendo de la presencia de TCGF, que fue aislado en 1983, red denominándose **interleukina-2**, advirtiendo que esta molécula era crucial en la actividad mitótica de las células T.

Genes; proteínas; fuentes

La secuencia de nucleótidos de la cadena de DNA de la IL-2 humana es un polipéptido de 153 aminoácidos incluyendo un péptido señal de 20 aminoácidos. El peso molecular de la IL-2 recombinante es de 15500 daltons, lo cual supone un tamaño ligeramente mayor que la IL-2 nativa sobre un análisis de gel de electroforesis con dodecil sulfato-policramida sódico. Clones de DNA de IL-2 han sido obtenidos también en otras especies como el ratón, la rata, la oveja, con un grado de homología de aminoácidos entre especies del 65 al 70%. Los genes de la IL-2 consisten en cuatro exones separados por un intron corto y dos largos distribuidos sobre aproximadamente 6 kb de DNA. El gen de la IL-2 está localizado en el cromosoma 4.

IL-2 ha sido cristalizada y analizada por difracción en rayos X. Contiene 4 segmentos extensivos alfa helicoidales en una cadena antiparalela. Un puente disulfuro es formado por residuos de cisteína en las posiciones 58 y 105.

Los linfocitos T activados son la mayor fuente de IL-2. Sin embargo, las células B pueden ser también inducidas a secretar esta citoquina bajo ciertas condiciones de estimulación *in vitro*. Mientras que los linfocitos en reposo no secretan IL-2, la activación a través del receptor da lugar a la inducción tanto de IL-2 como de los genes del receptor de IL-2 de alta afinidad de estas células.

Actividad in vitro

La mayor función de la IL-2 es la activación de una variedad de células del sistema inmune, incluyendo los linfocitos Th, células T citotóxicas, células B, macrófagos y células NK. IL-2 parece jugar un papel particularmente importante en mantener el desarrollo de precursores de linfocitos T citotóxicos estimulados por un antígeno a células T efectoras citotóxicas funcionales. IL-2 es capaz también de actuar como un factor de crecimiento autocrino para las células T. IL-2 es secretada por los linfocitos Th 4-12 horas tras la estimulación por la unión de antígeno al receptor para el antígeno. La unión subsecuente de IL-2 a su receptor da lugar a la proliferación de células T activadas por un antígeno, secreción aumentada de linfocinas, y alta expresión de receptores de membrana para otros factores de crecimiento. La vida media de la unión entre célula e IL-2 es de unos 25-30 minutos, siendo el complejo IL-2-IL-2R internalizado. Eventualmente, la resolución de la respuesta inmune tras el aclaramiento del antígeno, se produce una disminución tanto en la producción de IL-2 como en la expresión de receptores de alta afinidad para IL-2.

Tras la activación, las células B también expresan receptores de alta afinidad para la IL-2. Haciéndolas responsables de las señales mediadas por IL-2, las cuales,

en combinación con otras citocinas, induce la diferenciación y secreción de inmunoglobulina. La estimulación de las células B con IL-2 da lugar a la expresión de RNA mensajero que codifica la cadena J y la forma secretoria de la cadena pesada y de las inmunoglobulinas. Factores estimuladores de la mitosis son capaces de estimular la secreción de anticuerpos por células B humanas, sólo en presencia de los linfocitos T, los cuales aportan IL-2 para la respuesta de células B. La IL-2 producida de esta forma también actúa sobre las células T, presumiblemente de forma paracrina y autocrina, para inducir la secreción de otras linfocinas que son requeridas para la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.

La activación de los monocitos por la IL-2 induce la secreción de IL-1, potencia la citotoxicidad mediada por monocitos, promueve la proliferación de los precursores de macrófagos, y aumenta la fagocitosis. La respuesta de los NK a la IL-2 está caracterizada por la producción de IFN-gamma, producción y aumento de la actividad citolítica.

Actividad in vivo

Los estudios *in vivo* de la administración de IL-2 en ratones han confirmado la habilidad de esta molécula para mediar las respuestas inmunes mediadas por las células T. El tratamiento con IL-2 a animales previamente tratados con agentes inmunosupresores, devuelven su habilidad para generar células efectoras citolíticas tras la estimulación con un antígeno. Aún más, la respuesta de los NK de animales tratados con IL-2 fueron marcadamente elevadas si se compara con la respuesta del grupo control. De la misma manera, la administración continua de anticuerpos anti IL-2R en ratones neonatos ocasiona en algunos casos alteración en el desarrollo de las células T. Por el contrario, los ratones con deficiencia de IL-2 por alteración genética, tienen una composición de células T periféricas y a nivel del timo, completamente normal, indicando que la IL-2 no es absolutamente esencial para el desarrollo de las células T.

La IL-2 fue utilizada primero *in vitro* para generar tanto grandes cantidades de células T efectoras citolíticas antígeno-específicas o como de células NK activadas por linfocinas no antígeno-específicas. En realidad, en muchos experimentos, la administración de IL-2 de acuerdo con la terapia inmunosupresora se demostró ser totalmente capaz de eliminar los focos tumorales en animales a los que previamente se les había suministrado una dosis de sustancia productora de melanoma, fibrosarcoma, etc.

1.6 ADHESIÓN DE LOS LEUCOCITOS EN LOS PROCESOS DE INFLAMACIÓN. ICAM-1

En los últimos años ha habido una explosión en el entendimiento del papel central que juega la adhesión de los leucocitos en las funciones de la respuesta de defensa del huésped.

El papel de la adhesión de leucocitos y las moléculas implicadas en este proceso son críticas para todos los aspectos de las reacciones inmunes específicas y no específicas. En general, las moléculas implicadas en la adhesión de leucocitos pueden ser divididas en varias superfamilias genéticas diferentes que median diferentes funciones. La superfamilia genética de las INTEGRINAS, moléculas de adhesión facilitan la adhesión de la mayoría de los leucocitos y la migración a través de endotelio y los tejidos extracelulares. Esta familia de moléculas de adhesión también media las funciones efectoras de los leucocitos como la citolisis mediada por células, circunstancia en la cual la célula efectora y la célula diana deben adherirse antes del proceso de lisis, así como la adhesión homotípica y heterotípica requeridas para la presentación de antígenos y la subsecuente expresión clonal. La molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), ICAM-2, ICAM-3 y VCAM-1 (también denominada INCAM-1), así como CD2 y LFA-3 son moléculas de adhesión miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas.

Otra familia de moléculas de adhesión, las SELECTINAS, son funcionalmente más limitadas que las integrinas leucocíticas y se piensa median la unión inicial de los neutrófilos algunos linfocitos al endotelio de las lesiones inflamatorias, así como la dirección del tráfico natural de los linfocitos al tejido linfoide periférico. Tres selectinas han sido identificadas. Estas moléculas de las selectinas difieren unas de otras por su distribución celular, el tiempo que transcurre desde la estimulación a su aparición y los ligandos específicos que reconocen y a los que se unen.

L-selectina está expresada en la mayoría de los leucocitos y juega un papel en la adhesión de los neutrófilos a las lesiones inflamatorias y de los linfocitos a los nódulos linfoides periféricos. *L-selectina* es secretada de la superficie de los neutrófilos al mismo tiempo que *MAC-1* es regulada, sugiriendo la idea de que la *L-selectina* actúa enlenteciendo el flujo de los neutrófilos al sitio inflamatorio. Una vez producido este enlentecimiento, la interacción *CD18/ICAMs* permite a la célula migrar desde la circulación al foco inflamatorio. Para facilitar la migración, sin embargo, la *L-selectina* es secretada de la superficie de los neutrófilos, minimizando las fuerzas

adhesivas que mantienen la célula en la luz de los vasos. Los anticuerpos a la I-selectina inhiben las interacciones celulares neutrófilo/endotelio tanto *in vitro* como *in vivo*.

E-selectina es expresada únicamente en las células endoteliales activadas y es inducida con citocinas inflamatorias como el interferón gamma y la IL-5. *In vitro*, E-selectina ha demostrado mediar, en parte, la adhesión de los neutrófilos y una población de linfocitos al endotelio.

P-selectina es expresada en las plaquetas y el endotelio. Al igual que la E-selectina, la P-selectina es inducible. Existe en “pools” intracelulares y su expresión es inducida ben minutos sobre el endotelio expuesto a mediadores como la trombina o la histamina. Media las interacciones celulares neutrófilos/endotelio así como las interacciones plaquetas/célula endotelial.

Otra molécula de adhesión, CD44, participa en la respuesta inflamatoria pero no pertenece ninguna de las superfamilias genéticas ya mencionadas.

Adhesión de leucocitos-familia CD18

Está claro que la adhesión leucocito/leucocito y leucocito/célula diana es un acontecimiento necesario para que el sistema defensivo del huésped funcione normalmente en los procesos de inflamación. Los leucocitos deben adherirse a las células endoteliales que se alinean en los vasos sanguíneos previo a la migración desde la circulación sanguínea a la lesión inflamada. Para que los leucocitos realicen sus funciones efectoras tales como la destrucción de las células diana, debe adherirse primero a estas células para que altas concentraciones de mediadores líticos secretados por los leucocitos, puedan localizarse en la unión leucocito/célula diana.

La familia CD18 de moléculas de los leucocitos ha sido implicada como parcialmente responsables de la adhesión a los substratos celulares mediada por leucocitos. La familia CD18 o LFA-1 de moléculas de adhesión está formada por CD11a, CD18 (LFA-1), CD11b, CD18 (MAC-1), y CD11c. Estas moléculas, que están distribuidas en varias combinaciones en todos los leucocitos, son todos heterodímeros con distintas subunidades alfa que se asocian con una subunidad beta común. Estructuralmente, las moléculas de adhesión leucocíticas son miembros de una superfamilia de integrinas y específicamente pertenecen al subgrupo beta 2.

Una primera evidencia que demuestra que la función de estas moléculas y, por lo tanto, la importancia de la adhesión de leucocitos en la generación y mantenimiento

de la inflamación se han estudiado en muchos sistemas experimentales en los cuales los anticuerpos monoclonales para estas moléculas, utilizados como antagonistas, demostraron inhibir múltiples acontecimientos asociados con los procesos inflamatorios.

En experimentos *in vitro*, con anticuerpos monoclonales para la molécula CD18 o CD11a inhiben los acontecimientos líticos mediados por linfocitos como la actividad células T citotóxicas o la actividad de las células natural killer y los procesos de tráfico de los linfocitos como la adhesión de linfocitos al endotelio vascular y a las células epidérmicas. Aún más esos modelos de anticuerpos monoclonales inhibidos *in vitro* a las respuestas inmunológicas generales y/o específicas como la formación de anticuerpos, la mitosis y proliferación de células T inducidas por antígeno, y la respuesta linfocítica mixta. El mecanismo por el cual estos anticuerpos inhiben los procesos antes mencionados es por su habilidad para antagonizar la interacción del miembro apropiado de la familia CD18 con su ligando más que la eliminación celular dado que no se ha demostrado que estos anticuerpos sean citotóxicos por ellos mismos.

Los anticuerpos monoclonales para la molécula CD18 y para la CD11 también inhiben la función de los granulocitos como la adhesión al endotelio, la agregación homotípica, la unión a las partículas cubiertas de iC3b y a la molécula ADCC.

Otra evidencia es la identificación de un grupo de individuos que, debido a defectos genéticos, eran incapaces de expresar un número normal de moléculas de adhesión para leucocitos en superficies celulares. Estos individuos presentaron separación del cordón umbilical retrasada, afectaciones cutáneas frecuentes con escaso infiltrado de linfocitos y no formación de pus. Los pacientes con una deficiencia más severa, también presentaron respuestas de células T disminuidas, presumiblemente debido a un defecto en la capacidad de presentar antígenos por la incapacidad de las células T para unirse a las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos de estos pacientes, *in vitro*, se comportaron como linfocitos normales en la presencia de anticuerpos monoclonales anti-LFA-1.

Un ligando del LFA-1 es ICAM-1 el cual fue funcionalmente identificado por anticuerpos de screening de hibridones generados de células esplénicas de ratón inmunizado contra linfocitos con deficiencia de LFA-1 en cuanto a su habilidad para inhibir los ensayos de adhesión homotípica dependiente de LFA-1. Estructuralmente, ICAM-1 es un miembro de una familia supergenética y una corta cola citoplasmática. Una caracterización más precisa del ICAM-1 puso de manifiesto que era inducido *in vitro* en múltiples tipos celulares incluyendo las células hematopoyéticas, células

endoteliales y fibroblastos con IL-1a, IL-1b, TNF-alfa, TNF-beta y/o IFN gamma dependiendo del tipo celular. Funcionalmente, anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1, inhibían la proliferación inducida por el antígeno, la actividad de células T citotóxicas y la adhesión de granulocitos y linfocitos al endotelio. Estos datos sugieren que, al igual que la familia de moléculas de adhesión CD18, la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales y otros tipos celulares es crítico para el normal funcionamiento del sistema de defensa del huésped.

Hay una baja expresión constitutiva de ICAM-1 en las células del endotelio de las vénulas; sin embargo, su expresión está marcadamente aumentada en los focos inflamatorios. Aún más, hay un aumento en la expresión de ICAM-1 en múltiples tipos celulares incluyendo los queratinocitos en las lesiones inflamatorias de piel, conductos biliares y hepatocitos perivenulares durante los episodios de rechazo en los trasplantes hepáticos, o en los casos de cirrosis biliar primaria, endotelio cerebral alrededor de las múltiples placas de esclerosis en lesiones de encefalitis alérgica experimental en humanos y roedores, glomérulos y tubulos durante los episodios de rechazo de los riñones trasplantados, así como las células epiteliales pulmonares tras la estimulación por un antígeno. Asimismo se encuentra un aumento en la expresión de ICAM-1 en las células de los melanomas tras la aparición de metástasis.

Anti ICAM-1

Hay datos que sugieren que la interacción de las moléculas CD18 con los ligandos actúan como una señal co-estimuladora para los leucocitos. Este concepto es desarrollado posteriormente cuando se demostró que los linfocitos eran más responsivos en un medio con ICAM-1 que un medio proteico total. Es posible que incluso si los linfocitos se unen a los substratos celulares apropiados en presencia de un anticuerpo monoclonal adecuado anti-adhesión apropiado, la pérdida de la señal co-estimuladora, les deja “inservibles”.

En conclusión, la inhibición de las interacciones CD18/ICAM-1, inhibe el movimiento de leucocitos, la presentación de antígenos y la citolisis mediada por leucocitos. No está claro cuál de estos tres procesos inhibitorios es más responsable de esta dramática reducción de la respuesta inflamatoria. Probablemente es una combinación de los tres mecanismos.

El rechazo del injerto ocurre, cuando la respuesta inmune del receptor contra tejido extraño es inducida por los antígenos presentes en el injerto, pero ausentes en el receptor. Los antígenos codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad

(MHC) son los principales iniciadores de la cascada inflamatoria, incluyendo las células efectoras capaces de dañar el injerto.

Los antígenos MHC expresados en la superficie celular, además de potenciar la respuesta anti-injerto, además funcionan como dianas de la respuesta inmune del huésped. Los antígenos MHC clase II son los más inmunogénicos. En humanos, los antígenos MHC clase I y II son codificados por genes situados en el cromosoma 6.

Además, los antígenos no-MHC detectados en la superficie celular de células endoteliales, monocitos o antígenos de tejido específico de células específicas, pueden ser importantes en los mecanismos de rechazo.

La compatibilidad del grupo sanguíneo AB0 ha sido tradicionalmente requerida para el éxito del trasplante, describiéndose casos de rechazo hiperagudo en casos de incompatibilidad AB0. Sin embargo, no necesariamente da lugar a un rechazo hiperagudo en el trasplante hepático.

1.7 INMUNOLOGIA DEL TRASPLANTE

Esta parte de la introducción está basada en el siguiente tratado:

Neuberger J, Adams D. Immunology of Liver Transplantation. The Liver and Hepatobiliary Unit, Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, UK, 1993.

ANTÍGENOS DEL TRASPLANTE

Durante los años 50 (1950), se observó que la sangre de mujeres multíparas o personas trasfundidas contienen anticuerpos con leucocitos aglutinados de otros individuos. La identificación de esos individuos con antígenos leucocitarios, fue el primer paso hacia la 2

Es conocido que las moléculas MHC están implicadas en la producción de anticuerpos solo a través de la producción de la colaboración entre linfocitos T y B.

ORGANIZACIÓN GENÉTICA DE MHC

El MHC humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 6. El DNA del MHC comprende el 0.1% del total del genoma humano, siendo suficiente DNA para codificar al menos 50 genes.

Los genes **clase I** codifican los clásicos antígenos mayores del trasplante: HLA-A, HLA-B y HLA-C. Además, al menos otros 14 tipos de genes clase I se han descrito con función aún desconocida

Quince genes **clase II** (6A y 9B) se han mapeado en la parte telomérica del gen que codifica MHC esy que incluye tres subregiones: DR, DQ Y DP. Al menos 8 genes clase II son funcionales. proteínas Bf, genes para la 21-hidroxilasa, factor de necrosis tumoral, linfotoxina...

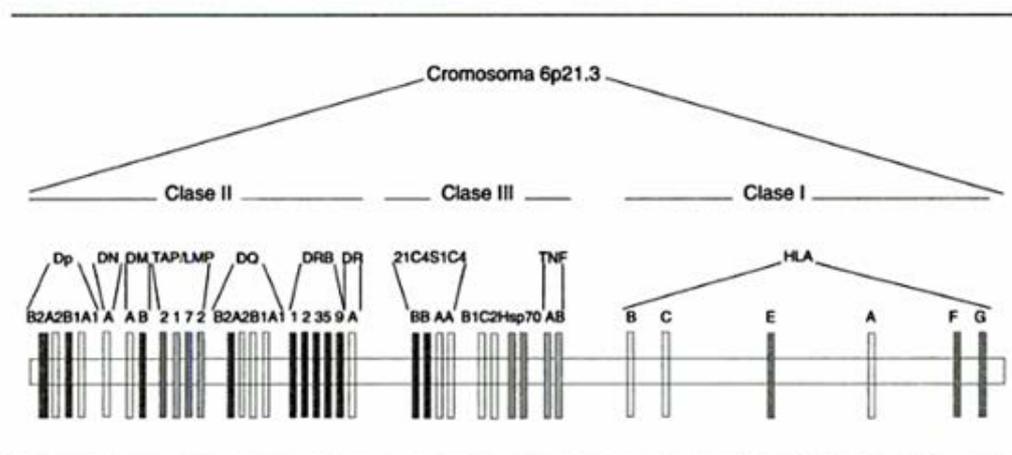


Figura 7 Complejo mayor de histocompatibilidad humano o sistema HLA **Curso de inmunología**
Universidad de Antioquía

Los genes MHC se localizan muy juntos. Se transmiten genéticamente en bloque según las leyes de Mendel. Casi todos los genes MHC expresan polimorfismo, siendo los de clase I, clase II DRB, DQB y DPB los más polimórficos

TRANSFORMACIÓN DE GENES A MOLECULAS

Los genes MHC son los genes más polimórficos descritos y se expresan de forma co-dominante. Moléculas clase I y clase II existen como heterodímeros y se expresan en la superficie celular como proteínas integrantes de su membrana.

La molécula clase I (HLA A, B y C) es una cadena pesada codificada altamente polimórfica, con un peso molecular de aproximadamente 45 KDa ligada, de forma no covalente con la B2-microglobulina.

La B2-microglobulina es una molécula o polimórfica codificada por el cromosoma 15, esencial para la expresión de moléculas clase I.

Las moléculas clase II, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP compuestos por dos cadenas de polipéptidos alfa y beta, codificado por genes A y B respectivamente. Ambos polipéptidos están integrados en la membrana celular formando un dímero. La cadena alfa tiene un peso molecular de 33 KDa y la cadena beta, 29 KDa. Intermediarios biosintéticos de los antígenos clase II, pero no moléculas maduras de la superficie celular, se asocian con una glicoproteína codificada por genes diferentes a los del MHC. El grado de polimorfismo se originan en la zona genética DR, DQ o DP.

GRUPOS SANGUÍNEOS ABO

Los determinantes antigénicos del sistema ABO son los azúcares terminales de las cadenas de carbohidratos. La mayoría de los antígenos de la superficie de las células rojas es una forma de glicoproteína, pero en algunos casos se ha encontrado un oligosacárido ligado a lípidos.

El azúcar terminal en el grupo sanguíneo A es la N-acetilgalactosamina y en el grupo sanguíneo B es la galactosa. Cuando faltan ambos azúcares del resto de la cadena de carbohidratos, se denomina antígeno H; así las células rojas del grupo sanguíneo O tienen antígeno H en su superficie. Las células rojas de los grupos A y B tienen antígeno H en su superficie pero en pequeñas cantidades.

La transmisión genética de los grupos sanguíneos está determinada por tres genes allelicos: A, B y O. A y B son co-dominantes y el gen O es recesivo.

A, B y H antígenos se expresan también en otros tejidos: leucocitos y en pequeñas cantidades en trombocitos, células endoteliales y en la mayoría de los órganos y vasos sanguíneos y algunas células epiteliales. No se encuentran en el sistema nervioso central o en el tejido conectivo.

Anticuerpos naturales, isoaglutininas, existen contra los antígenos de los grupos sanguíneos. Una persona con grupo sanguíneo A tiene isoaglutininas contra el grupo sanguíneo B y viceversa. Personas con grupo sanguíneo O tiene anticuerpos contra A y B. Sin embargo, las personas AB no tienen isoaglutininas.

En el trasplante de órganos, especialmente de riñón o corazón, puede producirse una pérdida rápida del injerto cuando existe una incompatibilidad ABO entre el donante y el receptor. Este rechazo hiperagudo está mediado por el grupo de anticuerpos sanguíneos del paciente en combinación con el grupo de antígenos sanguíneos en el endotelio vascular del injerto, activando el complemento, causando vasoespasmo y agregación plaquetaria. Todo esto da lugar a una rápida necrosis del injerto. Antígenos de los grupos sanguíneos se han encontrado también en los componentes celulares hepáticos. En el trasplante hepático, sin embargo, se han publicado casos de incompatibilidad ABO exitosos.

ANTÍGENOS DEL TRASPLANTE EN EL HÍGADO HUMANO

Expresión de antígenos MHC en el hígado normal

La expresión de los dos tipos de antígenos MHC en los diferentes tipos celulares tiene una distribución heterogénea en los tejidos humanos normales. En general, los antígenos clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas, mientras que los antígenos clase II muestran una distribución más restringida, estando limitada principalmente al sistema linfóide y células accesorias. Además, algunas células del parénquima, como las células endoteliales pueden expresar también antígenos clase II. Sin embargo, la distribución de antígenos MHC clase II en tejidos humanos es cuantitativa más que cualitativa, y la expresión aberrante de moléculas clase II es un fenómeno bien conocido.

En el hígado normal, el componente principal, los hepatocitos, no expresan o sólo muy pocas cantidades de antígenos clase I. Sólo encontramos una ligera expresión, si se encuentra en el endotelio vascular o en el epitelio de las células del conducto biliar. Un estudio más detallado confirma hallazgos compatibles con baja expresión de antígenos clase I en el parénquima hepático. El resto de células no parenquimatosas, como los linfocitos y fagocito mononucleares incluyendo las células de Kupffer, son los componentes más antigénicos del órgano. Las células dendríticas derivadas de la médula ósea en parénquima hepático expresan tanto antígenos clase I como II fuertemente.

La expresión de moléculas de clase II en la superficie de las células del hígado humano ha sido estudiada de forma intensiva. Todos los componentes parenquimatosos fueron prácticamente negativos para moléculas clase II analizados con anticuerpos policlonales. Sin embargo, algunos ligandos de anticuerpos para anticuerpos anti HLA-DR se han detectado en las células endoteliales y en células de conductos biliares. La menor expresión de antígenos DR se localizó en el endotelio sinusoidal y en los conductos biliares.

Aunque los componentes parenquimatosos del hígado humano no expresan antígenos clase II en cantidades significativas, las células no parenquimatosas expresan células clase II fuertemente. Los macrófagos tisulares, las células de Kupffer y otras células no parenquimatosas son reemplazadas, en pocas semanas por células del receptor. Las células de Kupffer y las células dendríticas derivadas de la médula ósea expresan fuertemente antígenos clase II y pueden actuar como células

presentadoras de antígeno en el hígado, e iniciar la respuesta anti-injerto en el trasplante hepático.

EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS MHC DURANTE EL RECHAZO

Respecto a las moléculas clase I se ha demostrado que se expresan fuertemente en los hepatocitos y en las células de los conductos biliares durante los episodios de rechazo agudo. La expresión de moléculas clase I en los sinusoides representa no sólo la expresión en el endotelio vascular sino también de las células Kupffer localizadas en dichos sinusoides. También se ha demostrado que las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C son inducidas de forma equitativa durante el episodio de rechazo. También se ha observado un aumento de la expresión de moléculas beta-2 de la cadena ligera de las moléculas clase I en parénquima hepático.

La expresión aberrante de moléculas clase II en hígado es más interesante. Diversos estudios han demostrado la inducción de moléculas clase II no sólo en conductos biliares, sino también en el endotelio de venas portales y centrales y en la arteria hepática.

La mayoría de los grupos están de acuerdo en que es inducible la expresión de moléculas clase II en estructuras biliares y vasculares del hígado. Sin embargo, la expresión de moléculas clase II en los hepatocitos es aún controvertido. En algunos estudios se ha evidenciado sólo durante episodios de rechazo severo con activación inmune intensa. En estos casos, hay una fuerte expresión siempre de moléculas clase II en células del conducto biliar durante el episodio de rechazo agudo.

En un análisis detallado de la inducción de las diferentes moléculas clase II: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, se ha demostrado que la expresión de DQ o DP se induce de forma menos intensa que la expresión de DR en el injerto hepático. Se establece una correlación entre el aumento de la expresión de moléculas clase II y la importancia de los conductos biliares y el endotelio vascular

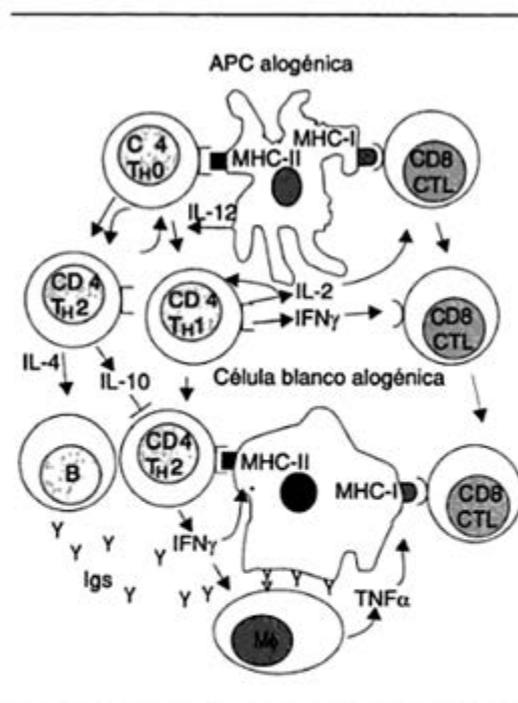


Figura 8 Interacciones celulares y producción de citoquinas en el reconocimiento alógeno y el rechazo agudo
Curso de inmunología.
Universidad de Antioquía.

como estructuras diana durante el proceso de rechazo.

Los antígenos clase I pueden estar regulados por varias citokinas, como distintos tipos de interferón o el factor de necrosis tumoral, producidos durante diversos procesos inmunológicos. De las citokinas estudiadas, interferón gamma, producida por linfocitos activados, es el inductor más potente para antígenos clase II, pero también induce clase I. Esta citokina es producida durante el rechazo hepático. La regulación de las moléculas clase II en los injertos hepáticos humanos, durante el rechazo, infecciones virales y otros procesos patológicos, como consecuencia de la activación de células T, producción de interferón gamma u otros factores que inducen moléculas clase II.

INDUCCIÓN DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS MHC DURANTE OTRAS CONDICIONES PATOLÓGICAS DISTINTAS DE TRASPLANTE HEPÁTICO

El aumento de expresión de antígenos MHC en el hígado puede ocurrir por distintas razones. Enfermedades hepáticas, como la cirrosis de distintas etiologías están asociadas con aumento de la expresión de moléculas clase I en los hepatocitos. Expresión aberrante de antígenos clase II en el epitelio del conducto biliar se ha descrito en la cirrosis biliar primaria y en la infección vírica por hepatitis B. Cualquier lesión o proceso patológico hepático puede asociarse con un aumento de la expresión de antígenos MHC en la superficie celular en las células parenquimatosas. Incluso la colestasis sólo, isquemia o reacciones tóxicas, pueden potenciar la expresión de moléculas clase I o clase II.

ANTÍGENOS DEL TRASPLANTE Y DESENLACE DEL INJERTO HEPÁTICO

El beneficio del tipaje HLA en el desenlace del injerto renal se ha demostrado con claridad. Tanto el tipaje HLA-ABC y HLA-DR afectan la supervivencia del injerto renal a largo tiempo. En el trasplante hepático, el corto tiempo de preservación del injerto, hacen difícil la realización de este tipaje pretrasplante.

Pese a una supervivencia del injerto a un año del 80-90%, el rechazo agudo ocurre en el 60-80% de los injertos y el rechazo crónico en el 10%. El rechazo agudo es la principal causa de morbilidad y hospitalización de esos pacientes. El rechazo crónico es la indicación habitual de retransplante. Dado el alto índice de rechazo, el tipaje HLA podría ser beneficioso.

Los datos publicados son, sin embargo, conflictivos. La compatibilidad HLA se asocia con menor supervivencia del injerto, aunque una mayor incidencia de fallo secundario a rechazo se correlacionó con un menor grado de compatibilidad HLA-DR. Muchos datos se han publicado sobre rechazo y HLA compatibilidad. Sin embargo, los datos clínicos limitados, y los distintos protocolos inmunosupresores pueden distorsionar el auténtico papel del tipaje HLA.

En el rechazo crónico (vanishing bile duct syndrome, VBDS), es aún menos claro que en el rechazo agudo. En algunos estudios no se han evidenciado efectos en no tipaje de moléculas clase I o clase II, aunque un no tipaje DQ parece más asociado a VBDS que no tipaje DR. Respecto al papel de las infecciones virales parece que los hallazgos relacionados con no tipaje para clase I y clase II e infección por CMV suponen un riesgo aumentado de desarrollar VBDS.

1.7.1 MECANISMOS DE RECHAZO EN TRASPLANTE HEPÁTICO

Parece que la expresión de antígenos MHC expresados en células parenquimatosas y no parenquimatosas determina el modelo y la severidad del proceso de rechazo. Al menos, la expresión de antígenos MHC en estas células es paralela a la aparición y desaparición de rechazo.

El patrón de infiltrado y daño celular visto en modelos humanos y animales parece correlacionarse con la expresión de antígenos de histocompatibilidad mayor expresados en el injerto. El epitelio del conducto biliar y el endotelio de la vena central expresan ambos antígenos clase I y clase II. Los antígenos clase I y II también son expresados por las células de Kupffer. Sin embargo, los hepatocitos expresan relativamente escasas cantidades de antígenos clase I y mínimas clases de antígenos clase II.

Estos datos sugieren que las células que expresan antígenos clase I y clase II parecen ser las dianas del proceso de rechazo.

Sin embargo, la presencia de antígenos MHC no es el único determinante para ser diana del proceso de rechazo. Las células de Kupffer son ricas en expresión de antígenos clase I y clase II, y durante el proceso de rechazo se evidencia poca inflamación en su proximidad. Posibles explicaciones para esta falta de inflamación en torno a estas células son: a) Relativa inaccesibilidad de las células de Kupffer para las células infiltrantes, b) Limitada expresión de antígenos MHC tras el trasplante hepático, c) Renovación de las células de Kupffer del donante. Las células Kupffer del donante son renovadas gradualmente por las células del huésped. Este proceso

puede limitar la habilidad de las células Kupffer para estimular la respuesta a rechazo, así como su papel como diana en el proceso de rechazo.

Hasta la fecha no se ha compatibilizado los antígenos HLA en los trasplantes hepáticos humanos. La necesidad emergente, el corto tiempo de preservación han contribuido a la pérdida de esta compatibilización. Sin embargo, de forma retrospectiva se ha demostrado que hubiese sido beneficioso.

Las células hepáticas no parenquimatosas, sin embargo, son altamente inmunogénicas. Estos datos son consistentes con estudios en ratones demostrando expresión aumentada de antígenos de expresión en células no parenquimatosas. La relativa inmunogenicidad de una célula debe ser evaluada en el siguiente contexto: ¿Cuánto accesible es esa célula a las células inmunes del huésped *in vivo*?

Efectos de los mecanismos celulares en el injerto hepático

Los linfocitos que infiltran los tractos portales y el endotelio de la vena central parecen desempeñar un papel central en el rechazo del injerto. Las células infiltrantes del huésped pueden ser monitorizadas por marcadores antigénicos de superficie: CD4+ y CD8+. Estos marcadores están presentes en el injerto cuando se realiza el diagnóstico de rechazo agudo.

En biopsias secuenciales se pone de manifiesto la presencia de células CD4+ y CD8+ en los tractos portales, pudiendo interpretarse como un marcador precoz de rechazo que precede a los cambios bioquímicos e histológicos varios días antes.

En estudios secuenciales, las células con especificidad clase I fueron identificadas antes que las de clase II. El concepto de “enriquecimiento” local de células citotóxicas en el injerto es generalmente aceptado.

En cultivos de células esplénicas del huésped con hepatocitos o células no parenquimatosas se desarrollaron células citotóxicas. Cuando se utilizaron hepatocitos los linfocitos citotóxicos específicos fueron de clase I, mientras que cuando se utilizaron células no parenquimatosas se desarrollaron linfocitos clase I y II. El daño de los hepatocitos puede demostrarse por la liberación de enzimas intracelulares en el medio de cultivo, evidenciándose asimismo la inhibición de la síntesis de proteínas (así, síntomas como ictericia o la disminución del nivel de conciencia pueden ser un reflejo de la actividad linfocitaria).

Citokinas en la respuesta de rechazo. Papel de la Interleukina-2

Las citokinas son moléculas producidas por células con actividad reguladora para otras células (función paracrina) o células del mismo tipo (función autocrina). Las citokinas se dividen generalmente en dos categorías:

* Citokinas inflamatorias (asociadas con procesos inflamatorios): IL-1, IL-6, TNF (factor de necrosis tumoral)

* Citokinas regulatorias (asociadas con procesos inmunes): IL-2, IL-4 e IL-5.

El papel central de la **IL-2** se debe a ser producida por las células T helper y uno de sus efectos es estimular la proliferación y maduración de los linfocitos citotóxicos. Además los inmunosupresores ejercen su efecto inhibiendo la producción y secreción de IL-2 y, en consecuencia, la inhibición del desarrollo de los linfocitos citotóxicos. Asimismo los anticuerpos anti IL-2 y anti receptor IL-2.

El estudio de IL-2 se realiza en sangre periférica y en otros tejidos donde se expresa esta molécula. En diversos estudios se han evidenciado niveles elevados en sangre periférica, en episodios de rechazo, no pudiendo diferenciarlo de otras complicaciones infecciosas.

Es aceptado generalmente que la IL-2 es el enlace central entre los linfocitos T helper y los linfocitos citotóxicos, que interactúan para dañar al injerto. Todos los pacientes tratados con ciclosporina o FK506 para inhibir la producción de IL-2.

Dada la importancia de la IL-2 en el proceso de rechazo, sería útil monitorizar sus niveles en sangre periférica para ante una elevación de sus niveles, preveer la posibilidad de rechazo, antes de que aparezcan los cambios histológicos.

Factor de necrosis tumoral alfa o TNF alfa, una citokina inflamatoria, cuya función se basa en la inhibición del crecimiento tumoral, está también implicada en la patogénesis del rechazo. Diversos grupos han demostrado elevación en sus niveles en rechazo agudo, antes de los hallazgos histológicos o alteraciones bioquímicos.

Hay estudios basados en el estudio de las citokinas en los sitios de inflamación (biopsias hepáticas).

Mecanismos inmunes en el rechazo agudo. Papel de la molécula de adhesión intercelular-1

El rechazo ocurre cuando el sistema inmune del huésped reconoce los antígenos de histocompatibilidad expresado por el injerto hepático. La expresión de antígenos MHC varía entre distintos tejidos. En el hígado humano, HLA clase I (ABC) y clase II (DR, DP, DQ) se expresan fuertemente en las células sinusoidales, HLA-DR y antígenos clase I se han evidenciado en el endotelio vascular. También se han evidenciado ocasionalmente ambos, clase I y II en el epitelio biliar. Los hepatocitos no expresan ninguno de los dos tipos.

La expresión de antígenos HLA aumenta durante los episodios de rechazo. Los hepatocitos expresan un patrón membranoso de depósitos focales de HLA clase I y clase II (HLA-DR, DP) y el epitelio biliar y el endotelio vascular muestran abundantes depósitos (DR y DP pero no DQ). Estos hechos suceden por acción de las citocinas (sobre todo gamma-interferon), que aumentan la expresión tisular de antígenos MHC, haciendo el tejido más susceptible al daño celular mediado por linfocitos T citotóxicos.

Sin embargo, el aumento de expresión de antígenos MHC no es específico de rechazo, también está presente en otros tipos de disfunción y en pacientes con rechazo resuelto, aunque en estos casos los niveles son menores.

Las células T deben adherirse a la célula diana antes de poder reaccionar con los antígenos MHC, un proceso mediado por receptores de adherencia de linfocitos como el CD2 que interactúan con el antígeno asociado a función linfocitaria 3 (LFA-3) y LFA-1, los cuales interactúan con los ligandos ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3.

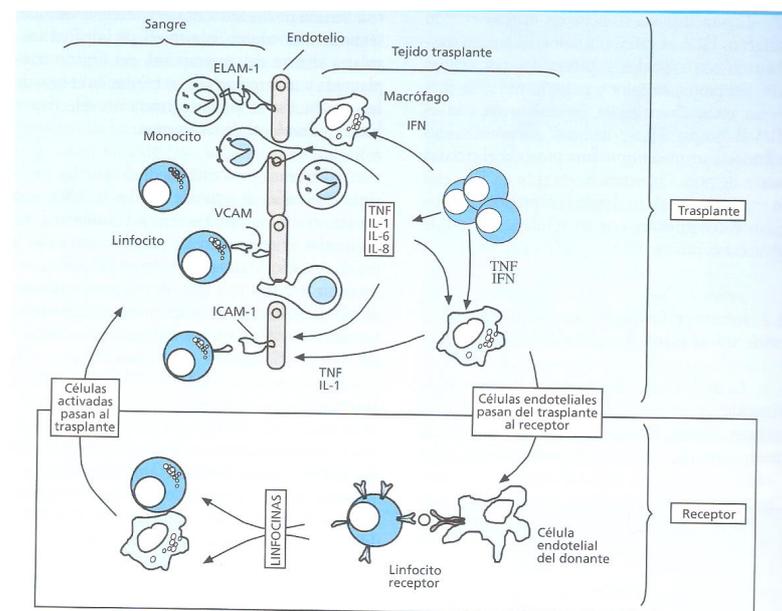


Figura 9: Respuesta al rechazo iniciada por células dendríticas (Inmunología Clínica. Bases Moleculares y Celulares. José Peña Martínez. Ed. Arán)

La vía LFA-1/ICAM-1 es de particular interés dado que la expresión de ICAM-1 es regulada *in vitro* e *in vivo* por citokinas proinflamatorias. En el hígado normal hay poca expresión de ICAM-1; sin embargo durante el rechazo del injerto, se induce la expresión de ICAM-1 en las estructuras diana (conductos biliares, endotelio vascular y focalmente en hepatocitos). Esta expresión persiste o aumenta en pacientes que no responden al tratamiento inmunosupresor, mientras que los niveles disminuyen si hay respuesta al tratamiento.

