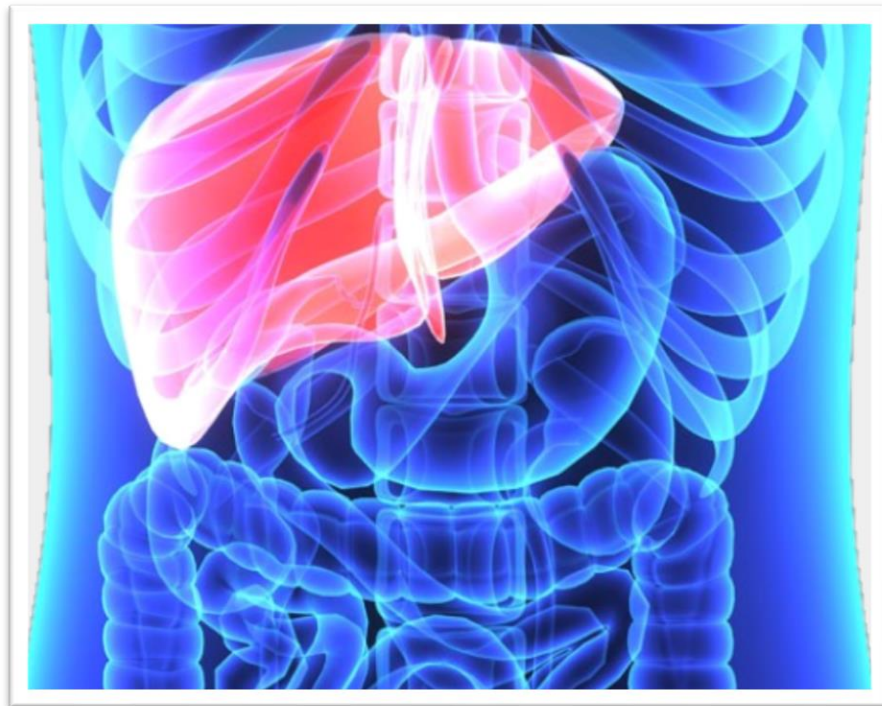




Universidad de Valladolid

**UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LA
INMUNIDAD CELULAR EN EL DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE LA DISFUNCIÓN DEL
INJERTO HEPÁTICO**



TRABAJO DE FIN DE GRADO 2018-2019

Autora: Laura Leal Casado

Tutora: Dra. Gloria Sánchez Antolín

Quizá los agradecimientos sea la parte más fácil y más difícil de todo este trabajo de fin de grado. Fácil porque saltan a la memoria caras, nombres y gestos. Difícil, porque es difícil plasmarlos en un papel.

Es por ello que, este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda, en primer lugar, de la Doctora Gloria Sánchez Antolín. Gracias por su entusiasmo a la hora de dirigir este trabajo y porque no sólo me ha dado la oportunidad de aprender a su lado, sino además ha sido un ejemplo de tranquilidad, constancia y trabajo.

Gracias a la Unidad de Hepatología porque con su trabajo diario he podido confeccionar mi base de datos. Mención especial al doctor Javier Tejedor Tejada por el interés y ayuda recibida.

Gracias también a Manuel González Sagrado por su apoyo estadístico.

Pero, sobre todo, gracias a mis padres, porque todo lo que soy como persona se lo debo a ellos. Gracias por enseñarme la importancia del amor propio y la satisfacción del trabajo bien hecho.

Gracias a mis tías, Candelas y Ramona, por animarme siempre en todo y ser el mayor ejemplo de generosidad y trabajo. Gracias a mis primos, Fernando y Pablo, por desempeñar el papel de hermanos en mi vida y ser mi ejemplo a seguir tanto en el mundo profesional como personal.

Finalmente, y no por ello menos importante, gracias a mis amigos y amigas del colegio y de la carrera, un pilar más en mi vida, por estar siempre pendientes de mí y por todo el cariño que recibo a diario.

“Saber mucho no es lo mismo que ser inteligente. La inteligencia no es sólo información, sino también juicio para manejarla”

Carl Sagan

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
2.1 Fundamento de ImmuKnow®	8
2.2 Trasplante hepático en la Comunidad de Castilla y León	9
2.3 Protocolo de profilaxis infecciosa	10
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	11
4.1 Selección de los candidatos.....	11
4.2 Recogida de datos clínicos	11
4.2.1 Definiciones de las variables objeto de estudio	11
4.3 Análisis de datos.....	12
4.3.1 Recogida y tratamiento de datos	12
4.3.2 Análisis Estadístico.....	12
4.4 Aspectos éticos	13
4.5 Búsqueda bibliográfica.....	13
RESULTADOS	14
5.1 Datos demográficos de los pacientes trasplantados hepáticos	14
5.2 Relación entre ImmuKnow y niveles de inmunosupresión en sangre.....	16
5.3 Utilidad de ImmuKnow en predecir infección	17
5.4 Variación de los parámetros analíticos antes y después del ImmuKnow	19
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24
PÓSTER DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO	26

RESUMEN

Muchas de las causas de morbi-mortalidad en los pacientes trasplantados hepáticos están relacionadas con el estado de inmunosupresión, y, por tanto, con la medicación inmunosupresora. Este dato sugiere la necesidad de un equilibrio en el nivel de inmunosupresión de los pacientes trasplantados hepáticos, que evite el rechazo por infra inmunosupresión pero también las complicaciones infecciosas o los tumores de novo asociados a un exceso de inmunosupresión. Actualmente, no existen test que midan con precisión el nivel de inmunosupresión de un trasplantado, ya que el nivel de fármacos que disponemos no siempre refleja el estado de inmunosupresión de los pacientes. ImmuKnow es un test que proporciona información objetiva acerca de la función celular inmune. **OBJETIVO:** Nuestro objetivo en el estudio fue determinar la correlación entre grado de inmunosupresión y niveles de ATP de los linfocitos T CD4 medidos por ImmuKnow en pacientes trasplantados hepáticos en el Hospital Universitario Río Hortega (HURH). Como objetivo secundario, valorar si ImmuKnow es capaz de identificar pacientes en riesgo de infección y si hubo mejoría analítica a los 6 meses de realizar el test. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Para ello diseñamos un estudio retrospectivo, descriptivo, que incluye a 119 pacientes trasplantados hepáticos a los que se les realizó ImmuKnow entre los años 2014-2018. Se recogieron: edad, sexo, indicación y fecha del trasplante, dosis y niveles de fármacos inmunosupresores, niveles de ImmuKnow y datos analíticos en el momento en que se realizó el test y a los 6 meses: parámetros de función hepática, serie leucocitaria y PCR de citomegalovirus. **RESULTADOS:** No hemos encontrado correlación entre los niveles de tacrolimus en sangre y los niveles de ATP medidos por ImmuKnow. A los seis meses de la realización de ImmuKnow observamos en nuestra serie, diferencias significativas en los valores de bilirrubina total y el número de monocitos. Sin embargo, hemos observado una asociación significativa entre niveles bajos de ImmuKnow, es decir, exceso de inmunosupresión, e infección por citomegalovirus en trasplantados hepáticos, especialmente con niveles por debajo de 175 ng/ml (sensibilidad del 100%). **CONCLUSIÓN:** ImmuKnow parece un test útil para identificar pacientes en riesgo de infección por citomegalovirus. No existe correlación entre el nivel de tacrólimus y ciclosporina y el nivel de IMMUKNOW. Se observó mejoría en las cifras de bilirrubina y monocitos a los seis meses de la realización de ImmuKnow. Es posible que las decisiones tomadas con el resultado del test modifiquen la actuación terapéutica de los especialistas en trasplante hepático.