Las citokinas proinflamatorias son producidas en el hígado durante el proceso de rechazo y probablemente induce tanto antígenos MHC y expresión de ICAM-1 en estructuras como el epitelio biliar, permitiendo aumentar la adherencia de los linfocitos, la interacción con los antígenos del injerto y, finalmente, la citotoxicidad. Los corticoides *in vivo* no regulan la expresión de ICAM-1, sino que ejerce su efecto mediante la supresión de la secreción de las citokinas proinflamatorias de células mononucleares infiltrantes. También hay evidencia de que la expresión de LFA-3, que reacciona con el receptor de células T, CD2, está aumentado en hepatocitos, endotelio vascular y células del conducto biliar.

Antígenos menores y antígenos sanguíneos pueden actuar también como dianas para el rechazo. La expresión de los antígenos sanguíneos se produce en el epitelio biliar y puede aumentarse en infecciones y colestasis.

PRESENTACION DE ANTÍGENOS

Los antígenos del trasplante pueden ser reconocidos por el sistema inmune del receptor directamente, sin necesidad de procesamiento, o tras ser procesados por las células presentadoras de antígeno del huésped.

Los macrófagos ejercen habitualmente como células presentadoras de antígeno y el hígado es particularmente rico en este tipo de células. Las células dendríticas en los tractos portales y células de Kupffer en los sinusoides son, asimismo, buenas presentadoras de antígenos.

Tras la realización del trasplante, las células Kupffer del donante son reemplazadas por células que expresan el fenotipo del huésped. En pacientes con rechazo severo este proceso ocurre rápidamente, en las primeras semanas, mientras que este fenómeno ocurre gradualmente en pacientes que toleran el injerto.

En estudios animales se ha puesto de manifiesto que las células del endotelio vascular y posiblemente también las del epitelio biliar (no los hepatocitos), son

capaces de presentar antígenos. Antígenos clase II son inducidos en estas estructuras durante los episodios de rechazo pudiendo estar implicadas en un proceso de “segunda” presentación de antígeno, dando lugar a una estimulación inmune permanente.

La presentación de antígenos MHC alogénicos al sistema inmune del huésped da lugar a la activación de las células T capaces de secretar linfocinas que infiltran y orquestan la respuesta efectora del rechazo. Este papel se ha asociado tradicionalmente a células T CD4+, aunque hay evidencia de que también las células CD8+ están también implicadas. La respuesta efectora que actúa es hipersensibilidad de tipo retardado, con reclutamiento de otras células inflamatorias y secreción de anticuerpos.

EL PAPEL DE LAS CÉLULAS T EN EL INJERTO HEPÁTICO HUMANO

Las células T son el tipo de células más común que infiltran el hígado humano trasplantado durante el episodio de rechazo. Tanto las células T helper (CD4+) como las células T supresoras (CD8+), se acumulan en los tractos portaes durante el rechazo e infiltra el epitelio biliar y el endotelio vascular de los principales sitios diana del proceso de diana.

La presencia predominantemente de células CD4+ infiltrando las estructuras diana, se ha asociado con episodios de rechazo reversible, mientras que un infiltrado predominantemente CD8+ se asocia a episodios de rechazo más severos, que pueden llegar a progresar a la destrucción masiva de conductos biliares (vanishing bile duct syndrome).

La mayoría de las células infiltrantes expresan el antígeno CD45 RO, creándose células memoria y también expresan marcadores de activación como HLA-DR y receptores de IL-2 secretados a bilis en los episodios de rechazo.

Un análisis funcional de los clones de células T que intervienen el proceso de rechazo han demostrado actividad proliferativa y citotóxica hacia los antígenos MHC clase I. *In vivo* estas células probablemente se adhieren al epitelio biliar y al endotelio vascular a través de moléculas adhesivas como ICAM-1, dando lugar a la lisis celular.

Las células T se acumulan en el lugar de rechazo por continua migración como respuesta a la secreción local de factores quimiotácticos o por proliferación de factores de crecimiento. Se detecta un aumento de células T circulantes, así como en el hígado, tanto CD4+, como CD8+.

La detección de actividad quimiotáctica en bilis durante el episodio de rechazo sugiere que los factores quimiotácticos se reflejan a nivel local.

OTROS LEUCOCITOS

Otras células pueden actuar como células efectoras: gran cantidad de monocitos, neutrófilos y eosinófilos y estas células pueden tener una función efectora importante. Los neutrófilos aparecen en bilis durante los episodios de rechazo. Los neutrófilos tras un trasplante hepático se activan rápidamente antes del comienzo de un episodio de rechazo y secretan grandes cantidades de radicales superóxido y enzimas proteolíticas, las cuales causan daño tisular. La actividad de los neutrófilos es suprimida con altas dosis de corticoides.

La detección de niveles elevados de niveles de monokinas como TNF alfa e IL-1 y su detección inmunohistoquímica en el infiltrado portal durante el rechazo sugiere el papel efector de los monocitos/macrófagos activados.

MECANISMOS HUMORALES

Aunque los injertos hepáticos son menos susceptibles al daño por anticuerpos linfocitotóxicos que otros órganos, hay crecientes evidencias que implican mecanismos humorales en la patogénesis del rechazo fulminante.

Diversos estudios han publicado niveles elevados de anticuerpos citotóxicos anti clase I en pacientes con rechazo, y cantidades significativas de inmunoglobulinas, especialmente IgM, están depositadas en las paredes arteriales del hígado rechazado. Asimismo, se ha evidenciado secreción de IgG y particularmente IgM en el hígado durante los episodios de rechazo agudo.

Los acontecimientos celulares que dan lugar al rechazo agudo en el trasplante hepático pueden desarrollarse de la siguiente manera:

* Las células presentadoras de antígeno (que incluye las células dendríticas y células Kupffer y subsecuentemente células del epitelio biliar y del endotelio hepático) que presentan células T con antígenos CD4+ (y posiblemente CD8+), en presencia de factores coestimuladores como la interleukina I.

* Estas células T se activan y secretan IL-2 y otras citokinas dando lugar a una proliferación clonal, diferenciación y reclutamiento de células T. Alguna de esas

células T tienen funciones inmunoreguladoras, mientras que otras tienen potencial citotóxico.

* La reacción inmunológica da lugar a una intensa respuesta inmunológica durante la cual las citocinas pro-inflamatorias dan lugar a un aumento de antígenos MHC en el injerto y a la expresión de moléculas de adhesión que atraen y activan otras células efectoras.

* El daño de injerto es producido por células T citotóxicas dirigidas a los antígenos MHC y la cascada inflamatoria generalizada que incluye eosinófilos, macrófagos y neutrófilos.

1.7.2 ASPECTOS CLINICOS Y ANATOMOPATOLOGICOS DEL RECHAZO EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO

El rechazo agudo es la complicación más frecuente del trasplante hepático.

Se **define** como la disfunción de la bioquímica hepática (más de un 20% de incremento en los niveles de bilirrubina sérica o de las transaminasas durante un periodo de más de 24 horas), confirmado en todos los casos con una histología característica.

Los hallazgos **clínicos** son: ictericia, fiebre y descenso en la excreción de bilis por el tubo en "T".

Un detalle a tener en cuenta para entender los capítulos posteriores, y sin relación con el rechazo agudo, es el Grado Child, un sistema de estadificación usado para evaluar el pronóstico de una enfermedad hepática crónica y que se utiliza, junto a otros parámetros (MELD) en la decisión de la necesidad de un trasplante hepático a un paciente.

Emplea cinco criterios clínicos de la enfermedad hepática, siendo medido cada criterio del 1-3. Estos criterios son: Bilirrubina total, albúmina sérica, INR/tiempo de protrombina, ascitis y encefalopatía hepática. La suma total de todos los criterios da una puntuación. El Grado Child se divide en tres A, B y C según la puntuación obtenida.

CLASIFICACION ANATOMOPATOLÓGICA

La clasificación de grado de rechazo se basa en la clasificación de Banff (Canada, 1995)

1. No rechazo
2. Leve (Grado I): Infiltrado de rechazo leve, en una minoría de los espacios porta y limitado a los mismos.
3. Moderado (Grado II): Infiltrado de rechazo que afecta a la mayoría o a todos los espacios porta)
4. Severo (Grado III): Infiltrado de rechazo como en el grado II, que se extiende a las áreas periportales y/o inflamación perivena centrolobulillar moderada a severa asociada a necrosis hepatocitaria perivena centrolobulillar.

No rechazo:

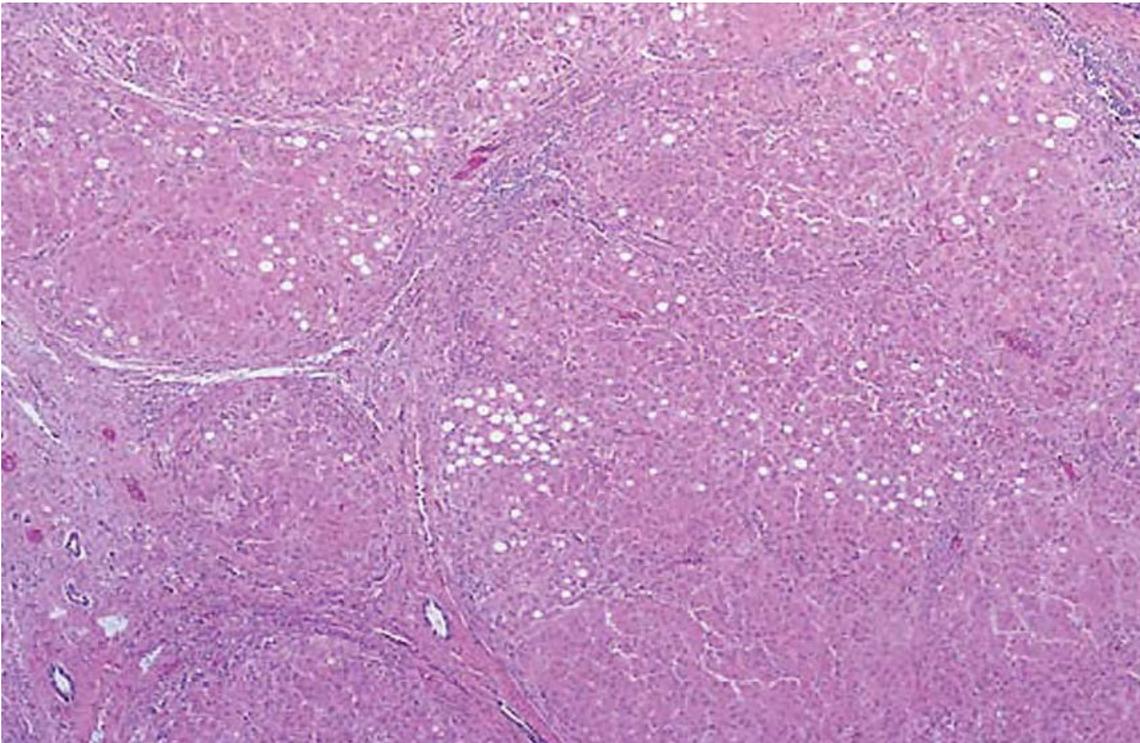


Fig. 10: Imagen anatomopatologica de espécimen sin rechazo

Leve (Grado I):

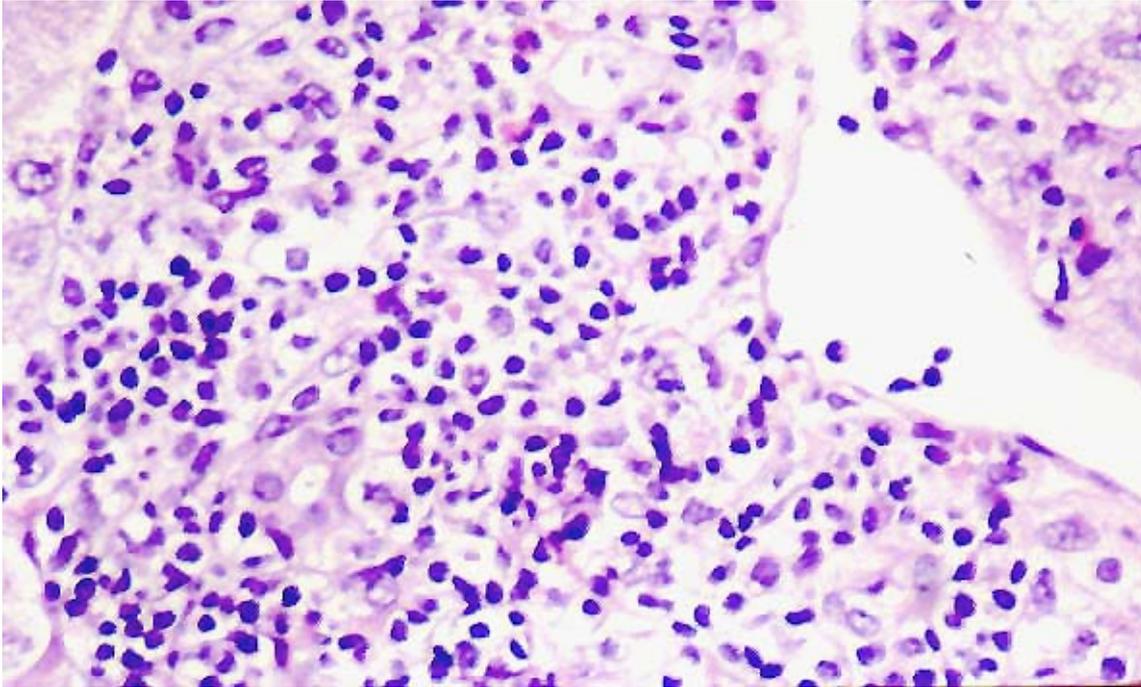


Fig. 11: Imágen anatomopatológica de espécimen con rechazo leve

3. Moderado (Grado II)

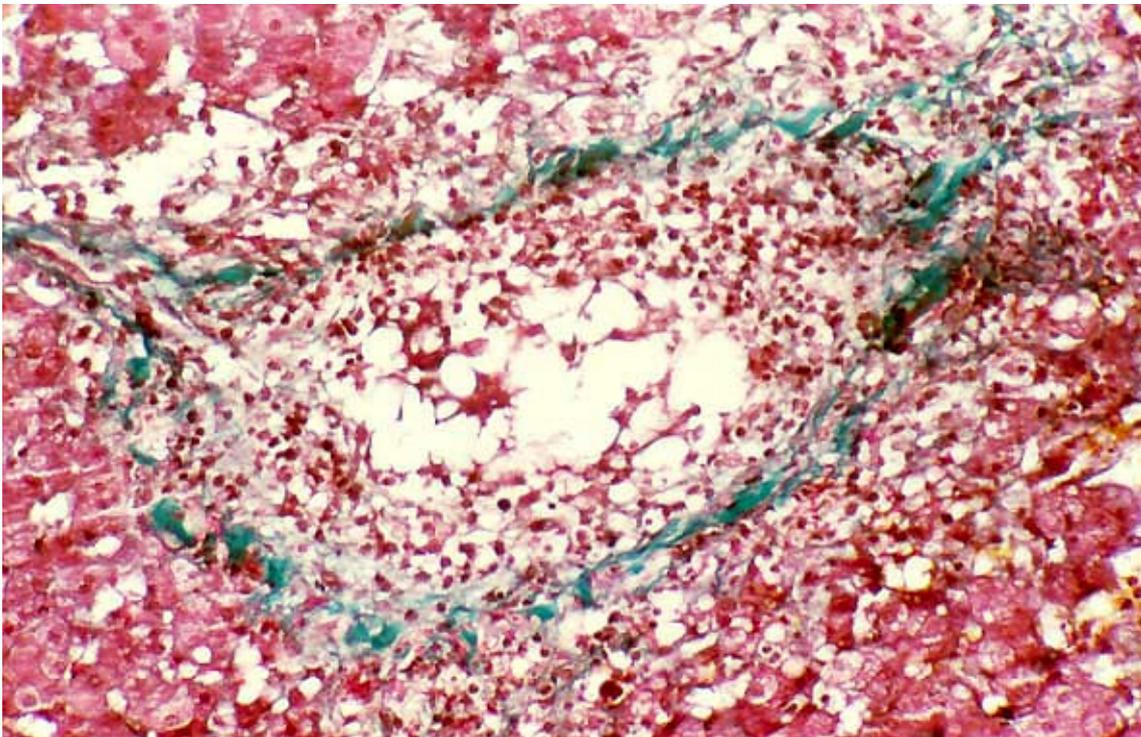


Fig. 12: Imágen anatomopatológica de espécimen con rechazo moderado

4. Severo (Grado III)

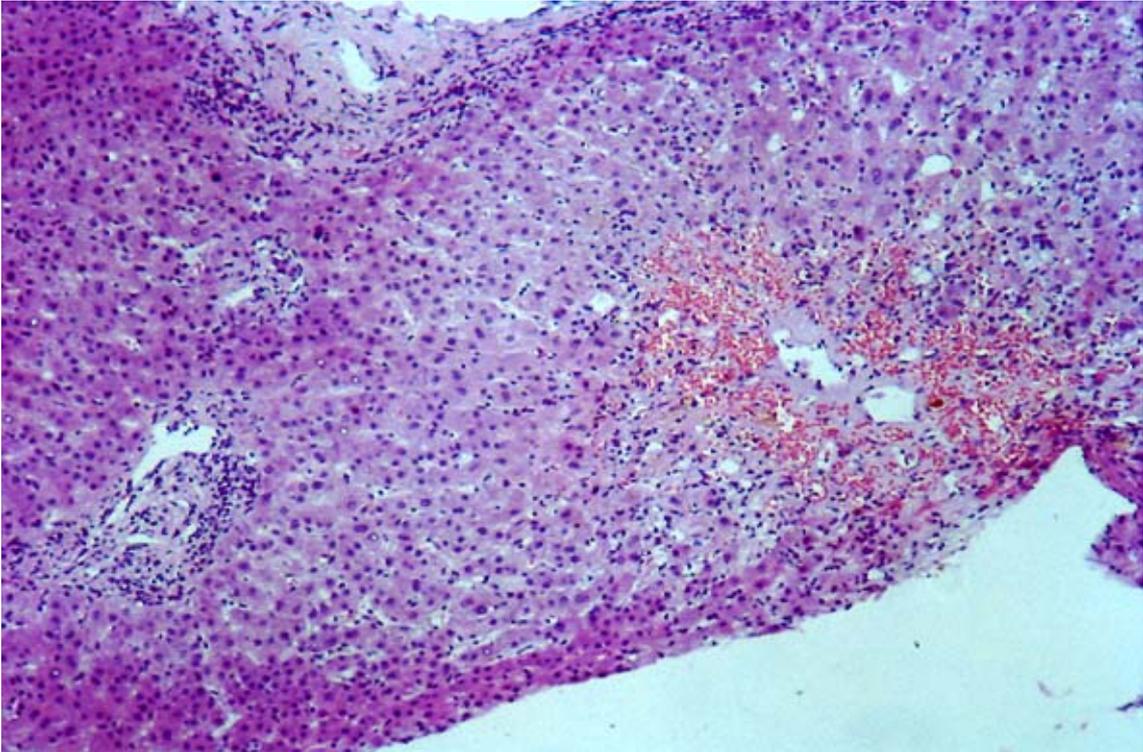


Fig. 13: Imagen anatomopatológica de espécimen con rechazo severo.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Pese a los avances en el manejo terapéutico y clínico del trasplante hepático, el rechazo agudo sigue limitando la vida del injerto. Según diversas series se estima una incidencia del 7 al 42%.

El rechazo puede ser definido como el daño del injerto producido por la respuesta del sistema inmune del receptor al hígado trasplantado y que puede dar lugar a diferentes patrones clínicos. El término “rechazo agudo” hace referencia normalmente, al curso clínico de episodio de rechazo, pero está, a menudo, basado en los hallazgos histológicos, presentando infiltrado inflamatorio, colangitis y endotelitis indicativos de rechazo agudo. Asimismo puede presentar arteriopatía y ductopenia, indicativos, asimismo, de rechazo agudo.

Los hallazgos clínicos, los tests de función hepática (bilirrubina, fosfatasa alcalina, GOT...) pueden sugerir la de rechazo agudo, pero no son específicos. La prueba principal para el diagnóstico de rechazo es la biopsia percutánea del injerto hepático. Sin embargo, la biopsia puede tener complicaciones como, por ejemplo, el sangrado en pacientes con coagulopatía.

El proceso de rechazo es una cascada inflamatoria y los acontecimientos inmunológicos que acompañan a cada paso del proceso, pueden ser potencialmente monitorizados como índices de activación inmune y rechazo. Diversos marcadores inflamatorios han sido estudiados a tal efecto: interferón-gamma, beta-2 microglobulina, neopterina, IL-2R....

Un marcador serológico de rechazo agudo que pudiera ser medido rutinariamente en los pacientes, sería de gran beneficio en el manejo de la disfunción del injerto. Así, los distintos tests inmunológicos jugarían un papel importante.

Dado que la respuesta inflamatoria del rechazo está centrada en los conductos biliares de pequeño tamaño, la secreción biliar ofrece acceso directo al lugar donde se centra el proceso de rechazo. En aquellos pacientes que presentan un drenaje biliar externo, es posible monitorizar los niveles de esos marcadores en bilis. Diversos estudios han demostrado que el análisis en bilis proporciona una detección más precisa de la activación inmune en el injerto hepático que los tests serológicos.

El rechazo agudo se asocia con una abundante cantidad de diferentes proteínas en suero antes o durante el episodio de rechazo agudo. La función de estas proteínas depende de su presencia en suero: citocinas, ligando de receptores, hormonas... La función de estas proteínas halladas en suero es diversa: factores de transcripción, respuesta a stress, proteínas de degradación, metabolismo lipídico, activación del complemento y función inmune, adhesión celular, factores de crecimiento y señales de transducción.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La IL-2 tiene un papel clave en el proceso de rechazo agudo en el trasplante hepático. Es producida por los linfocitos T helper y uno de sus efectos es estimular la proliferación y maduración de los linfocitos T citotóxicos, efectores de la destrucción del injerto. Además los inmunosupresores ejercen su efecto inhibiendo la producción y secreción de IL-2.

Las células T deben adherirse a la célula diana antes de poder reaccionar con los antígenos, un proceso mediado por receptores de adherencia de linfocitos, los cuales interactúan con los ligandos ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3. Es de particular interés la vía LFA/ICAM-1 dado que la expresión de ICAM-1 es regulada por citocinas proinflamatorias. En el hígado normal, la expresión de ICAM-1 es poca, pero durante el episodio de rechazo del injerto, se induce la expresión de ICAM-1 en las estructuras diana. Esta expresión persiste, aumenta o disminuye según la respuesta al tratamiento inmunosupresor.

La hipótesis del presente trabajo se basa en que la determinación de IL-2 e ICAM-1 puede ayudar al diagnóstico del rechazo agudo en el trasplante hepático.

Pensamos que su determinación puede diferenciar los pacientes afectados de rechazo de los que no y de los pacientes con otras complicaciones de diversa índole.

Con su determinación pensamos es posible obtener un diagnóstico precoz a fin de instaurar un tratamiento lo antes posible y unos mejores resultados en el tratamiento del rechazo agudo en el trasplante hepático.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL:

*Valorar la utilidad de dos biomarcadores: **IL-2** (interleukina-2) e **ICAM-1** (molécula de adhesión intercelular-1) en sangre y bilis en el diagnóstico del rechazo en el trasplante hepático.*

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- 1) Valorar el comportamiento secuencial de estos biomarcadores.
- 2) Comprobar el descenso de estos biomarcadores en el grupo rechazo tras la instauración del tratamiento inmunosupresor.
- 3) Analizar el comportamiento de IL-2 e ICAM-1 en pacientes con complicaciones para valorar su utilidad en el diagnóstico diferencial con el rechazo agudo.

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL

5.1.1 TAMAÑO MUESTRAL Y GRUPOS DE ESTUDIO

En el presente trabajo se analizan los niveles de **IL-2** y de **ICAM-1** en sangre y bilis de 90 pacientes sometidos a trasplante hepático en la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Virgen del Rocío. Sevilla, en un periodo comprendido de 2004 a 2009. Todos los pacientes estaban incluidos en lista de espera de trasplante hepático según los requisitos de la ONT.

La calidad de la metodología del trabajo se realizó según las instrucciones del Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Intervention and de Cochrane Hepatobiliary Group Module.

Asimismo el protocolo del estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y firma del consentimiento informado.

Se trata de un estudio prospectivo no randomizado, observacional de cohortes.

Los pacientes incluidos en este estudio se han dividido en tres grupos:

1) Pacientes con función del injerto **estable**: los pacientes incluidos en este grupo están clínicamente bien, sin fiebre, con tests de función hepática estables y con cultivos negativos y ausencia de rechazo agudo. A este grupo lo denominamos "GRUPO ESTABLE"

2) Pacientes con **rechazo agudo**: se definen como aquellos con disfunción de la bioquímica hepática (más de un 20% de incremento en los niveles de bilirrubina sérica o de las transaminasas durante un periodo de más de 24 horas), confirmado en todos los casos por una histología característica. A este grupo lo denominamos "GRUPO RECHAZO"

3) Pacientes sin rechazo y afectados de **otras complicaciones**: pacientes con disfunción del injerto de una causa específica o no, sin datos histológicos de rechazo. Se incluyen aquellos pacientes con complicaciones infecciosas, malfunción del injerto, y otras. A este grupo lo denominamos "GRUPO COMPLICACIONES"

Se decidió establecer estos tres grupos claramente definidos para evitar interferencias en los datos si confluían en el mismo grupo pacientes con distintas circunstancias: rechazo + complicaciones, estable en un primer momento pero con complicaciones en los primeros días...

En los tres grupos se realizó **BIOPSIA HEPÁTICA** para confirmar la existencia o no de rechazo hepático. En el grupo de pacientes afectados de **rechazo** se realizó la biopsia hepática en el momento en que apareció la sintomatología. En el grupo de **complicaciones** se realizó cuando aparecieron los síntomas y en el grupo **estable o grupo control** se realiza entre el día 7 y 10.

En el grupo **complicaciones** se realizaron diversas pruebas para diagnosticar estas complicaciones: ECO-DOPPLER arteria hepática, cultivo de bilis, hemocultivo, serología, cultivo para CMV, TAC ABDOMINAL, colangiografía transkher, etc...

Se estableció un **periodo de seguimiento de un mes.**

Criterios de inclusión: - Periodo de seguimiento de un mes.

- Pacientes con enfermedad hepática aguda o crónica incurable de manera irreversible con otros tratamientos, incluido fallo hepático fulminante.
- Trasplante ortotópico hepático de donante cadáver isogrupo con injerto completo.

Criterios de exclusión: - Trasplante pediátrico.

- Pacientes con seguimiento inferior a un mes.
- Pacientes que requieran retrasplante durante el periodo de estudio.
- Paciente con trasplante parcial o donante vivo.

5.1.2 PROTOCOLO PERITRASPLANTE

Todos los pacientes ingresaron 4 horas previas al TOH y se sometieron a profilaxis antibiótica con amoxicilina-clavulánico i.v.

El **protocolo de inmunosupresión general** es:

- 500 mgr de 6-metil prednisolona intraoperatorios
- Inducción (por sonda nasogástrica): **Ciclosporina** 20 mgr/kg/día VO. Posteriormente la dosis de ciclosporina varía para mantener los niveles valle en sangre entre 300 y 400 ngr/cc durante la 1ª semana y posteriormente entre 250 y 350 ngr/cc
- Inducción (por sonda nasogástrica): **Micofenolato mofetilo** 1 gr / 12 hrs VO. Se reduce a partir de la 3ª semana a 1gr/ día.
- Inducción (por sonda nasogástrica) **Prednisona** 20 mgr/ 24 hrs VO. Se reduce progresivamente hasta la retirada al tercer mes

Todos los pacientes ingresaron en la Unidad de Cuidados Intensivos tras el TOH y pasan a Planta de Hospitalización cuando alcanzan la estabilidad clínica.

En caso de **RECHAZO AGUDO**, el protocolo de tratamiento es:

- Optimización de la inmunosupresión.
- Si no hay mejoría, bolos de 6 metil prednisolona i.v. 1 gr x 3

5.1.3 Características comunes a todos los pacientes:

- Tuvieron tiempos de isquemia similares (entre 4-8 horas)
- Se realizó la misma técnica, hepatectomía con preservación de cava: piggy-back
- Se empleó la misma solución de preservación: WISCONSIN
- Anastomosis coledo-coledocianas termino terminales con tubo de kher.
- Se controlaron los niveles de inmunosupresores cada 48 horas.

- Se utilizó como tratamiento inmunosupresor inhibidores de la calcineurina (CICLOSPORINA) + micofenolato mofetil + prednisona.
- Las indicaciones de Trasplante Hepático en nuestra serie son:
 - Cirrosis alcohólica
 - Cirrosis autoinmune
 - Atresia vía biliar
 - Cirrosis biliar primaria
 - Cirrosis biliar secundaria
 - Fallo hepático fulminante
 - Cirrosis criptogenética
 - Cirrosis virus hepatitis C
 - Cirrosis virus hepatitis B
 - Cirrosis alcohólica + virus hepatitis C
 - Cirrosis alcohólica + virus hepatitis B
 - Cirrosis alcohólica + virus hepatitis B y C

5.2. METODOLOGÍA

El estudio de IL-2 e ICAM-1 se puede realizar en sangre periférica y en otros sitios donde se expresen estas moléculas, como en el tejido hepático (biopsias). En nuestro estudio, se va a determinar en sangre y en bilis.

Como pilotaje del presente trabajo se analiza la evolución clínica en pacientes previos al estudio, y en base al comportamiento clínico en los pacientes con rechazo, con complicaciones y con evolución estable, se decidió realizar extracciones de sangre y bilis los días 5, 10, 15 y 20 tras la realización del trasplante hepático (5 cc).

La sangre fue colectada en un tubo EDTA y la bilis en un tubo normal, sin conservantes. La recogida de estas muestras se realizaban a primera hora de la mañana, se transportaban en hielo y se almacenaban de forma inmediata en el servicio de inmunología.

La obtención de la muestra de sangre no fue problemática, pero la obtención de la muestra de bilis no siempre fue posible, sobre todo tras el clampaje del tubo de kher (aunque se desclampase a fin de obtener la muestra) y la reinstauración de la circulación enterohepática

5.2.1 VARIABLES DEL ESTUDIO

5.2.1.1 a) VARIABLES PRINCIPALES

- Niveles de Receptores de Interleukina-2 en sangre (pm/l)
- Niveles de Receptores de Interleukina-2 en bilis (pm/l)
- Niveles de ICAM-1 en sangre (ngr/ml)
- Niveles de ICAM-1 en bilis (ngr/ml)

5.2.1.2 b) VARIABLES SECUNDARIAS

- Bilirrubina(Bt) (mg/dl)
- Aspartato aminotransferasa (GOT) (U/L)
- Alanino aminotrasferasa (GPT) ((U/L)
- Gamma glutamiltranspeptidasa (GGT) (U/L)
- Fosfatasa alcalina (ALP) (U/L)
- Colinesterasa (U/L)
- Niveles de ciclosporina.

Estas muestras fueron remitidas al Servicio de Inmunología inmediatamente para su procesamiento. Creímos fundamental comparar toda esta información con **OTROS PARÁMETROS** (bilirrubina, GOT, GPT, GGT, ALP colinesterasa, niveles de anticalneurinicos), utilizados en la práctica clínica diaria para el control del paciente.

En el protocolo postoperatorio habitual del paciente trasplantado, estos parámetros son evaluados periódicamente. No sólo han sido pruebas establecidas para nuestro estudio clínico

5.2.2 PROCESAMIENTO EN EL SERVICIO DE INMUNOLOGIA

En el Servicio de Inmunología se procede a la determinación mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) de los niveles de receptor de IL-2, que es la forma indirecta de cuantificar los niveles de interleukina-2, y de molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) circulante en suero y bilis de pacientes sometidos a trasplante hepático.

PROCESAMIENTO DE IL-2 E ICAM-1 MEDIANTE ELISA

Se realiza mediante un **set standard** que consiste en un sándwich formado por un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

El material utilizado para conseguir resultados es :

- Placas microonduladas, con multiples pocillos
- Un lector de microplacas capaz de medir absorbancia a 450 nm.
- Pipetas ajustables que midan volúmenes comprendidos entre 2 microlitros y 1 mililitro.
- Agua desionizada.
- Solución amortiguadora: Bicarbonato de sodio.
- Diluyente: Suero fetal bovino al 10% u otras sustancias.
- Tampón fosfato salino.
- Sustancia limpiadora.
- Amortiguador limpiador.
- Botella limpiadora.
- Solución TMB: agregado del sustrato de la enzima. (Reactivo color)
- Solución de parada (ácido sulfúrico)

- Papel para registrar el análisis de datos.
- Tubos para preparar diluciones standard.
- Cronómetro.
- Papel absorbente.

Almacenamiento de las muestras

- Kit de almacenamiento a 4°C.
- Tras la reconstitución y liofilización standard con los diluyentes, dividimos equitativamente en viales de polipropileno y almacenamos las muestras a -70°C. Evitamos congelar/descongelar de forma repetida o puede perder su actividad.
- Antes de utilizar las muestras, llevamos los componentes a la temperatura ambiente (18-25°C). Hasta que se complete el estudio, retornamos todos los componentes a las condiciones de almacenaje apropiadas.

Recogida y manipulación de las muestras

Cultivo de células sobrenadantes: Si es necesario, centrifugamos para extraer detritus previo al análisis. Las muestras pueden ser guardadas a <-20°C.

Suero: Usamos un tubo para separar el suero y extraer coágulos. Después centrifugamos durante 10 minutos a 1,000 X g. Quitamos la capa de suero y estudiamos la muestra inmediatamente o guardamos el ejemplar de suero a <-20°C. Las muestras de plasma deben ser claras y no hemolizadas.

Preparación de las muestras

No mezclamos reactivos de diferentes sets o lotes. Todos los reactivos deben diluirse inmediatamente antes de ser utilizados.

- Diluimos el anticuerpo unido a la enzima 1: 200 en la solución amortiguadora. En una placa, diluimos 60 microlitros de anticuerpos en 11.94 ml de solución amortiguadora.
- Reconstituimos la muestra liofilizada standard con 0.2 ml del diluyente y mezclamos bien. Dejamos reposar a temperatura ambiente 15 minutos y mezclamos de nuevo.

- Antes de utilizar, preparamos 1.000 microlitros de sustancia de parada y añadimos a la mezcla a una concentración de 500 pg/ml, de la solución guardada en el diluyente.
- Diluimos el reactivo 1: 1000 con el diluyente. Por cada placa, diluimos 12 microlitros de reactivo en 11,99 de diluyente.

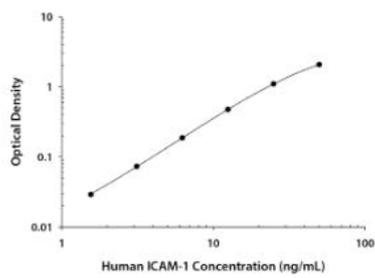
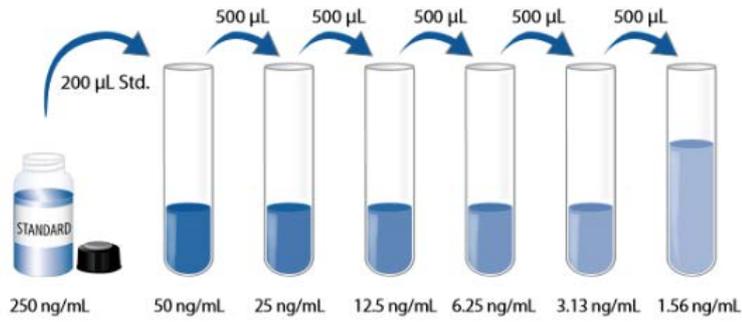
Procedimiento del estudio

- Un día antes de la realización del ELISA, diluimos el anticuerpo en la solución amortiguadora. Añadimos 100 microlitros de este anticuerpo a todos los pocillos de la placa del set. Incubamos la placa durante toda la noche a 4°C.
- Es importante que todos los reactivos estén a temperatura ambiente antes de ser utilizados. Es importante que todas las muestras se procesen por duplicado o triplicado así como es importante realizar una curva standard por cada estudio realizado.
- Lavamos cada placa cuatro veces al menos con 300 microlitros de amortiguador limpiador cada pocillo y secamos con papel absorbente.
- Para bloquear una unión no específica y reducir problemas, añadimos 200 microlitros de diluyente por pocillo.
- Sellamos la placa e incubamos en la centrifugadora durante una hora a 200 rpm.
- Preparamos 1.000 microlitros de la solución standard a una concentración de 500 pg/ml con el diluyente. Preparamos seis dobles series de diluciones de la dilución standard de 500 pg/ml en tubos separados. Tras la dilución, las concentraciones standard de IL-2 humana son 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml, 15.6 pg/ml y 7.8 pg/ml respectivamente El diluyente sirve como muestra control (0 pg/ml). En el caso de ICAM-1 el proceso es igual, pero las mediciones se obtuvieron en ngr/ml.
- Lavamos cada placa cuatro veces con la solución limpiadora.
- Añadimos 100 microlitros de solución standar y muestra a los pocillos.
- Sellamos cada placa y la incubamos en la centrifugadora durante dos horas.
- Lavamos cada placa cuatro veces con solución limpiadora.

- Añadimos 100 microlitros de solución de anticuerpos diluïdos a cada pocillo, sellamos la placa e incubamos en la centrifugadora durante una hora.
- Limpiamos la placa cuatro veces con solución limpiadora.
- Añadimos 100 microlitros de reactivo a cada pocillo, sellando la placa e incubándola en la en la centrifugadora durante 30 minutos.
- Limpiamos la placa cinco veces de forma minuciosa con solución limpiadora. Fue el lavado final y concienzudo para evitar errores.
- Añadimos 100 microlitros de TMB (reactivo color) e incubamos en la oscuridad durante 15-30 minutos o hasta que obtuvimos el color deseado. Los pocillos que reaccionaron cambiaron a color azul. En este paso no fue necesario sellar la placa.
- Detuvimos la reacción añadiendo la solución de parada en cada pocillo. En este momento cada pocillo cambi3 su color de azul a amarillo.
- Se ley3 la absorci3n a 450 nm en 30 minutos. Si el lector puede leer hasta 570 nm, la lectura mejora.

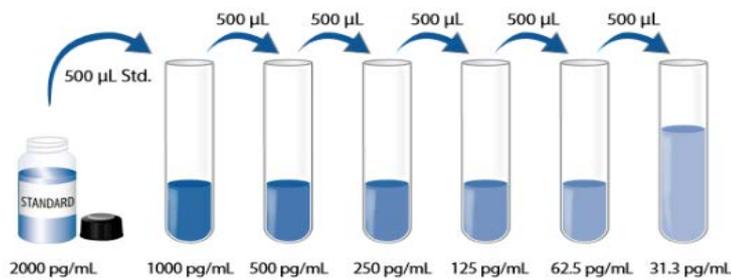
La incubaci3n 3ptica de las muestras depende de las condiciones del laboratorio y de los rangos de los lectores de placas de ELISA.

PROCESAMIENTO ICAM-1

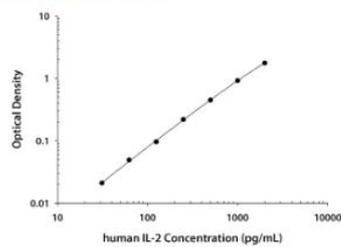


(ng/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.008 0.011	0.010	—
1.56	0.037 0.041	0.039	0.029
3.13	0.082 0.084	0.083	0.073
6.25	0.196 0.198	0.197	0.187
12.5	0.475 0.492	0.484	0.474
25	1.095 1.116	1.106	1.096
50	2.062 2.100	2.081	2.071

PROCESAMIENTO DE IL-2



SERUM/PLASMA ASSAY



(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.035 0.031	0.033	—
31.3	0.054 0.054	0.054	0.021
62.5	0.084 0.081	0.082	0.049
125	0.121 0.137	0.129	0.096
250	0.247 0.258	0.252	0.219
500	0.474 0.489	0.482	0.449
1000	0.956 0.945	0.950	0.917
2000	1.785 1.799	1.792	1.759

5.2.3 METODO ESTADÍSTICO

Una vez descritas las características de los pacientes incluidos en el estudio, pasamos a ver la determinación de los parámetros IL-2 e ICAM-1 en sangre y bilis y su análisis estadístico.

Se ha realizado un estudio estadístico descriptivo de las variables según los grupos de estudio. Se usó para representarlos gráficamente diagramas de cajas y bigotes.

Se realizó una comprobación de los grupos de estudio mediante la H de Kruskall-Wallis. Para las comparaciones múltiples se usó la prueba U Mann-Whitney, aplicando la corrección de Bonferroni.

A nivel de significación estadística, se estableció en $p < 0.05$. Los datos fueron analizados con el software IBM^R SPSS^R Statistics 19.

ANALISIS CURVAS ROC

La toma de decisiones clínicas es un proceso extremadamente complejo en el que deberá finalmente ser valorada la utilidad para el manejo del paciente de cualquier prueba diagnóstica. En este contexto, es imprescindible conocer detalladamente la exactitud de las distintas pruebas diagnósticas que se realizan al paciente. Por este motivo, decidimos realizar el estudio de las **curvas de ROC** y determinar la sensibilidad y especificidad del análisis de IL-2R e ICAM-1 en sangre y bilis.

Generalmente, la exactitud diagnóstica se expresa como sensibilidad y especificidad diagnósticas. La **sensibilidad** es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo respecto a la condición que estudia la prueba. La **especificidad** es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como negativo.

Un primer grupo de métodos para construir la curva ROC lo constituyen los llamados métodos *no paramétricos*. Posteriormente se procede a la elección de distintos *niveles de decisión o valores de corte* que permiten una clasificación de los valores de la prueba según sean superiores o inferiores al valor elegido.

Respecto al análisis de las **curvas de ROC** en nuestro estudio para analizar la sensibilidad y especificidad de nuestros biomarcadores, establecemos tres niveles de corte: 1) nivel A: nivel próximo a niveles normales; 2) nivel B: nivel intermedio entre el nivel normal y el nivel más elevado y 3) nivel C: nivel al

6.1 RESULTADOS EN CUANTO A LA MUESTRA

Como ya comentamos en material y métodos, en este estudio se han incluido 90 pacientes.

En la tabla posteriormente expuesta resumimos las características de los 90 pacientes incluidos en el estudio, divididos en los tres grupos: grupo estable (16 pacientes), grupo rechazo (50 pacientes) y grupo complicaciones (24 pacientes).

6.1.1 VARIABLES DE ESTUDIO

- * *Sexo.*
- * *Edad.*
- * *Indicación del Trasplante hepático.*
- * *Grupo sanguíneo (fundamental para la compatibilidad del injerto).*
- * *Estadío de Chid (A, B o C) pretrasplante de los pacientes.*
- * *Grado de rechazo de los pacientes con rechazo: se divide en Grado I, Grado II y Grado III.*
- * *Injerto óptimo/subóptimo.*
- * *Tipo de anastomosis.*
- * *Reintervenciones si/no.*
- * *Infecciones.*
- * *Tiempo medio de isquemia venosa (minutos).*
- * *Tiempo medio de isquemia arterial (minutos).*

6.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

	RECHAZO (50)	ESTABLE (16)	COMPLICACIONES (24)
SEXO	26 V/ 16	9V/7H	20V/4H
EDAD	46 años (14-61)	41 (20-56)	46 años (32-61)
INDICACION TOH	Cirrosis alcohólica: 20 Cirrosis VHC: 8 FHF: 2 Cirrosis autoinmune:2 Ci alcohólica +VHC: 8 Cirrosis VHB: 4 Ci alcohólica + VHB: 2 Atresia vía biliar: 2 Ci biliar primaria: 2	Cirrosis biliar 2ª: 2 Cirrosis alcohólica: 8 Ci criptogenética: 2 Cirrosis VHC: 2 FHF: 2	Cirrosis alcohólica: 10 Cirrosis VHB: 2 Ci alcohólica + VHC: 2 Ci alcohólica + VHB: 4 Ci alcóh+VHB+VHC: 2 Ci criptogenética: 2 FHF: 2
GRUPO SANGUINEO	A-: 2 0+:12 B+: 6 A+: 28 0-: 2	AB+: 2 0+: 6 A-: 2 0+: 2 A+: 2 B+: 2	A+: 6 0+:12 B: 2 A-: 4
ESTADIO CHILD	Grado A: 4 Grado B: 28 Grado C: 10	Grado A: 5 Grado B: 7 Grado C: 2	Grado A: 4 Grado B: 12 Grado C: 8
GRADO RECHAZO	Grado I: 20 Grado II:14 Grado III: 16		
COMP VASCULARES	2: - Estenosis arteria hepática	NO	NO
INJ SUBOPTIMO	2	NO	2 daño preservación 4 injerto subóptimo 2 malfunción 1ª injerto 2 Sd colostático benigno
ANASTOMOSIS	Coledoco-coledociana en todos	Coledoco-coledociana en todos	Coledoco-coledociana en todos
REINTERVENC	2 complic biliares 4 sangrado	NO	2: sangrado
INFECCIONES	Bacteriana: 22 Bacteriana +vírica: 10 Bacteriana+ fúngica: 8 Bact+ vírica+ fung: 2	Bacteriana: 11 Bacteriana + fúngica: 2	No infecciones: 4 Bacteriana: 10 Bacteriana + fúngica: 4 Bacteriana + vírica: 1 Bact+vírica+fung: 2
ISQ VENOSA	Media: 405 minutos	Media: 420 minutos	Media: 405 minutos
ISQ ARTERIAL	Media: 480 minutos	Media: 460 minutos	Media: 453 minutos
RECHAZO	SI	NO (Biopsia negativa)	NO (Biopsia negativa)

6.2 OTROS PARÁMETROS: DATOS ANALÍTICOS

Resumen del procesamiento de los casos

Vamos a mostrar los resultados tras el estudio estadístico de los distintos parámetros estudiados y utilizados en la práctica clínica habitual: *inhibidores de calcineurina, bilirrubina, GOT, GPT, GGT, ALP y colinesterasa* en los tres grupos: grupo estable, grupo rechazo y grupo complicaciones.

Las variables estudiadas son: Media, Error típico de la media, Intervalo de confianza al 95%(Límite superior y límite inferior), Media recortada al 5%, Mediana, Varianza y Desviación típica.

6.2.1 Descriptivos

INHIBIDORES DE CALCINEURINA	ESTADISTICOS
ESTABLE	
Media	494,63
Error típico de la media	97,83
Intervalo confianza al 95% Límite inferior	279,30
Límite superior	709,96
Media recortada al 5%	469,20
Mediana	389,65
Varianza	114854,49
Desviación típica	338,65
RECHAZO	
Media	508,40
Error típico de la media	56,14
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	394,17
Límite superior	622,64
Media recortada al 5%	491,22
Mediana	457,80
Varianza	107191,42
Desviación típica	327,40
COMPLICACIONES	
Media	590,75
Error típico de la media	146,79
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	243,64
Límite superior	937,85
Media recortada al 5%	581,50
Mediana	507,50
Varianza	172381,3
Desviación típica	415,18

BILIRRUBINA**ESTADISTICOS****ESTABLE**

Media	2,58
Error típico de la media	,21
Intervalo confianza al 95% Límite inferior	2,11
Límite superior	3,05
Media recortada al 5%	2,58
Mediana	2,50
Varianza	,55
Desviación típica	,74

RECHAZO

Media	20,46
Error típico de la media	2,6
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	15,11
Límite superior	25,80
Media recortada al 5%	18,95
Mediana	15,50
Varianza	264,46
Desviación típica	16,26

COMPLICACIONES

Media	10,66
Error típico de la media	2,01
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	14,83
Límite superior	9,68
Media recortada al 5%	7,26
Mediana	97,45
Varianza	9,87
Desviación típica	2,87

GOT**ESTADISTICOS****ESTABLE**

Media	17,50
Error típico de la media	1,33
Intervalo confianza al 95% Límite inferior	14,56
Límite superior	20,43
Media recortada al 5%	17,33
Mediana	16,50
Varianza	21,36
Desviación típica	4,62

RECHAZO

Media	98,94
Error típico de la media	73,03
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	124,85
Límite superior	93,71
Media recortada al 5%	61,00
Mediana	6212,80
Varianza	78,82
Desviación típica	13,00

COMPLICACIONES	
Media	110,00
Error típico de la media	34,09
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	39,47
Límite superior	180,52
Media recortada al 5%	85,55
Mediana	57,00
Varianza	27893,73
Desviación típica	167,01

GPT	ESTADISTICOS
ESTABLE	
Media	45,66
Error típico de la media	4,51
Intervalo confianza al 95% Límite inferior	35,72
Límite superior	55,61
Media recortada al 5%	45,51
Mediana	44,50
Varianza	244,97
Desviación típica	15,65
RECHAZO	
Media	202,21
Error típico de la media	30,74
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	139,90
Límite superior	264,51
Media recortada al 5%	188,06
Mediana	135,00
Varianza	35931,19
Desviación típica	189,55
COMPLICACIONES	
Media	268,08
Error típico de la media	68,25
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	126,88
Límite superior	409,27
Media recortada al 5%	225,70
Mediana	137,50
Varianza	111807,55
Desviación típica	334,37

GGT		ESTADÍSTICOS
ESTABLE		
Media		72,83
Error típico de la media		11,35
Intervalo confianza al 95% Límite inferior		47,84
	Límite superior	97,81
Media recortada al 5%		70,72
Mediana		72,50
Varianza		1546,33
Desviación típica		39,32
RECHAZO		
Media		269,84
Error típico de la media		28,02
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior.....		213,05
	Límite superior.....	326,63
Media recortada al 5%		256,54
Mediana		231,00
Varianza		29852,24
Desviación típica		172,77
COMPLICACIONES		
Media		196,63
Error típico de la media		35,21
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior.....		123,41
	Límite superior	269,86
Media recortada al 5%		186,81
Mediana		142,00
Varianza		27276,24
Desviación típica		165,15

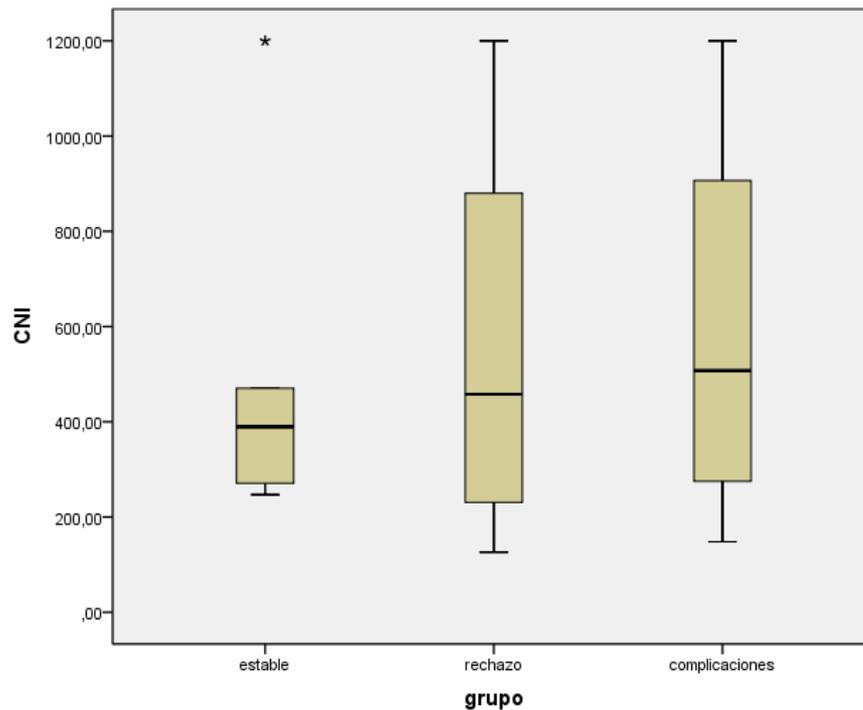
ALP		ESTADÍSTICOS
ESTABLE		
Media		169,33
Error típico de la media		24,31
Intervalo confianza al 95% Límite inferior		115,82
	Límite superior	222,84
Media recortada al 5%		168,31
Mediana		175,50
Varianza		7092,97
Desviación típica		84,21
RECHAZO		
Media		323,73
Error típico de la media		20,63
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior.....		281,93
	Límite superior.....	365,54
Media recortada al 5%		319,15
Mediana		310,00
Varianza		16177,49
Desviación típica		127,19

COMPLICACIONES	
Media	357,08
Error típico de la media	43,03
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	268,06
Límite superior	446,09
Media recortada al 5%	346,09
Mediana	254,00
Varianza	44438,68
Desviación típica	210,80

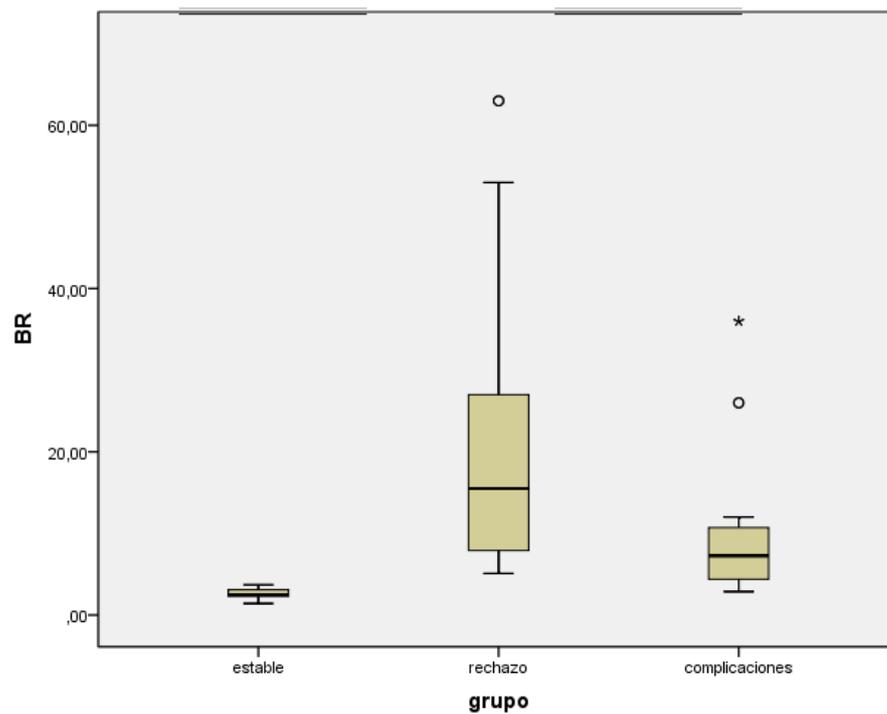
COLINESTERASA	ESTADÍSTICOS
ESTABLE	
Media	3876,00
Error típico de la media	238,21
Intervalo confianza al 95% Límite inferior	3351,68
Límite superior	4400,31
Media recortada al 5%	3869,94
Mediana	4040,00
Varianza	680973,45
Desviación típica	825,21
RECHAZO	
Media	3637,05
Error típico de la media	194,50
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	3242,94
Límite superior	4031,16
Media recortada al 5%	3616,72
Mediana	3534,00
Varianza	1437650,64
Desviación típica	1199,02
COMPLICACIONES	
Media	4061,83
Error típico de la media	275,54
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	3491,82
Límite superior	4631,84
Media recortada al 5%	4056,59
Mediana	3731,00
Varianza	1822209,53
Desviación típica	1349,89

6.2.2 Diagrama de cajas de la distribución de los tres grupos para la LOS INHIBIDORES DE CALCINEURINA Y LA BILIRRUBINA

CNI

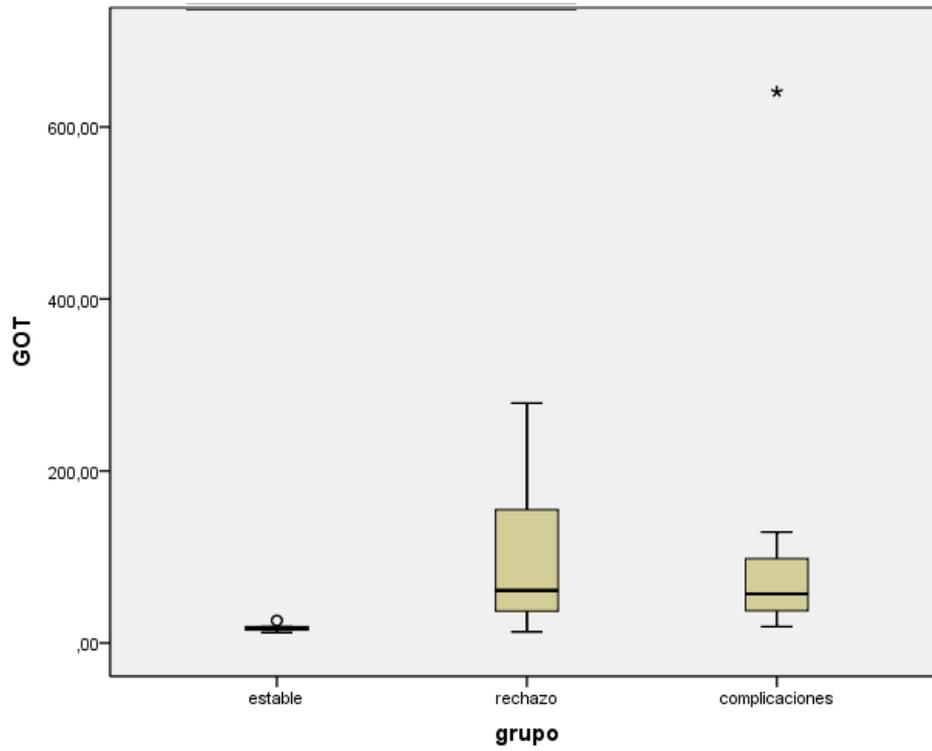


Br

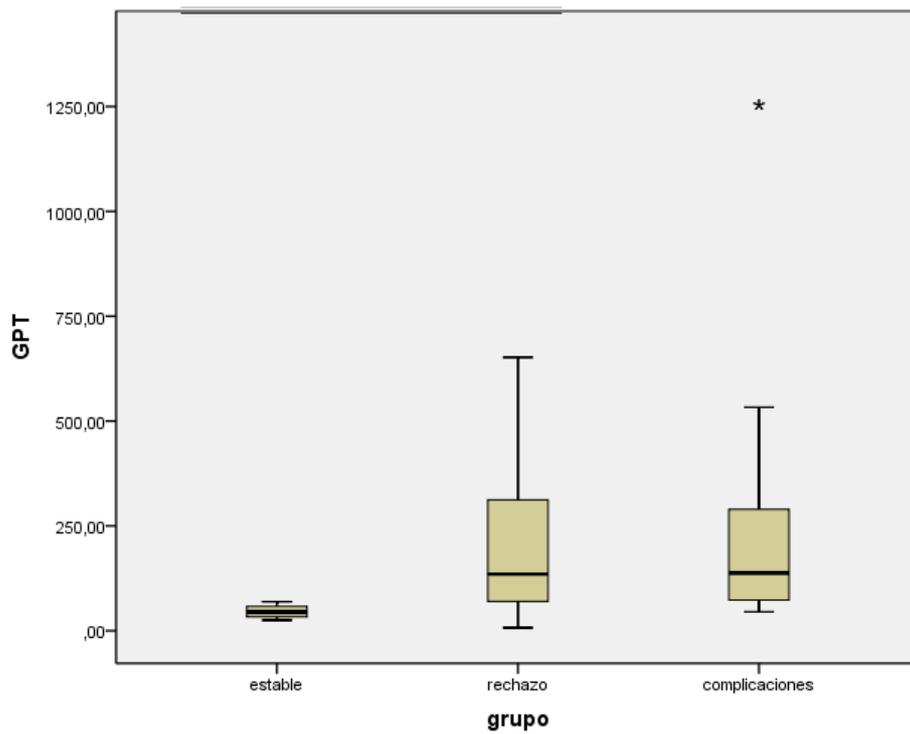


6.2.3 Diagrama de cajas de la distribución de los tres grupos para la GOT y la GPT

GOT

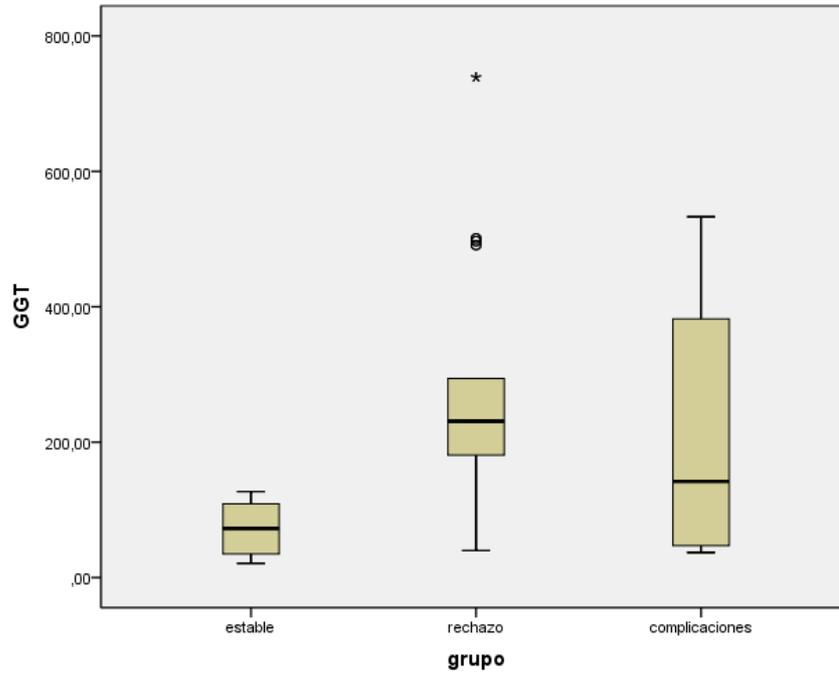


GPT

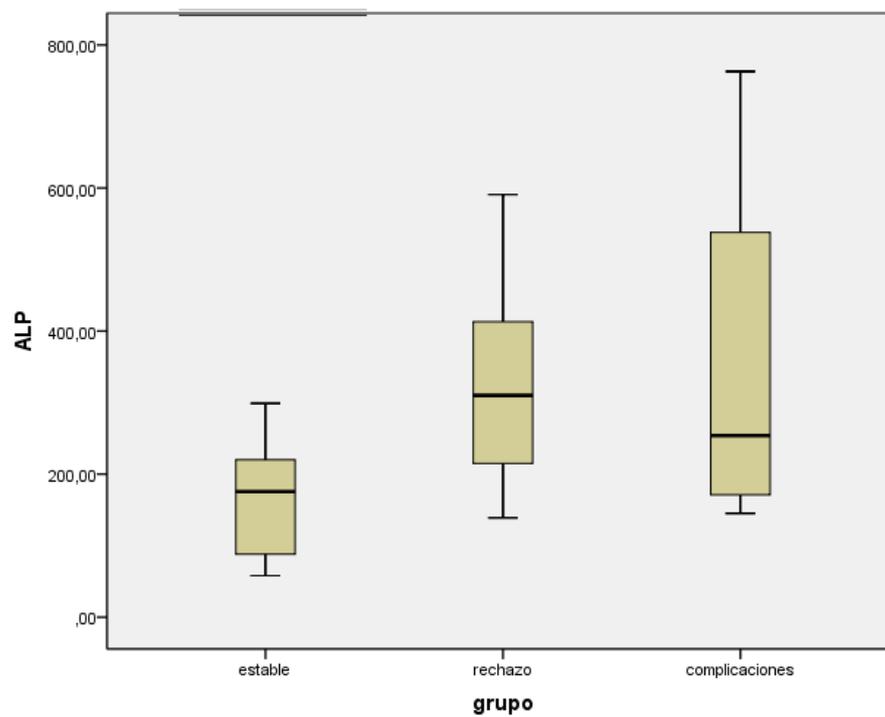


6.2.4 Diagrama de cajas de la distribución de los tres grupos para GGT y ALP

GGT

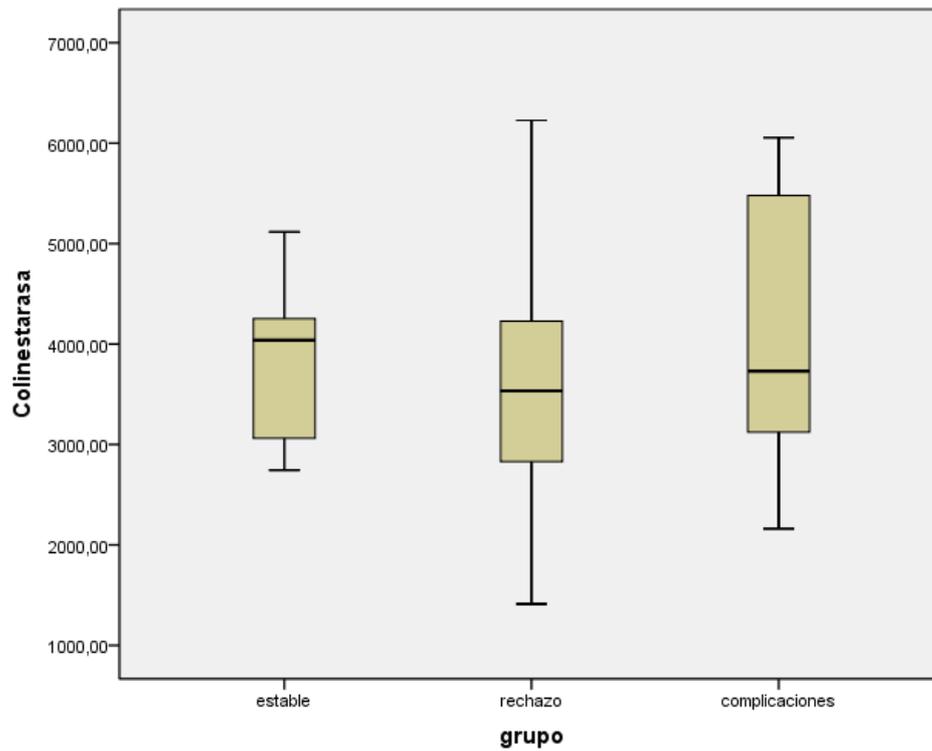


ALP

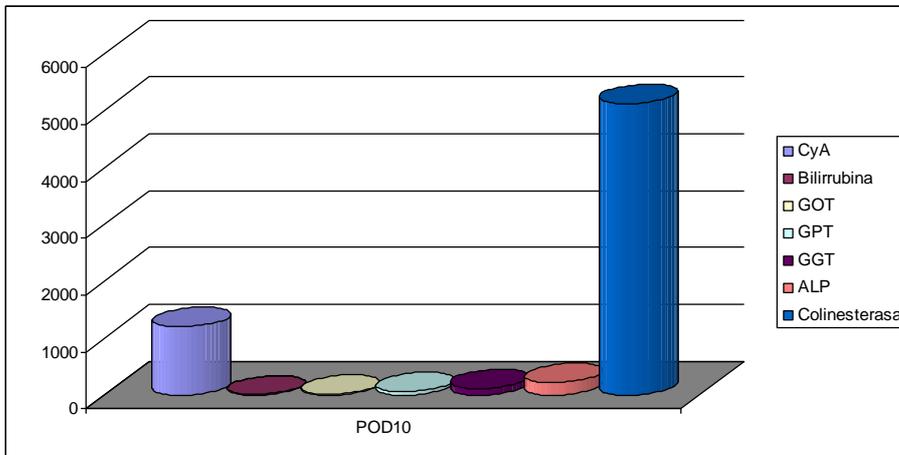


6.2.5 Diagrama de cajas de la distribución de los tres grupos para la COLINESTERASA

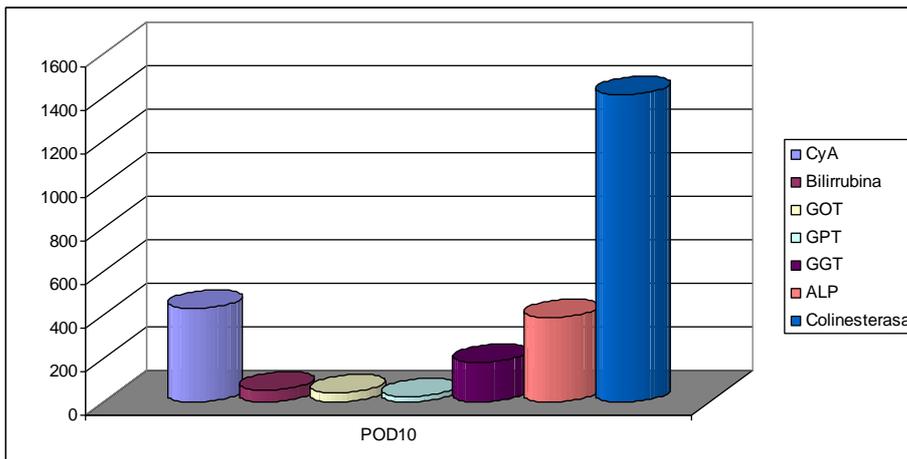
Colinesterasa



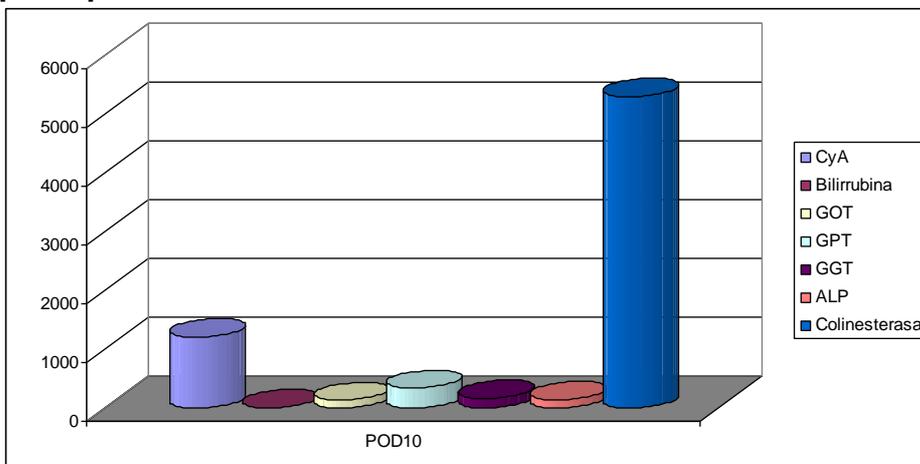
6.2.6 DIAGRAMAS DE BARRAS DE LOS DISTINTOS PARÁMETROS



Representación media en pacientes grupo ESTABLE en el 10º día postoperatorio



Representación media en pacientes grupo RECHAZO en el 10º día postoperatorio



Representación media en pacientes grupo COMPLICACIONES en el 10º día postoperatorio

6.2.7 RESUMEN MEDIA EN LOS TRES GRUPOS 10º DÍA

Media	ESTABLE	RECHAZO	COMPLICACIONES
<i>Bilirrubina</i>	2,58 mg/dl	20,46 mg/dl	10,66 mg/dl
<i>GOT</i>	17,50 U/l	98,94 U/l	110,00 U/l
<i>GPT</i>	45,66 U/l	202,21 U/l	268,08 U/l
<i>GGT</i>	72, 83 U/l	269,84 U/l	196,63 U/l
<i>ALP</i>	169, 33 U/l	323,73 U/l	357,08 U/l
<i>Colinesterasa</i>	3876,00 U/ml	3637,05 U/ml	4061 U/ml
<i>Inh calcineurina</i>	494,63 ngr/cc	508.40 ngr/cc	590,75 ngr/cc

Hemos representado mediante diagrama de cajas, diagrama de barras y tabla, la media de bilirrubina, GOT, GPT, GGT, ALP, colinesterasa e inhibidores de calcineurina en el 10º día postoperatorio, poniendo de manifiesto las diferencias entre los tres grupos de pacientes incluidos en este estudio: pacientes estables, pacientes con rechazo y pacientes con complicaciones diferentes de rechazo.

6.2.8 PRUEBAS NO PARAMETRICAS

Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de contraste

	CNI	BR	GOT	GPT	GGT	ALP
Chi-cuadrado	,349	36,263	22,477	14,877	17,496	12,064
Gl	2	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,840	,000	,000	,001	,000	,002

Prueba de Mann-Whitney . SIG SI P<0.025. PRUEBA DE BONFERRONI

Estadísticos de contraste^a

	BR	GOT	GPT	GGT	ALP
U de Mann-Whitney	,000	44,000	88,000	44,000	72,000
W de Wilcoxon	78,000	122,000	166,000	122,000	150,000
Z	-5,182	-4,183	-3,183	-4,183	-3,546
Sig. asintót. (bilateral)	,000	,000	,001	,000	,000

Es importante analizar los parámetros arriba descritos. La determinación es la correspondiente al 10º día postoperatorio. Se eligió este día porque suele corresponder con el día del rechazo en este grupo o en el de complicaciones si estas han aparecido. Hay una elevación de todas las enzimas hepáticas y de la bilirrubina en el grupo rechazo y en el grupo complicaciones estadísticamente significativa. **Bilirrubina** en el grupo rechazo, **GOT** en el grupo complicaciones, **GPT** en el grupo complicaciones, **GGT** en el grupo rechazo y **ALP** en el grupo complicaciones.

La **colinesterasa** mantiene niveles normales en los tres grupos. Este dato se puede relacionar con una buena función del injerto. Pese al rechazo y a las distintas complicaciones en el grupo rechazo y grupo complicaciones, el tratamiento es el adecuado, no afectándose la función hepática.

Los niveles de **inhibidores de calcineurina** son iguales en los tres grupos, aportando homogeneidad a la muestra.

Observando los datos obtenidos podemos afirmar que los tres grupos son homogéneos, asimismo, en cuanto a sexo, edad, indicación TOH, grupo sanguíneo, estadio Child, técnica quirúrgica y tiempo de isquemia.

6.3 RESULTADOS DE IL-2R EN SANGRE

Resumen del procesamiento de los casos

Los niveles normales de IL-2R son de 100 ± 50 pm/l

Vamos a mostrar tras el estudio estadístico los resultados del análisis de IL-2 en sangre en los días 1, 5, 10, 15 y 20.

Las variables estudiadas son: Media, Error típico de la media, Intervalo de confianza al 95% (Límite superior y límite inferior), Media recortada al 5%, Mediana, Varianza y Desviación típica.

6.3.1 DESCRIPTIVOS

sIL- 2R	1	ESTADÍSTICOS
ESTABLE		
Media	234,71
Error típico de la media	27,32
Intervalo confianza al 95%	Límite inferior	176,47
	Límite superior	292,95
Media recortada al 5%	233,12
Mediana	197,35
Varianza	11945,52
Desviación típica	109,29
RECHAZO		
Media	251,16
Error típico de la media	31,44
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	187,66
	Límite superior.....	314,66
Media recortada al 5%	227,54
Mediana	185,00
Varianza	41522,47
Desviación típica	203,77
COMPLICACIONES		
Media	211,37
Error típico de la media	72,52
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	39,88
	Límite superior	382,86
Media recortada al 5%	209,44
Mediana	194,00
Varianza	42074,48
Desviación típica	205,12

ESTABLE		
Media	239,00
Error típico de la media	16,56
Intervalo confianza al 95%	Límite inferior	203,70
	Límite superior	274,30
Media recortada al 5%	240,77
Mediana	232,00
Varianza	4388,53
Desviación típica	66,24

RECHAZO		
Media	462,48
Error típico de la media	33,82
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	394,17
	Límite superior.....	530,80
Media recortada al 5%	456,85
Mediana	438,00
Varianza	48062,08
Desviación típica	219,23

COMPLICACIONES		
Media	213,30
Error típico de la media	87,55
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	6,27
	Límite superior	420,32
Media recortada al 5%	203,75
Mediana	127,35
Varianza	61321,13
Desviación típica	247,63

ESTABLE		
Media	289,14
Error típico de la media	24,80
Intervalo confianza al 95%	Límite inferior	236,26
	Límite superior	342,01
Media recortada al 5%	292,99
Mediana	318,00
Varianza	9847,04
Desviación típica	99,23

RECHAZO		
Media	527,23
Error típico de la media	37,00
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	452,50
	Límite superior.....	601,95
Media recortada al 5%	520,14
Mediana	520,00
Varianza	57503,40
Desviación típica	239,79

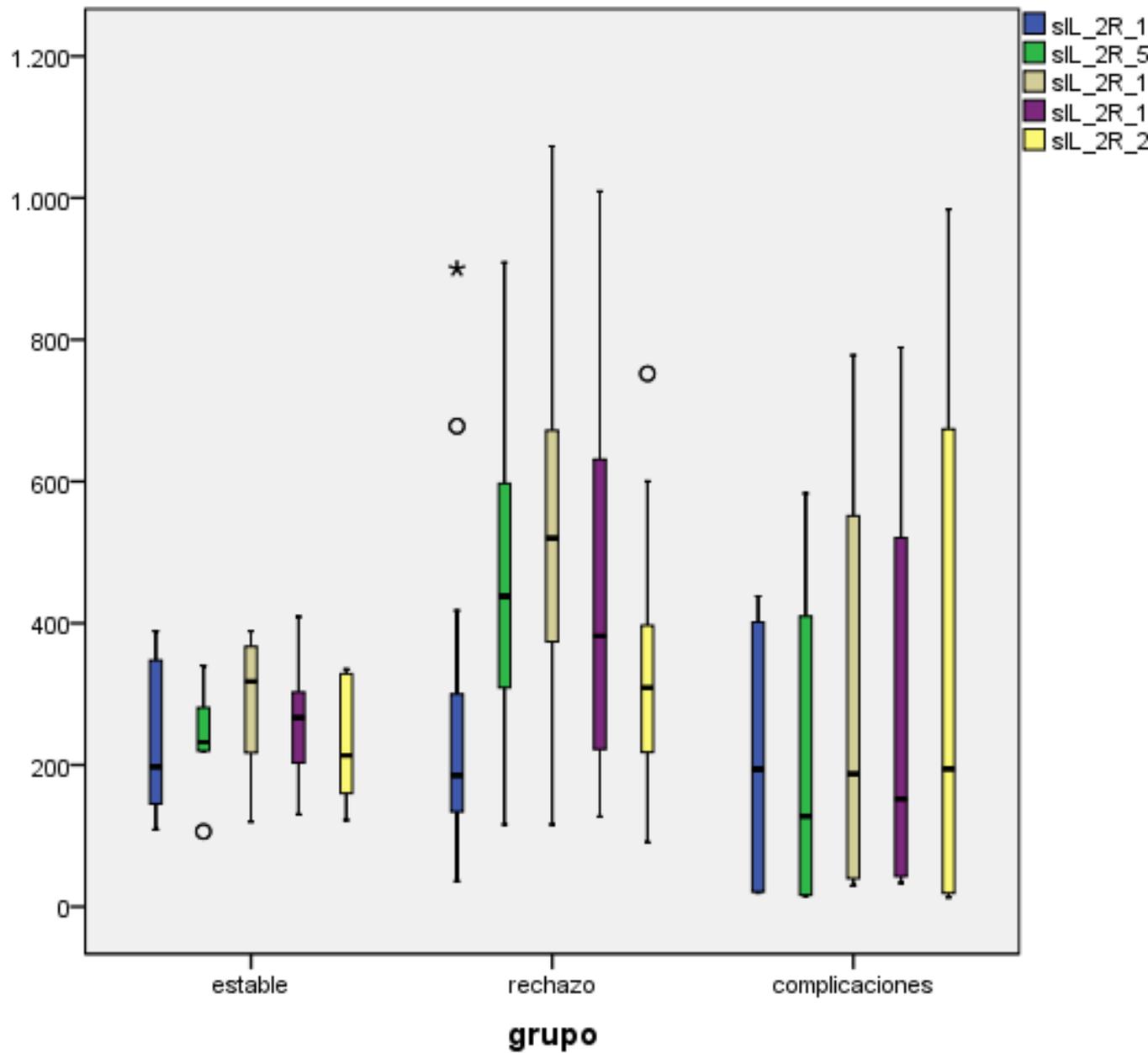
ESTABLE		
Media	232,57
Error típico de la media	21,13
Intervalo confianza al 95%	Límite inferior	187,51
	Límite superior	277,62
Media recortada al 5%	233,02
Mediana	213,28
Varianza	7149,02
Desviación típica	84,55
RECHAZO		
Media	331,85
Error típico de la media	25,41
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	280,52
	Límite superior.....	383,17
Media recortada al 5%	322,17
Mediana	309,00
Varianza	27131,63
Desviación típica	164,71
COMPLICACIONES		
Media	346,50
Error típico de la media	148,95
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	-5,73
	Límite superior	698,73
Media recortada al 5%	329,60
Mediana	194,40
Varianza	177512,08
Desviación típica	421,32

6.3.2 RESUMEN MEDIA EN LOS TRES GRUPOS POR DIA

Media	ESTABLE	RECHAZO	COMPLICACIONES
<i>Día 1</i>	234,71 pm/l	251,16 pm/l	211,37 pm/l
<i>Día 5</i>	239,00 pm/l	462,48 pm/l	213,30 pm/l
<i>Día 10</i>	289,14 pm/l	527,23 pm/l	295,65 pm/l
<i>Día 15</i>	260,42 pm/l	435,65 pm/l	281,70 pm/l
<i>Día 20</i>	323,57 pm/l	331,85 pm/l	346,50 pm/l

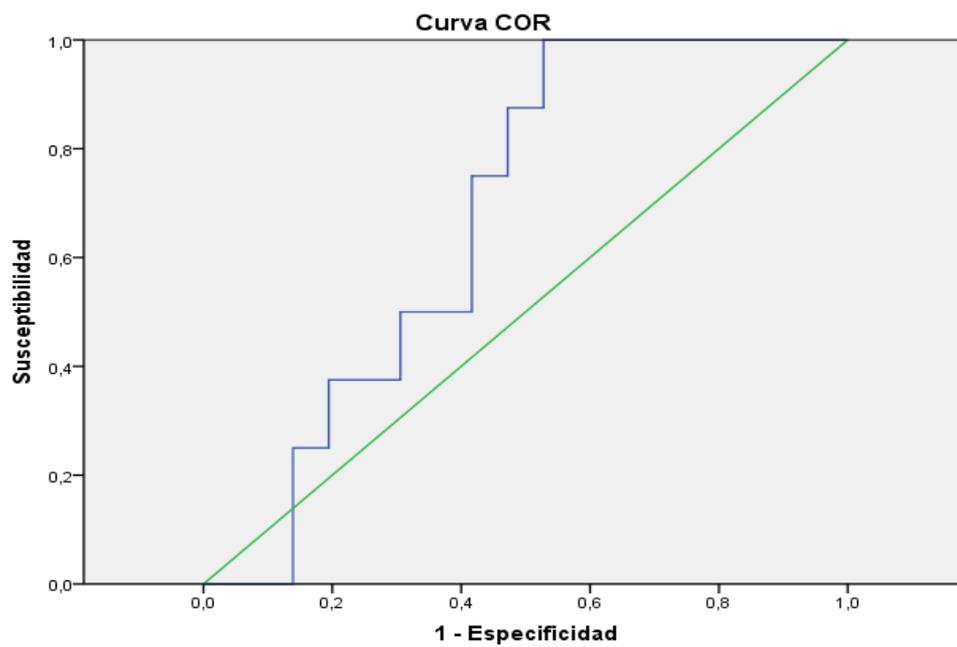
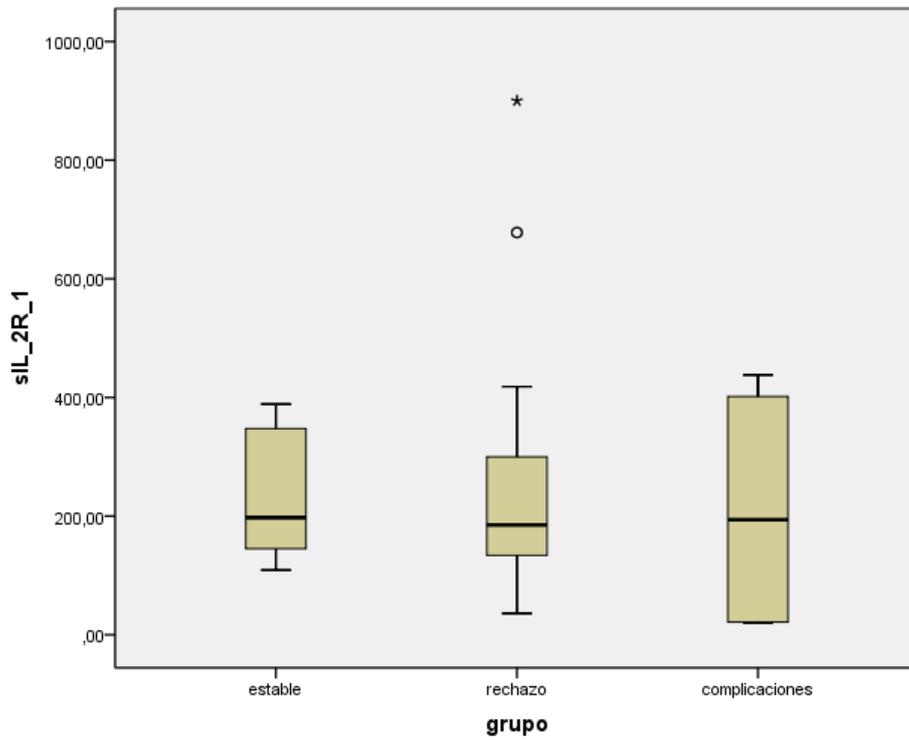
Resumen de las medias de sIL-2R por día en los tres grupos, evidenciando las diferencias estadísticamente significativas.