INTRODUCCIÓN

El trasplante hepático, que es la sustitución del hígado original enfermo por un órgano sano (aloinjerto), ha supuesto uno de los avances más importantes en las últimas décadas, siendo en la actualidad un tratamiento eficaz de la enfermedad hepática terminal, con supervivencias al año de más del 85 % y 70% a los 5 años con una elevada calidad de vida de los pacientes. (1)

El trasplante hepático está indicado en aquellas enfermedades hepáticas en las que han fracasado otras medidas terapéuticas, en ausencia de contraindicaciones absolutas.

Las principales causas de trasplante hepático son la cirrosis hepática avanzada, el hepatocarcinoma en estadio BCLC-A con hipertensión portal, algunas enfermedades congénitas en niños y a veces enfermedades que producen un deterioro muy brusco y agudo del hígado conduciendo a la insuficiencia hepática aguda grave. En la infancia, la causa más frecuente es la atresia biliar extrahepática.

El primer trasplante hepático lo realizó por primera vez Thomas Starzl en la Universidad de Colorado en el año 1963. Desde entonces se realizaron varias decenas de trasplantes en el resto del mundo en las décadas de los sesenta y los setenta, pero con unos resultados muy pobres, que en las mejores manos apenas supuso una supervivencia al año de un 30% de los pacientes. (1)

Hubo que esperar a los ochenta para que las mejoras en el ámbito quirúrgico, de la anestesia, del manejo de la coagulación, pero sobre todo de la inmunosupresión, consiguieran que el trasplante tuviera supervivencias elevadas. Una conferencia de consenso celebrada bajo los auspicios del Instituto de la Salud (NIH) norteamericanos en Bethesda (Maryland) en junio de 1983 supuso la declaración del trasplante hepático como procedimiento de utilidad terapéutica demostrada y su verdadera difusión por todo el mundo. (2) La supervivencia al año pasó del 30 al 70% y seguiría mejorando en las siguientes décadas, en enfermos que sin este procedimiento tienen una mortalidad muy elevada a corto plazo.

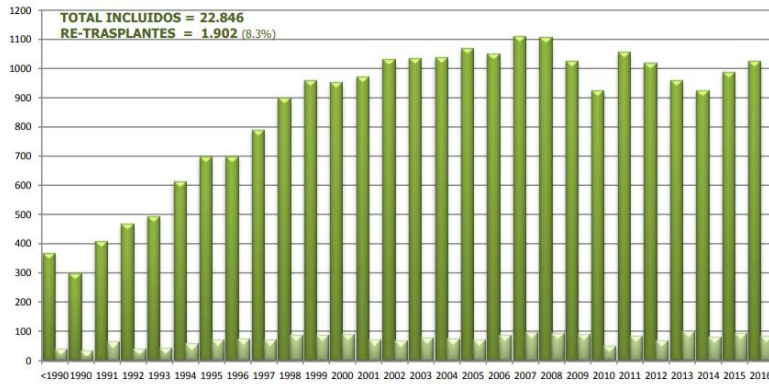


Ilustración 1. Actividad en España Trasplante Hepático <1990-2016. (2)

En España fueron los doctores Carles Margarit y Eduardo Jaurrieta en el Hospital de Bellvitge de l'Hospitalet, Barcelona, en 1984 quienes hicieron con éxito la primera operación. Hoy el trasplante hepático se realiza en 24 hospitales de

España, y son más de mil cien los enfermos que anualmente reciben un trasplante hepático en nuestro país. [Ilustración 1](#) (2)

De hecho, somos el país con la tasa más alta de trasplante hepático en el mundo. España supone sólo un 0,7% de la población del planeta, pero realizamos desde hace años cerca del 10 % de todos los trasplantes de hígado del mundo.

El descubrimiento en la década de los ochenta de la ciclosporina revolucionó el mundo del trasplante, de modo que la tasa de rechazo agudo disminuyó drásticamente hasta cifras en torno al 10-15% en la actualidad, permitiendo un desarrollo realmente importante del trasplante de órganos, y consiguiendo supervivencias del paciente que llegan al primer año al 90%. Posteriormente, se añadieron al arsenal terapéutico del rechazo el FK-506 o tacrolimus, el mofetil micofenolato y los inhibidores del enzima mTOR, de modo que en la actualidad disponemos de un amplio abanico de posibilidades terapéuticas para el rechazo.

La ciclosporina y el tacrolimus tienen el mismo mecanismo de acción, únicamente que tacrolimus es entre 10 y 100 veces más potente que Ciclosporina. Ambos fármacos son inhibidores de la calcineurina, por lo que inhiben la actividad fosfatasa de la calcineurina linfocitaria a través de la unión de los complejos ciclosporina-ciclofilina y tacrolimus-FKBP12 inhibiendo la activación de los linfocitos T. El tacrolimus en su formulación retardada es un fármaco seguro con menor toxicidad renal, más cómodo con una administración diaria, con ventajas respecto al tacrolimus inicial, de menor vida media. Su eficacia en el control del rechazo ha hecho que el tacrolimus sustituya a la ciclosporina en la mayor parte de los hospitales en los que se lleva a cabo trasplante hepático. (1)

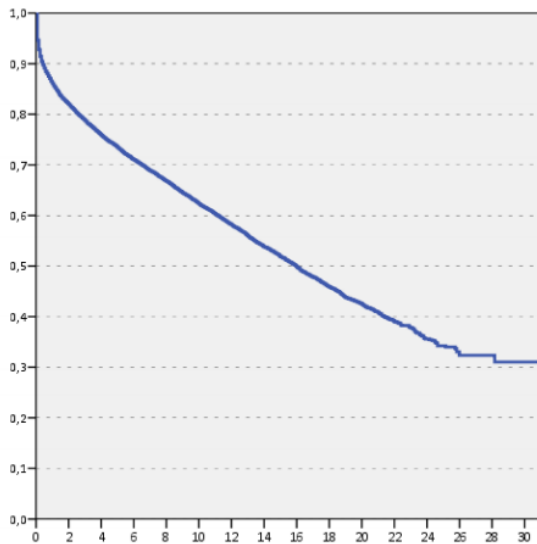


Ilustración 2. Supervivencia del paciente tras trasplante hepático. RETH. Memoria de Resultados 1984-2016. (2)

Sin embargo, más de 25 años de trasplante hepático permiten valorar los efectos negativos de la inmunosupresión con anticalcineurínicos. Si bien la mortalidad durante el primer año de trasplante ha mejorado sensiblemente en las últimas décadas gracias a la mejora de la cirugía y la anestesia, del manejo de la infección y del postoperatorio inmediato, la supervivencia a largo plazo actual, mantiene una pendiente de la curva similar a la de hace más de 20 años. [\[Ilustración 2\]](#) (2)

Esta mortalidad tardía está asociada a la toxicidad renal, hipertensión arterial, desarrollo de diabetes, y aumento del riesgo de infecciones y tumores a largo plazo. (3)

Por ese motivo y gracias al desarrollo de otros inmunosupresores con distintos perfiles de eficacia y de seguridad en el trasplante, han aparecido pautas inmunosupresoras de “minimización” con el objetivo de mantener en niveles mínimos la tasa de rechazo del injerto hepático, pero de mejorar a largo plazo la toxicidad asociada a anticalcineurínicos.

El ácido micofenólico, inhibidor del metabolismo de la purina no nucleosídico, es otro inmunodepresor que habitualmente debe utilizarse en combinación con anticalcineurínicos. La ausencia de toxicidad renal de este fármaco, permite bajar la dosis de tacrolimus o ciclosporina para mejorar la disfunción renal de los pacientes sometidos a trasplante hepático sin aumento de la tasa de rechazo.