6.3.3 REPRESENTACION DE LOS DISTINTOS GRUPOS. MEDIA IL-2 EN LOS TRES GRUPOS

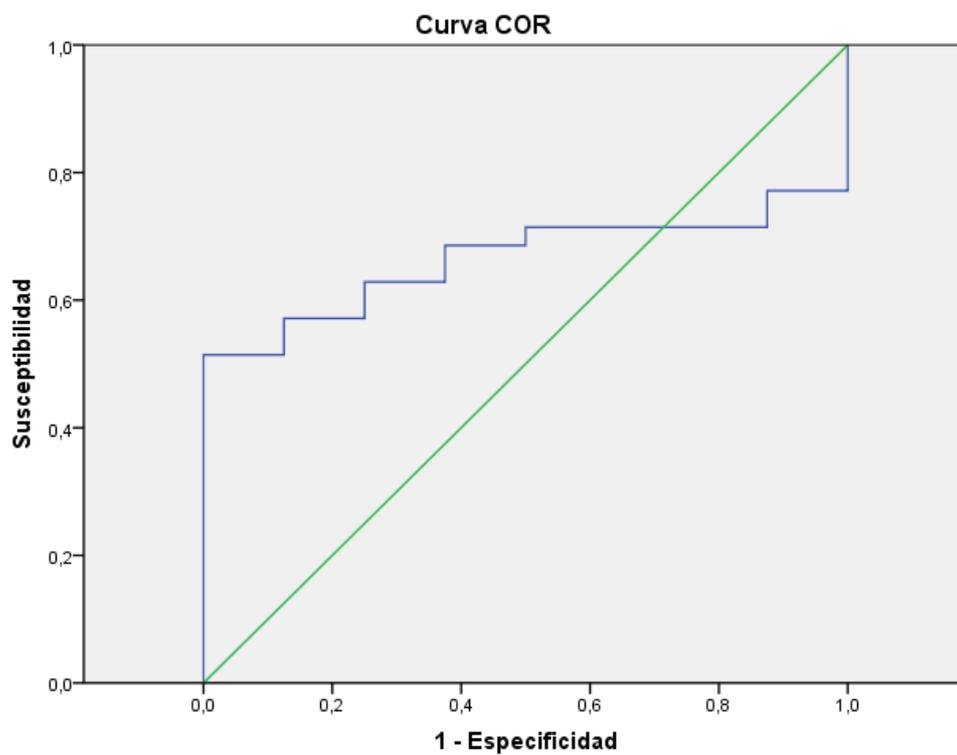
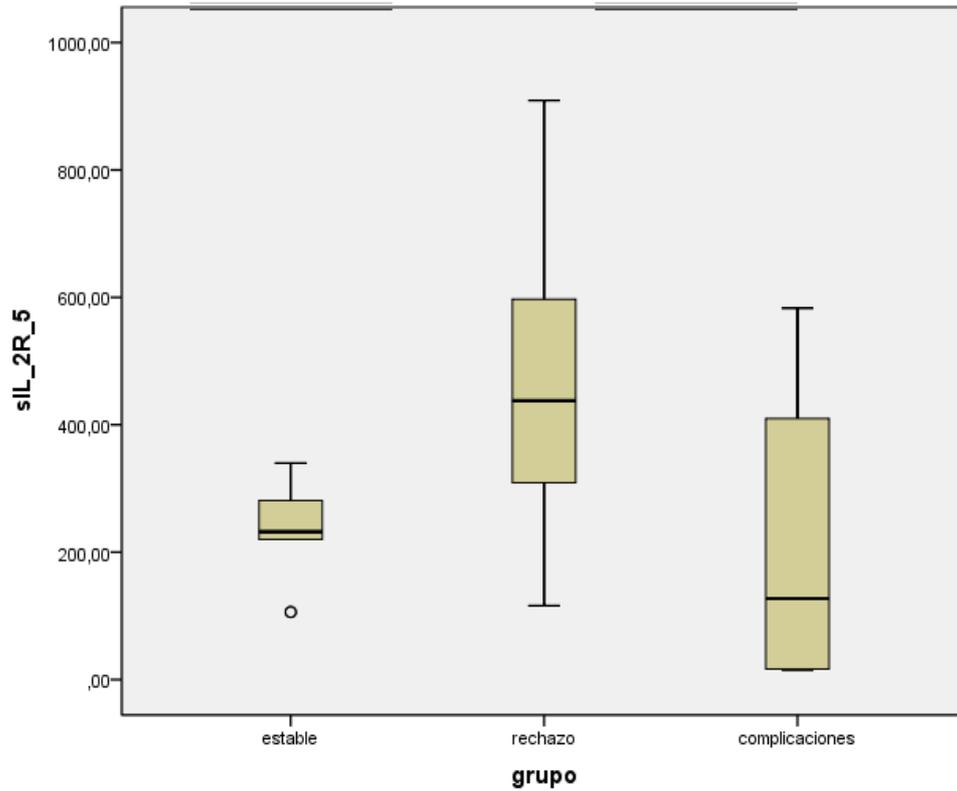


6.3.4 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 1 Y SU CURVA DE ROC.

sIL-2R 1

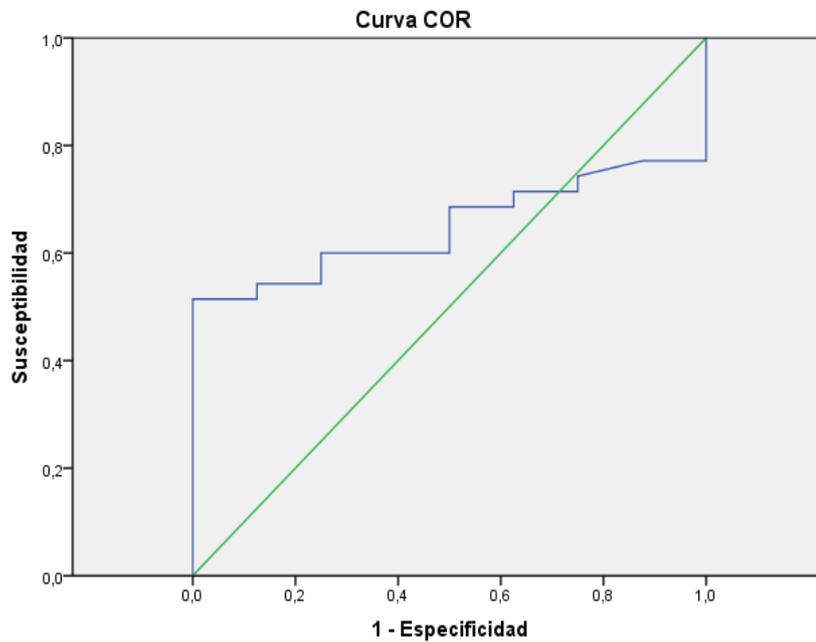
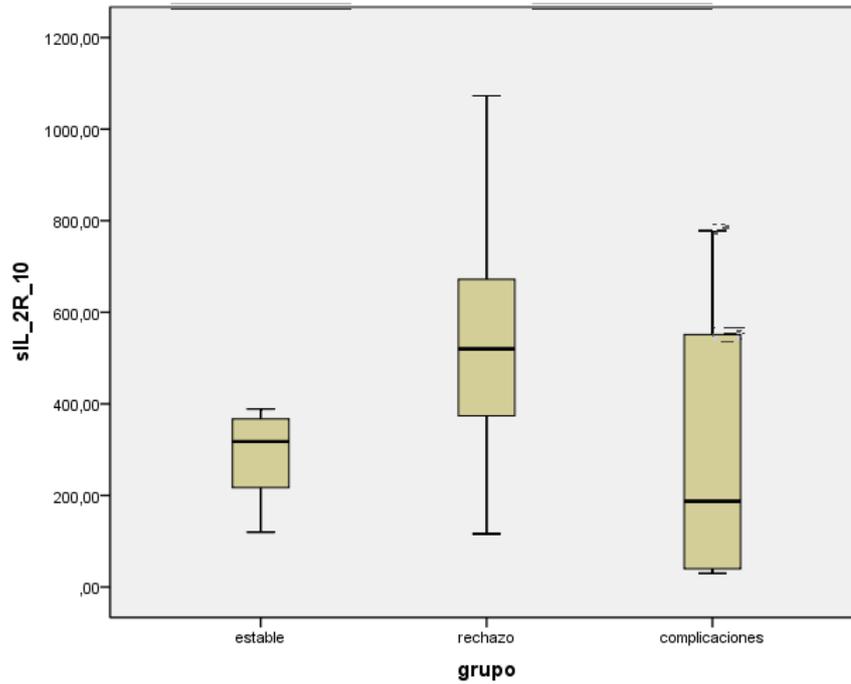


6.3.5 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 5 Y SU CURVA DE ROC IL-2R5



6.3.6 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 10 Y SU CURVA DE ROC.

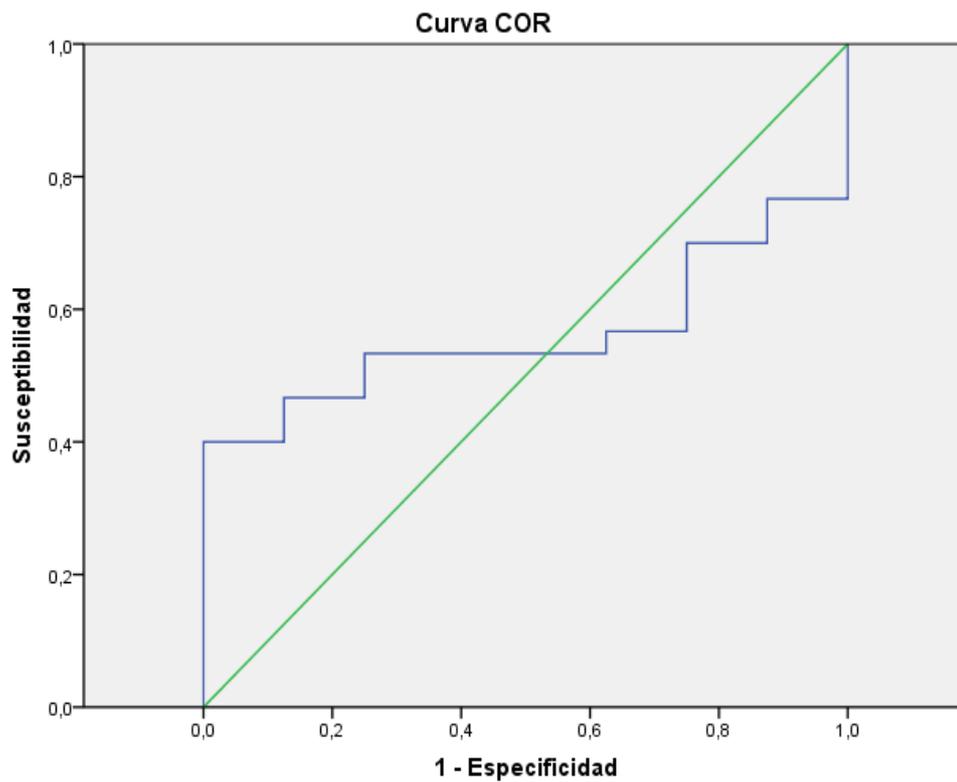
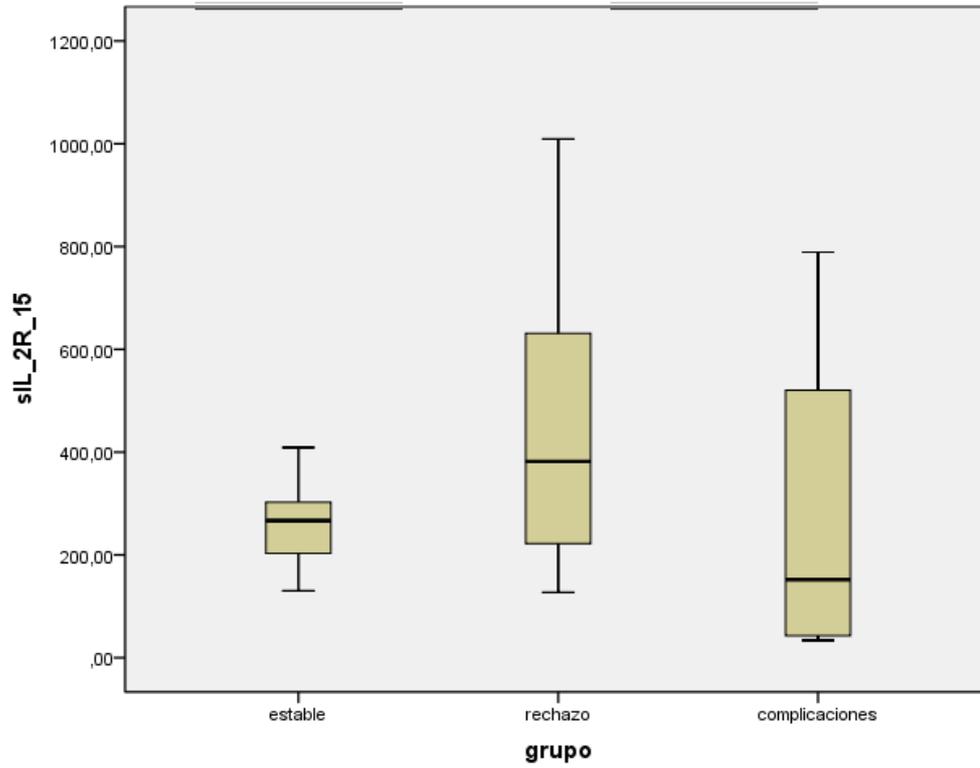
sIL-2R 10



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

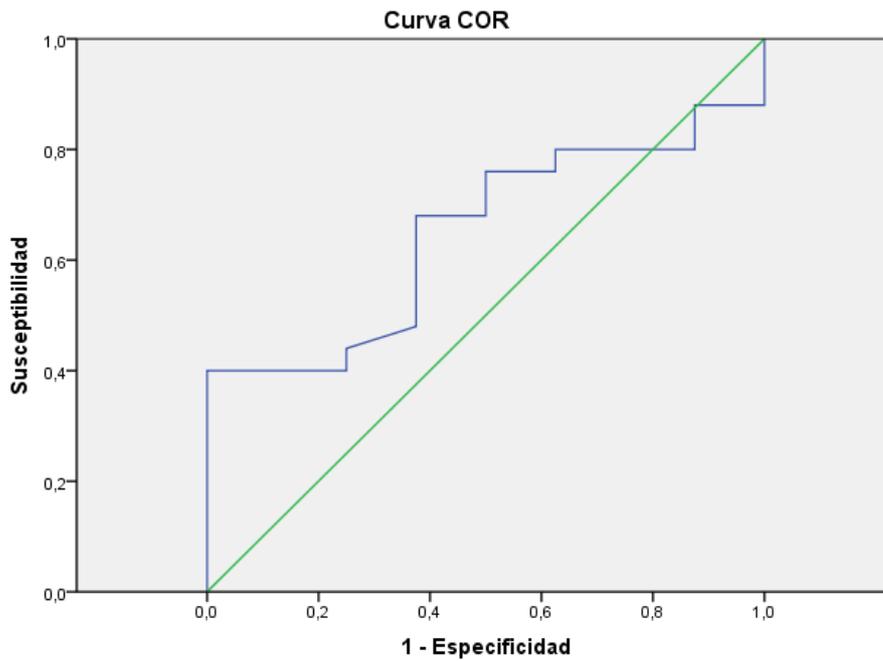
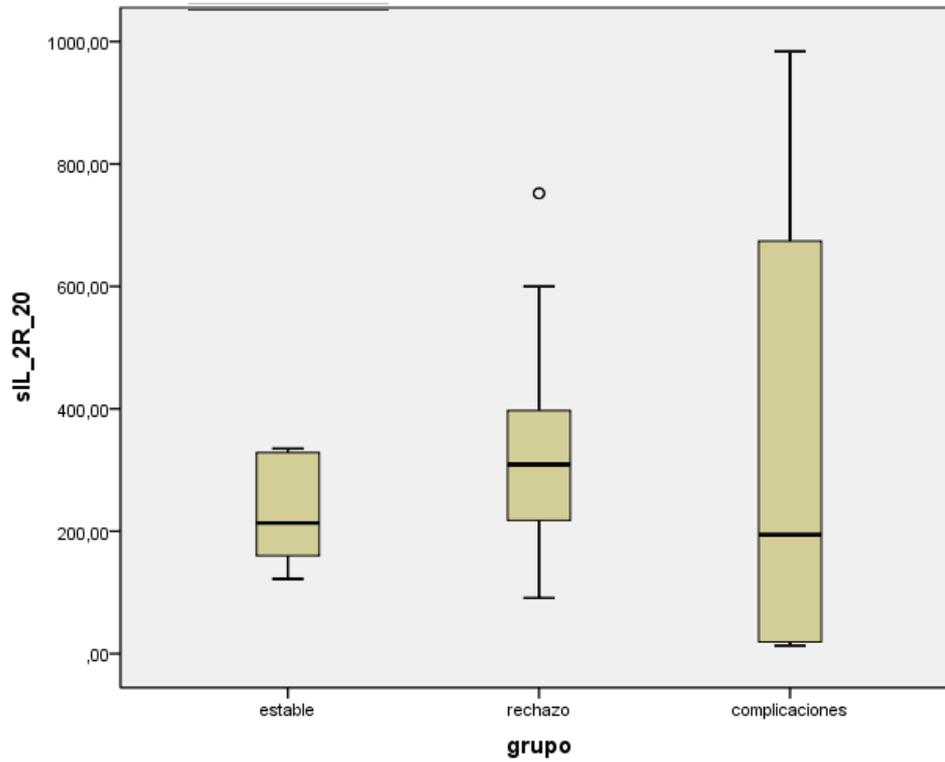
6.3.7 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 15 Y SU CURVA DE ROC.

sIL-2R 15



6.3.8 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 20 Y SU CURVA DE ROC.

IL-2R 20



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.3.9 PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS

Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de contraste

	sIL_2R_1	sIL_2R_5	sIL_2R_10	sIL_2R_15	sIL_2R_20
Chi-cuadrado	,849	21,056	15,373	7,092	4,008
Gl	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,654	,000	,000	,029	,135

Prueba de Mann-Whitney: CORRECIÓN DE BONFERRONI Y SERÁ SIGNIFICATIVO SI $P < 0.025$

Estadísticos de contraste

	sIL-2R 5	sIL-2R 10	sIL-2R 15
U de Mann-Whitney	92,000	122,000	208,000
W de Wilcoxon	228,000	258,000	344,000
Z	-4,249	-3,725	-2,228
Sig. asintót. (bilateral)	,000	,000	,026

Tras el análisis de datos arriba expuestos sobre la **IL-2 en suero**, observamos que los niveles de IL-2 en suero aparecen elevados en los tres grupos: estable, rechazo y complicaciones y en todas las determinaciones: 1º día, 5º día, 10º día, 15º día y 20º día postrasplante.

Los niveles son más elevados en el grupo rechazo respecto a los otros grupos, que mantienen entre ellos niveles similares.

Como se ha evidenciado, al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) y la Corrección de Bonferroni (test Mann-Whitney) ($p < 0.025$), esta elevación es estadísticamente significativa los días 5 ($p < .000$), 10 ($p < .000$) y 15 ($p < .026$).

6.3.10 CURVAS ROC IL-2R

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: **sIL-2R 1**

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótico ^a ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,674	,057	,030	,561	,786

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: **sIL-2R 5**

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,664	,055	,041	,557	,772

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: **sIL-2R 10**

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,648	,055	,065	,539	,757

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: **sIL-2R 15**

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,563	,063	,445	,440	,685

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: **sIL-2R 20**

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,648	,069	,077	,512	,783

Respecto a las **curvas de ROC**, podemos considerar que hemos obtenido significación asintótica los días 1 ($p < .030$), 5 ($p < .041$), 10 ($.065$) y 20 ($p < 0.77$), aunque los valores sean algo mayor que 0.05.

Hemos analizado la sensibilidad y especificidad para cada uno de estos días. Debemos recordar que los niveles normales son: 100 ± 50 pm/l.

Aplicando el protocolo descrito en material y métodos de establecer un nivel A, nivel B y nivel C, según las determinaciones obtenidas en el marcador...

Según las determinación obtenidas:

DIA	NIVEL	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
DIA 1	A) 101,5 pm/l	100%	42%
	B) 234,56 pm/l	50%	70%
DIA 5	A) 222,50 pm/l	71,4%	38%
	B) 303,50 pm/l	57,1%	88%
	C) 410,00 pm/l	42,9%	100%
DIA 10	A) 257,07 pm/l	70,4%	25%
	B) 363,50 pm/l	60,00%	75%
	C) 514,50 pm/l	42,90%	100%
DIA 20	A) 208,50 pm/l	72%	50%
	B) 328,42 pm/l	42%	75%
	C) 420,00 pm/l	24%	100%

1) nivel A: nivel próximo a niveles normales; 2) nivel B: nivel intermedio entre el nivel normal y el nivel más elevado y 3) nivel C: nivel alto

IL-2 bilis 5		ESTADÍSTICOS
ESTABLE		
Media		7,83
Error típico de la media		2,85
Intervalo confianza al 95% Límite inferior		1,07
	Límite superior	14,59
Media recortada al 5%		7,57
Mediana		5,50
Varianza		66,40
Desviación típica		8,08
RECHAZO		
Media		53,30
Error típico de la media		18,63
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior.....		14,29
	Límite superior.....	92,30
Media recortada al 5%		45,88
Mediana		12,50
Varianza		6946,74
Desviación típica		83,34

IL-2 bilis 10		ESTADÍSTICOS
ESTABLE		
Media		3,70
Error típico de la media		1,23
Intervalo confianza al 95% Límite inferior		,77
	Límite superior	6,63
Media recortada al 5%		3,61
Mediana		2,91
Varianza		12,29
Desviación típica		3,50
RECHAZO		
Media		31,30
Error típico de la media		15,86
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior.....		-1,90
	Límite superior.....	64,50
Media recortada al 5%		21,61
Mediana		8,50
Varianza		5035,16
Desviación típica		70,95
COMPLICACIONES		
Media		2,00
Error típico de la media		1,26
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior.....		-1,25
	Límite superior	5,25
Media recortada al 5%		1,88
Mediana		,00
Varianza		9,60
Desviación típica		3,09

IL-2R bilis 15

ESTADÍSTICOS

ESTABLE	
Media	1,70
Error típico de la media	,77
Intervalo confianza al 95% Límite inferior	-1,12
Límite superior	3,5
Media recortada al 5%	1,6
Mediana	,90
Varianza	4,76
Desviación típica	2,18

RECHAZO	
Media	46,30
Error típico de la media	25,61
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	-7,31
Límite superior	99,91
Media recortada al 5%	30,38
Mediana	4,50
Varianza	13121,48
Desviación típica	114,54

IL-2R bilis 20

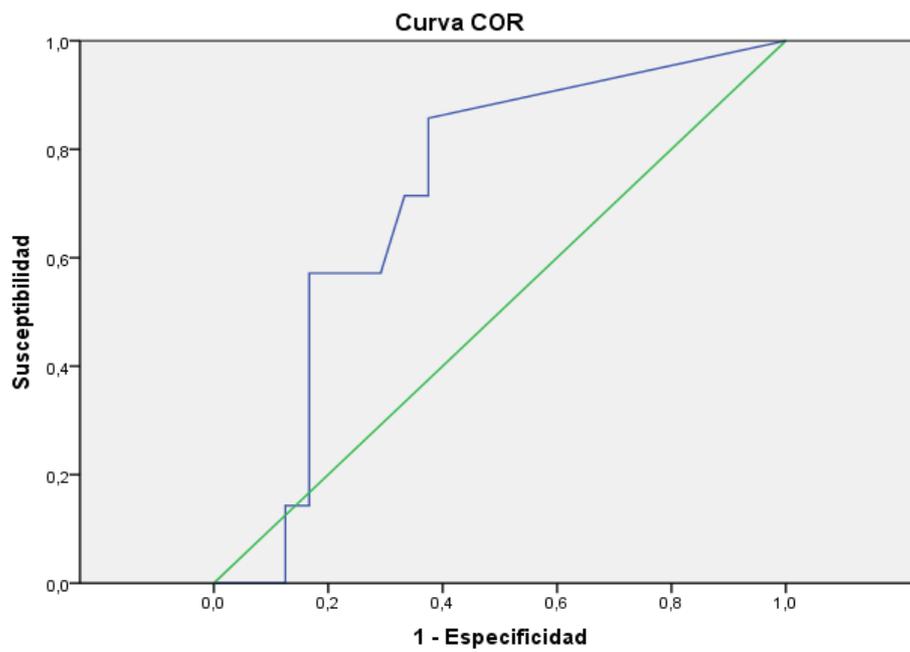
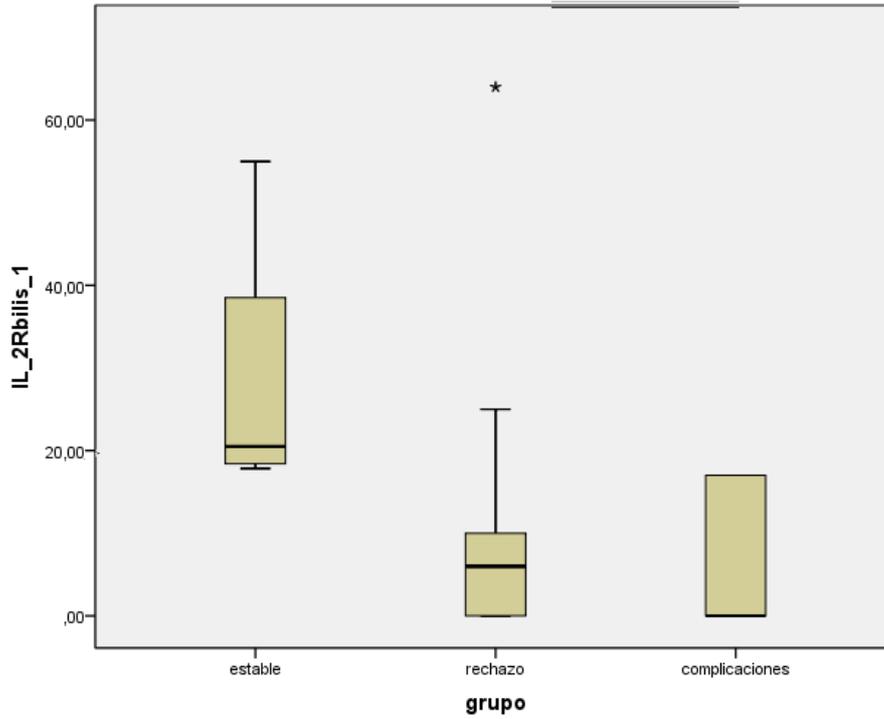
ESTADÍSTICOS

ESTABLE	
Media	3,00
Error típico de la media	,70
Intervalo confianza al 95% Límite inferior	1,32
Límite superior	4,67
Media recortada al 5%	3,05
Mediana	3,50
Varianza	4,00
Desviación típica	2,00

RECHAZO	
Media	3,90
Error típico de la media	1,89
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	-,06
Límite superior	7,86
Media recortada al 5%	2,83
Mediana	,00
Varianza	71,67
Desviación típica	8,46

6.4.2 DIAGRAMA DE CAJAS DE LAMEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 1 Y SU CURVA DE ROC.

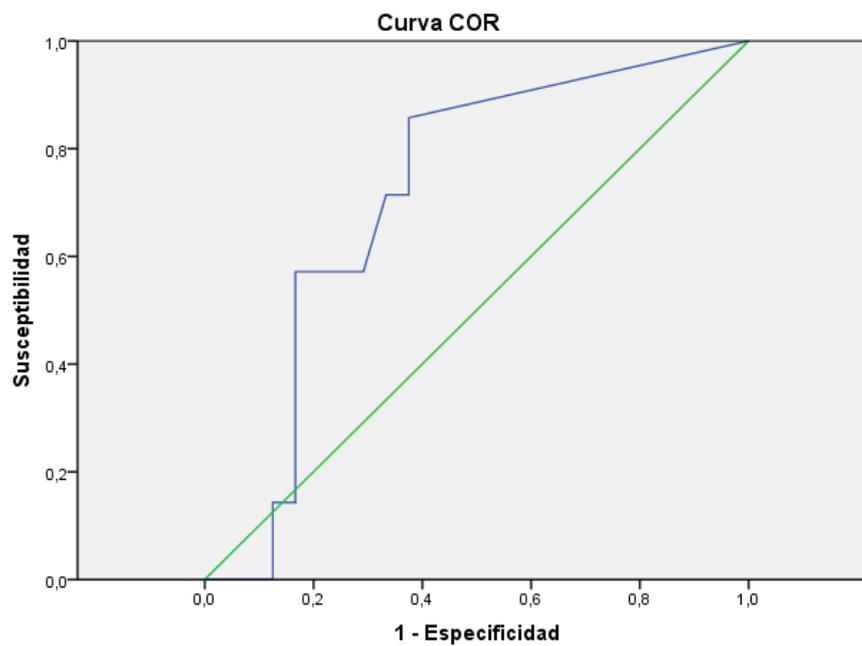
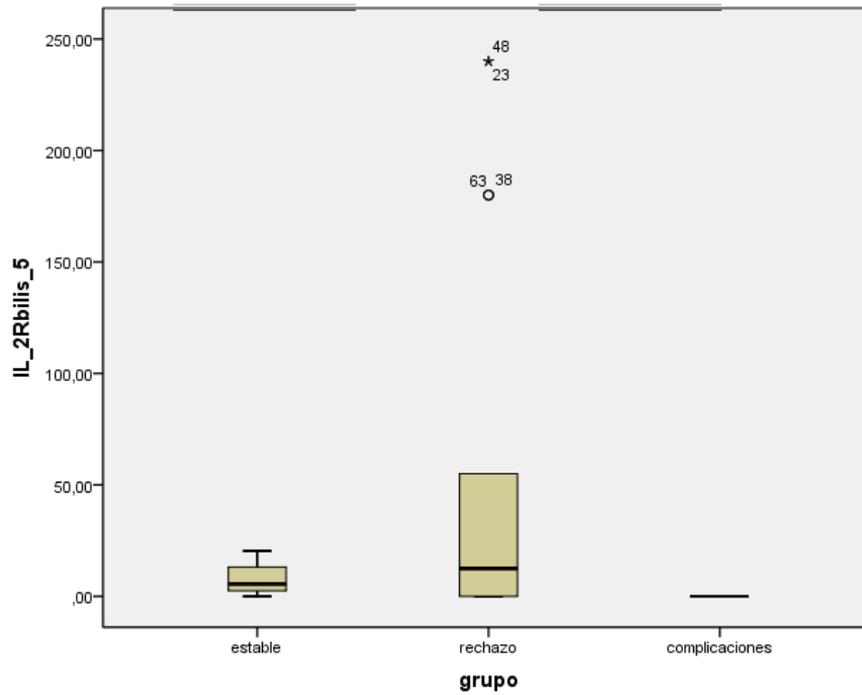
IL-2R bilis 1



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.4.3 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 5 Y SU CURVA DE ROC.

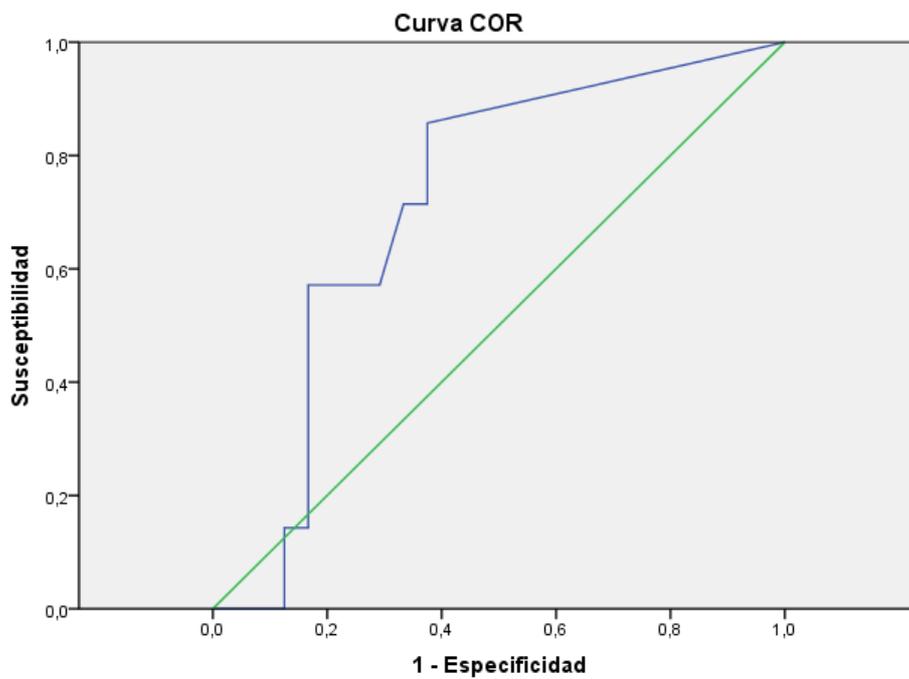
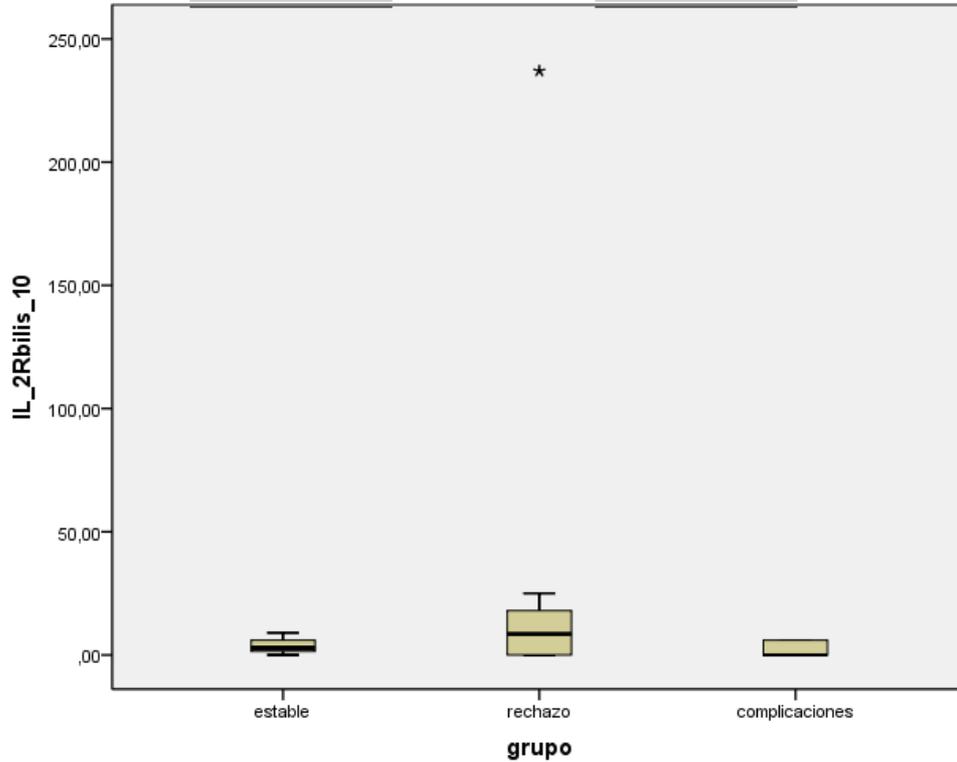
IL-2R bilis 5



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.4.4 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 10 Y SU CURVA DE ROC.

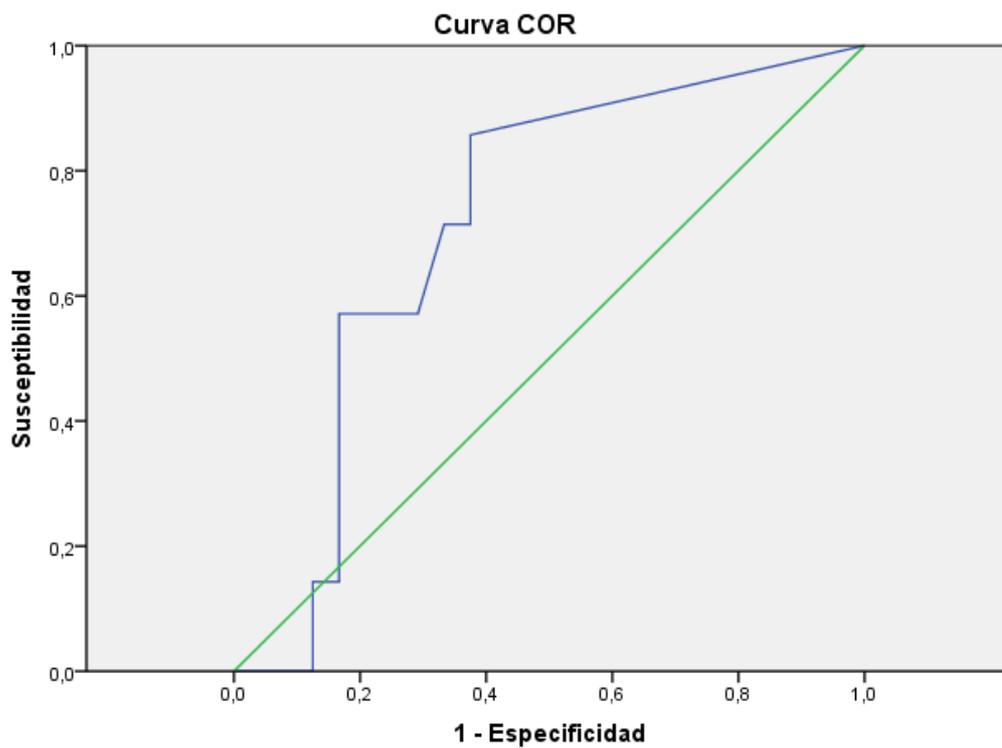
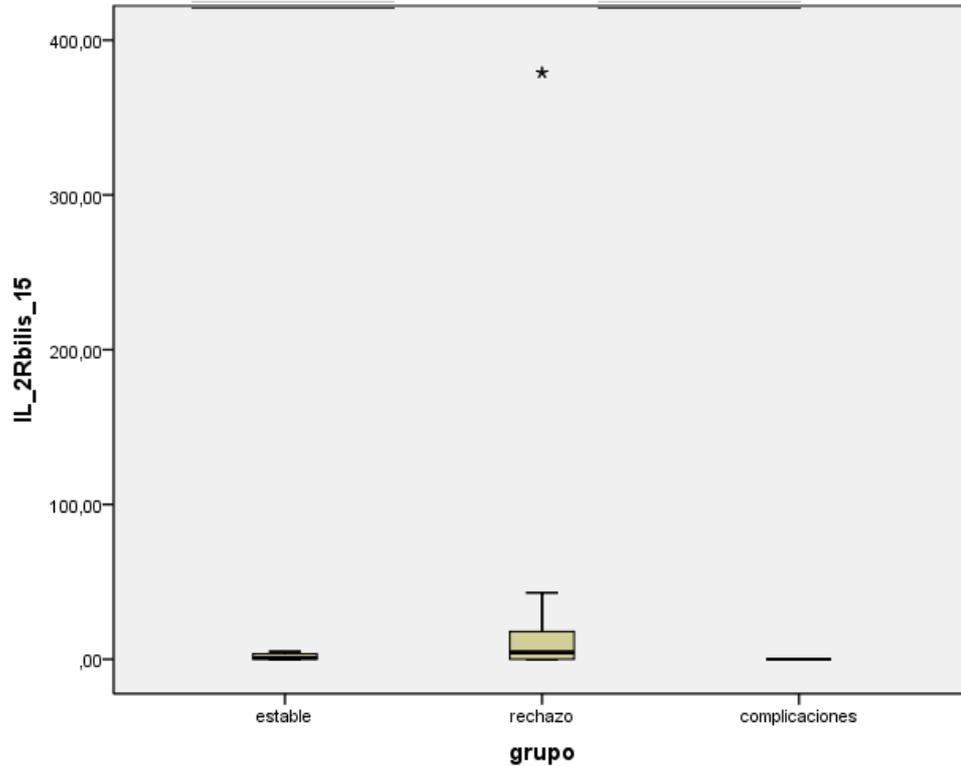
IL-2R bilis 10



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.4.5 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 15 Y SU CURVA DE ROC.

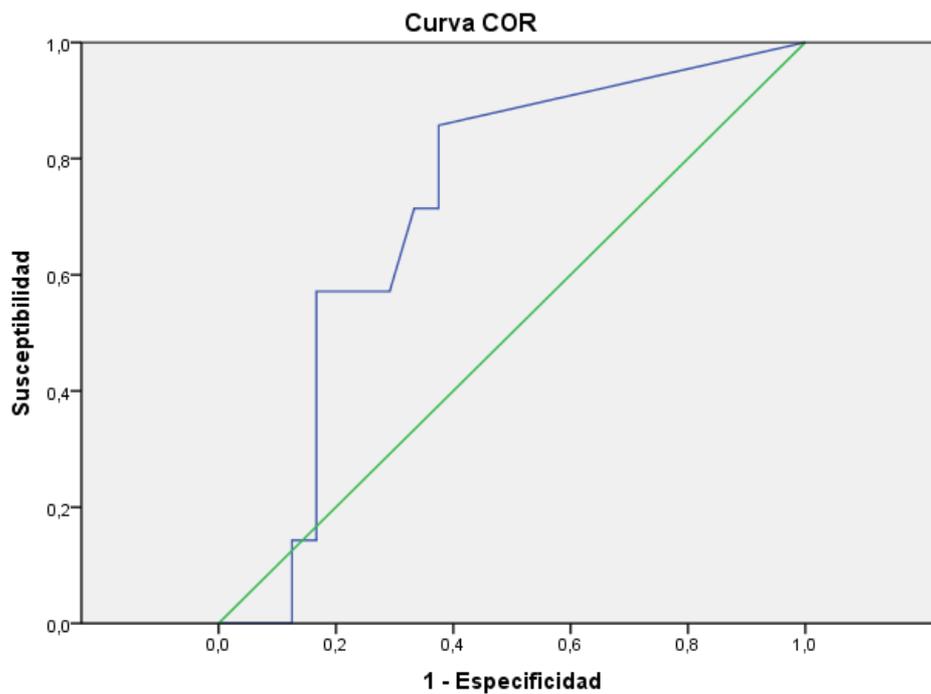
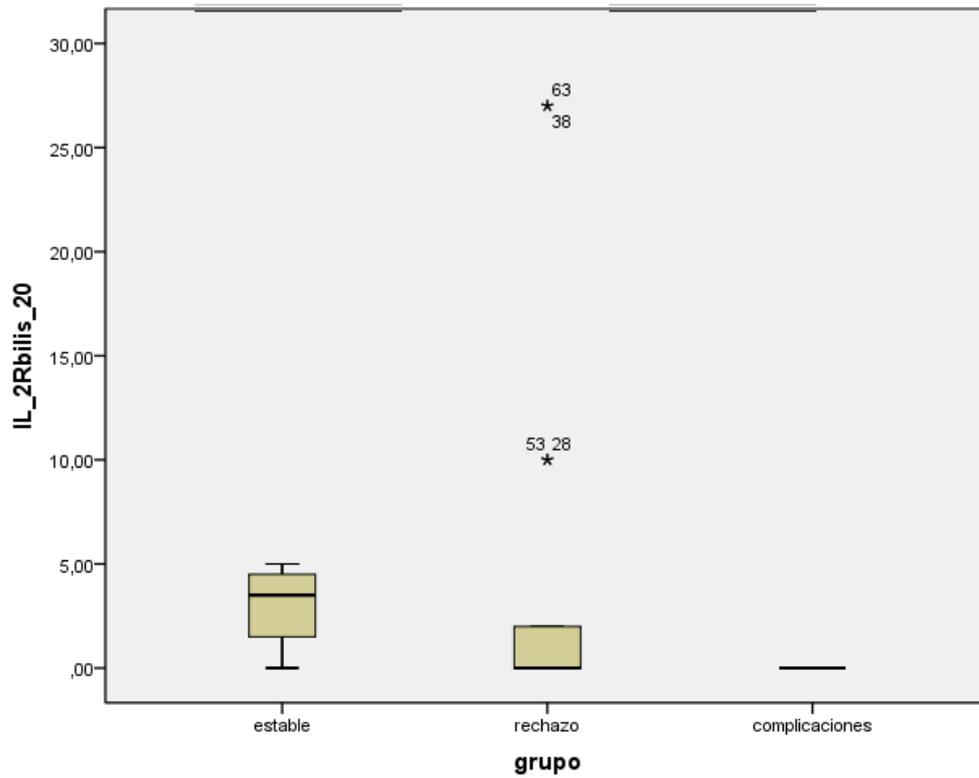
IL-2R bilis 15



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.4.6 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 20 Y SU CURVA DE ROC.

IL-2R bilis 20



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.4.7 RESUMEN MEDIA EN LOS TRES GRUPOS POR DIA

Media	ESTABLE	RECHAZO	COMPLICACIONES
<i>Día 1</i>	28,4575 pm/l	12,1000 pm/l	5,6667
<i>Día 5</i>	7,8325 pm/l	53,3000 pm/l	
<i>Día 10</i>	3,7075 pm/l	31,3000 pm/l	2,0000
<i>Día 15</i>	1,7000 pm/l	46,3000 pm/l	
<i>Día 20</i>	3,0000 pm/l	3,9000 pm/l	

Resumen de las medias de IL-2R en bilis por día en los tres grupos, evidenciando las diferencias, siendo estadísticamente significativa el día 5.

6.4.8 PRUEBAS NO PARAMETRICAS

Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de contraste

	IL-2Rbilis 5	IL-2Rbilis 10
Chi-cuadrado	10,767	2,581
Gl	2	2
Sig. asintót.	,005	,275

Prueba de Mann-Whitney-CORRECIÓN DE BONFERRONI Y SERÁ SIGNIFICATIVO SI $P < 0.025$

Estadísticos de contraste

	IL-2Rbilis 5
U de Mann-Whitney	28,000
W de Wilcoxon	238,000
Z	-2,682
Sig. asintót. (bilateral)	,007
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,007 ^a

Según los resultados de **IL-2 en bilis** arriba expuestos, lo primero que llama la atención es los niveles tan bajos obtenidos de este parámetro (los niveles normales son 100 ± 50 pm/l), no llegando a límites inferiores.

Sin embargo, dentro del rango obtenido, los niveles más elevados se encuentran en el grupo rechazo respecto a los otros dos grupos: estable y complicaciones. Este aumento es más evidente los días 5, 10 y 15.

Aplicando la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) y la corrección de Bonferroni (test Mann-Whitney) ($p < 0.025$) este aumento sólo es significativamente estadísticamente en el 5º día ($p < 0.007$)

6.4.9 CURVAS ROC IL-2R BILIS

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:sIL-2R 1

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
.664	.055	.041	.557	.772

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:sIL-2R 5

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
.674	.057	.030	.561	.786

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:sIL-2R 10

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
.648	.055	.065	.539	.757

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:sIL-2R 15

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
.563	.063	.445	.440	.685

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:sIL-2R 20

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
.648	.069	.077	.512	.783

Respecto a las **curvas de ROC**, podemos considerar que hemos obtenido significación asintótica los días 1 ($p < ,041$), 5 ($p < ,030$), 10 ($p < ,065$) y 20 ($p < ,077$), aunque los valores superan ligeramente los preceptivos ($p < ,05$)

Hemos analizado la sensibilidad y especificidad para cada uno de estos días. Recordar que los niveles normales son: 100 ± 50 pm/ l.

Aplicando el protocolo descrito en material y métodos de establecer un nivel A, nivel B y nivel C, según las determinaciones obtenidas en el marcador.

Según las determinación obtenidas:

DIA	NIVEL	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
DIA 1	A) 17,41 pm/l	57,1%	84%
	B) 40,00 pm/l	14,3%	88%
DIA 5	A) 14,50 pm/l	42,9%	77%
	B) 70,50 pm/l	14,3%	93%
DIA 10	A) 1,50 pm/l	71%	63%
	B) 4,50 pm/l	14%	63%
DIA 20	A) 2,90 pm/l	33%	82%
	B) 4,50 pm/l	0,16%	82%

1) nivel A: nivel próximo a niveles normales; 2) nivel B: nivel intermedio entre el nivel normal y el nivel más elevado y 3) nivel C: nivel alto

COMPLICACIONES		
Media	412,50
Error típico de la media	90,52
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	198,43
	Límite superior	626,56
Media recortada al 5%	425,55
Mediana	530,00
Varianza	65564,28
Desviación típica	256,05

sICAM-1 15		ESTADÍSTICOS
ESTABLE		
Media	436,57
Error típico de la media	53,95
Intervalo confianza al 95%	Límite inferior	321,56
	Límite superior	551,57
Media recortada al 5%	423,41
Mediana	340,00
Varianza	46577,82
Desviación típica	215,81
RECHAZO		
Media	682,40
Error típico de la media	52,37
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	576,62
	Límite superior.....	788,17
Media recortada al 5%	672,03
Mediana	600,00
Varianza	115211,16
Desviación típica	339,42
COMPLICACIONES		
Media	558,75
Error típico de la media	63,61
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	408,32
	Límite superior	709,17
Media recortada al 5%	560,27
Mediana	572,50
Varianza	32376,78
Desviación típica	179,93

ESTABLE		
Media	359,00
Error típico de la media	33,87
Intervalo confianza al 95%	Límite inferior	286,79
	Límite superior	431,20
Media recortada al 5%	355,00
Mediana	319,50
Varianza	18362,93
Desviación típica	135,50
RECHAZO		
Media	565,70
Error típico de la media	48,89
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	466,96
	Límite superior.....	664,43
Media recortada al 5%	541,35
Mediana	440,00
Varianza	100390,83
Desviación típica	316,84
COMPLICACIONES		
Media	404,75
Error típico de la media	88,12
Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior.....	196,13
	Límite superior	613,36
Media recortada al 5%	405,83
Mediana	414,50
Varianza	62265,92
Desviación típica	249,53

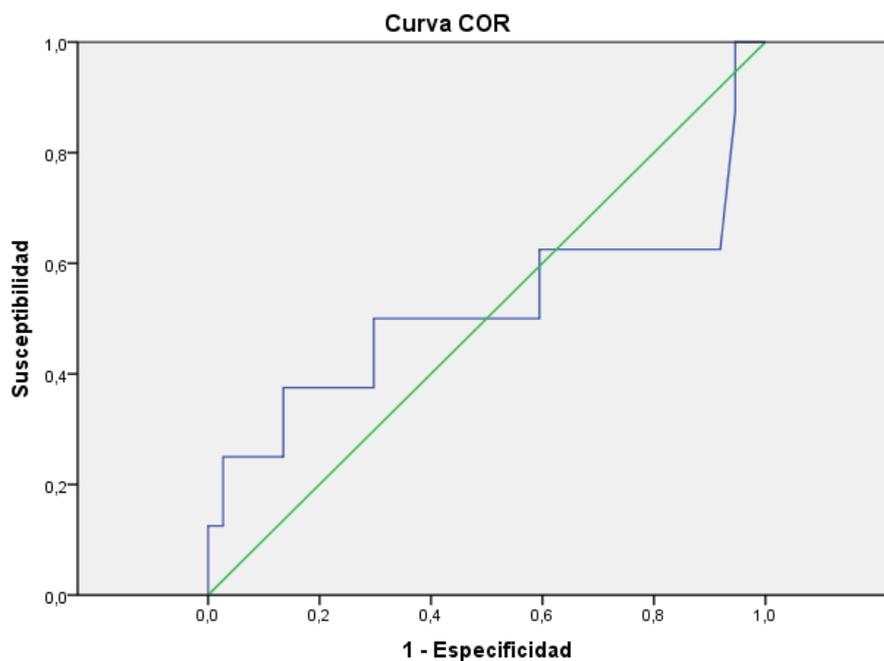
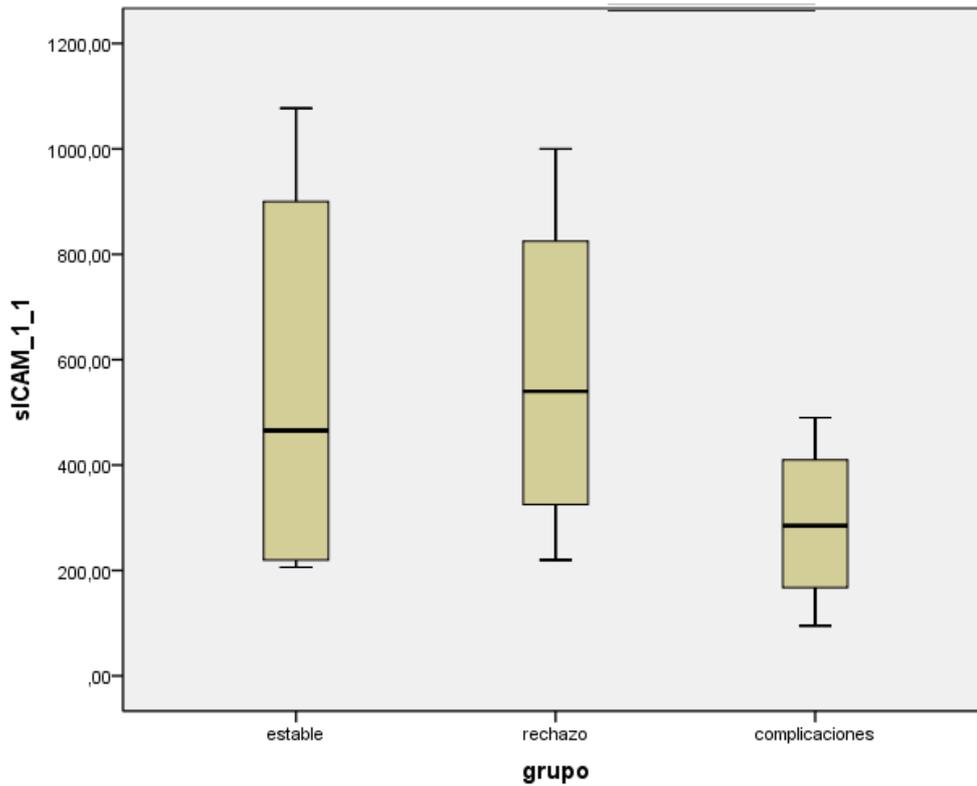
6.5.2 RESUMEN MEDIA EN LOS TRES GRUPOS POR DIA

Media	ESTABLE	RECHAZO	COMPLICACIONES
Día 1	556,71 ngr/ml	543,00 ngr/ml	288,75 ngr/ml
Día 5	586,14 ngr/ml	691,36 ngr/ml	450,00 ngr/ml
Día 10	519,85 ngr/ml	755,99 ngr/ml	412,50 ngr/ml
Día 15	436,57 ngr/ml	682,40 ngr/ml	558,75 ngr/ml
Día 20	359,00 ngr/ml	565,70 ngr/ml	404,75 ngr/ml

Resumen de las medias de sICAM-1 por día en los tres grupos, evidenciando las diferencias, estadísticamente significativas a partir del día 10.

6.5.3 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 1 Y SU CURVA DE ROC.

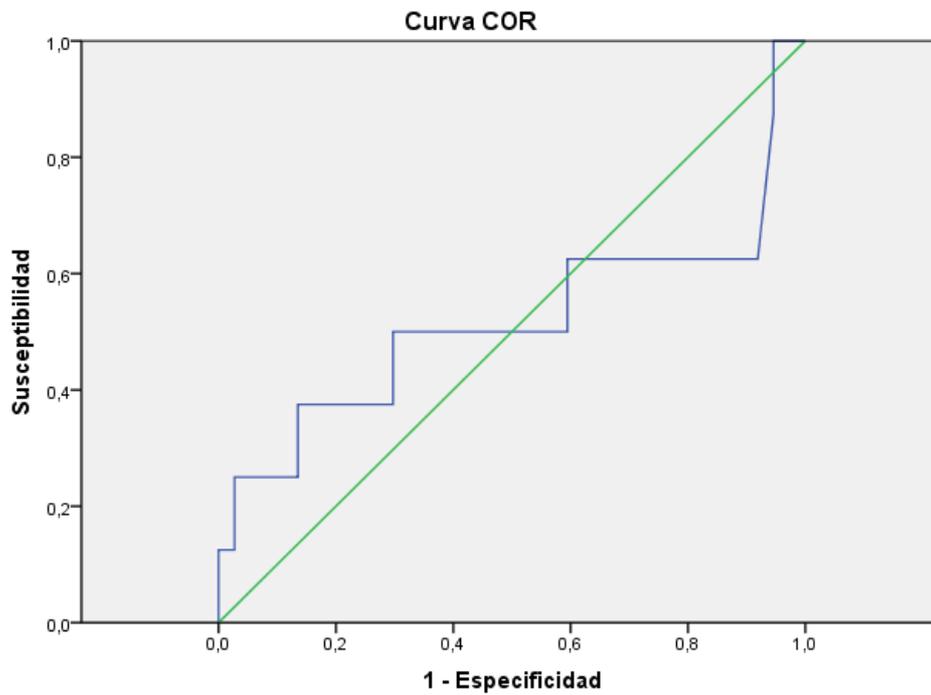
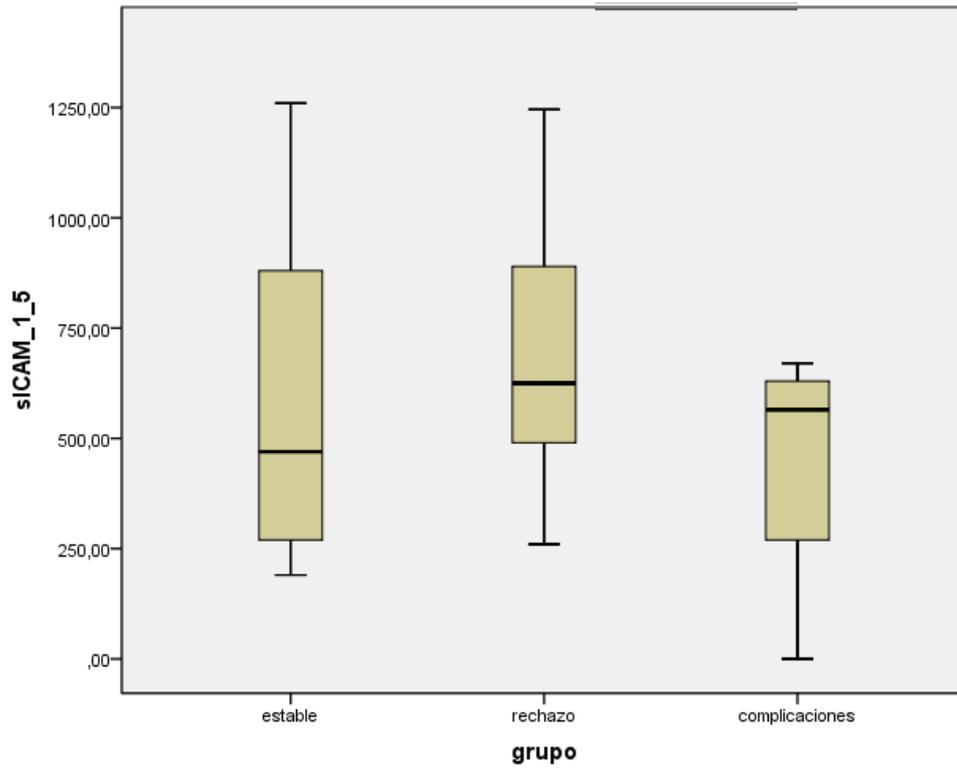
sICAM-1 1



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.5.4. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 5 Y SU CURVA DE ROC.

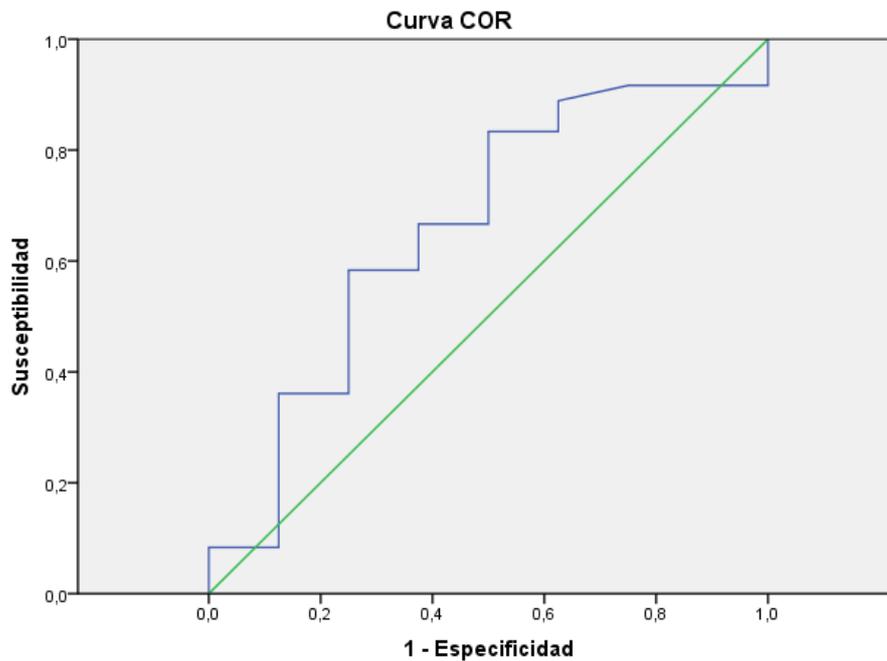
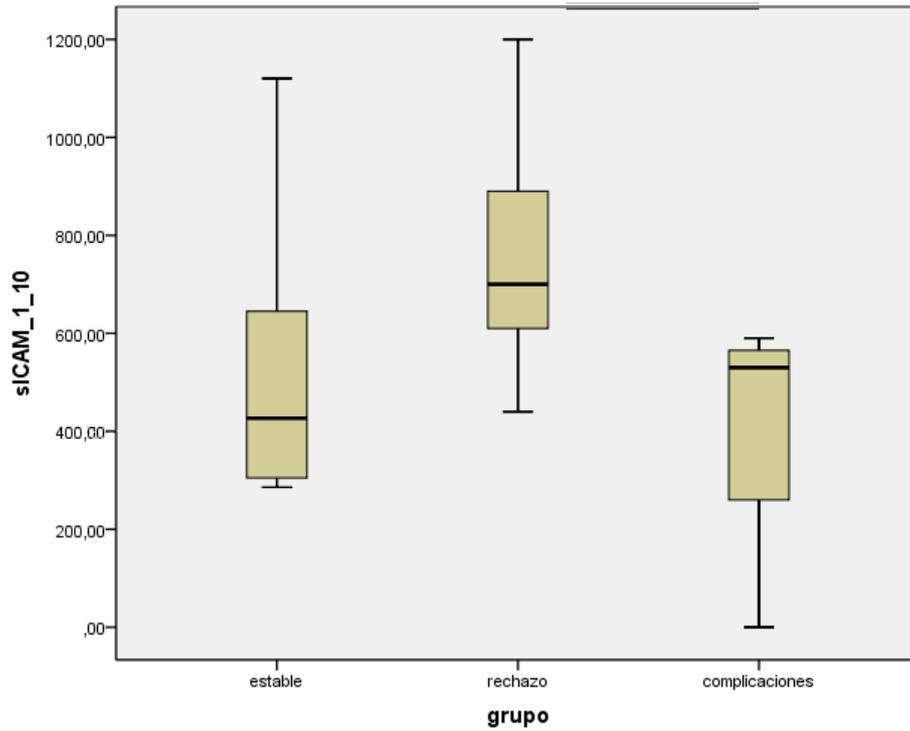
ICAM-1 5



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.5.5 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 10 Y SU CURVA DE ROC.

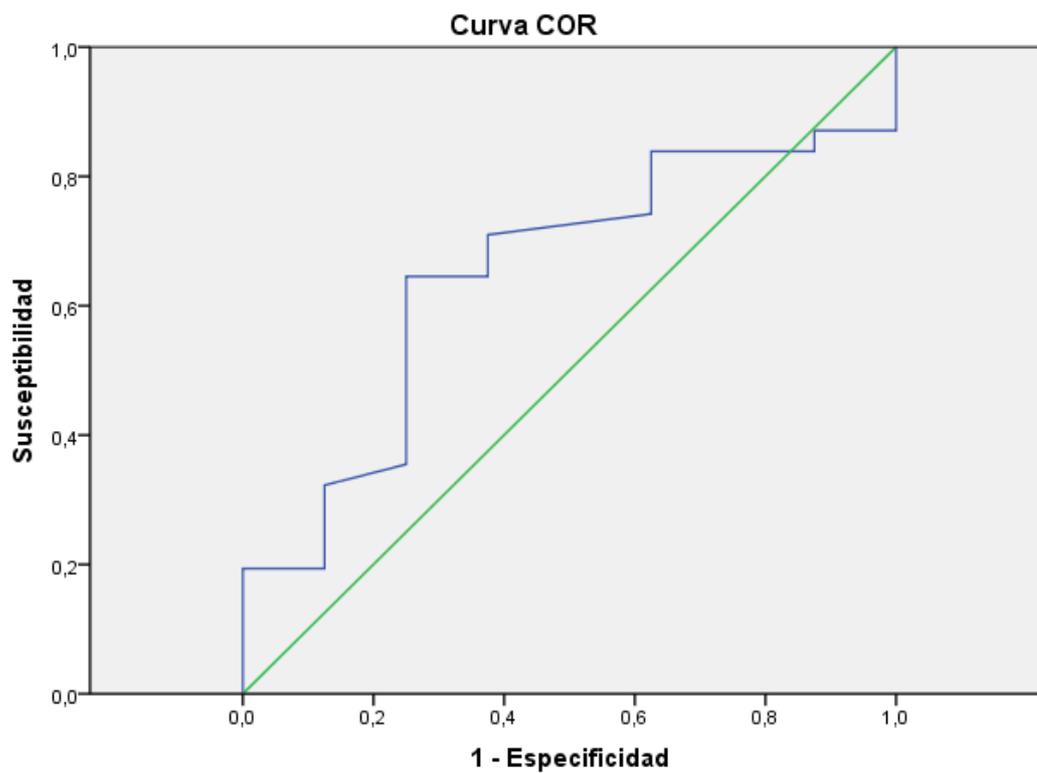
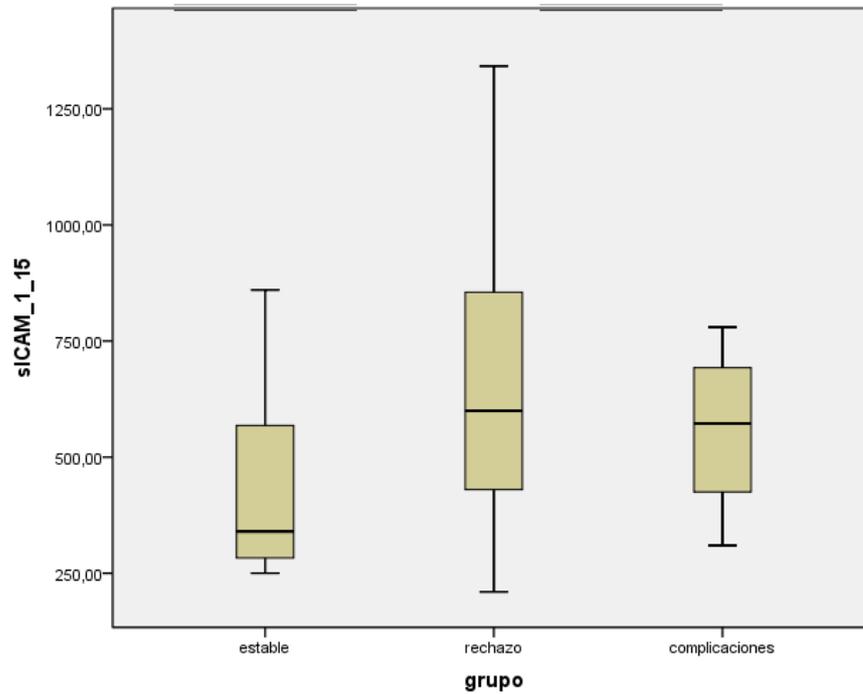
ICAM-1 10



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.5.6 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 15 Y SU CURVA DE ROC.

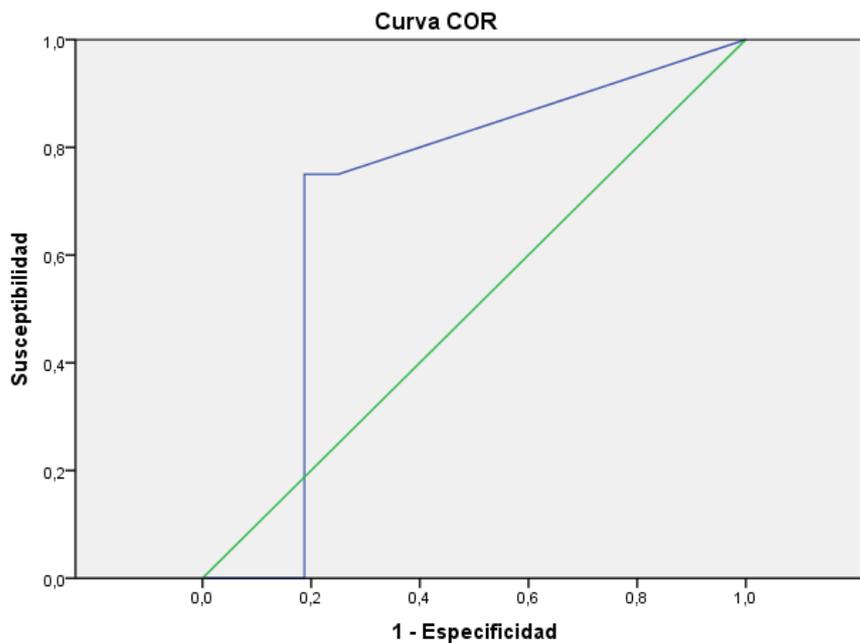
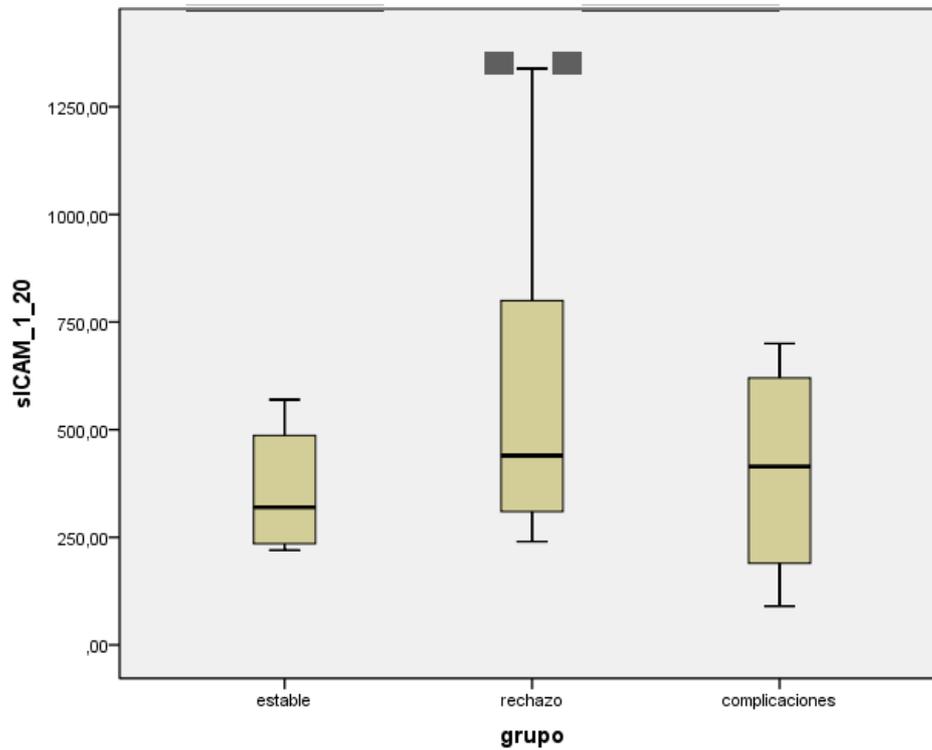
ICAM-1 15



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.5.7 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 20 Y SU CURVA DE ROC.

ICAM-1 20



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.5.8 PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS

Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de contraste

	sICAM-1 1	sICAM-1 15	sICAM-1 10	sICAM-1 15	sICAM-1 20
Chi-cuadrado	5,698	4,171	14,658	7,046	7,752
G1	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,058	,124	,001	,030	,021

Prueba de Mann-Whitney-CORRECCIÓN DE BONFERRONI Y SERÁ SIGNIFICATIVO SI $P < 0.025$

Estadísticos de contraste

	sICAM-1 10	sICAM-1 15	sICAM-1 20
U de Mann-Whitney	160,000	190,000	186,000
W de Wilcoxon	296,000	326,000	322,000
Z	-3,064	-2,544	-2,612
Sig. asintót. (bilateral)	,002	,011	,009

Según los resultados arriba expuestos, los niveles de **ICAM-1 en suero** están elevados en los tres grupos, siendo estos niveles más elevados en el grupo rechazo. Estos niveles son evidentes los días 5, 10, 15 y 20.

Aplicando la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) y la Corrección de Bonferroni (test Mann-Whitney) ($p < 0.025$), los niveles son estadísticamente significativos los días 10 ($p < 0.002$); 15 ($p < 0.0011$) y 20 ($p < 0.009$).

6.5.9 CURVAS ROC ICAM-1

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: sICAM-1 1

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,517	,100	,833	,320	,714

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: sICAM-1 5

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,450	,093	,530	,267	,633

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: sICAM-1 10

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,658	,078	,049	,504	,812

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: sICAM-1 15

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,647	,072	,071	,506	,788

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: sICAM-1 20

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,703	,071	,015	,564	,841

Respecto a las **curvas de ROC**, podemos considerar que hemos obtenido significación asintótica los días 10 ($p < ,049$), 15($,071$) 20 ($p <,015$), aunque los valores superan ligeramente los preceptivos ($p <,05$)

Hemos analizado la sensibilidad y especificidad para cada uno de estos días. Debemos recordar que los niveles normales son: 283 ± 113 ngr/ml

Aplicando el protocolo descrito en material y métodos de establecer un nivel A, nivel B y nivel C, según las determinaciones obtenidas en el marcador...