En cuanto a otro grupo de los inmunosupresores introducidos recientemente, los inhibidores de la enzima mTOR (mammalian Target of Rapamycin), se ha demostrado que la combinación de everolimus con los inhibidores de la calcineurina mejora significativamente la función renal de los pacientes, manteniendo a la vez un perfil de eficacia y seguridad comparables a la terapia estándar con tacrolimus para la prevención del rechazo agudo celular. Sin embargo, se ha asociado a un incremento de la dislipemia y factores de riesgo cardiovascular. (4)

Existen también otro tipo de inmunosupresión basada en el uso de anticuerpos monoclonales en la inducción del trasplante hepático, es decir, el primer día postrasplante hepático. La principal ventaja que presentan es que no producen insuficiencia renal y permiten evitar en los primeros días postrasplante el uso de anticalcineurínicos en enfermos con problemas en la función renal. Actualmente se usan sobre todo los anticuerpos anti-CD25 o Basiliximab.

Sin embargo, como ya hemos comentado, a pesar del evidente beneficio del tratamiento inmunosupresor, se ha visto en la evolución postrasplante que muchas de las causas de morbi-mortalidad de los receptores de trasplante hepático están relacionadas con la inmunosupresión, estimándose que entre el 40% -70% de toda la mortalidad post-trasplante es atribuible a la inmunosupresión. (3)

Para conseguir un equilibrio adecuado, capaz de minimizar la mortalidad por rechazo y a la vez conseguir tener una tasa mínima de efectos secundarios de la inmunosupresión, es fundamental un seguimiento postrasplante muy estrecho tanto de las pruebas de función hepática, como de los niveles sanguíneos de fármacos anticalcineurínicos, realizado por especialistas en el manejo del paciente postrasplantado. (5)

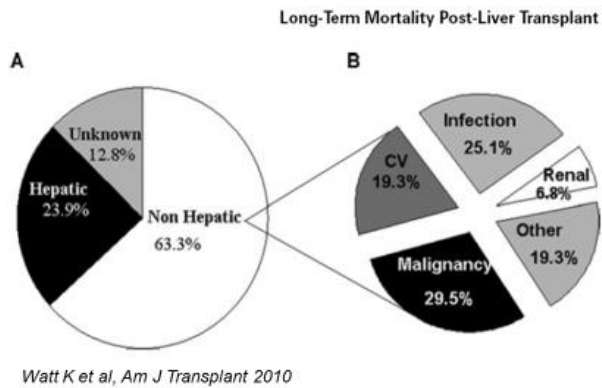
Pero, además, más de dos tercios de los pacientes trasplantados de hígado tienen mínimo una infección durante el seguimiento postrasplante. (6) Nuevamente la inmunosupresión juega un papel importante en la aparición de infecciones postrasplante. Y, sin embargo, por el otro lado, la infrainmunosupresión conduce a rechazo del injerto, acortando el tiempo hasta la muerte o un nuevo trasplante.

[\[Ilustración 3\]](#) (7)

Por ello es importante en el trasplante de órganos proporcionar a los pacientes la mínima inmunosupresión necesaria para evitar el rechazo, pero minimizar la toxicidad a largo plazo.

La biopsia hepática es la técnica actual utilizada para diagnosticar el rechazo agudo pero es una técnica invasiva, cara, requiere ingreso hospitalario e incómoda para el paciente, no exenta de complicaciones. Además, es capaz de medir la presencia de rechazo, pero no el exceso de inmunosupresión.

MORTALIDAD TARDIA POSTRASPLANTE HEPATICO



Se pueden medir en el laboratorio los niveles de tacrolimus, ciclosporina y everolimus, para evitar administrar dosis tóxicas o infraterapéuticas, pero hasta el momento no están claros cuáles son los niveles de inmunosupresión ideales en cada paciente.

Ilustración 3: Mortalidad tardía postrasplante hepático. (8)

En los últimos años se ha desarrollado un test comercial, llamado ImmuKnow (Cylex) capaz de medir la inmunidad celular en pacientes sometidos a trasplante de órganos que recibían tratamiento inmunosupresor. Es el único test aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) el 2 de abril de 2002 para cuantificar la función inmunológica. Se trata de una prueba analítica, no invasiva y cómoda para los pacientes, capaz de monitorizar la inmunidad celular.

Disponer de este test tendría un posible impacto clínico incluyendo: reducción significativa del número de biopsias, reducción de efectos adversos de la inmunosupresión pudiendo mantener menores dosis, y también, minimizar el uso de antibióticos al disminuir el riesgo de infección. Permitiría además, individualizar la terapia inmunosupresora (personalizar el grado de inmunosupresión), ingresos más cortos de los pacientes, reducción en el número de revisiones del paciente y reducción de costes.

2.1 Fundamento de ImmuKnow®

De forma específica, ImmuKnow mide el trifosfato de adenosina producido después de la estimulación de células T con fitohemaglutinina de lectina de planta (PHA) mitógeno. Después de la incubación durante la noche, las células CD4 se seleccionan utilizando partículas paramagnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal para CD4. (9)

Las células clave son los linfocitos T CD4 positivos ya que los principales fármacos inmunosupresores están diseñados para inhibir específicamente la activación de las células T, lo que se ha relacionado con el rechazo. La cantidad de ATP presente en las muestras de sangre estimulada es una medida de la actividad de los linfocitos.

[Ilustración 4](#) (10)

La importancia del ensayo es que proporciona una medida funcional global de las células Th y no sólo la medida de un metabolito, una célula o el nivel de un fármaco.

Por otro lado, es un método reproducible que minimiza la variabilidad que existe con otros ensayos celulares al ser independiente del número de linfocitos CD4. (11)

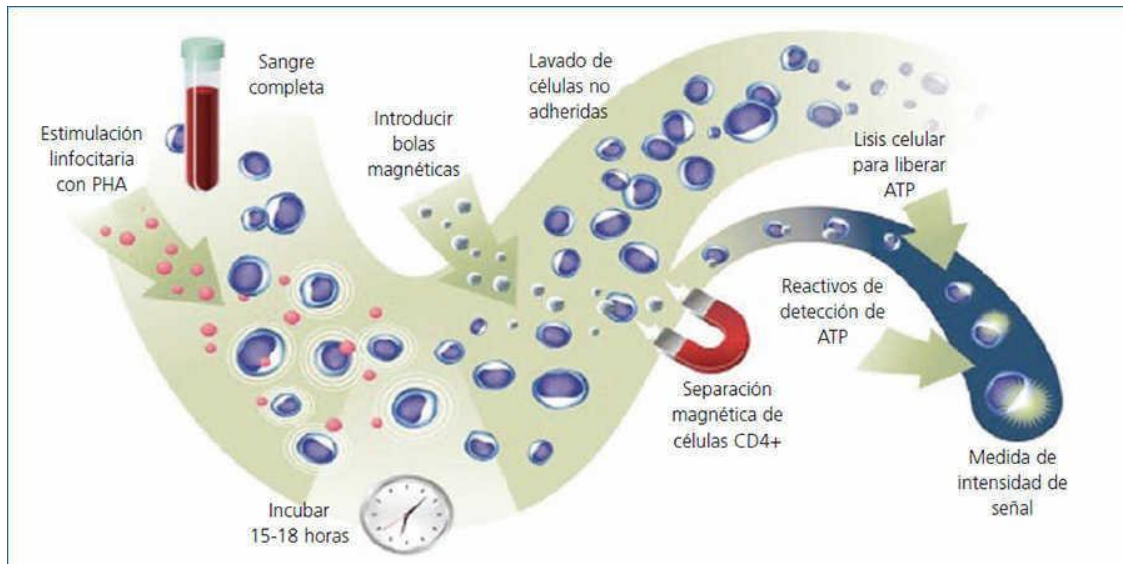


Ilustración 4. Esquema explicativo del ensayo para medir in vitro la función global de las células T CD4+ sanguíneas. (12)

2.2 Trasplante hepático en la Comunidad de Castilla y León

La Comunidad de Castilla y León dispone de un programa de Trasplante Hepático en el Hospital Universitario del Río Hortega de Valladolid. El primer trasplante hepático se realizó el 20 de Noviembre de 2001 desde entonces han sido más de 700 los trasplantes realizados.