Según las determinación obtenidas:

DIA	NIVEL	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
DIA 10	A) 315,00 ngr/ml	88%	38%
	B) 519,93 ngr/ml	66%	63%
	C) 764,74 ngr/ml	36%	88%
DIA 15	A) 300,00 ngr/ml		38%
	B) 490,00 ngr/ml		75%
	C) 885,00 ngr/ml		100%
DIA 20	A) 305,00 ngr/ml	72%	50%
	B) 536,50 ngr/ml	48%	88%
	C) 843,00 ngr/ml	16%	100%

1) nivel A: nivel próximo a niveles normales; 2) nivel B: nivel intermedio entre el nivel normal y el nivel más elevado y 3) nivel C: nivel alto

6.6 RESULTADOS DE ICAM-1 EN BILIS

Resumen del procesamiento de los casos

Los valores normales de ICAM-1 son 283 ± 113 ngr/ml

Mediana	702,38
Varianza	87851,22
Desviación típica	296,39
RECHAZO	
Media	1180,00
Error típico de la media	160,16
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	768,27
Límite superior	1591,72
Media recortada al 5%	1190,00
Mediana	1360,00
Varianza	153920,00
Desviación típica	392,32
COMPLICACIONES	
Media	541,00
Error típico de la media	119,46
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	526,24
Límite superior	1140,41
Media recortada al 5%	824,25
Mediana	670,00
Varianza	85626,66
Desviación típica	292,62

ICAM-1 bilis 10	ESTADÍSTICOS
ESTABLE	
Media	513,93
Error típico de la media	65,12
Intervalo confianza al 95% Límite inferior	377,63
Límite superior	650,22
Media recortada al 5%	505,09
Mediana	505,00
Varianza	84812,89
Desviación típica	291,22
RECHAZO	
Media	833,33
Error típico de la media	119,46
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	526,24
Límite superior	1140,41
Media recortada al 5%	824,25
Mediana	670,00
Varianza	85626,66
Desviación típica	292,6
COMPLICACIONES	
Media	480,00
Error típico de la media	170,17
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	42,54
Límite superior	917,45
Media recortada al 5%	472,22
Mediana	340,00

Varianza	173760,00
Desviación típica	416,84

ICAM-1 bilis 15		ESTADÍSTICOS
ESTABLE		
Media		395,40
Error típico de la media		43,56
Intervalo confianza al 95% Límite inferior		304,22
Límite superior		486,57
Media recortada al 5%		388,77
Mediana		418,00
Varianza		37954,56
Desviación típica		194,81
RECHAZO		
Media		920,00
Error típico de la media		29,21
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior		844,90
Límite superior		995,09
Media recortada al 5%		920,00
Mediana		920,00
Varianza		5120,00
Desviación típica		71,55
COMPLICACIONES		
Media		410,00
Error típico de la media		189,13
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior		-76,19
Límite superior		896,19
Media recortada al 5%		398,33
Mediana		200,00
Varianza		214640,00
Desviación típica		463,29

sICAM-1 bilis 20		ESTADÍSTICOS
ESTABLE		
Media		358,80
Error típico de la media		48,09
Intervalo confianza al 95% Límite inferior		258,13
Límite superior		459,48
Media recortada al 5%		347,48

Mediana	309,54
Varianza	46270,61
Desviación típica	215,10
RECHAZO		
Media	710,00
Error típico de la media	125,59
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	387,15
Límite superior	1032,84
Media recortada al 5%	717,22
Mediana	840,00
Varianza	94640,00
Desviación típica	407,63
COMPLICACIONES		
Media	360,00
Error típico de la media	202,91
Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	-161,60
Límite superior	881,60
Media recortada al 5%	344,44
Mediana	80,00
Varianza	247040,00
Desviación típica	497,03

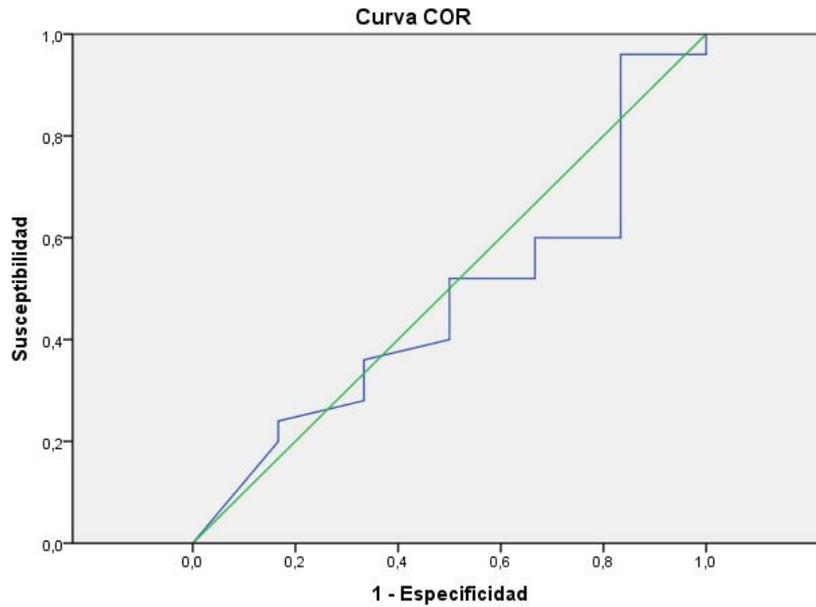
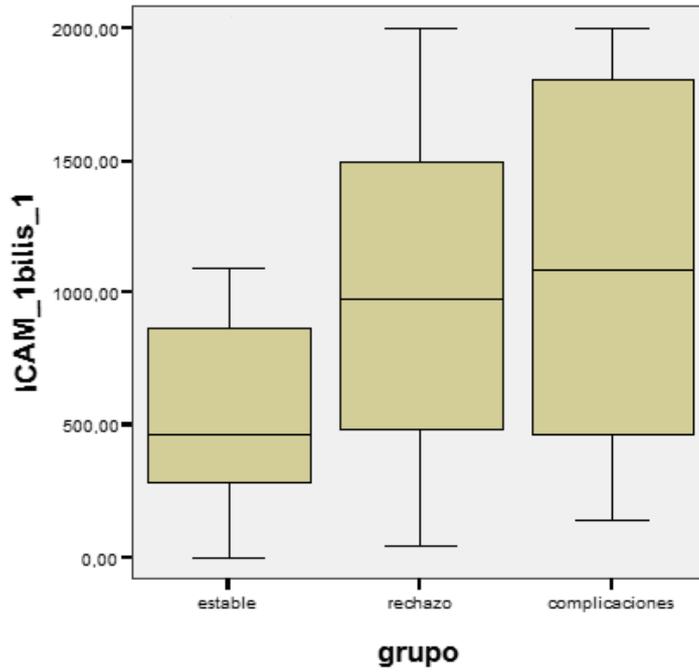
6.6.2 RESUMEN MEDIA EN LOS TRES GRUPOS POR DIA

Media	ESTABLE	RECHAZO	COMPLICACIONES
Día 1	1071,66 ngr/ml	1535,00 ngr/ml	893,33 ngr/ml
Día 5	811,07 ngr/ml	1180,00 ngr/ml	541,00 ngr/ml
Día 10	513,93 ngr/ml	833,33 ngr/ml	480,00 ngr/ml
Día 15	395,40 ngr/ml	920,00 ngr/ml	410,00 ngr/ml
Día 20	358,80 ngr/ml	710,00 ngr/ml	360,00 ngr/ml

Resumen de las medias de ICAM-1 en bilis por día en los tres grupos, evidenciando las diferencias que son estadísticamente significativas en todos los casos.

6.6.3 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 1 Y SU CURVA DE ROC.

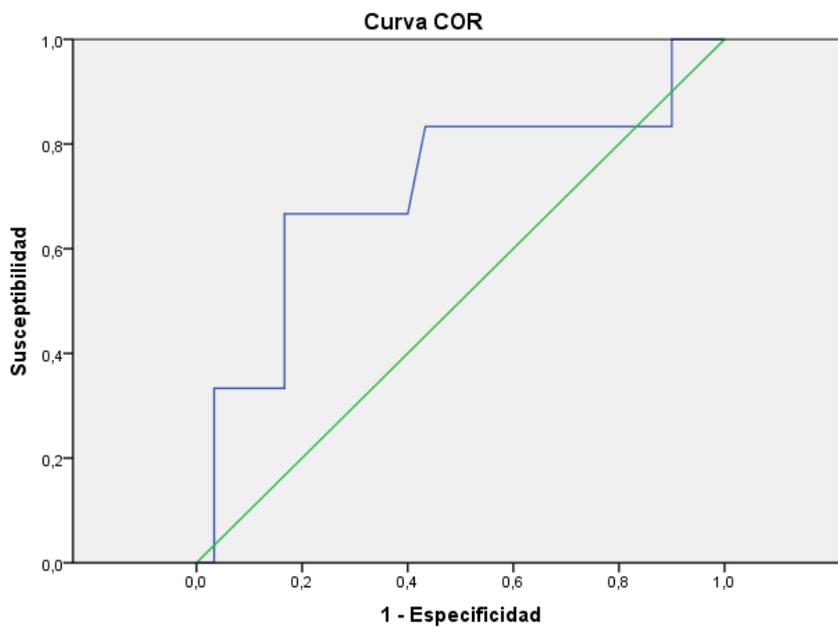
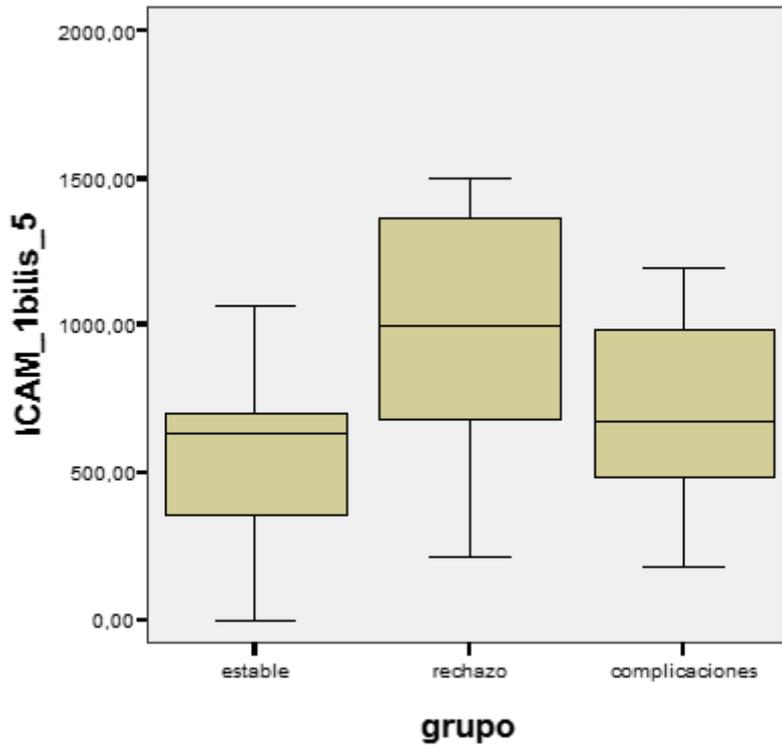
ICAM-1bilis 1



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.6.4 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 5 Y SU CURVA DE ROC.

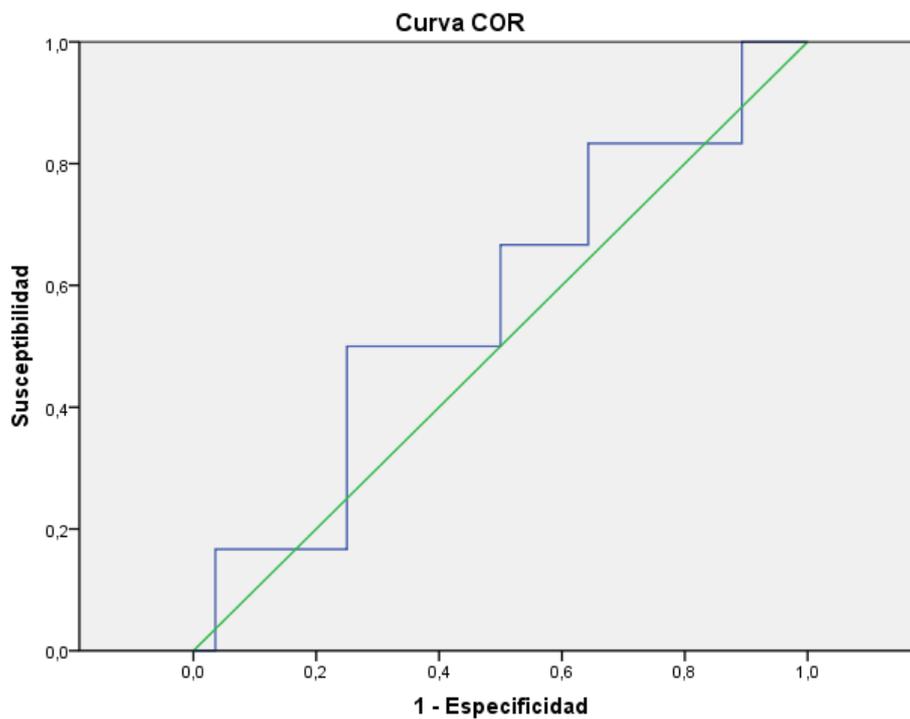
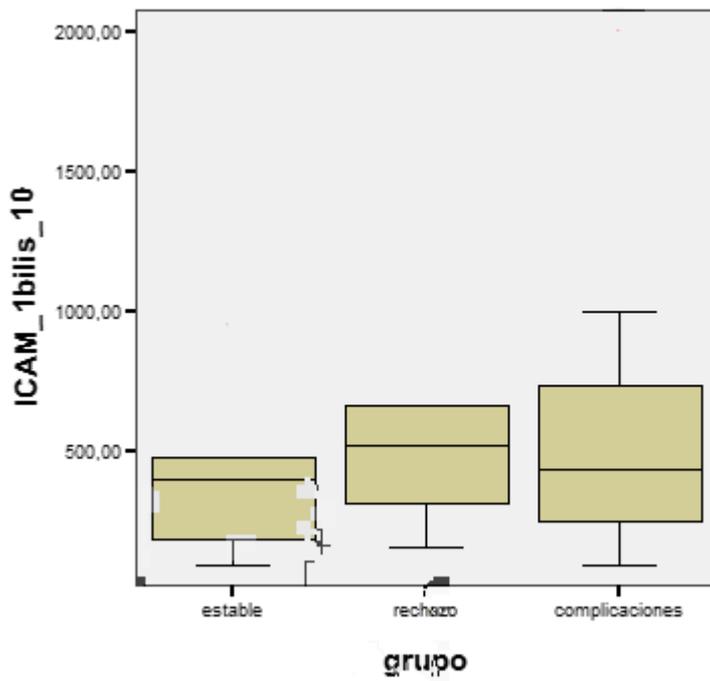
ICAM-1 bilis 5



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

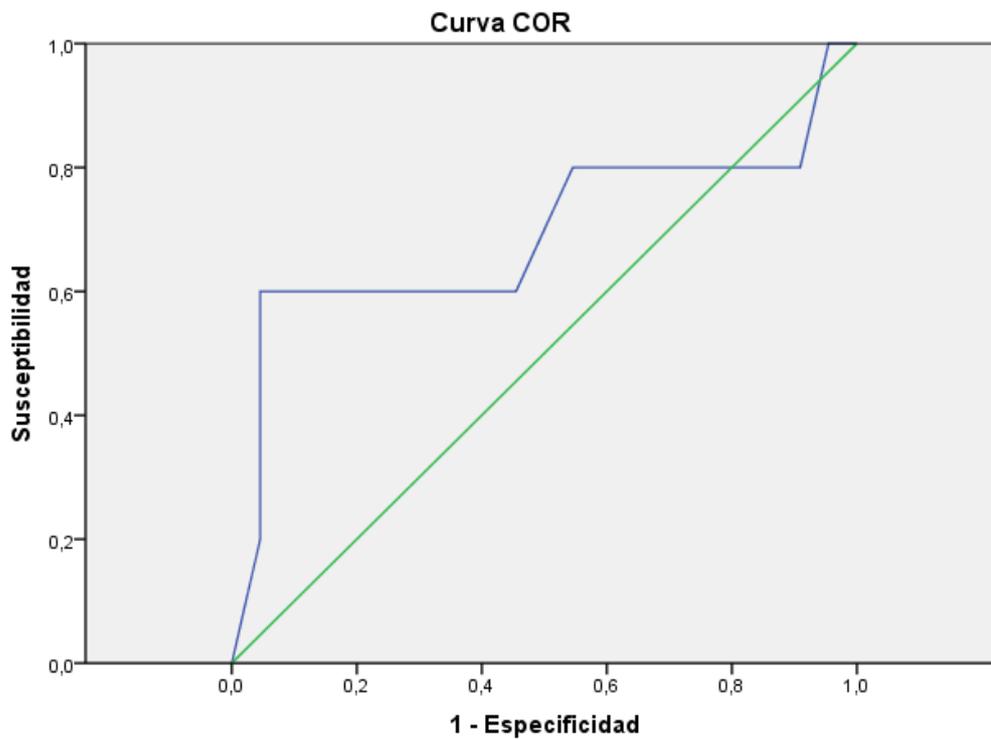
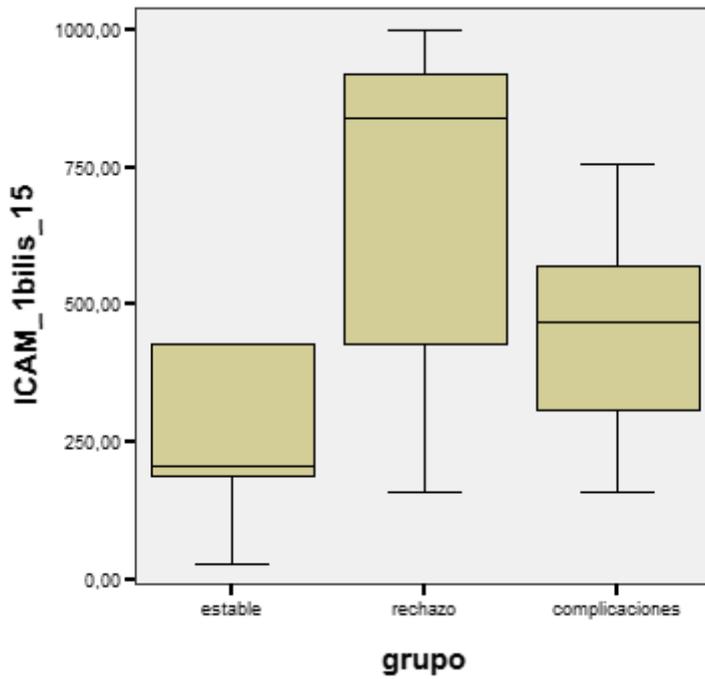
6.6.5 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 10 Y SU CURVA DE ROC.

ICAM-1bilis 10



6.6.6 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 15 Y SU CURVA DE ROC.

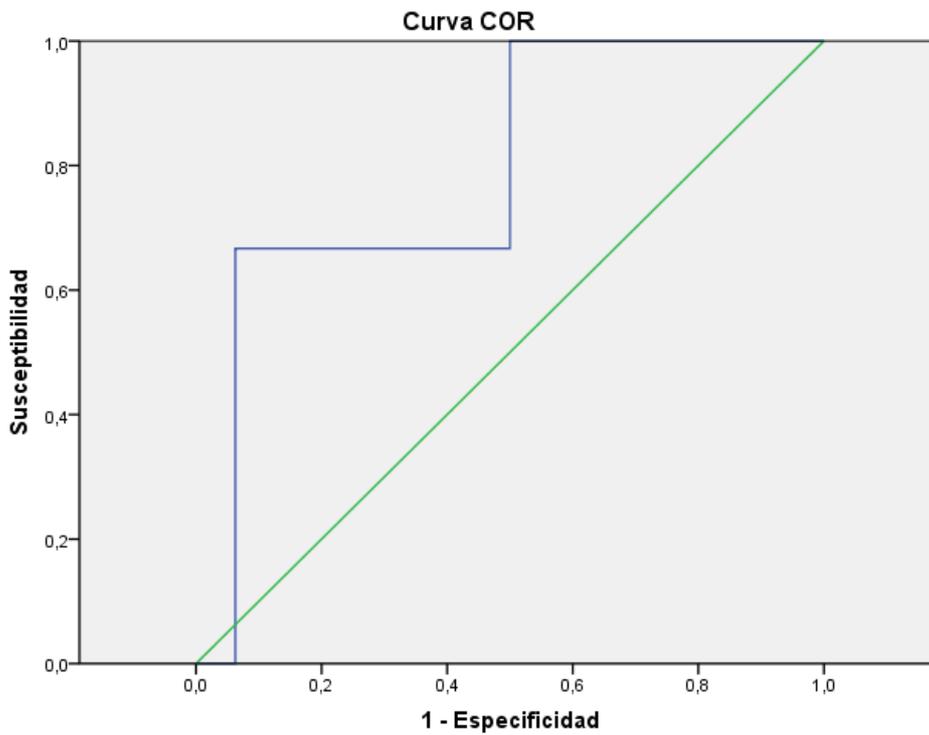
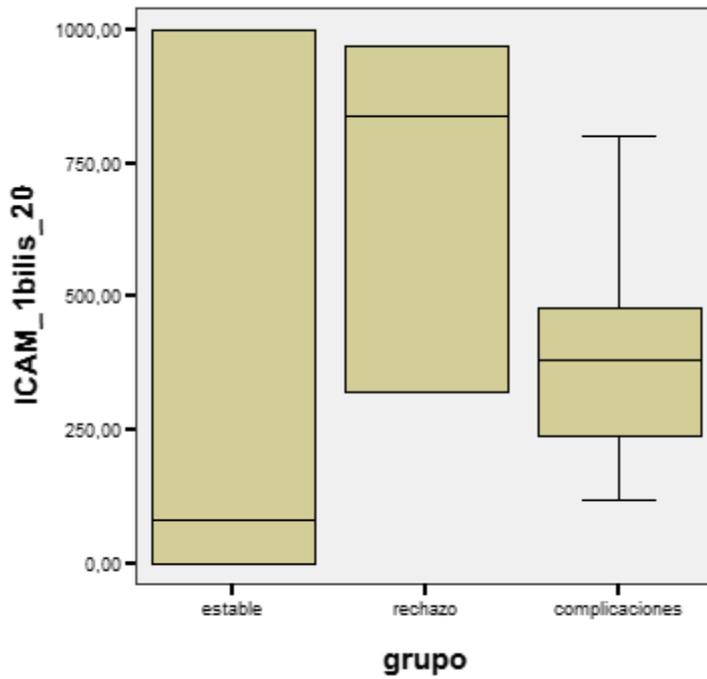
ICAM-1bilis 15



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

6.6.7 DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MEDIA EN LOS TRES GRUPOS EN EL DÍA 20 Y SU CURVA DE ROC.

ICAM-1 BILIS 20



6.6.8 PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS

Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de contraste

	ICAM-1bilis 1	ICAM-1bilis 5	ICAM-1bilis 10	ICAM-1bilis 15	ICAM-1bilis20
Chi-cuadrado	83,384	118,200	113,731	69,375	76,000
G1	1	1	1	1	1
Sig. asintót.	,000	,000	,000	,003	,001

Prueba de Mann-Whitney-CORRECIÓN DE BONFERRONI Y SERÁ SIGNIFICATIVO SI P<0.025

Estadísticos de contraste

	ICAM-1bilis 5	ICAM-1bilis 10	ICAM-1bilis 15
U de Mann-Whitney	20,000	16,000	,000
W de Wilcoxon	230,000	226,000	210,000
Z	-2,446	-2,684	-3,660
Sig. asintót. (bilateral)	,024	,000	,001

Respecto a los datos arriba expuestos sobre **ICAM-1 en bilis**, el primer dato a resaltar que encontramos niveles elevados en todos los grupos, pero niveles por encima de los normales (283 ± 113 ngr/ml), al contrario como ocurría en la determinación de IL-2 en bilis.

Los niveles de este marcador aparecen elevados desde el día 1 en todos los grupos, sobre todo en el grupo rechazo, aunque también en el grupo estable y en el grupo complicaciones. En el día 5, 10, 15 y 20 la elevación siendo mayor en el grupo rechazo respecto a los otros dos grupos, disminuyendo lentamente los niveles sin alcanzar la normalidad.

Si aplicamos la prueba Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), esta elevación es estadísticamente significativa en todos los días; día 1 ($p < 0.000$), día 5 ($p < 0.000$), día 10 (0.000), día 15 ($p < 0.003$) y día 20 ($p < 0.001$).

Aplicando la corrección de Bonferroni (test Mann-Whitney) ($p < 0.025$), esta elevación es estadísticamente significativa en el 5º día ($p < 0.024$), día 10 ($p < 0.000$) y día 15 ($p < 0.001$)



6.6.9 CURVAS DE ROC ICAM-1 BILIS

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: ICAM-1 bilis 1

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%
------	-------------------------	---------------------------------	---



			Límite inferior	Límite superior
,470	,091	,748	,291	,649

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:ICAM-1bilis 5

			Intervalo de confianza asintótico al 95%	
Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Límite inferior	Límite superior
,714	,093	,020	,532	,896

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:ICAM-1bilis 10

			Intervalo de confianza asintótico al 95%	
Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Límite inferior	Límite superior
,571	,092	,440	,392	,751

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:ICAM-1bilis 15

			Intervalo de confianza asintótico al 95%	
Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Límite inferior	Límite superior
,691	,117	,061	,461	,921

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste:ICAM-1bilis 20

			Intervalo de confianza asintótico al 95%	
Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Límite inferior	Límite superior
,792	,097	,025	,601	,983

Respecto a las **curvas de ROC**, podemos considerar que hemos obtenido significación asintótica los días 5 ($p < ,020$), 15($,061$) 20 ($p < ,025$), aunque los valores superan ligeramente los preceptivos ($p < 0,05$)

Hemos analizado la sensibilidad y especificidad para cada uno de estos días. Recordar que los niveles normales son: 283 ± 113 ngr/ml

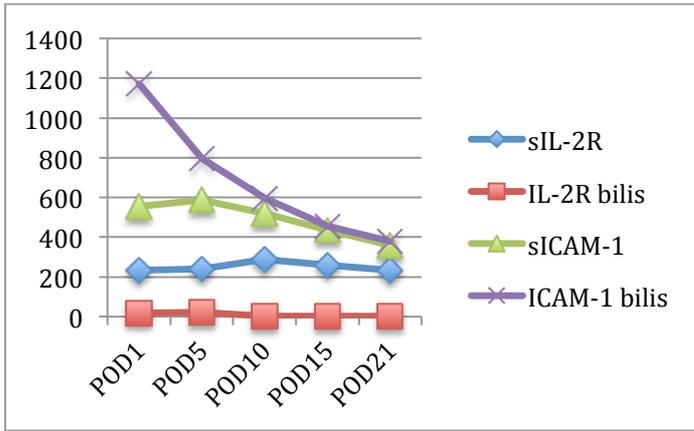
Aplicando el protocolo descrito en material y métodos de establecer un nivel A, nivel B y nivel C, según las determinaciones obtenidas en el marcador...

Según las determinación obtenidas:

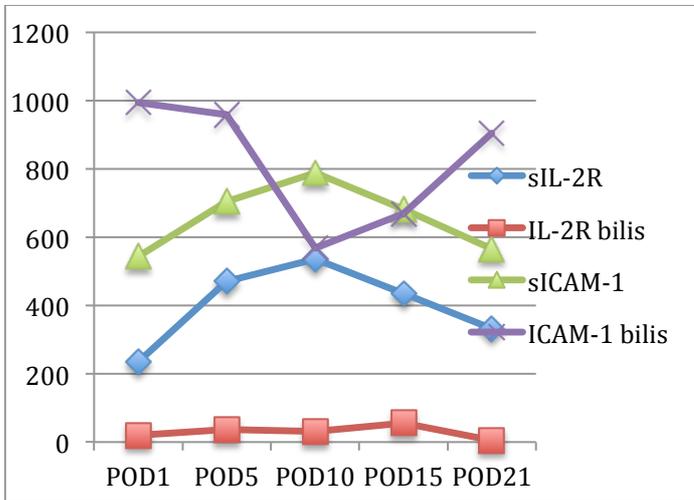
DIA	NIVEL	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
DIA 5	A) 325,00 ngr/ml	83%	14%
	B) 822,38 ngr/ml	66.7%	70%
	C) 1.430 ngr/ml	16%	97%
DIA 15	A) 314 ngr/ml	83.3%	36%
	B) 610,00 ngr/ml	50%	75%
	C) 1.105 ngr/ml	50%	75%
DIA 20	A) 349,54 ngr/ml	66.7%	50%
	B) 540 ngr/ml	66.7%	75%
	C) 905 ngr/ml	33%	99.4%

1) nivel A: nivel próximo a niveles normales; 2) nivel B: nivel intermedio entre el nivel normal y el nivel más elevado y 3) nivel C: nivel alto

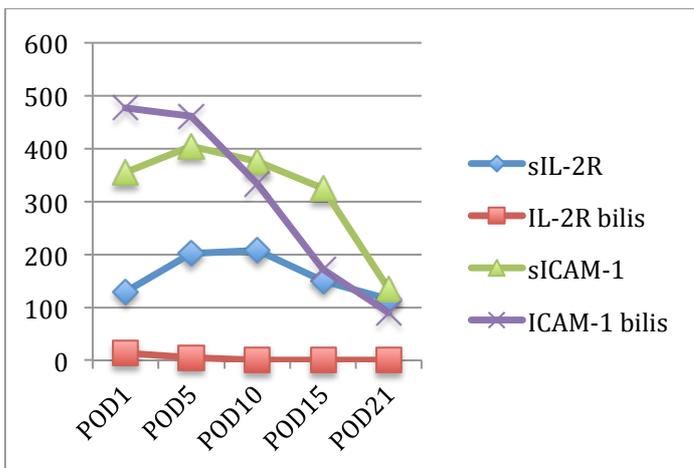
6.7 EVOLUCION NIVELES EN EL TIEMPO DE LOS DISTINTOS MARCADORES EN LOS DISTINTOS GRUPOS



GRÁFICA PACIENTES GRUPO ESTABLE



GRÁFICA PACIENTES GRUPO RECHAZO



GRÁFICA PACIENTES GRUPO COMPLICACIONES

Gráficas que reflejan como evolucionan los niveles de los distintos biomarcadores estudiados en los tres grupos de pacientes en los distintos días que se realizan las determinaciones: 1, 5, 10, 15 y 20.

En el **GRUPO ESTABLE**, niveles estables , con discreta elevación en los distintos biomarcadores, salvo ICAM-1 bilis, en el que se objetiva una elevación en las primeras 24-48 horas, descendiendo a niveles normales después.

En el **GRUPO RECHAZO**, niveles elevados que se elevan aún más en el momento del rechazo. Respecto a ICAM-1 en bilis, hay una elevación en las primeras 24-28 horas, que disminuye, elevándose posteriormente en el momento del rechazo.

En grupo **COMPLICACIONES**, niveles normales que se elevan progresivamente a niveles menores que los del grupo rechazo. En el grupo ICAM-1 en bilis, la dinámica de las primeras 24-48 es la misma que en los otros dos grupos.

DISCUSIÓN



El trasplante hepático es aceptado ampliamente como tratamiento eficaz para salvar la vida a pacientes con enfermedades terminales o en pacientes con fallo hepático agudo. A pesar de la mejoría del tratamiento inmunosupresor y los continuos avances técnicos, el índice de supervivencia del injerto tras el trasplante es de un 80%

a un año y de un 70% a los cinco años según la base de datos de la United Network for Organ Sharing (UNOS) y Japanese Liver Transplant Society.

Una de las principales causas de fracaso de los órganos trasplantados es el RECHAZO de los mismos, esto es, la destrucción del injerto por parte del sistema inmune del receptor, de tal manera que los órganos puedan perder su capacidad funcional.

La incidencia de rechazo agudo es de un 7 a un 42% en pacientes trasplantados⁽¹⁻³⁾, debiendo tener en cuenta otras situaciones en el diagnóstico diferencial. El índice de supervivencia al año tras el trasplante hepático ha aumentado de un 30% en los 1970s a más de un 80% en la actualidad⁽⁴⁻⁶⁾. El rechazo agudo ocurre de forma más común en el postoperatorio precoz (en las seis primeras semanas)⁽⁷⁾. La mayoría de estos episodios (aproximadamente un 85%) se resuelven con tratamiento antirechazo, habitualmente con bolos de corticoides⁽⁷⁾ o aumentando el tratamiento inmunosupresor. Estos episodios pueden jugar un papel decisivo en la supervivencia a largo plazo del injerto

La prueba diagnóstica por excelencia para el diagnóstico de rechazo agudo no ha cambiado desde el comienzo de la realización del primer trasplante por Starlz en 1963. El rechazo requiere la evidencia de disfunción del injerto (elevación de enzimas hepáticas seguido por la confirmación mediante la biopsia hepática). Este método de diagnóstico, considerado el principal, es caro, arriesgado y conlleva tiempo. Además del tiempo que conlleva el análisis de la biopsia, en ocasiones hay errores de interpretación y no es extraño la instauración de un tratamiento empírico antirechazo antes de que el informe histológico lo confirme.

El rechazo agudo es la complicación más frecuente tras el trasplante hepático. La terapia inmunosupresora con esteroides, inhibidores de la calcineurina, con o sin mycofenolato mofetil, reducen la incidencia de rechazo agudo en el trasplante hepático. Sin embargo, la mejoría del pronóstico del paciente depende no sólo de reducir la incidencia de rechazo, sino también de disminuir los efectos adversos asociados a los esteroides⁽⁸⁻¹⁰⁾ o a los inhibidores de la calcineurina⁽¹¹⁻¹³⁾.

La investigación clínica se ha focalizado en la prevención del rechazo limitando los efectos secundarios a los inmunosupresores utilizados mientras mantengan su efecto inmunosupresor. Una alternativa es la utilización de antagonistas de receptores de IL-2 como terapia de inducción en el periodo perioperatorio a fin de reducir la dosis o retrasar la introducción de inhibidores de calcineurina o reducir o eliminar la administración de esteroides⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

No debemos subestimar la importancia del tratamiento inmunosupresor dado que este se asocia a un riesgo aumentado de infecciones, recurrencia del virus de la hepatitis y complicaciones metabólicas como diabetes mellitus, hiperlipidemia, HTA, etc. Por otra parte, repetidos episodios de rechazo agudo sin inmunosupresión o con tratamiento inmunosupresor inadecuado, puede dar lugar a rechazo crónico produciendo la pérdida del injerto. Así, un tratamiento inmunosupresor adecuado para el rechazo agudo es crítico para reducir la morbilidad y mejorar la calidad de vida de los receptores, haciendo necesario el diagnóstico precoz y definitivo de rechazo agudo.

Hay solapamiento en los hallazgos histológicos y las manifestaciones clínicas de rechazo clínico y otras complicaciones tras el trasplante hepático, como daño por isquemia/reperfusión, complicación biliar, recurrencia virus hepatitis, etc.⁽¹⁷⁾

Estos “solapamientos” hacen que el diagnóstico de rechazo agudo y su gradación sea difícil y urge explorar métodos potenciales y marcadores moleculares que faciliten el diagnóstico de rechazo agudo y la evaluación de su severidad.

Los síntomas clínicos de rechazo agudo, así como los tests convencionales como: bilirrubina y enzimas en suero son utilizados rutinariamente para diferenciar rechazo de otras causas de disfunción del injerto. Su eficacia diagnóstica es baja debido a su poca especificidad^(18,19-21).

Nuevos biomarcadores no invasivos en el rechazo agudo podrían aumentar la calidad de vida de los pacientes trasplantados de diversas maneras, por ejemplo, reduciendo la necesidad de biopsias –que es un método invasivo que puede producir efectos adversos-, optimizando el tratamiento inmunosupresor, evitando niveles elevados innecesarios de inmunosupresores en pacientes con riesgo de complicaciones, con una detección precoz y finalmente, mejorando la supervivencia del injerto.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, demostramos que existen marcadores biológicos (IL-2R e ICAM-1) que son capaces de ayudar en el diagnóstico de rechazo agudo en el trasplante hepático. Pasamos a discutir los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

7.1 DETERMINACION DE RECEPTORES DE INTERLEUKINA-2 EN SUERO

Un diagnóstico rápido y seguro de rechazo agudo es importante para el tratamiento satisfactorio del injerto rechazado. En la patogénesis del rechazo agudo, la activación de las células T CD4+ juega un papel importante. Tras una activación específica, las células T proliferan, expresan receptores de IL-2 en la superficie celular, y secretan citocinas incluyendo IL-2. Estas células T activadas también pueden ser identificadas en el injerto⁽²²⁾, donde se regulan las células T citotóxicas, células B y macrófagos⁽²³⁾. Los IL-2R tienen tres cadenas proteicas transmembrana: alfa (CD25), beta (CD122) y gamma (CD132). La cadena alfa es un componente importante de la molécula que constituye el receptor de alta afinidad y que se expresa mucho en los linfocitos T activados.

Este complejo proceso orquesta la destrucción del injerto mediante la lisis de las células diana vía anticuerpos. El infiltrado local de linfocitos se origina en otros órganos linfoides y en linfocitos circulantes en sangre periférica. Además, poblaciones de linfocitos en sangre periférica muestran un patrón de activación que refleja la respuesta inmune local que se produce en el trasplante.

Hay publicaciones que indican que el sistema de afinidad para el receptor de IL-2 se autorregula durante el rechazo agudo^(14,24-26). Una expresión aumentada se produce en la población de linfocitos CD4+ y en menor medida en los linfocitos T CD8+.

La regulación de IL-2R en la superficie celular va paralela a los niveles elevados de IL-2R en suero. Se ha demostrado que la liberación de los receptores ligados a membrana se acompaña de un aumento de IL-2R circulante⁽²⁷⁾.

La presencia de IL-2R soluble en suero puede derivar de distintas fuentes celulares, incluyendo las células T del injerto en la circulación o de órganos linfoides. Un 5-10% de células mononucleares del injerto han demostrado tener receptores de IL-2R⁽²⁸⁾. Asimismo otras células como macrófagos y células B activadas también manifiestan IL-2R contribuyendo a los niveles de IL-2R en suero⁽²⁹⁾.

La presencia o ausencia de moléculas coestimuladoras y el microambiente de citocinas es crítico en la respuesta de las células T efectoras⁽³⁰⁾.

En nuestro estudio, como se objetivó en el apartado resultados, la determinación de este marcador, receptor de IL-2, ha mostrado muy buenos resultados. Ya en la determinación en el 5º día hemos obtenido resultados satisfactorios, elevándose en pacientes con rechazo agudo respecto a los otros dos grupos. Esta elevación se mantiene los días 10 y 15 descendiendo en el día 20 tras la

instauración del tratamiento inmunosupresor. Esta elevación (día 5, 10 y 15) es estadísticamente significativa. De esta manera, se puede afirmar que este marcador en nuestra experiencia es un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo agudo. Se eleva de forma precoz, resultados significativos ya en el 5ª día e incluso su monitorización es buena para comprobar la eficacia del tratamiento inmunosupresor. Su elevación se produce en el periodo en que es más probable que se produzca el rechazo agudo, de ahí de gran utilidad. Asimismo es útil para diferenciar rechazo agudo de otras complicaciones que pueden aparecer e el postoperatorio precoz del trasplante hepático.

Respecto a la sensibilidad y especificidad (**curvas ROC**) de este marcador, hemos observado que es un **marcador muy sensible**. Con ligeras elevaciones de sus niveles normales, alcanza una gran sensibilidad, siendo muy específico cuando estos niveles son muy altos. Con niveles B y C la especificidad es buena ratificando la utilidad de este marcador. Obtenemos niveles de sensibilidad y especificidad ponderados con niveles intermedios.

En nuestra experiencia, la determinación de IL-2R en suero es un **marcador diagnóstico muy bueno** en el manejo del rechazo agudo en el trasplante hepático de manera precoz, con resultados prometedores en el día 5, 10 y 15, los días donde la incidencia de rechazo es mayor. Esto contribuye a un diagnóstico precoz del rechazo agudo y a un tratamiento precoz del mismo.