El trasplante por otro lado no sería posible sin la generosidad de la población y, en ese sentido, es de destacar la alta tasa de donaciones de esta Comunidad que se sitúa incluso por encima de la media nacional sin duda. España es el país con la mayor tasa de donantes por millón de habitantes del mundo. Sin embargo, a pesar de ello, la muerte en lista de espera es actualmente el mayor problema de los pacientes candidatos a trasplante hepático.

El ImmuKnow se empezó a utilizar en este hospital en el año 2014 en situaciones en las que el especialista en trasplante precisaba una información precisa del estado de inmunosupresión del paciente, bien por tener dudas sobre el riesgo de rechazo o sobre el riesgo del paciente de exceso de inmunosupresión.

2.3 Protocolo de profilaxis infecciosa

Dada la relación tan estrecha entre infección en el paciente trasplantado y mortalidad, es de capital importancia la prevención, así como el diagnóstico y tratamiento precoz de las infecciones.

En la prevención emplearemos:

- **Medidas generales:** Aislamiento en planta de hospitalización, con uso de guantes, medidas de asepsia para cualquier manipulación y restringir procedimientos invasivos.
- **Medidas específicas** de profilaxis farmacológicas destinadas a prevenir las infecciones más frecuentes en cada etapa del postrasplante. La profilaxis utilizada en la unidad de trasplante del Hospital Universitario Río Hortega es:
 - **Profilaxis de neumonía por *Pneumocystis Carinii*:** Cotrimoxazol (Trimetoprin/ Sulfametoxazol) 1c/día lunes, miércoles y viernes durante 12 meses desde el momento que el paciente tolere por vía oral.
 - **Fúngica:** de manera universal emplearemos Nistatina durante tres meses en todos los pacientes de riesgo estándar para infección fúngica.
 - **Viral (sólo se realizará para CMV):** El CMV es el agente que con mayor frecuencia causa infección en todos los tipos de trasplante de órgano sólido. En pacientes trasplantados hepáticos administraremos Valganciclovir 900 mg/24 horas desde el día 7º postrasplante hasta el tercer mes postrasplante, ajustando la dosis a la función renal del paciente.
 - **Descontaminación selectiva intestinal,** con Norfloxacino 400 mg al día, para reducir el número de bacterias intestinales gram negativas y disminuir el riesgo de infección por dichas bacterias.

OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es determinar la correlación entre el grado de inmunosupresión y los niveles de ATP de los linfocitos T CD4 medidos por ImmuKnow en pacientes trasplantados hepáticos.

Como objetivo secundario, queremos conocer si ImmuKnow es capaz de identificar pacientes en riesgo de infección y conocer si hubo mejoría analítica de los pacientes a los 6 meses.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio retrospectivo, observacional, comparativo, de todos los pacientes trasplantados hepáticos en el Hospital Universitario Río Hortega a los que se les solicitó un ImmuKnow desde el año 2014 hasta 2018.

4.1 Selección de los candidatos

Se seleccionaron a todos los pacientes a los que se les ha realizado la prueba ImmuKnow desde 2014 hasta 2018 y están trasplantados hepáticos. Se excluyó a aquellos pacientes a los que se realizó el test pretrasplante pero finalmente no fueron trasplantados.

4.2 Recogida de datos clínicos

Se recogieron datos demográficos, analíticos y microbiológicos de manera anónima acorde a la Ley de Protección de Datos. Dichos datos serán almacenados en una base de datos que será dada de alta en la Agencia de Protección de Datos.

4.2.1 Definiciones de las variables objeto de estudio

1. Variables epidemiológicas:
 - Edad: edad del paciente, medida en años
 - Sexo
2. Datos del trasplante:
 - Indicación o motivo por el que se trasplantó al paciente. Se clasificó la indicación en Cirrosis avanzada, Hepatocarcinoma, Insuficiencia Hepática Aguda Grave, Cirrosis Biliares y Autoinmunes y Otros que incluía otras indicaciones menos frecuentes de trasplante.

- Fecha de trasplante
- Régimen inmunosupresor: tacrolimus, ciclosporina, micofenolato de mofetilo, everolimus y prednisona.

3. Datos analíticos:

- Posología: Dosis administrada y concentración de inmunosupresor en sangre.
- Función inmunitaria de las células T CD4 (ImmuKnow).
- Analítica basal: GOT, GPT, GGT, Fosfatasa Alcalina, Bilirrubina total, serie leucocitaria, plaquetas, serología y PCR citomegalovirus.
- Analítica a los 6 meses: GOT, GPT, GGT, Fosfatasa Alcalina, Bilirrubina total, serie leucocitaria, plaquetas, serología y PCR citomegalovirus.

4.3 Análisis de datos

4.3.1 Recogida y tratamiento de datos

Para la recogida de los datos se confeccionó una base de datos en el programa Excel 2013. Los datos fueron adecuadamente anonimizados. Los datos fueron introducidos por una sola persona y revisados por un experto. Tras su depuración fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS v. 15.0 (SPSS Inc. 1989-2006). La pérdida de valores superior al 15% en una determinada variable será considerada como un posible sesgo del estudio.

4.3.2 Análisis Estadístico

La normalidad de las variables cuantitativas será establecida con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables de distribución normal serán descritas como media \pm desviación estándar (DE) y las de distribución no normal y/o discretas como mediana y rango intercuartílico. Por su parte, las variables cualitativas serán descritas mediante la tabla de frecuencias absolutas y relativas (porcentajes) de sus categorías.

Para estudiar la asociación entre variables cualitativas se utilizará la prueba de Chi cuadrado con test exacto de Fisher (tablas 2x2) o razón de verosimilitud (más de 2 categorías), dependiendo de sus condiciones de aplicación (frecuencia esperada <5 en más del 20% de las casillas).

Para estudiar las diferencias entre medias independientes y dependientes se utilizará la prueba de la t de Student o la U de Mann-Whitney, para muestras independientes y/o pareadas dependiendo de las condiciones de aplicación (normalidad), para 2 grupos, y el ANOVA o la H de Kruskal-Wallis, dependiendo asimismo de las condiciones de aplicación (normalidad), para más de 2 grupos.

Así mismo, para estudiar la correlación entre variables no paramétricas se empleará el coeficiente de correlación de Spearman.

El nivel de significación para todas las pruebas se considerará para una $p \leq 0,05$.

4.4 Aspectos éticos

Este trabajo se realizará siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki de 1964 (última enmienda, 2013). Se cuenta con la aprobación de la Comisión de Investigación y el Comité de Ética Asistencial y Ensayos Clínicos (CEIC) del Hospital Universitario Río Hortega-Área Oeste de Valladolid.

No precisa consentimiento informado porque sólo precisa la revisión de historias clínicas.

No existe conflicto de intereses ni se dispone de financiación por organismos públicos o privados.

4.5 Búsqueda bibliográfica

La búsqueda bibliográfica principal ha sido realizada en la base de datos MEDLINE a través de PubMed, recurso de acceso libre mantenido y desarrollado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI), de la Biblioteca Nacional de Medicina (National Library of Medicine, NLM) de los Estados Unidos, localizada en los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health, NIH). La búsqueda inicial se planteó utilizando términos libres y la definitiva a través de términos controlados tomados del tesoro de MEDLINE, la base de datos MeSH. Los términos de búsqueda fueron relacionados mediante operadores lógicos e implementados mediante truncadores, utilizando como límites el tiempo (15 últimos años), el idioma (español e inglés) y las condiciones “investigación en humanos” y “artículos con abstract”, para confeccionar la estrategia más adecuada. Esta estrategia se planteó, inicialmente, con formulación PICO (Patients, Control, Outcome), adaptada al diseño del estudio. De los artículos recuperados fueron seleccionados los que aportaban la información más pertinente y relevante según criterio personal. Los límites de búsqueda no fueron considerados para trabajos históricos de referencia.

La revisión bibliográfica ha sido realizada en dos tiempos, el primero antes del diseño del estudio, para lograr una idea del estado actual del tema, y el segundo con posterioridad al mismo, con el fin de priorizar los datos obtenidos y establecer modelos comparativos. Dicha revisión también se realizó con la finalidad de hacer una comparación de nuestros resultados con la literatura científica actual acerca del ImmuKnow.

RESULTADOS

5.1 Datos demográficos de los pacientes trasplantados hepáticos

Se realizó ImmuKnow a 119 pacientes. Un total de 18 pacientes a los que se les realizó el test entre 2014-2018 fueron excluidos de este análisis en el estudio porque finalmente no se trasplantaron. De ellos, el 39% fallecieron antes de recibir el trasplante.

De los 101 pacientes trasplantados hepáticos a los que se les realizó la prueba ImmuKnow desde 2014 hasta 2018, el 82.2% eran hombres y el 17,8% mujeres [\[Ilustración 6\]](#), siendo la edad media $55.30 \pm 11,04$.

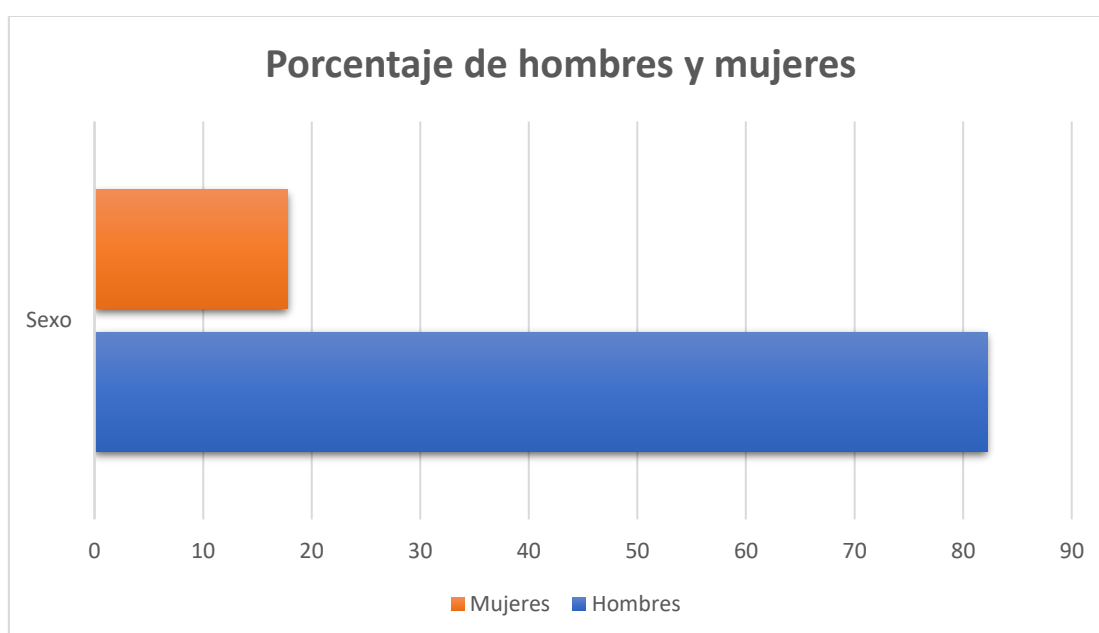


Ilustración 5. Porcentaje de hombres y mujeres trasplantados hepáticos.

El porcentaje de pacientes que se trasplantaron según indicación de trasplante y etiología se recoge en las siguientes figuras, siendo la cirrosis avanzada (65%) y el alcohol (46%), la indicación [Ilustración 6] y etiología [Ilustración 7] más frecuentes, respectivamente.

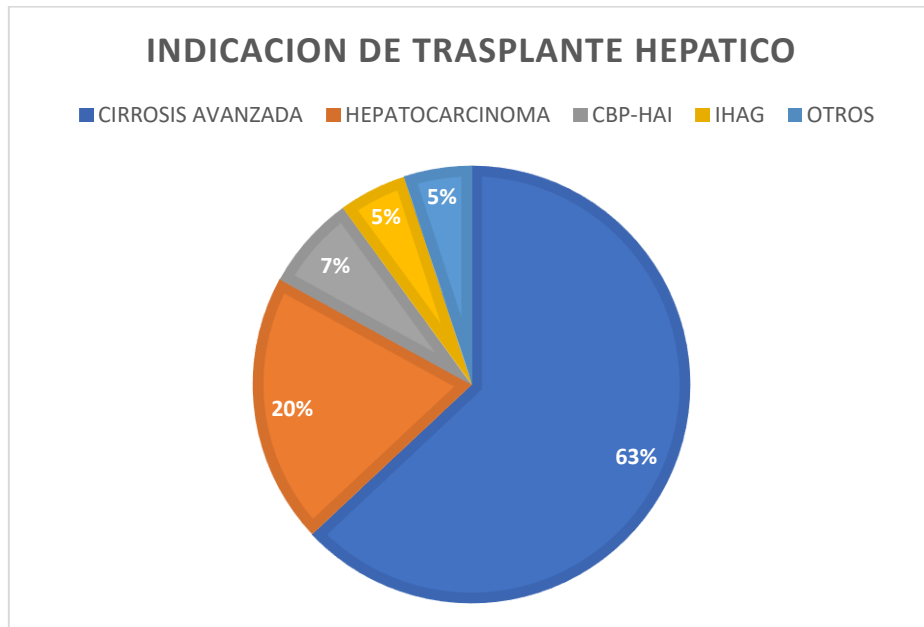


Ilustración 6. Porcentaje de pacientes trasplantados según cada indicación. HC: Hepatocarcinoma. CB-HAI: Cirrosis biliares y Hepatitis autoinmune. IHAG: Insuficiencia hepática aguda.