Autores como Andreas Lun et al⁽³¹⁾ en una serie de 119 pacientes se realizaron determinaciones pretrasplante (cada 1-2 días) hasta 14-18 días postrasplante (cada 3-4 días) de IL-2R junto a parámetros de laboratorio (bilirrubina y otras enzimas hepáticas). Obtuvieron resultados significativos ($p < 0.001$) a partir del 4º día con un pico máximo al 7º día, en el momento más susceptible de que ocurra el rechazo agudo. No sólo obtuvieron resultados significativos, sino un VPP del 83% y un VPN del 85% en el 7º día con niveles de IL-2R en suero > 3850 IU/ ml. El resto de parámetros bioquímicos se elevaron se forma evidente aunque no estadísticamente significativa. Los autores de este trabajo concluyen que este marcador es muy útil para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático, con resultados parecidos a los nuestros.

En el estudio de Adams et al⁽³²⁾ en su trabajo sobre 76 pacientes, al igual que el nuestro, establece tres grupos de pacientes (pacientes estables, pacientes con rechazo y pacientes con complicaciones), 53 pacientes fueron incluidos en el grupo

rechazo. La determinación se realizó diaria, detectándose niveles elevados de forma significativa ($p < 0.0001$) en el grupo rechazo respecto a pacientes con injerto estable o complicaciones. Según el autor, esta elevación se detecta 24-48 horas antes del diagnóstico clínico de rechazo agudo. De esta manera, se puede definir este marcador como útil para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático.

Perkins James D et al⁽³³⁾ con una serie de 82 pacientes (12 pacientes grupo control, 20 grupo rechazo, 5 grupo CMV, 45 en grupo de múltiples complicaciones) en los que realizaron la determinación de este marcador según el siguiente protocolo: determinación diaria la primera semana, tres determinaciones la segunda semana y dos veces la tercera semana y siguientes hasta la sexta semana o indicación clínica. El grupo CMV se demostró mediante en hemocultivos o biopsias. El análisis de los niveles de IL-2R puso de manifiesto un aumento significativo de los mismos en la determinaciones de los 10 días previos al diagnóstico de rechazo agudo de forma significativa ($p < 0.0004$), disminuyendo los niveles posteriormente tras la instauración del tratamiento inmunosupresor. Al igual que en nuestro trabajo, este biomarcador se postula como un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático y un buen marcador para monitorizar el efecto del tratamiento inmunosupresor.

Granot E et al⁽³⁴⁾ monitorizaron las citocinas derivadas de los linfocitos T helper 1 (Th1): IL-2, IL-2R e IFN-gamma las derivadas de los linfocitos T helper 2 (Th2): IL-4 e ICAM-1 en 22 pacientes (13 pacientes con rechazo agudo. Las indicaciones de trasplante fueron muy diversas). Realizaron determinaciones a las 4 horas, 3 y 6 días postrasplante. En el caso de los niveles de IL-2R los niveles aumentaron en el grupo rechazo de forma significativa en el 6º día postoperatorio respecto a los niveles postperfusión. El resto de parámetros determinados no fueron estadísticamente significativos. Otro estudio más que apoya la validez de este marcador en el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. La monitorización de otras citocinas en este trabajo no dieron resultados tan satisfactorios.

Otro autor con resultados satisfactorios es O. Millan et al⁽³⁵⁾ en una serie de 47 pacientes en los cuales se practicó trasplante hepático y de los cuales 9 desarrollaron rechazo agudo se determinó IL-2R e INF-gamma en suero. Se realizaron determinaciones pretrasplante (no más de un mes antes del procedimiento) y postrasplante: 1ª semana, 2ª semana, 1º mes, 2º mes, 3º mes, 6º mes y 12º mes. En las determinaciones del postoperatorio precoz, las que pueden diagnosticar rechazo agudo, tanto los niveles de IFN- gamma como los de IL-2R fueron significativos en la determinación al 7º día, definiendo aquellos pacientes con riesgo de desarrollar

rechazo agudo tras el trasplante hepático. En el análisis de ambos marcadores se obtuvieron resultados significativamente estadísticos en el 7º día, constituyendo un marcador de riesgo con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 82% reafirmando la capacidad de para diagnosticar precozmente la aparición de rechazo agudo en los pacientes con trasplante hepático, coincidiendo con nuestra hipótesis de trabajo. Otro autor que apoya nuestros resultados es Akoglu et al⁽³⁶⁾ quien obtuvo resultados similares a los de O. Millan et al y a los nuestros.

Sin embargo Sasan Roayaie et al⁽³⁷⁾ en un estudio sobre 37 (de los cuales 8 presentaron rechazo agudo), no obtuvo resultados significativos. La indicación de trasplante hepático en su serie fue solo hepatitis C. Otra característica de la serie fue que el tratamiento inmunosupresor de inicio fue OKT3 + prednisona + azatioprina, administrando a los pacientes ciclosporina o tacrolimus a partir del 4º día postoperatorio y manteniendo OKT3 hasta que los niveles de inhibidores de calcineurina sean estables. Analizaron los niveles de citocinas, ICAM-1 e IL-2R en sangre en los días 5, 7 y 10 postoperatorios, y si bien presentaron elevación entre el día 5 y el 10 ($p < 0.7923$) y ($p < 0.7079$), no hubo significación estadística. Probablemente la muestra es muy pequeña para obtener resultados significativos. En definitiva, son muchos los autores que apoyan la utilización de este marcador en el seguimiento de pacientes con trasplante hepático⁽³⁸⁻⁴¹⁾.

Se ha demostrado que los niveles de IL-2R pueden ser un excelente marcador de rechazo porque las células T activadas, HLA antígeno específicas, producen IL-2R de forma precoz en el proceso de rechazo⁽⁴²⁾. El tratamiento con inhibidores de calcineurina no interfiere con los pasos de la producción de IL-2R^(43,44).

En los injertos hepáticos que no sufren rechazo, proceso infeccioso o reintervención, los niveles de IL-2R se elevan durante un mínimo periodo de tiempo y disminuye a un nivel estable en pocos días^(38-41,44). Varios factores podrían causar este incremento inicial, incluyendo enfermedad primaria del injerto, manipulación quirúrgica y reconocimiento inmunológico del injerto. Asimismo, el mantenimiento de niveles estables de IL-2R se debe a un buen control de la inmunosupresión controlando la activación de las células T, dando lugar a la tolerancia del injerto.

Se asume que un aumento indica la presencia de células T activadas que causan rechazo del injerto. Los niveles de IL-2R en sangre se elevan varios días antes de que se diagnostique el rechazo, pudiendo considerarse un marcador precoz de rechazo. Además, los incrementos rápidos en los niveles diarios de IL-2R ocurren en pacientes con rechazo hepático en los primeros 20 días postrasplante.

La utilidad de este marcador es mayor en el postoperatorio precoz cuando varias anomalías, además de rechazo, pueden indicar disfunción del injerto, como

daño de preservación, hepatotoxicidad por ciclosporina y hemólisis. Otras causas que pueden provocar aumento de los niveles de IL-2R tales como reintervención de fístulas biliares o infecciones bacterianas, víricas o fúngicas^(43,44).

El interés en determinar qué tipo de subpoblación celular sintetiza citocinas específicas va en aumento porque la subpoblación celular puede determinar el tipo de respuesta inmune. Por ejemplo, se identifica en base a su potente reactividad como factor de crecimiento sobre las células T, considerándose una citocina “llave” en la alorespuesta del injerto, especialmente cuando es producida por células T CD8+⁽⁴⁵⁾. Sin embargo, la IL-2, que es producida fundamentalmente por células T CD4+, está implicada en el mantenimiento de la tolerancia periférica, manteniendo la supervivencia y función reguladora de las células T⁽⁴⁶⁾.

Son necesarios ensayos funcionales de citocinas para minimizar la variabilidad intra e interlaboratorios y así poder estandarizar el procedimiento antes de poder ser estandarizado en la práctica clínica rutinaria. Sin embargo, el impacto de la matriz biológica, el tipo y tiempo de estimulación, instrumentos utilizados y el análisis de datos son consideraciones importantes en la implementación de estas técnicas en análisis multicéntricos y, por tanto, en la práctica clínica rutinaria⁽⁴⁷⁾.

Una terapia inmunosupresora óptima es esencial para mantener un injerto viable. Varios biomarcadores han demostrado resultados prometedores para detectar la respuesta inmune individual y predecir el rechazo agudo⁽⁴⁸⁾.

Es de particular interés medir la actividad soluble o intracelular de las citocinas, demostrando así una fuerte correlación con el desenlace clínico^(38,49). En nuestra experiencia, la medida de los niveles de IL-2R en suero ha demostrado ser un herramienta muy útil en el manejo del gran problema del diagnóstico y tratamiento precoz del rechazo agudo en el trasplante hepático con su morbi-mortalidad.

7.2 DETERMINACION DE RECEPTORES DE INTERLEUKINA-2 EN BILIS

Lo novedoso de nuestro estudio es la determinación de estos biomarcadores (IL-2R e ICAM-1) en bilis. Así como en el trasplante renal se probó con la determinación de enzimas urinarias o proteínas moleculares, como marcadores de rechazo agudo en el postoperatorio precoz del trasplante renal^(50,51), algunos ensayos se han orientado en la búsqueda de marcadores en bilis para la detección precoz del rechazo agudo en el trasplante hepático.

El sitio principal de la respuesta inmune en el injerto es la triada portal que muestra inflamación, endotelitis y daño del conducto biliar. Diversos autores han demostrado un aumento de la secreción local de citocinas en el sitio inflamado, a nivel de los tractos portales, secretándose así en bilis y permitiendo su medición. Una posible explicación de esta utilidad es que la acumulación de linfocitos activos en el hígado, en los tractos portales, pueden producir daño en las células de los conductos biliares e interferir el flujo biliar en los canalículos biliares secundario al daño de estos. De esta manera, los canalículos biliares serían la diana principal del rechazo agudo en el trasplante hepático^(52,53). Para algunos autores, la activación linfocitaria ocurre fuera del injerto y las células activadas en la circulación localizan el injerto. El nivel de una proteína sérica en bilis depende del tamaño molecular de la misma y su concentración en suero, así como de la integridad en la interfase conducto biliar/endotelio vascular⁽⁵⁴⁾.

Sin embargo, los altos niveles de IL-2R determinados en bilis en el episodio de rechazo son más atribuibles a una gran producción local que a una filtración entre suero y bilis. Niveles de IL-2R se han medido simultáneamente en suero y bilis. Para asegurar aún más la importancia de la producción local de IL-2R, el cociente de IL-2R bilis/suero se compara con el nivel de albúmina, una proteína plasmática de paso molecular a bilis por difusión pasiva⁽⁵⁴⁾.

La anastomosis coledo-coledociana T-T es el método estándar para la reconstrucción de la vía biliar en el trasplante hepático. El drenaje biliar es importante para conocer la cantidad, color y otras propiedades del débito biliar del injerto hepático. La formación de bilis es la función central del hígado. Tras el trasplante hepático, el flujo biliar, la viscosidad, su color, son monitorizados estrechamente. Los cambios en la calidad de la bilis producida pueden indicar disfunción del injerto. Asimismo, puede reducir las complicaciones biliares⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. La bilis habitualmente es desechada sin analizarla, aunque pensamos que podría aportar mucha información. En algunos estudios se evalúa la función del injerto analizando la bilirrubina en bilis⁽⁵⁸⁾, ácidos biliares⁽⁵⁹⁾ y otros biomarcadores. Se considera que este tipo de reconstrucción biliar proporciona baja morbilidad al trasplante hepático^(60,61).

Un tubo en T se utiliza rutinariamente en la vía biliar para acceder a estudios diagnósticos y monitorización postoperatoria de la producción de bilis. Esto incluye poder medir los niveles de bilirrubina y de otros parámetros. Esto compensa los riesgos de colocación de un tubo de kher, como puede ser una fistula biliar, etc. Inicialmente la bilis dreña libremente a una bolsa colectora externa. En general, el tubo en T es clampado entre el día 7 y 10 del postoperatorio. El tubo se retira a los tres meses. En nuestro estudio la bilis ha sido recogida directamente del tubo en T.

Muchos medicamentos pueden afectar la formación de bilis y su cantidad. Un medicamento que causa colestasis es la ciclosporina, un péptido de origen fúngico con potentes propiedades inmunosupresoras⁽⁶²⁻⁶⁴⁾. Dado que la secreción de colesterol y fosfolípidos depende de los ácidos biliares, la colestasis puede ser resultado del tratamiento con ciclosporina, dando lugar a un aumento de la concentración de bilirrubina y ácidos biliares en suero^(65,66). Además, la ciclosporina puede afectar la composición de la bilis inhibiendo selectivamente la síntesis de ácido quenodeoxicólico (CDCA)⁽⁶⁷⁾.

Uno de los problemas que se presentan en los estudios que pretenden analizar la bilis es que las muestras de bilis obtenidas tras trasplante hepático, en ocasiones, no son suficientes para realizar determinaciones de parámetros, debido a su escaso volumen. La mayoría de estos estudios son a corto plazo, terminando antes del clampaje del tubo en T y el restablecimiento de la circulación enterohepática. En nuestro estudio obtuvimos fluido biliar hasta el vigésimo día tras la realización del trasplante hepático.

Se han estudiado diversos marcadores en bilis para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. Entre estos, la beta-2-microglobulina, una proteína biliar, cuyos niveles biliares son considerados un indicador más sensible de la actividad inflamatoria, que los niveles séricos^(52,53). Otros ensayos han demostrado que la determinación de perforina y granzima B en la biopsia hepática, pueden ser marcadores sensibles y específicos para el diagnóstico de rechazo agudo^(67,68).

Otro marcador estudiado con éxito es la composición de lípidos biliares. Sin embargo, se pueden ver alterados tras la administración prolongada de ciclosporina. La concentración de lípidos biliares disminuye con el daño del injerto, pero aumenta de nuevo con la resolución del agente perjudicial, sugiriendo que puede ser un indicador de la función hepática⁽⁶⁸⁾.

La elevación precoz de los niveles de IL-2R da la oportunidad de instaurar un tratamiento precoz para suprimir la activación de linfocitos y prevenir la producción de citocinas y el reclutamiento de células inflamatorias capaces de dañar el injerto. Los

antagonistas de IL-2R humanizados u orgánicos son anticuerpos monoclonales IgG contra la subunidad alfa de IL-2R que antagoniza competitivamente la activación de células T y de proliferación bloqueando la combinación de IL-2 con sus receptores. Diversos trabajos han demostrado que el tratamiento de inducción con antagonistas de IL-2R, reduce la incidencia de rechazo agudo sin aumentar el riesgo de infección o tumores^(17,69-72,73).

En nuestra serie, de los 90 pacientes estudiados, sólo 34 pacientes pudieron incluirse en el protocolo de determinación en bilis debido a la dificultad para obtener la muestra tras el clampaje del tubo en "T" y la restauración de la circulación bilioentérica. No obstante, a pesar de este hecho, su repercusión sobre los resultados no ha demostrado significación estadística.

De los 34 pacientes, 8 corresponden al grupo de pacientes estable; 6 al de pacientes con complicaciones distintas al rechazo y 14 a pacientes con rechazo.

Comentar que los niveles de IL-2R en los tres grupos son muy bajos, no llegando a los límites normales (100 ± 50 pm/l), si bien hemos observado diferencias entre cada uno de ellos. Creemos que los niveles bajos pueden ser secundarios al metabolismo de la molécula.

Respecto a los resultados obtenidos en el análisis de este marcador, en nuestra serie, los resultados son "parecidos" a los obtenidos en el análisis de IL-2R en suero. Hay una elevación de los niveles de IL-2R en bilis en el día 5, 10 y 15, disminuyendo radicalmente en el día 20. Esta elevación, sin embargo, es sólo estadísticamente significativa en el día 5, no en el día 10 y 15, como ocurre en la IL-2R en suero. Sin embargo, la diferencia de los niveles es evidente. Por lo tanto, la determinación de IL-2R en bilis es un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. Que los niveles desciendan a partir del vigésimo día, nos llega a sugerir su utilidad para monitorizar la eficacia del tratamiento inmunosupresor y la diferencia entre el grupo rechazo y el grupo complicaciones podría facilitar el diagnóstico diferencial de estas dos patologías clave en el postoperatorio del trasplante hepático. Insistir en la importancia de la elevación precoz de los niveles de este marcador en el grupo rechazo, contribuyendo a la instauración de un tratamiento inmunosupresor lo antes posible y aumentar la supervivencia del injerto. Creemos que con un número de muestras mayor los resultados obtenidos hubieran ofrecido una mayor significación estadística.

Así pues, IL-2R es un **marcador útil** en el **diagnóstico precoz de rechazo** en los pacientes con trasplante hepático. La significación en el 5º día es un muy interesante. Esto podría ser indicativo de pacientes con alta sospecha de desarrollar

rechazo agudo y plantear la instauración de un tratamiento precoz, o un estrecho seguimiento.

Respecto al análisis de sensibilidad y especificidad (**curvas ROC**), es un marcador **con sensibilidad media** a niveles bajos, muy poco sensible a niveles altos y si es **muy específico**, incluso a niveles bajos.

Asimismo, hay autores con resultados muy prometedores, Adams DH et al en su serie de 76 pacientes⁽³²⁾, al que ya hemos hecho referencia en la discusión de los resultados de la determinación de IL-2R en suero, incluye 40 pacientes en el protocolo de determinaciones de IL-2R en bilis (se añadió thiomersal a la bilis como bacteriostático). Este autor publica que obtiene niveles elevados de IL-2R en bilis en pacientes con rechazo agudo respecto a pacientes con injerto estable, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). Su elevación fue constatable 1-2 días antes del diagnóstico clínico de rechazo pero, sin embargo refiere que es más sensible que la determinación de IL-2R en sangre, con una sensibilidad del 94%, especificidad del 84%, VPP del 83% y VPN del 94%. Para el autor, la determinación de IL-2R en bilis es un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático.

También se obtuvieron niveles elevados, en esta serie (hay que recordar que se establecen tres grupos: (pacientes control, pacientes con rechazo agudo y pacientes con complicaciones), aunque no de forma significativa, en pacientes con disfunción hepática secundaria no a rechazo: infección por CMV, colangitis 2ª a infección bacteriana indicando que la activación de las células T forma parte de la respuesta inflamatoria general.

Sin embargo, como ya se ha reseñado arriba, los niveles de IL-2R en bilis fueron más específicos y sensibles que en suero, pudiendo ser una prueba “fundamental” en el diagnóstico, sobre todo en los pacientes no subsidiarios de biopsia hepática por diferentes motivos, dando lugar a un tratamiento precoz que suprima la activación linfocitaria y prevenir la producción de citocinas y el reclutamiento de células inflamatorias capaces de dañar el injerto.

Otro autor con buenos resultados es Perkins James D et al⁽³³⁾, con una serie de 82 pacientes en la que se realizaron determinaciones protocolizadas, a saber: determinación diaria la primera semana, tres determinaciones la segunda semana y dos veces la tercera semana y siguientes hasta la sexta semana o indicación clínica. Se evidenció una elevación significativa en los diez días previos al rechazo agudo ($p < 0.0004$), resultados similares a la determinación de IL-2R en suero, definiendo la

determinación de IL-2R en bilis como un buen marcador de rechazo agudo en pacientes trasplantados. La presencia de linfocitos Th o Ts o ambos en los tractos portales parece estar relacionado con la presencia de niveles de IL-2R en bilis. Al igual que en suero, los niveles descienden tras la instauración del tratamiento inmunosupresor. Tal y como afirmábamos en la discusión sobre los resultados de IL-2R en suero, es un buen marcador para el diagnóstico de rechazo precoz en el trasplante hepático y para monitorizar la respuesta al tratamiento inmunosupresor. Asimismo es buen marcador para diferenciar rechazo de complicaciones en el postoperatorio precoz, al igual que nuestros resultados.

Este autor, sin embargo, hace constar que hay otros factores que pueden elevar los niveles de IL-2R y dificultar el uso de esta molécula como indicador de rechazo del injerto, tales como factores mecánicos tras una reintervención, una fístula biliar o secundario a infección bacterianas, víricas o fúngicas⁽³³⁾.

En este sentido, quizás en nuestra serie, los niveles elevados significativamente el primer día postoperatorio pueden ser secundarios a la técnica quirúrgica, a la reperfusión o a factores secundarios al injerto.

Otro punto sobre el que llama la atención el autor es la identificación de enfermedad por CMV como un factor que causa niveles elevados de IL-2R, posiblemente por estimulación de la respuesta mediada por células, dando lugar a niveles elevados de IL-2R, aunque más bajos^(38,39).

No obstante, para este autor es un buen marcador diagnóstico/pronóstico de rechazo agudo en el trasplante hepático.

Warlé MC et al⁽⁷⁵⁾, en una serie de 61 pacientes monitorizan los niveles de ICAM-1, IL-2R, TNF, IL-6, IL-8 y IL-10 en suero y bilis diariamente durante el primer mes postoperatorio. De los 61 pacientes son incluidos en el estudio 45 y de estos, 23 reciben tratamiento con anticuerpos monoclonales (basiliximab) 6 horas tras el trasplante y en el 4º día postoperatorio. Basiliximab es un antagonista de los receptores de IL-2 que disminuye la incidencia de rechazo de un 41% al 26% (no significativo). Los niveles sanguíneos de IL-2R en suero disminuyen en el grupo tratado con anticuerpos monoclonales de forma significativa. Sin embargo, los niveles de IL-2R en bilis no se afectan por la administración de esta medicación. Sin embargo el volumen de la muestra de pacientes en ambos grupos con anticuerpos monoclonales es tan pequeña que no es susceptible de análisis estadístico.

Por consiguiente, en nuestra experiencia, la utilización de la determinación de IL-2R en bilis es muy útil para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático.

7.3 DETERMINACION DE ICAM-1 EN SUERO

La molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), es una molécula de adhesión de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa en las células endoteliales y hematopoyéticas. Se induce también en diferentes tipos de células en lugares de inflamación^(76,77). ICAM-1(CD54) está implicado en las interacciones de las integrinas, hecho importante en el proceso multipaso en la migración celular transendotelial durante la respuesta inflamatoria^(78,79).

La molécula de ICAM-1 tiene cuatro epítomos distintos en su molécula, localizados en los dominios D1, D2, D4 Y D5. Cuando ICAM-1 se une a su antígeno específico, esto da lugar a la producción de moléculas de similar tamaño y propiedades. Es posible inmovilizar la función de ICAM-1 a través del dominio 5. Tiene asimismo una sola región transmembrana y una corta cola citoplasmática^(80,81). Es una glucoproteína de la superficie celular de 90 kDa.

Sus ligandos son integrinas expresadas en leucocitos y linfocitos cuya función se asocia a moléculas LFA-1 (CD11a/CD18) y células NK como monocitos como Mac-1 (CD11B/CD18)^(82,83,84).

Es generalmente aceptado que la asociación intercelular entre moléculas de adhesión y sus ligandos estabiliza el contacto de los receptores de linfocitos y la célula presentadora del complejo MHC-péptido durante el reconocimiento del antígeno y la citólisis.

La inducción de ICAM-1 es un proceso paralelo al rechazo en trasplante renal^(85,86) y cardíaco^(87,88).

Durante el rechazo hepático, la expresión de ICAM-1 se aumenta por las citocinas: factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, interleukina (IL)-1, beta interferón (IFN) gamma, IL-2 e IL-4^(90,91). Niveles elevados de ICAM-1 se han publicado en enfermedades crónicas hepáticas⁽⁹²⁾, tras trasplante cardíaco⁽⁹³⁾ y tras trasplante hepático⁽⁹⁴⁾. Se ha demostrado la existencia de formas solubles de moléculas de adhesión en la circulación de individuos normales⁽⁹⁵⁾, aunque poco es conocido sobre su papel fisiológico. Se ha sugerido que podrían inhibir la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, bloqueando la adhesión a los receptores⁽⁹⁶⁾.

Publicaciones previas han detectado que estas moléculas están elevadas en procesos inflamatorios^(97,98), cáncer⁽⁹⁹⁾ e infecciones⁽¹⁰⁰⁾.

ICAM-1 tiene un efecto sinérgico estimulando la señal para la indispensable activación de las células T, dando lugar a un aumento en la expresión de moléculas de adhesión, estando involucradas en la interacción células T-células estromales, células efectoras-células diana y reacción inflamatoria, potenciando las funciones de las células mononucleares y macrófagos. ICAM-1 también está implicado en funciones leucocitarias como quimiotaxis y presentación de antígenos y es coseñal para la activación de linfocitos⁽¹⁰¹⁾. Los leucocitos deben adherirse a las estructuras diana y otras células inmunes antes de poder interactuar con ellas⁽⁹⁶⁾.

Las fuentes celulares de ICAM-1 parecen ser las células mononucleares y líneas de células linfoides. Dado que ICAM-1 tiene la habilidad de ligarse específicamente a LFA-1 puede actuar regulando la adhesión celular, promoviéndola.

En nuestro estudio, los resultados del análisis de este marcador son prometedores. Sus niveles se elevan desde el día 5, día 10, día 15 y día 20. Excepto el día 5, esta elevación es estadísticamente significativa los días 10, 15 y 20. Los niveles se mantienen elevados, aunque menos, en el día 20 no siendo útil para monitorizar la eficacia del tratamiento inmunosupresor. Aunque los resultados no son significativos en el día 5, creo que podemos considerar que es un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. Asimismo es útil para el diagnóstico diferencial entre rechazo y complicaciones en el postoperatorio precoz del trasplante hepático.

Respecto al análisis de la sensibilidad y especificidad (**curvas ROC**), con niveles bajos (A), es un marcador poco específico y no muy sensible. Con niveles más altos (B y C), es un marcador poco sensible pero muy específico, obteniendo especificidades de hasta el 100%. Esa especificidad hace de él que sea también muy útil para diferenciar el rechazo agudo de otra causa de disfunción hepática, las complicaciones no debidas a rechazo agudo.

Por consiguiente, creemos que es un marcador **útil en el diagnóstico de rechazo agudo con sensibilidad baja y alta especificidad. Útil para diferenciar rechazo de complicaciones.**

Múltiples estudios han analizado la utilidad de esta molécula como marcador diagnóstico. Yahoug YU et al⁽¹⁰²⁾, en una serie de 43 pacientes, con diversas indicaciones para realizar trasplante hepático, como en nuestra serie, (16 pacientes con rechazo severo y 15 pacientes sin complicaciones severas que se utilizó como

grupo control, tras desestimar pacientes), determinó ICAM-1 en suero y bilis en el tercer, sexto y décimo día postoperatorio. En su serie se observó un aumento importante de los niveles de ICAM-1 en suero de pacientes con rechazo agudo respecto al grupo control (pacientes sin complicaciones severas y pacientes con diversas complicaciones, sobre todo infecciosas). Esta elevación fue constatable tres días antes del diagnóstico de rechazo agudo, de forma significativa y en el momento del diagnóstico, constituyendo un buen marcador de diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. Posteriormente comentaremos los resultados en bilis.

Según Fabrega E, et al, en una serie más amplia (140 pacientes)⁽¹⁰³⁾, analizó los niveles de ICAM-1 en los días 1, 7 y 15 del postoperatorio, además del día de la biopsia hepática. Se comparó pacientes con rechazo agudo y pacientes sin rechazo. Pacientes con complicaciones de diversa índole fueron excluidos. Se obtuvieron niveles significativamente elevados ($p < 0.03$) en el 7º día postoperatorio y en el día de la biopsia. Otros parámetros analizados en este estudio son los niveles de VCAM-1, con el que no se obtuvieron resultados significativos y niveles de ácido hialurónico (polisacárido de alto peso molecular sintetizado principalmente por las células mesenquimales y transportado por el sistema linfático a la circulación general. Más del 95% del hialurónico circulante es eliminado vía vascular por el hígado mediante endocitosis con una vida media de 2.5-5 minutos), que también se elevan de forma significativa ($p < 0.02$) en el momento del diagnóstico de rechazo agudo. No se encontró relación entre el grado de rechazo y los niveles de ICAM-1. En nuestro estudio no incluimos esta correlación.

Este estudio pone de manifiesto la utilidad de la monitorización de los niveles de ICAM-1, así como la de los niveles de ácido hialurónico como marcadores para el diagnóstico precoz de rechazo agudo.

Warlé MC et al⁽⁷⁵⁾, de su serie de 61 pacientes analiza 45, con monitorización diaria durante un mes de ICAM-1 y diversas citocinas. Aunque parte de los pacientes fueron tratados con basiliximab, esto no afecta a la determinación de los niveles en suero de ICAM-1. En todos los casos se obtuvieron niveles elevados ($p < 0.001$) se obtuvieron en el momento del diagnóstico de rechazo agudo lo que permite identificar a este grupo de pacientes precozmente, diferenciarlos de otras complicaciones y monitorizar la eficacia del tratamiento inmunosupresor.

Otro autor con buenos resultados es Ninova D et al⁽¹⁰⁴⁾. En una serie de 19 pacientes se efectuaron determinaciones en el día 1, 3 postoperatorio, en el momento del diagnóstico y una semana después del tratamiento. Se establecen tres grupos: pacientes con rechazo, pacientes con injerto estable y pacientes con infección por

CMV (los pacientes afectados de rechazo y de infección por CMV fueron diagnosticados mediante biopsia hepática). No sólo hay resultados significativos en los pacientes con rechazo agudo respecto a los que no lo presentan ($p < 0.008$), sino que también se obtuvieron resultados significativos en los niveles de ICAM-1 tras el tratamiento inmunosupresor ($p < 0.014$). Según este estudio, la determinación de ICAM-1 en suero es un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático y para monitorizar la respuesta al tratamiento inmunosupresor.

Sin embargo no todos los resultados son iguales, hay autores como Adams DH. et al⁽⁴⁾ que, tras determinar los niveles de ICAM-1 en suero y compararla con los niveles de bilirrubina, GOT, ALP, creatinina y niveles de inhibidores de anticalcineurínicos, en 61 pacientes (17 pacientes con rechazo, 13 pacientes con infección pero no rechazo, 12 con complicaciones no infecciosas sin rechazo y 19 con injerto estable), realizándose determinaciones diarias, no se obtuvo correlación significativa entre los niveles de ICAM-1 en suero y los niveles de bilirrubina, enzimas hepáticas y niveles de anticalcineurínicos. Al comparar estos tres grupos, obtuvieron diferencias significativas entre el grupo rechazo y no rechazo. Aunque en el grupo de complicaciones infecciosas los niveles estaban elevados, dicha elevación no fue significativa al compararla con el grupo rechazo. Así pues, para estos autores, ICAM-1 es un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo, pero no para diferenciar rechazo de complicaciones.

Navarro Victor et al⁽¹⁰⁵⁾ no obtuvo resultados significativos. En una serie de once pacientes estudiados en dos centros universitarios. Se determinaron los niveles de VCAM-1, ELAM-1 e ICAM-1. En el caso de los niveles de ICAM-1, no se obtuvieron resultados significativos entre el grupo rechazo y no rechazo. En este caso, uno de los factores que pudo contribuir a este resultado es el pequeño tamaño de la muestra (11 pacientes de los que al final sólo fueron válidos 7).

Otro autor sin resultados concluyentes es Sasan Roayaie et al⁽³⁷⁾ con una serie de 32 pacientes sometidos a trasplante hepático por virus C con inmunosupresión con OKT-3. Hace determinaciones de IL-2, IL-2R, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, TNF-alfa, IL-1 beta e IL-6. Ninguna de estas moléculas proporciono resultados satisfactorios. En el caso de las moléculas de nuestro interés IL-2R e ICAM-1, en este estudio, se constató elevación de los niveles de ICAM-1 en el 5º día postoperatorio sin significación estadística ($p < 0.7433$).

La extensión del daño por isquemia o reperfusión es considerado un determinante principal de la función del injerto en el postoperatorio puede también afectar los niveles de las citocinas en el postoperatorio precoz^(106,107).

Según Adams DH et al⁽⁴⁾ y Lang T et al⁽¹⁰⁹⁾, los niveles de ICAM-1 disminuyen tras el tratamiento inmunosupresor, constituyendo un magnífico marcador de respuesta.

La disminución tras la administración de altas dosis de corticoides sugiere que este fármaco actúa en parte de manera directa en las células regulando la expresión de ICAM-1 o inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias de los leucocitos infiltrantes. También podrían inhibir el efecto de las citocinas en las células dianas, o bien una combinación de acontecimientos a dicho nivel⁽¹¹⁰⁾.

En nuestra experiencia, ICAM-1 parece un buen marcador en unión a otras pruebas complementarias.

7.4 DETERMINACION DE ICAM-1 EN BILIS

Diversos autores han estudiado el comportamiento de la molécula ICAM-1 a nivel del injerto hepático (biopsias) en el periodo postrasplante, durante el episodio de rechazo agudo u otras disfunciones hepáticas.

Durante el rechazo del injerto, se ha demostrado un aumento de la expresión de ICAM-1 en los tejidos, localizándose en las estructuras diana, como los conductos biliares^(32,111). La determinación de esta molécula es llamativa en el epitelio del conducto biliar y en los hepatocitos durante el proceso de rechazo, siendo secretado por estas células, cuestión no plenamente demostrada⁽¹¹¹⁾. Si está demostrado, como en el apartado anterior hacíamos referencia, que las células mononucleares y las células linfoides secretan ICAM-1 durante el episodio de rechazo^(32,112-114). Esto hace al injerto más susceptible al daño por las células efectoras: linfocitos y otras células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos que están implicados en la respuesta efectora del rechazo del injerto^(85,115).

La evidencia de la secreción local de ICAM-1 es el alto ratio bilis:suero de esta molécula que se detectan durante el rechazo. En algunos casos los niveles biliares exceden los séricos, y en todos los casos el ratio bilis:suero es mucho mayor que el que podría esperarse para una molécula del mismo tamaño si procediese de difusión pasiva del suero⁽⁵²⁾. Esto daría la razón a aquellos autores que sugieren que los factores inmunológicos en bilis son más sensibles y específicos que los séricos⁽⁵²⁾.

En el hígado normal, ICAM-1 se expresa débilmente en el endotelio sinusoidal y algunas células kupffer⁽¹¹⁶⁾. Se ha sugerido que podrían inhibir la adhesión de leucocitos a las células endoteliales⁽⁵¹⁾, bloqueando la adhesión a los receptores.

Estudios seriados revelan sorprendentemente altos niveles biliares de ICAM-1 en el postoperatorio inmediatamente, cayendo en las primeras 24 horas. Este patrón se ha visto en pacientes que desarrollan rechazo, pero también en pacientes con postoperatorio complicado. Este mecanismo no es claro, puede reflejar la activación inicial de los linfocitos o el reconocimiento de los antígenos del injerto, o, alternativamente, daño en la preservación del injerto⁽⁷⁴⁾.

En los episodios de rechazo se ha demostrado la expresión de ICAM-1 en los hepatocitos en las biopsias hepáticas⁽¹¹⁷⁻⁻¹²⁰⁾. En el estudio de Romero M. et al observaron un aumento significativo de la expresión de esta molécula según el grado de severidad del rechazo⁽¹¹⁹⁾.

ICAM-1 puede ejercer efecto feed-back para controlar la adhesión celular y el proceso inflamatorio.

Como la secreción local de citokinas en el sitio inflamado en los tractos portales puede proporcionar marcadores específicos de rechazo agudo, existiendo publicaciones sobre la utilización de IL-2R en bilis⁽¹¹⁶⁾, IL-6⁽¹¹⁷⁾ e ICAM-1⁽¹¹⁸⁾ para monitorizar los pacientes trasplantado; mostrando que los niveles de ICAM-1 y de IL-2R, aumentan durante el episodio de rechazo en comparación con pacientes con otras complicaciones y aquellos con injerto estable^(116,118).

En nuestra experiencia, los resultados son muy satisfactorios, estando elevados en el grupo de rechazo durante todos los días. Los niveles están elevados en los tres grupos en el día 1, probablemente debido a la manipulación quirúrgica, a la reperusión o a otros factores en relacionados con el procedimiento quirúrgico. Los niveles se van normalizando progresivamente a excepción del grupo rechazo donde se mantienen elevados incluso en el día 20. La diferencia ha sido estadísticamente significativa en todos los días, día 1, 5, 10, 15 y 20. Estos resultados hacen que este marcador sea una herramienta muy útil para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. Al igual que la determinación de ICAM-1 en suero, los niveles permanecen elevados, aunque en menor nivel, en el día 20, no siendo buen marcador para monitorizar la respuesta al tratamiento inmunosupresor. Es muy útil para diferenciar rechazo de complicaciones, importante en el postoperatorio precoz del trasplante hepático. La media de los niveles en los tres grupos en el día 1 esta muy elevada descendiendo posteriormente en el grupo estable y con otras complicaciones distintas al rechazo y manteniéndose elevados en el grupo rechazo. Esto ratifica que

los niveles en bilis reflejan con mayor claridad los fenómenos locales que ocurren en el injerto.

Respecto al análisis de sensibilidad y especificidad (**curvad de ROC**), en el día 5, en el postoperatorio precoz es un marcador muy sensible con niveles bajos (A). Pasado este periodo la sensibilidad disminuye, convirtiéndose en un marcador muy específico con niveles medios y altos (B y C).

Así pues, la determinación de ICAM-1 en bilis es un **marcador muy útil para diagnóstico precoz de rechazo agudo** elevándose de forma significativa y de forma **muy sensible en el postoperatorio del trasplante hepático**. Asimismo, con niveles elevados de forma media o alta, aporta **buena especificidad**. Es un marcador muy útil en la monitorización de los pacientes sometidos a trasplante hepático para poder realizar un diagnóstico precoz de rechazo agudo. Resulta muy útil para diferenciar rechazo de otro tipo de complicaciones.

Un autor con buenos resultados en el análisis de esta molécula es Adams DH et al⁽⁴⁾. Aporta una serie de 61 pacientes donde evaluó los niveles de ICAM-1 en suero y bilis junto a otros parámetros (bilirrubina, GOT, etc...). En suero, la diferencia de niveles era significativa entre el grupo rechazo y no rechazo, pero no fue significativa entre en grupo rechazo y el de complicaciones infecciosas. Sin embargo, en bilis hay una diferencia significativa entre en grupo rechazo y el no rechazo ($p < 0.001$), no elevándose en pacientes con otras complicaciones. Esto sugiere que los factores inmunológicos en bilis son más sensibles y específicos, constituyendo un mejor marcador que en la determinación en suero. La ratio bilis/suero es mayor en el grupo rechazo que en el no rechazo, siendo también esta diferencia significativa ($p < 0.001$). La elevación de los niveles de ICAM-1 en bilis son apreciables 24-48 horas antes del diagnóstico de rechazo. En este estudio se objetivan los niveles elevados las 24-28 horas postrasplante, que descienden en todos los pacientes y se elevan posteriormente en los pacientes con rechazo agudo. Según estos datos, la determinación de ICAM-1 en bilis es un marcador muy útil para diagnosticar precozmente el rechazo agudo e instaurar precozmente el tratamiento inmunosupresor.

Otro trabajo con resultados muy interesantes es el de Yahoung YU et al⁽¹⁰²⁾. En una serie de 43 pacientes determina los niveles de ICAM-1 en suero y bilis. Ya comentamos previamente que en su serie, la determinación de ICAM-1 en suero se

elevaba en rechazo agudo de forma significativa. La determinación en bilis puso de manifiesto niveles elevados también tres días antes del diagnóstico de rechazo agudo. Según el autor este aumento de los niveles de ICAM-1 en bilis reflejan más fielmente los cambios hepáticos siendo muy útil para diferenciar rechazo de otras complicaciones y monitorizar el rechazo y la respuesta al tratamiento. Hay autores que consideran que ICAM-1 en suero puede elevarse también en procesos infecciosos y secundario al fenómeno isquemia-reperfusión, mientras que en bilis se eleva sólo en rechazo, sugiriendo que la determinación de los niveles de ICAM-1 en bilis puede ser un marcador diagnóstico más específico de rechazo que la determinación en suero^(74,75, 119).

Además se ha estudiado la expresión de ICAM-1 en tejido biopsiado, en las biopsias hepáticas de pacientes con rechazo agudo, hallando una expresión aumentada de ICAM-1 en los conductos biliares, endotelio y hepatocitos alrededor de la vena portal. Esto demuestra que ICAM-1 está implicado en el rechazo agudo tras el trasplante hepático^(32,106).