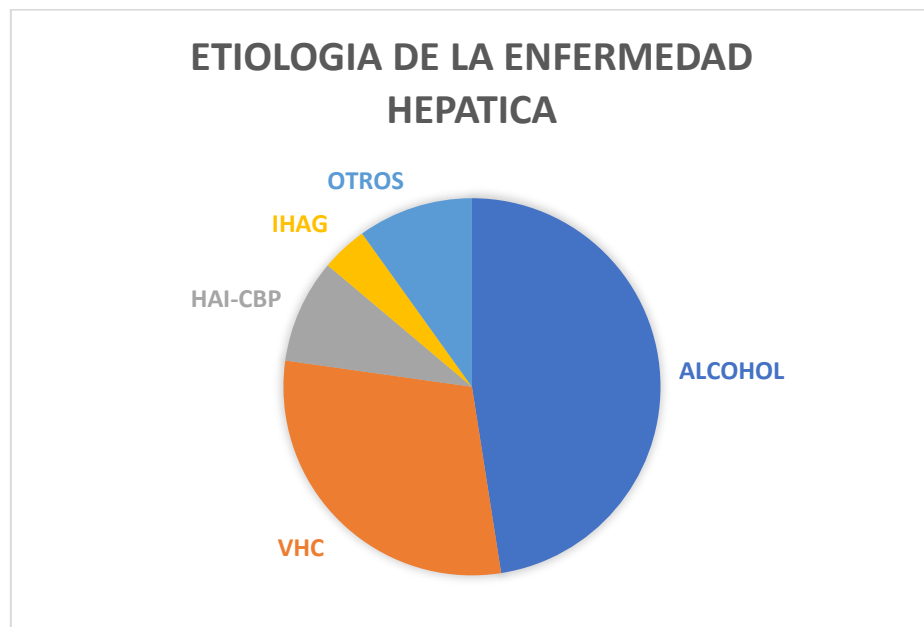


Ilustración 7. Porcentaje de pacientes trasplantados según etiología. OH: Alcohol. VHC: Virus de la Hepatitis C. HAI-CBP: Hepatitis autoinmune y Cirrosis biliar primaria. IHAG: Insuficiencia hepática aguda.

Durante el seguimiento, 18% de los pacientes incluidos fallecieron.

5.2 Relación entre ImmuKnow y niveles de inmunosupresión en sangre

El nivel medio de ImmuKnow fue 154 ± 114 ng/ml. 49 pacientes recibieron un régimen de inmunosupresión basado en tacrolimus. La dosis media de tacrolimus fue 4 ± 3.8 mg y los niveles de tacrolimus en sangre fueron $6 \pm 4,5$ ng/ml.

Se clasificaron a los pacientes en cuatro grupos según los resultados de ImmuKnow:

- <100 ng/ml
- 100-175 ng/ml
- 175-250 ng/ml
- >250 ng/ml

En la siguiente ilustración se representa los niveles medios de tacrolimus (ng/ml) con un intervalo de confianza del 95%, según los grupos de respuesta inmune señalados (6.72 ± 6 ng/ml fue la media de los niveles de tacrolimus en el grupo < 100 ; 4.7 ± 2.6 ng/ml en el grupo 100-175; $6 \pm 1,6$ en el grupo 175- 250 y en los que tuvieron un resultado mayor de 250 ng/ml en el test los niveles medios fueron de $6.7 \pm 4,7$ ng/ml). [\[Ilustración 9\]](#)

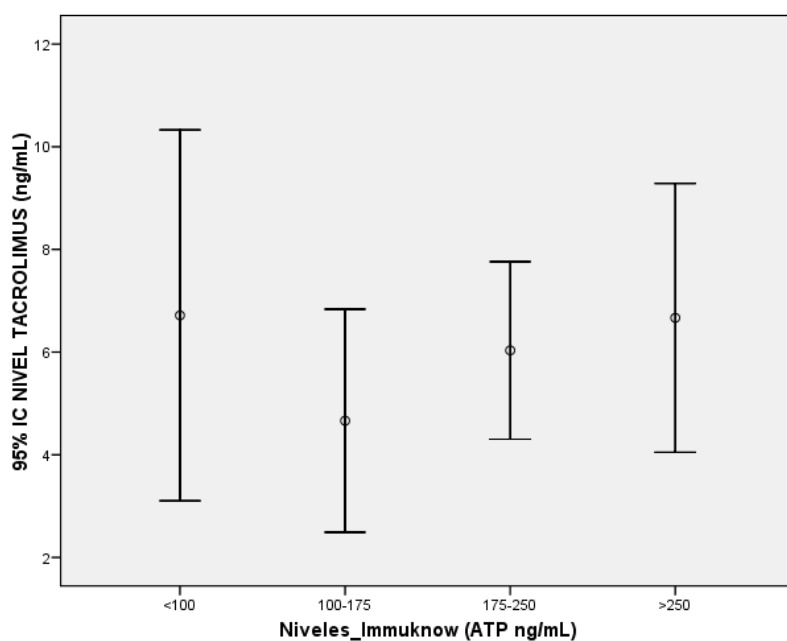


Ilustración 8. Relación niveles de ImmuKnow (ATP ng/ml) con niveles sanguíneos de tacrolimus (ng/ml).

No hubo correlación entre los niveles de tacrolimus en sangre y los niveles de ImmuKnow (r de Spearman= 0,098, $p= 0.536$). [\[Ilustración 10\]](#)

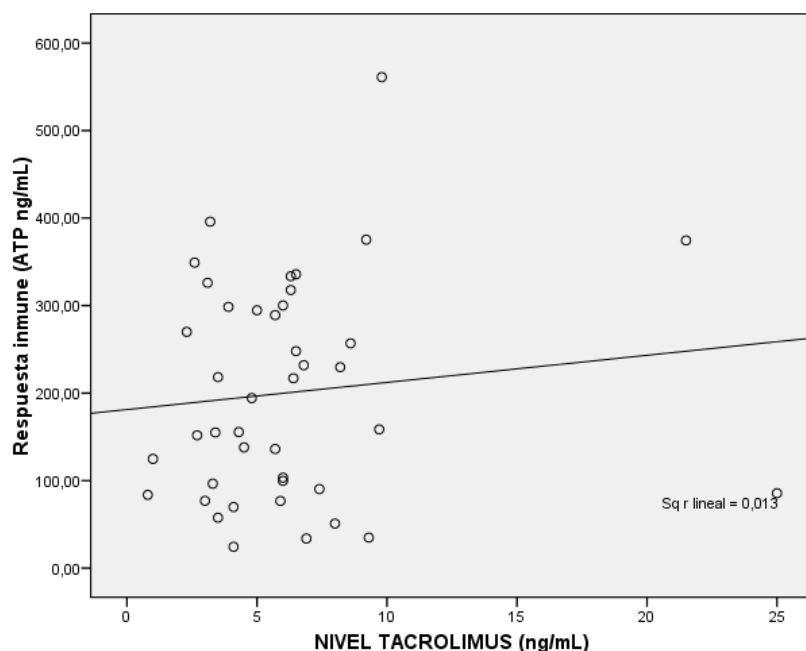


Ilustración 9. No hubo correlación entre el nivel de respuesta inmune y los niveles de tacrolimus (ng/ml).

Tacrolimus es el inmunosupresor más empleado y con el que se tiene mayor experiencia. No obstante, dentro de nuestros pacientes, 10 fueron tratados con ciclosporina y 14 con everolimus. Los niveles medios de ciclosporina y everolimus en sangre fueron, respectivamente, 72.3 ± 16.3 ng/ml y 4.6 ± 1.6 ng/ml.

Junto al tratamiento anticalcineurínico se empleó prednisona en 28 pacientes y ácido mofetil micofenolato en 32 trasplantados con la finalidad de reducir la dosis de tacrolimus y ciclosporina.

5.3 Utilidad de ImmuKnow en predecir infección

47 de los 101 pacientes trasplantados sufrieron infecciones. 11 pacientes tuvieron infección por citomegalovirus, 7 infección por el virus de la hepatitis B y 28 por el virus de la hepatitis C. Sí que se ha demostrado una relación significativa entre los resultados obtenidos con el test y la infección por citomegalovirus ($p=0,002$). Estos pacientes tuvieron un nivel de ImmuKnow más bajo comparado con los pacientes no infectados (73.9 ± 48 ng/ml vs 160.5 ± 115.5 ng/ml). Es decir, los pacientes con más nivel de inmunosupresión tuvieron mayor incidencia de infección por CMV. [\[Ilustración 11\]](#)

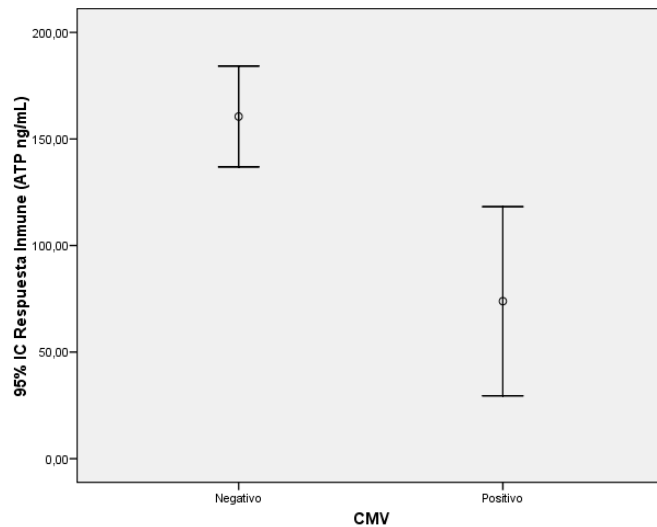
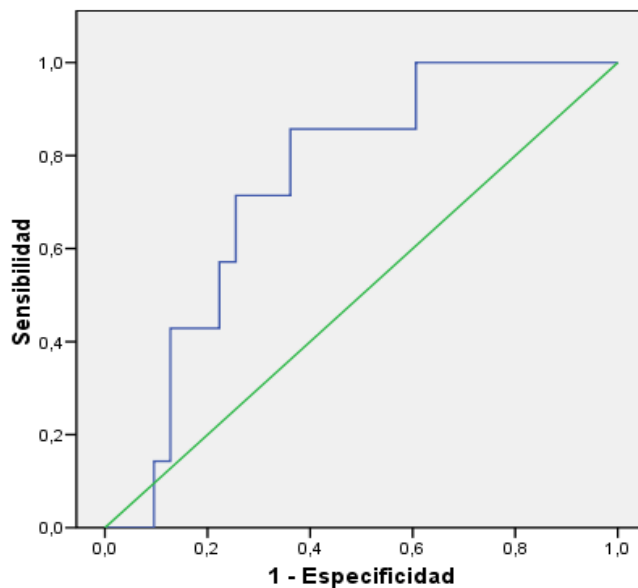


Ilustración 10. Los niveles de ImmuKnow fueron menores en los pacientes con infección por CMV que en los no infectados ($p=0,002$).

De los 11 pacientes que sufrieron infección por el CMV, 7 se detectaron en la analítica inicial y posteriormente se negativizaron en la analítica de seguimiento (presumiblemente debido a un cambio en la inmunosupresión después del test) y, en 4 pacientes aumentó la carga viral del virus en la PCR de la analítica de seguimiento. Dentro de los 4 que se positivatizaron, el 100% obtuvo valores por debajo de 175 ng/ml en el test y 0% por encima de 175 ng/ml, por lo que se considera un buen punto de corte. Además, este punto se ha podido confirmar con la curva ROC (punto de corte 175: Sensibilidad 100% y Especificidad 40%). [Ilustración 12](#)

Curva COR



Por lo tanto, el ImmuKnow es un test con una sensibilidad muy alta (100%) y un alto valor predictivo negativo (100%).

Ilustración 11. Curva ROC, ImmuKnow como herramienta para predecir infección por CMV. ($AUC=0,74$, $b=0,032$).

5.4 Variación de los parámetros analíticos antes y después del ImmuKnow

Se midieron parámetros de función hepática y serie leucocitaria en el momento de realizar el test inmune y a los 6 meses para verificar una posible mejoría analítica en la evolución. En la [tabla 1](#) se recoge la media \pm desviación típica de las variables.

VARIABLES	MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR BASAL	MEDIA MAS MENOS DS A LOS 6 MESES	p
GOT	30 \pm 18	37 \pm 47	NS
GPT	58 \pm 66	40 \pm 46	NS
GGT	420 \pm 525	227,76 \pm 392	NS
FA	213 \pm 169	164 \pm 184	NS
Bilirrubina total	1.23 \pm 0,65	1.27 \pm 2	<0,05
Leucocitos total (x1000)	7 \pm 2	5 \pm 2	NS
Linfocitos total	17 \pm 12	21 \pm 12	NS
Monocitos	6 \pm 2	6 \pm 3	<0,05
Neutrófilos	57 \pm 33	63 \pm 21	NS
Plaquetas (1000/ul)	162 \pm 97	169 \pm 75	NS

Tabla 1. Parámetros analíticos antes y después del ImmuKnow. NS: No significativo.

Los dos parámetros que mejoraron a los 6 meses fueron la bilirrubina total y dentro de la fórmula leucocitaria, los monocitos ($p < 0,05$). [Ilustración 13](#)

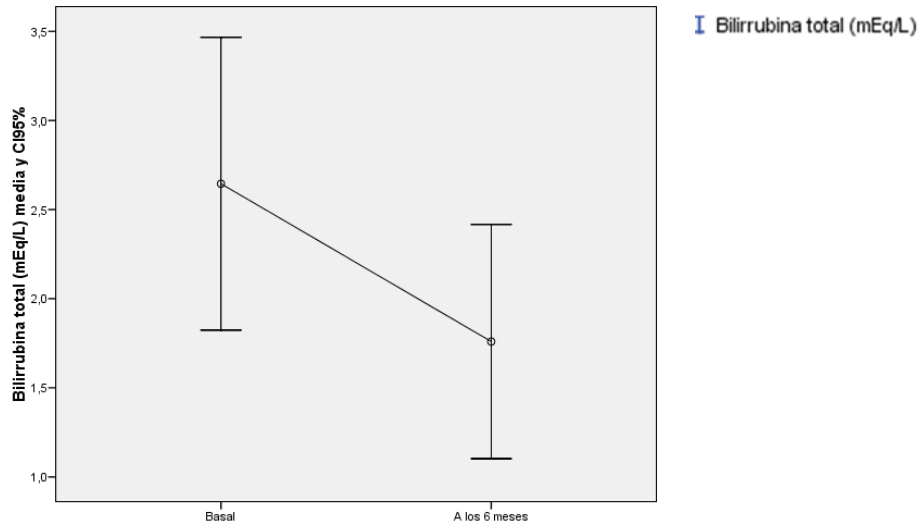


Ilustración 12. Mejoría de la bilirrubina total a los 6 meses de realizar el test.