Hay autores que no han obtenido resultados satisfactorios monitorizando ICAM-1 en bilis, como Warlé et al⁽⁷⁵⁾, en su serie de 45 pacientes, que detallamos en la determinación de ICAM-1 en suero y que utiliza basiliximab en parte de los pacientes. Mientras que los resultados fueron estadísticamente significativos monitorizando los niveles de ICAM-1 en suero no sucedió lo mismo en bilis, donde los niveles se elevan en menor cuantía, sin significación estadística.

Uno de los primeros sucesos que ocurren en el rechazo agudo, junto a hechos clínicos y analíticos, es la disminución en la cantidad y calidad de bilis que se exterioriza por el tubo de kher. Cynthia W. Ko et al⁽⁶⁹⁾, en una serie de 17 pacientes, mide la concentración de lípidos biliares en bilis (ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol y lípidos totales) 3º día postoperatorio, 6º-7º día en distintos días los tres meses del periodo postoperatorio. Estas determinaciones se acompañan de biopsias hepáticas en el 10º, 21º y 3 meses postoperatorios junto a pruebas de laboratorio rutinarias. La autora observa una disminución de la concentración de los lípidos biliares no sólo en los episodios de rechazo agudo, sino también en diversas complicaciones como: trombosis de la vena cava inferior, hepatitis farmacológica, etc. No se obtuvo significación estadística ($p>.2$) aunque este descenso no es significativamente estadístico. Lo que sí que tiene correlación significativa es la composición lipídica con los niveles de ciclosporina ($p<0.03/0.002$). Los niveles de lípidos biliares aumentan tras la resolución del episodio de rechazo o de complicación (disfunción del injerto).

7.5 OTROS PARÁMETROS

Se han analizado otros parámetros que se utilizan en la práctica clínica diaria y que son útiles en el control sistemático de la evolución clínica del paciente.

Estos parámetros se alteran en diversas situaciones que implican la disfunción del injerto como son, los episodios de rechazo, disfunción primaria del mismo, complicaciones de diversa índole, infecciones, etc

Creímos fundamental incluir estos parámetros en nuestro estudio para una correcta interpretación de los resultados obtenidos, y a su vez analizar si las variaciones que se producían en ellos tenían alguna valor estadístico.

Los parámetros analizados fueron:

Bilirrubina (Br)
GOT (aspartatoaminotrasferasa)
GPT (alanino aminotransferasa)
GGT (gamma glutamiltranspeptidasa)
ALP (fosfatasa alcalina)
Colinesterasa
Niveles de Inhibidores de Calcineurina

Los resultados obtenidos de los diversos parámetros analíticos realizados en el 10º día postoperatorio fueron dispares, la **bilirrubina** está significativamente elevada en el grupo rechazo respecto al grupo estable o al grupo complicaciones. La **GOT y GPT**, sin embargo, están elevadas significativamente en el grupo complicaciones respecto al grupo estable y el grupo rechazo. En cuanto a la **GGT**, esta enzima está significativamente más elevada en el grupo rechazo respecto a los otros dos grupos. Finalmente, la **ALP**, está más elevada significativamente en el grupo complicaciones respecto al grupo rechazo y al grupo estable. La **colinesterasa** está igual en los tres grupos y en rango normal y los niveles de **inhibidores de calcineurina** son similares en los tres grupos, aunque sus niveles están elevados (tras la primera semana los niveles valle en sangre deben estar entre 250 y 350 ngr/cc), aportando homogeneidad a la muestra y *haciendo posible la comparación del resto de variables entre los tres grupos.*

Estos valores analíticos se utilizan habitualmente en la práctica clínica. Como hemos expuesto se elevan ante cualquier daño hepático ya sea secundario a rechazo o bien secundario a otras patologías. Aunque se han obtenido niveles elevados significativamente, estos se han obtenido tanto en el grupo rechazo como en el grupo complicaciones. **Son parámetros con gran sensibilidad, pero no útiles en el diagnóstico de rechazo agudo en el trasplante hepático.** Consideramos que es útil su monitorización junto otras pruebas complementarias para facilitar el diagnóstico precoz de rechazo agudo en pacientes con trasplante hepático, pero no son decisivas en sí mismas.

En la mayoría de los grupos de trasplante hepático se intenta disminuir progresivamente el número de biopsias hepáticas para diagnosticar el rechazo agudo en el trasplante hepático. En la actualidad, sólo en pacientes con elevación en los tests de función hepática sin explicación alternativa son sometidos a biopsia hepática por “sospecha” clínica de rechazo agudo. Los tests de función hepática han sido siempre muy sensibles pero no específicos para diagnosticar rechazo agudo, e incluso los resultados de estos parámetros no han sido uniformes en la literatura ⁽¹²¹⁻¹²³⁾. Sin embargo, esta estrategia transforma el examen histológico, que es un método de diagnóstico objetivo y validado para diagnosticar y valorar la intensidad del rechazo agudo⁽¹²⁴⁾, en una aproximación subjetiva que puede variar ampliamente, no sólo entre los centros que realizan trasplante hepático, sino entre los integrantes de la misma institución. Esto da lugar a resultados sorprendentes: 28% al 71% de los pacientes con rechazo moderado-severo pueden haber sido diagnosticados correcta o incorrectamente. De otra manera, del 15% al 43% de los pacientes sin rechazo o mínimo rechazo podrían haber sido biopsiados y más del 24% podría haber recibido tratamiento empírico con bolos de esteroides sin rechazo agudo. Se necesita un consenso para seleccionar candidatos para biopsia hepática y puede ser particularmente relevante la realización de estudios randomizados controlados que evalúen diferentes protocolos de inmunosupresión post-trasplante hepático, especialmente cuando sólo se utiliza como método diagnóstico la biopsia hepática ⁽¹²⁵⁾.

Según Rodríguez-Perálvarez et al ⁽¹²⁶⁾, proponen un modelo multivariable compuesto por parámetros clínicos y parámetros clínicos rutinarios capaces de predecir rechazo severo-moderado en la biopsia hepática. Pacientes jóvenes con bajo MELD (sistema de puntuación para mediar la severidad de la enfermedad hepática crónica), tienen más probabilidad de tener un rechazo moderado-severo, mientras que los pacientes más enfermos en el momento del trasplante (mayores y con mayor

MELD), están “protegidos” contra el rechazo agudo, como se refleja en diversas publicaciones⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾.

Respecto a la inmunosupresión, el uso de dosis reducidas de tacrolimus, concentraciones de <6 ngr/ml sin antimetabolitos es un factor predictivo independiente de rechazo agudo. En publicaciones previas, dosis reducidas de tacrolimus tras trasplante hepático junto a otros inmunosupresores se ha asociado a resultados satisfactorios respecto a resultados de rechazo agudo^(130,131), aunque no es común en la práctica clínica.

Finalmente, el cambio en el número de eosinofilos en sangre proporciona una información útil sobre la presencia y el grado de rechazo, avalado por publicaciones previas^(121,132) y avalado por este estudio.

En el estudio estadístico se utilizó la clasificación MELD, inmunosupresión y contaje de eosinofilos en sangre, obteniendo en el modelo AUROC un score de 0.84. Esto hace que sea un método útil para predecir qué pacientes son subsidiarios de biopsia hepática y es también útil para monitorizar la respuesta del rechazo al tratamiento con bolos de esteroides.

Tras todo lo expuesto en esta discusión es indiscutible la necesidad de un marcador sensible, específico, precoz, sin morbimortalidad para diagnosticar a la mayor brevedad la aparición de rechazo agudo en el trasplante hepático.

Un único biomarcador probablemente no será suficiente para reflejar toda la complejidad asociada al trasplante de órganos. Un panel de distintos biomarcadores sería necesario para ajustar el tratamiento inmunosupresor.

Estos mismos marcadores han sido identificados como marcadores de riesgo de rechazo en una cohorte de pacientes con trasplante hepático estable bajo tratamiento inmunosupresor. El hecho de que un biomarcador tenga el mismo comportamiento en distintas cohortes de pacientes trasplantados confirma la validez del biomarcador en la detección precoz de rechazo agudo⁽⁴⁹⁾.

La necesidad de un método no invasivo para el diagnóstico de rechazo agudo ha sido potenciado por Grandes Sociedades e Institutos Nacionales de Salud. Recientes avances en la separación de proteínas, incluyendo la depleción de abundantes cantidades de proteínas⁽¹³³⁾ y la utilización de la espectrometría de masas⁽¹³⁴⁾, han facilitado la caracterización detallada de complejos biológicos en suero^(135,136). Se ha intentado un estudio en dos fases. En una primera fase se procede a una gran depleción de proteínas para una absoluta cuantificación y caracterización de

las proteínas séricas en el rechazo agudo mediante la espectrometría de masas. En la segunda fase, las proteínas identificadas en la primera fase son validadas por ELISA.

La identificación de distintas proteínas séricas en el episodio de rechazo, incluyendo proteínas no previamente asociadas a este, aumenta la posibilidad de nuevos avances diagnósticos y terapéuticos en el manejo de la inmunosupresión en el trasplante hepático y tal vez en el trasplante de otros órganos.

En la búsqueda de ese biomarcador ideal, hay una técnica en auge, la CITOMETRIA DE FLUJO permite la cuantificación de grandes cantidades de células y su distribución, estado de activación, perfil de producción de citokinas y otras funciones celulares. Esta técnica puede obtener información de cientos de células en un corto periodo de tiempo ⁽¹³⁷⁾. A la luz de nuestros resultados, determinación de IL-2R e ICAM-1 en sangre y bilis, bien pudieran entrar dentro de la esta batería de parámetros inmunológicos.

Además, la introducción de esta técnica permite evaluar diferentes biomarcadores simultáneamente en el mismo ensayo.

Algunos el uso de la citometría de flujo en los trabajos clínicos posee ciertas ventajas como por ejemplo, su fácil uso instrumental y el análisis de datos. Es importante en la citometría de flujo personal cualificado con buen entrenamiento, así como un hardware apropiado y un software que asegure una producción de datos seguros, lo cual no está disponible en todos los laboratorios ⁽¹³⁸⁾.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES SOBRE IL-2R EN SUERO. Es un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. Presenta muy

buena sensibilidad. Se eleva de forma precoz y disminuye también pronto en cuanto se instaure el tratamiento inmunosupresor. Es útil, en nuestra experiencia, para diferenciar rechazo de complicaciones.

CONCLUSIONES SOBRE IL-2 EN BILIS. Es un buen marcador para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático, poco sensible pero muy específico. Se eleva de forma precoz, disminuyendo rápidamente tras la instauración del tratamiento inmunosupresor. Es útil para diferenciar rechazo de complicaciones.

CONCLUSIONES SOBRE ICAM-1 EN SUERO. Es útil para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. Sin embargo sus niveles se mantienen elevados pese a la instauración del tratamiento inmunosupresor. Su sensibilidad es baja pero su especificidad es alta. Es útil para diferenciar complicaciones de rechazo.

CONCLUSIONES SOBRE ICAM-1 EN BILIS. Es útil para el diagnóstico precoz de rechazo agudo en el trasplante hepático. Se eleva de forma precoz, manteniendo sus niveles elevados pese a la instauración del tratamiento inmunosupresor. Es poco sensible pero muy específico. Es útil para diferenciar complicaciones de rechazo agudo.

CONCLUSIONES SOBRE OTROS PARÁMETROS. La utilización de parámetros habituales en práctica clínica, en nuestra experiencia, no son útiles para el diagnóstico de rechazo agudo. Son muy sensibles, elevándose tanto en pacientes con rechazo como en complicaciones, no siendo útiles para nuestro propósito.

BIBLIOGRAFIA

1. Maluf DG, Stravitz RT, Cotterell AH, et al. Adult liver donor versus deceased donor liver transplantation: A 6-year single center experience. *Am J Transpl* 2005; 5: 149.

2. Liu LU, Bodian CA, Gondolesi GE, et al. Marked Differences in acute cellular rejection rates between living-donor and deceased-donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2005; 80: 1072.
3. Shaked A, Ghobrial RM, Marion RM, et al. Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9:301.
4. Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, et al. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2003; 9: 1231-1243
5. Roberts MS, Aryus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver transpl* 2004; 10: 886-897.
6. Lee KW, Cameron AM, Maley WR, Seger DL, Montgomery RA. Factors affecting graft survival after adult/child split-liver transplantation: analysis of the UNOS/OPTN data base. *Am J Transplant* 2008; 8: 1186-1196.
7. Wiesner RH, Demetris AJ, Belle S, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK, et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors and impact on outcome. *Hepatology* 1998; 28: 638-645.
8. Vicenti F, Schena FP, Paraskevas S, et al. A randomized multicenter study of steroid avoidance, early steroid withdrawal on standard steroid therapy in kidney transplant recipients therapy in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2008; 8: 307.
9. Postaing L, Cantarovich D, Mourad G, et al. Corticosteroid free immunosuppression with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and daclizumab. Induction in renal transplantation. *Transplantation* 2005; 79, 807.
10. Fellstrom B. Risk factors for and management of postransplantation cardiovascular disease. *Biodrugs* 2001; 15: 261.
11. U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group: A Comparison of Tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl Med* 1994; 331:1110.

12. European FD 506. Multicenter Liver Study Group: Randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in prevention of liver allograft rejection. *Lancet* 1994; 344, 8920: 423.
13. Greig P, Lilly L, Scudamore C, et al. Early steroid withdrawal after liver transplantation: the Canadian Tacrolimus versus microemulsion cyclosporine. A trial: 1-year follow-up. *Liver Transpl* 2003; 9: 587.
14. Washburn K, Speeg KV, Esteri R, et al. Steroid elimination 24 hours after liver transplantation using daclizumab, tacrolimus y mycofenolato mofetil. *Transplantation* 2001; 72: 1675.
15. Heffron TG, Smallwood GA, Pillen T, et al. Liver Transplant induction trial of daclizumab to spare calcineurin inhibition. *Transplant Proc* 2002; 34: 1514.
16. Boillot O, Mayer D, Boudjema K, et al. Corticosteroid-free immunosuppression with tacrolimus following induction with daclizumab: a large randomized clinical study. *Liver Transpl* 2005; 11: 61.
17. Neil DA, Hüscher SG. Current views on rejection pathology in liver transplantation. *Transpl Int* 2010, 23: 971-983.
18. Kaden J, Schütze B, May G. A critical analysis of soluble interleukin-2-receptor levels in kidney allograft recipients. *Transplant Int* 1996; 9 Suppl.1, 63-7.
19. Abraham SC, Furth EE. Receiver operating characteristic analysis of serum chemical parameters as tests of liver transplant rejection and correlation with histology. *Transplantation* 1995; 59: 740-6.
20. Neuberger J. Tests of liver transplant rejection and correlation with histology. Liver allograft rejection –current concept son diagnosis and treatment-. *J Hepatol* 1995; 23 Suppl 1: 54-61.
21. Nagral A, Butler P, Sabin CA, Prolles K, Burroughs AK. Alfa-glutathione-S-transferase in acute rejection of liver transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 401-44.
22. Markus BH, Demetris AJ, Saldman S, et al. Alloreactive T lymphocytes cultured from transplant biopsies: associations of HLA specificity with clino-pathological findings. *Clin Transplant* 1988; 2: 70-5.

23. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338: 1813-21.
24. Döcke WD, Reinke P, Staffa G, et al. An immune monitoring program for the management of immunosuppressive therapy in early phase after transplantation. *Tex Med* 1994; 6: 13-18.
25. Stockenhuber F, Grant M, Gottsauher-Wolf MT et al. Soluble interleukin-2 receptors in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 1991; 23: 1417-18.
26. Jindal RM, Greer G, Popescu I, Sidner RA. Lymphocyte subset analysis for the diagnosis of rejection and infection in recipients of liver transplants. *Am Surg* 1999; 65: 77-80.
27. Robb RR, Kutny RM. Structure-function relationships for the IL-2 receptor system IV. Analysis of sequence and ligand-binding properties of soluble Tac protein. *J Immunol* 1987; 139: 855-62.
28. Hancock WW, Gee D, DeMocklose P, Rickles FR, Ewan VA, Atkins RC. Immunohistological analysis of serial biopsies taken during human renal allograft reject: A profile of infiltrating cells and activation of the coagulation system. *Transplantation* 1985; 39: 430-48.
29. Hermann F, Cannistra SA, Levine H, Griffin JD: Expression of interleukin-2 receptors and binding of interleukin-2 by gamma interferon-induced human leukemic and normal monocytic cells. *J Exp Med.* 1985; 162: 1111-6.
30. Benseler V, McCaughan GW, Sehlitt HJ, et al. The liver: a special case in transplant tolerance. *Semin Liver dis* 2007; 27: 94-213.
31. Andreas Lun, Mi Young Cho, Christian Müller, Gerhard Staffa, Wolf Otto Bechstein, Cornelia Radke, et al. Diagnostic value of peripheral blood T-cells activation and soluble IL-2 receptor for acute rejection in transplantation. *Clinica Acta* 2002; 320: 69-78.
32. Adams DH, Wang L, Hubscher SG, Elias E, Neuberger JM. Soluble interleukin-2 in serum and bile of liver transplant recipients. *The Lancet* 1989, March 4.
33. James D Perkins, David L Nelson, Jorge Rakela, Patricia M Grambsch and Ruud A F. Krom. Soluble interleukin-2 receptor level as an indicator of liver allograft rejection. *Transplantation* January 1989; N°1, 47: 77-81.

34. Granot E, Tarcsafalvi A, Emre S, Sheiner P, Guy S, Schwartz ME, Boros P et al. Th1/Th2 cytokines and ICAM-1 levels post-liver transplant do not predict early rejection. *Mediators of Inflammation* 2000; 9, 35-38.
35. O. Millán, L. Rafael- Valdivia, E. Torrademé, A. López, V. Fortuna, S. Sánchez Cabús, et al. Intracellular INF-gamma 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* 61, 2013; 556-564.
36. Akoglu B, Kriener S, Martens S, et al. Interleukin-2 in CD8+ T cell correlates with Banff score during organ rejection in liver transplant recipients. *Clin Exp Med* 2009; 9, 4: 259-62.
37. Sasan Roayaie, Patricia A Scheiner, Sukuru Emre, Steven Ruy, Myron E. Schwartz, Peter Boros et al. Cytokine profiles in early rejection following OKT3 treatment in liver transplant patients. *Mediators of inflammation* 2000; 9, 141-146.
38. Kupiec-Weglinski JW, de Sousa M, Tilney NL. The importance of lymphocyte migration patterns in experimental organ transplantation. *Transplantation* 1985; 40: 1.
39. Häyry P. Intra-graft events in allograft destruction. *Transplantation* 1984; 38: 1
40. Munn SR, Tominaga S, Perkins JD, Hayes DH, Wiesner RH, Krom RAF. Increasing peripheral T lymphocyte counts predict rejection in human orthotopic liver allograft. *Transplant Proc* 1988; 20 Suppl: 674.
41. Stolc V, Krause JR. Interleukin-2 receptors levels are increased in blood of heart-transplant patients during infections. *Diagn Clin Immunol* 1987; 5: 171.
42. Hemler ME, Brenner MB, McLean JM, Strominger JL. Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin-2 receptor on human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2172.
43. White DJG, Plumb AM, Pawelec G, Brons G. Cyclosporine A: an immunosuppressive agent preferentially active against proliferating T cells. *Transplantation* 1979; 2, 27: 55.

44. Lawman MJP. Cell-mediated immunity: induction and expression of T-cell function. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181: 1022.
45. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73: 1373-81.
46. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA et al. A function for interleukin-2 in FOXP3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 1142-51.
47. Maecker HT, McCoy JP. A model harmonization flow cytometry in clinical trials. *Nat Immunol* 2010; 11: 200-275.
48. Wieland E, Olbricht CJ, Süsal C et al. Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients. *The Drug Monit* 2010; 72: 560—72.
49. Millán O, Benitez C, Guillén D, et al. Biomarkers of immunosuppression status in liver transplant recipients undergoing weaning of immunosuppressive therapy. *Clin Immunol* 2010; 137, 337-46.
50. Jung K, Diego J, Stronbelt U, et al. Diagnostic significance of some urinary enzymes for detecting acute rejection crises in renal transplant recipients. Alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, and lysozyme. *Clin Chem* 1986; 32: 1807.
51. Kuzniar J, Marchewka Z, Krasnowski R et al. Enzymuria and low molecular weight protein excretion as the differentiating marker of complications in the early post kidney transplantation period. *Int Urol Nephrol* 2006; 38: 753.
52. Adams DH, Burnett D, Hubscher DG, Stockley RA, McMaster P, Elias E. Biliary beta-2-microglobulin in liver allograft rejection. *Hepatology* 1988; 8: 1565-70.
53. Adams DH, Burnett D, Stockley RA, McMaster P, Elias E. Markers of biliary epithelial damage in liver allograft rejection. *Transplant Proc* 1987; 19: 3820-21.
54. Dive C, Heremans JF. Nature and origins of the proteins in bile, 1: a comparative and analysis of serum and bile protein in man. *Eur J Clin Invest* 1974; 4: 235-39.
55. Rabbin JM, Orloff SL, Reed MH et al. Biliary tract complications of side-to-side without T tube versus end-to-end with or without T tube

- choledochocholedochostomy in liver transplat recipients. *Transplantation* 1998; 65: 193.
56. Marcos A, Ham JM, Fisher RA, et al. Single-center analysis of the first 40 adult-to –adult living donor liver transplants using the right lobe. *Liver Transplant* 2000; 6: 296.
57. Goresky CA, Gordon ER, Sanabria JR, et al. Changes in bilirubin pigments secreted in bile after liver transplantation. *Hepatology* 1992; 15: 849.
58. Hedaya MS, El Moghazy WM, Yasumoto Y, et al. Is biliary bile acid a good predictor for acute celular rejection in living donor liver transplantation?. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 474.
59. Kasahara M, Egara H, Takada Y et al. Biliary reconstruction in right lobe living donor liver transplantation: comparison of different techniques in 321 recipients. *Ann Surg* 2006; 243: 559.
60. Marubashi S, Dono K, Nagano H, et al. Biliary reconstruction in living donor liver transplantation: technical invention and ris factor analysis for anastomosis stricture. *Transplantation* 2009; 88: 1123.
61. Laupacis A, Keown PA, Ulan RA, Sinclair NR; Stiller CR. Hyperbilirrubinaemia and cyclosporine A levels. *Lancet* 1981; 2: 1426-1427.
62. Klintmalm GB, Iwatsuki S, Starlz TE. Cyclosporine A toxicity in 66 renal allograft recipients. *Tansplantation* 1981; 2: 1426-1427.
63. Larber MI, Van Buren CT, Flechner SM, Williams C, Kahan BD. Hepatobiliary and pancreatic complications of cyclosporine therapy in 466 renal transplant recipients. *Transplantation* 2987, 43: 35-40.
64. Azer SA, Stacey NH. Differential effects of cyclosporin A on transport of bile acids by rats hepatocytes. Relationship to individual serum bile acid levels. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 124: 302-309.
65. Román ID, Monte MJ, González-Buitrago JM, Esteller A, Jiménez R. Inhibition of hepatocytary vesicular transport by cyclosporine A in the rat: relationship with cholestasis and hyperbilirrubinemia. *Hepatology* 1990; 12: 83-91.

66. Levy J, Budai K, Javitt NB. Bile acid synthesis in HepG2 cells: effects of cyclosporine. *J Lipid Res* 1994; 35: 1795-1800.
67. Krams SM, Villanueva JC, Quinn MB. Expression of the cytotoxic T cell mediator granzyme B during liver allograft rejection. *Transplant Immunol* 1995; 3: 162-164.
68. Ji J, Yu Yu YY, Chen H. Perforin and granzyme B expression in liver allograft rejection. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2004; 12: 325-328.
69. Cynthia W. Ko, Kris V. Kawdley, T W. Geoff. Biliary lipid composition after liver transplantation: effect of allograft function and cyclosporine. *Liver Transplantation and Surgery*, vol 4; Nº 4 July, 1998: pp 258.
70. Neuberger JM, Mamelok RD, Neuhaus, et al. Delayed introduction of reduce-dose tacrolimus, and renal function in liver transplantation: the "RESPECT" study. *Am J Transplant* 2009; 9: 327.
71. Neuhaus P, Clavien PA, Kittur D, et al. Improved treatment response with basiliximab immunoprophylaxis after liver transplantation: results from a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Liver Transpl* 2002; 8: 132.
72. De Simone P, de Carlis L, Grazi GL, et al. Results of a multicenter, randomized, open-label trial comparing basiliximab vs steroid in HCV liver transplant patients (abstract). *Am J Transp* 2007 Suppl: 312.
73. Yoshida EM, Morotta PJ, Greig PD, et al. Evaluation of renal function in liver transplant recipient receiving daclizumab (Zenapax), mycophenolate mofetil, and a delayed low-dose tacrolimus regimen vs a standard dose tacrolimus and mycophenolate mofetil regimen: a multicenter randomized clinical trials: *Liver Transpl* 2005; 11: 1064.
74. Adams DH, Wang L, Hubscher SG, Elias E, Neuberger JM. Soluble interleukin-2 receptors in serum and bile of liver transplant recipients. *Lancet* 1989; 1: 469.
75. Michiel C. Warlé, Herold J. Metselaar, Win C. J. Hop, Inge c. Gyssens, Marcel Kap, Jaap Kwekkeboom, et al. Early differentiation between rejection and infection in liver transplant patients by serum and biliary cytokine patterns. *Transplantation* 2003 January Nº 1; 75, 146-151.
76. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-434.

77. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon gamma: tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule ICAM-1. *J Immunol* 1986; 137: 245-254.
78. Patarrayo M, Makgoba MW. Leukocyte adhesion to cells in immune and inflammatory responses. *Lancet* 1989; 2: 1139-1142.
79. McKay CR, Imhof BA. Cell adhesion in the immune system. *Immun Today* 1993; 1, 14: 99-102.
80. Adams DH, Mainolfi E, Elias E, Neuberger JM, Rothlein R. Detection of circulation intercellular adhesion molecule-1 after liver transplantation – evidence of local release within the liver during graft rejection. *Transplantation* 1993, 55: 83-87.
81. Simmons D, Makgoba MW and B Seed. ICAM-1 and adhesion ligand of LFA-1 is homologous into the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 1988; 331, 624.
82. Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of the least three mechanism for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cells Biol* 1988; 107: 321-331.
83. Rothlein R, Czjkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule-1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agent and neutralizing antibodies. *J. Immunol* 1988; 141: 1665-1669.
84. Makgoba MW, Sanders ME, Ginther Luce EG, Dustin ML, Springer TA, Clark EA et al. ICAM-1 a ligand for LFA-1 dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* 1988; 331: 86-88.
85. Steinhoff G, Benrend B, Schrader B, Duijvestijn AM, Wonigeit K. Expression patterns of leukocyte adhesion. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 and LFA-3. *Am J Pathol* 1993; 142: 481-488.
86. Fuggle SV, Sanderson JB, Gray DWR, Richardson A, Morris PJ. Variation in expression of endothelial adhesion molecules in retransplant and transplanted kidneys-correlation with intra-graft events. *Transplantation* 1993; 55: 117-123.

87. Brockmeyer, Ulbrecht M, Schendel DJ, Weiss EH, Hillebrand G, Burkhardt K et al. Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation* 1993; 55: 610-615.
88. Ferran C, Peuchmaur M, Desvennes M, Ghoussoub JJ, Cabrol A, Brousse N, et al. Implications of the novo ELAM-1 and VCAM-1 expression in human cardiac allograft rejection. *Transplantation* 1993; 55: 605-609.
89. Morgan CJ, Pelletier RP, Hernandez CJ, Teske DL, Huang E, Ohye R et al. Alloantigen-dependent endothelial phenotype and lymphokine mRNA expression in rejection murine cardiac allograft. *Transplantation* 1993; 55: 919-923.
90. Hoffmann MW, Wonigeit K, Steinhoff G, Herzbeck H, Glad HD, Pichlmayr R. Production of cytokines (TNF- α), (IL-1 β) and endothelial cell activation in human liver allograft rejection. *Transplantation* 1993, 55: 329-335.
91. Adams DH, Mainolfi E, Neuberger JM, Ayres R, Elias E, Rothlein R. Detection of circulating ICAM-1 in chronic liver diseases. *Hepatology* 1992; 16: 810-814.
92. Ballantyne C, Mainolfi EA, Young JB et al. Prognostic value of increase levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 after heart transplantation. *Clin Res* 1991; 39: 295.
93. Gearing AJH, Newan W. Circulation adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993; 14: 506.
94. Seth R, Raymond FD, Makoba MW. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* 1991; 338-83.
95. Wellicome SM, Kaphi P, Mason JC, Lebranchu Y, Yarwid GM, Haskard DO. Detection of circulation form of vascular cell adhesion molecule-1, raised levels in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 412.

96. Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 1993; 68: 122.
97. Kuster H, Degitz K. Circulating ICAM-1 in neonatal sepsis. *Lancet* 1993; 341: 506.
98. Altmann DM, Hogg N, Townsdales J and Wilkinson D. Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* 1989; 338-512.
99. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C and Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* 1989; 83, 2008.
100. Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting human T cells. *J. Immunol* 1990; 144: 4590.
101. Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW, Heidecke CD, Lear PA, Strom TB. Mechanisms of rejection and prolongation of vascularized organ allograft. *Immunol Rev* 1984; 7, 77: 185 (28).
102. YU Yahong, CHEN Zhong, YE Qifa. The role of sICAM-1 detection in the diagnosis of acute rejection following liver transplantation. *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Med Sci)* 2006; 26, 5: 580-582.
103. Fabrega E, Castro B, Crespo J; De la Pena J. Different time course of circulating adhesion molecules and hyaluran during hepatic allograft rejection. *Transplantation* 69; 4, 27 february 2000, pp 569-573.
104. Dora Ninova, Ruud A.F. Krom and Russell H. Wiesner. Hepatic allograft rejection is associated with increased levels of soluble intercellular adhesion molecule-1. *Liver Transplantation and Surgery*, vol 1, N° 5 September, 1995: pp 290-295.

105. Navarro Victor J, Silver David, Langnas Alan N, Rodney S, Friedman Amy L, Pober Jorodan S. A pilot study of soluble adhesion molecules as surrogate markers for acute liver allograft rejection. *Transplantation*; 65, 1, 15 January 1998, pp 126-130.
106. Emre S, Schwartz ME, Mor E, et al. Obviation of prereperfusion rinsing and decrease in preservation/reperfusion injury in liver transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 784-803.
107. Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, et al. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E. *Transplantation* 1989; 46: 447-53.
108. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation: a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55, 8: 807-13.
109. Lang T, Krams SM, Villanueva JC, et al. Differential patterns of circulating intercellular adhesion molecule-1 (cICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (cVAM-1) during liver allograft rejection. *Transplantation*, 1995; 59, 4: 584-589
110. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338: 1813-21.
111. Lautenschlager IT, Hockerstedt KA. ICAM-1 induction on hepatocytes as a marker for immune activation of acute liver allograft rejection. *Transplantation* 1993; 56: 1495.
112. Hayry P, Von Villebrand E, Parthenais E, et al. The inflammatory mechanisms of allografts rejection. *Immunol Rev* 1984; 77: 85
113. Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, Pichlmayr R. Intercellular immune adhesion molecules in human liver transplants: overview on expression patterns on leukocyte receptors and ligand molecules. *Hepatology* 1993; 18: 440.
114. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML and Springer TA. Primary structure of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) demonstrate interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 1988, 52, 925.



115. Steinhoff G, Benhred M, Pichlmayr R. Induction of ICAM-1 on hepatocyte membranes during liver allograft rejection and infection. *Transplant Proc* 1990; 2, 22: 2308-2309.
116. Adams DH, Hubscher SG, Shaw J, Rothlein R, Neuberger JM. Intercellular adhesion molecule 1 on liver allograft during rejection. *Lancet* 1989; 2: 1122-1125.
117. Steinhoff G, Benrend M, Wonigeit K. Expression of adhesion molecules on lymphocytes, monocyte and hepatocytes in human liver grafts. *Hum Immunol* 1990; 28: 123-127.
118. Wang ZJ, Chen GH, He XS et al. Significance of gene expression of interleukin-6 and interferon-gamma in diagnosis of acute rejection after liver transplantation in rats. *Chin J Hepatobil Surg (Chinese)* 2003; 9, 9: 550-55.
119. Romero M, García Monzón C, Clemente G, Salcedo M, Bañares R, Alvarez E, et al. Modulation of ICAM-1 tissue expression in patients with liver transplantation and acute rejection after glucocorticoid treatment. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl: S456-460.
120. Marthelius T, Salmi M, Wu H et al et al. Induction of vascular adhesion protein-1 during liver allograft rejection and cytomegalovirus infections in rats. *Am J Pathol* 2000;157, 4: 1229-1237.
121. Rodríguez-Perálvarez M, Germani G, Tsochatzis E et al. Predicting severity and clinical course of acute rejection after liver transplantation using blood eosinophil count. *Transplant Int* 2012; 25: 555.
122. Schlitt HJ, Nashan B, Krick P, et al. Intragraft immune events after human liver transplantation. Correlation with clinical signs of acute rejection and influence of immunosuppression. *Transplantation* 1992; 54: 273.
123. Nagral A, Butler P, Sabin CA, Toller K, Borroughs AK. Alpha-glutathione-S-transferase in acute rejection of liver transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 401.

124. Demetris A, Batts K, Dhillon A, et al. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658.
125. Rodríguez –Perálvarez M, Germani G, Darius T, Lerut J, Tsochtzis E, Burroughs AK. Tacrolimus trough levels, rejection and renal impairment in liver transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant* 2012; 12: 2797.
126. Rodríguez- Perálvarez M, García Caparros C, Tsochtzis E, Germani G, Hogan B, Poyato-González A, et al. Lack of agreement for defining “clinical suspicion of rejection” in liver transplantation: a model to select candidates for liver biopsy. *Transplant Int* 2015, 455-464.
127. Thuraiajah PH, Carbone M, Bridgestone H, et al. Late acute liver allograft rejection: a study of its natural history and graft survival in the current era. *Transplantation* 2013; 95: 995.
128. Ikegami T, Bekki Y, Imai D, et al. Clinical outcomes of living donor liver transplantation for patients 65 years old or older with preserved performance status. *Liver Transpl* 2014; 20, 408.
129. Heinbokel T, Hock K, Liu G, Edtinger K, Elkhail A, Tullius SG. Impact of immunosenescence on transplant outcome. *Transpl Int* 2013; 26: 242.
130. Boundjema K, Camus C, Saliba F, et al. Reduce-dose tacrolimus with mycophenolate mofetil vs standard-dose tacrolimus in liver transplantation: a randomized study. *Transplant* 2011; 11: 965.
131. Saliba F, De Simone P, Nevens F, et al. Renal function at two years in liver transplant patients receiving everolimus: results of a randomized, multicenter study. *Am J Transplant* 2013; 13: 1734
132. Barnes EJ, Abdel-Rehim MM, Goulis Y, et al. Applications and limitations of blood eosinophilia for the diagnosis of acute cellular rejection in liver transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 432.
133. Washburn MP, Wolters D, Yates JR III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001; 19, 24: 242-247.

134. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PPJ, Fusaro Va, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 35, 359: 572-577.
135. Jacobs JM, Adkins JN, Qian WJ, Liu T, Shan Y, Camp DG II, et al. Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J Proteome Res* 2005; 4: 1073-1085.
136. Simpson MA, Madras PN, Monaco AP. Immunological heterogeneity among potential transplant recipients. Prospects for predicting immune responses to allograft with in vitro tests. *Clin Lab Med* 1991; 11: 733-762.
137. Omar Massoud, Julie Heimback, Kimberley Viker, Anuradha Krihnan, John Poterucha, William Sánchez et al. Noninvasive diagnosis of acute cellular rejection in liver transplant recipients. A proteomic signature validated by enzyme-linked immunosorbent assay. *Liver Transplantation* 2011; 17: 723- 732.
138. Maecker Holden T, McCoy JP Jr and The Focis Human Immunophenotyping Consortium. A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials. *Nat Immunol* 2010 November; 11, 11: 975-978. Doi: 10.1038/ni.1110-975.

ABREVIATURAS

- **a.c.:** Antes de Cristo
- **ACN:** Anticalcineurínicos
- **ADCC:** Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
- **Ag-Ac:** Antígeno-anticuerpo

- **ALP:** Fosfatasa alcalina
- **APC:** Célula presentadora de antígeno
- **BCR:** Receptor de la célula B
- **Br:** Bilirrubina
- **Ca²⁺:** Calcio
- **cc.:** Centímetros cúbicos
- **CCCC:** Cuatro cisteínas cercanas en posiciones equivalentes
- **CDCA:** Ácido quenodeoxicólico
- **CD2:** Familia de supergenes de las inmunoglobulinas
- **CD18:** Antígeno leucocitario funcional
- **CHP:** Célula hematopoyética pluripotencial
- **CMV:** Citomegalovirus
- **CTL:** Linfocitos T citotóxicos
- **DAG:** Diacilglicerol
- **d.c.:** Después de Cristo
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetra acético sal disódica
- **ELAM:** Molécula de adhesión al endotelio
- **ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- **Fc:** Parte del anticuerpo que se une a los receptores
- **FHF:** Fallo hepático fulminante
- **GGT:** Gamma glutamiltranspeptidasa
- **GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- **GOT:** Aspartato aminotransferasa
- **gr:** Gramo
- **GTP:** Guanosín trifosfato
- **HLA:** Antígeno de histocompatibilidad
- **HTA:** Hipertensión arterial
- **iC3b:** Molécula proteica con habilidad especial para unirse a células diana específicas
- **ICAM:** Molécula de adhesión intercelular
- **ICE:** Proteasa endógena
- **IFN:** Interferón
- **Ig:** Inmunoglobulina

- **IL:** Interleukina
- **IL-Ra:** Antagonista del receptor de la interleukina
- **IL-1a:** Interleukina 1 alfa
- **IL-1b:** Interleukina 1 beta
- **IL-2R:** Receptor de interleukina 2
- **IP3:** Inositoltrifosfato
- **JAK:** Fosforilasa del receptor en residuos de tirosina
- **Kg:** kilogramo
- **MALT:** Tejido linfoide asociado a mucosas
- **MCAF:** Factor quimiotáctico activador de los monocitos
- **MELD:** sistema de puntuación para medir la severidad de la enfermedad hepática crónica
- **mgr:** miligramos
- **MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad
- **MIF:** Factor inhibidor de la migración de los macrófagos
- **mlg:** Inmunoglobulina de membrana
- **ml:** mililitros
- **NK:** Natural killer
- **NO:** Óxido nítrico
- **NRI:** Intermediarios reactivos de nitrógeno
- **LFA:** Antígenos leucocitarios funcionales
- **LPS:** Lipopolisacárido
- **PKC:** Proteinkinasa
- **PMN:** Polimorfonucleares
- **PLC:** Fosfolipasa C
- **PTK:** Tirosinkinasas
- **ROI:** Intermediarios reactivos de oxígeno
- **sIL-R:** Versión soluble del receptor
- **STAT:** Transductoras de señal y activadoras de la transcripción de la fosforilación de la tirosinas
- **Tc:** Linfocitos T citotóxicos
- **TCGF:** Factor potenciador del crecimiento de los linfocitos T citolítico
- **TCR:** Receptor de la célula T
- **Th:** Linfocito T helper
- **TI:** Antígeno timo-independiente

- **Tind**: Antígeno timo-independiente
- **TMB**: Agregado del sustrato de la enzima en el procesamiento por ELISA
- **TNF**: Factor de necrosis tumoral
- **TOH**: Trasplante ortotópico hepático
- **Ts**: Linfocito T supresor
- **UCI**: Unidad de Cuidados Intensivos
- **VBDS**: Síndrome desaparición conductos biliares
- **VCAM=INCAM**: Molécula de adhesión al endotelio vascular
- **VHB**: Virus hepatitis B
- **VHC**: Virus hepatitis C
- **VPN**: Valor predictivo negativo
- **VPP**: Valor predictivo positivo
- **WSXWS**: Triptófano-serina X triptófano-serina
- **6MP**: 6 metil prednisolona