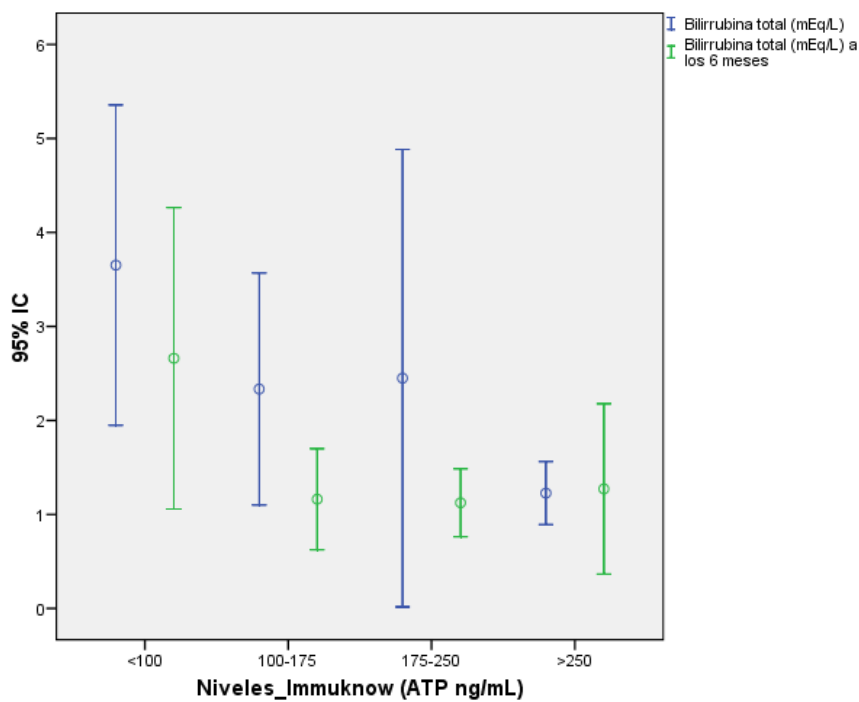


Ilustración 13. Niveles medios de bilirrubina total (mEq/l) en función de los niveles de ImmuKnow (ATP ng/ml).

También se han comparado los niveles medios de bilirrubina total en función del nivel de inmunosupresión, observándose una clara disminución en la analítica de seguimiento. [Ilustración 14](#)

DISCUSIÓN

En el momento actual, disponemos de datos en la literatura acerca del uso de ImmuKnow sobre todo en pacientes que han sido trasplantados de riñón, pero poca en trasplantados hepáticos. Por eso este estudio es importante, aportando información sobre la posible utilidad de ImmuKnow en trasplante hepático.

En nuestro estudio, hemos encontrado que no existe correlación entre los niveles de tacrolimus en sangre y los niveles de ATP medidos por ImmuKnow. No es el primer estudio que demuestra esta falta de correlación en trasplante de órganos sólidos. López-Hoyos M y cols. del Hospital Marqués de Valdecilla de Santander publicaron que “los resultados de ImmuKnow® no guardan relación ni con el número de células T CD4+ ni con los niveles sanguíneos de los inmunosupresores en los pacientes trasplantados de riñón”. (12) No obstante, otros investigadores sí que han encontrado relación significativa (13). Es posible que en este análisis haya que incluir el resto de fármacos inmunosupresores, para poder valorar el total de inmunosupresión que se administra a un paciente y no sólo la asociada al anticalcineurínico. Serán necesarios, por tanto, nuevos estudios para confirmarlo.

Pero el dato más importante del estudio es el hallazgo de una asociación significativa entre niveles bajos de ImmuKnow e infección por citomegalovirus en trasplantados hepáticos. El nivel medio de ImmuKnow en los trasplantados hepáticos que sufrieron una infección por el citomegalovirus fue significativamente inferior al de los que no sufrieron infección por dicho virus (73.9 ± 48 ng/ml vs 160.5 ± 115.5 ng/ml), siendo los niveles de test inferiores a los que describió Kowalski y cols (10), como zona de riesgo.

Aunque este test de función inmune(Immuknow) fue diseñado como una herramienta de monitorización del estado de inmunosupresión y no como un test diagnóstico de infección, en pacientes trasplantados, parece útil para predecir la aparición de infecciones oportunistas en pacientes con exceso de inmunosupresión.

Los resultados que hemos obtenido son comparables a los de otros estudios. (14) (15) En un meta-análisis en el que se evaluaba el riesgo de infección y rechazo en 504 receptores de trasplante sólido, Kowalski y otros investigadores describieron una zona de mínimo riesgo de infección o rechazo entre 130 y 450 ATP ng/ml con un valor predictivo negativo del 95%. En su estudio, mostraron que niveles superiores a 280 ng/ml ATP podrían proteger al aloinjerto del riesgo de rechazo y al paciente de la infección por citomegalovirus. (10)

Cadillo- Chavez (16) estudió pacientes trasplantados de riñón y llegó a la misma conclusión que Kowalski. En nuestro estudio, hemos encontrado una sensibilidad del 100% para un valor de ImmuKnow de 175 ATP ng/ml y un valor predictivo negativo del 100% aunque con significativamente menor nivel de especificidad (40%) y valor predictivo positivo (6%).

Interpretando estos resultados, podemos deducir que el ImmuKnow proporciona información muy interesante de cara al control del exceso de inmunosupresión que favorece la aparición de infecciones oportunistas como el CMV. Por tanto, mantener a los pacientes trasplantados hepáticos con niveles de ImmuKnow superiores a 175 ng/ml, garantiza con un alto valor predictivo negativo, que el riesgo de infección por citomegalovirus es muy bajo, ya que la probabilidad de que siendo el resultado negativo tenga la infección es prácticamente inexistente. Esto nos permite ahorrar muchas pruebas innecesarias en estos pacientes y ahorrar recursos económicos y, por lo tanto, una mejor praxis con menos complicaciones clínicas en estos pacientes.

Cuando valoramos si existían diferencias analíticas a los seis meses de la extracción del ImmuKnow sólo hubo diferencias significativas en la bilirrubina total y el número de monocitos.

Es posible que conocer el valor de ImmuKnow contribuya a mejorar la toma de decisiones del médico, al disponer de una herramienta más para el manejo del paciente trasplantado, contribuyendo a mejorar la función hepática y, lógicamente, la supervivencia del injerto.

Sin embargo, utilizar un solo nivel de iATP para evaluar el estado inmunosupresor tiene indudablemente sus limitaciones. Resultaría interesante realizar varias determinaciones de ImmuKnow en estos pacientes para ver la variación, por ejemplo, una vez resulta la infección y así poder definir con mayor exactitud la periodicidad de la realización de pruebas seriadas, sin embargo, esta es una prueba aún cara, y no está implementada en la rutina clínica debido al alto precio.

También, entre las limitaciones del estudio podemos señalar el tamaño muestral, si bien 101 pacientes no es un tamaño muestral irrelevante pudiera ser que con mayor tamaño muestral obtuviésemos mayor potencia estadística.

Considero que resultaría interesante realizar estudios en un futuro de los cambios en los niveles de ImmuKnow según el protocolo de inmunosupresión que se emplee en cada paciente, para ver si los niveles cambian en pacientes que sólo reciben tacrolimus frente a los que reciben tacrolimus y mofetil micofenolato u otras combinaciones de inmunosupresión.

CONCLUSIONES

- Los linfocitos CD4+ juegan un papel importante en la respuesta inmune y son las células diana de la mayoría de agentes inmunosupresores. Por ello medir su nivel de ATP podría aportar información sobre el nivel de inmunosupresión.
- En la actualidad existe un test comercial llamado ImmuKnow que mide los niveles intracelulares de ATP en linfocitos T CD4+ estimulados con fitohemaglutinina.
- Hasta el momento la mayoría de los datos publicados acerca de este test están relacionados con el trasplante renal, pero no existen muchos datos sobre la utilidad de ImmuKnow en el trasplante hepático. En nuestro estudio, no se demuestra correlación entre los niveles sanguíneos de tacrolimus y los niveles de ImmuKnow.
- Sólo hubo diferencias significativas en la bilirrubina total y monocitos a los seis meses postextracción en el grupo de pacientes trasplantados hepáticos.
- El descenso de los niveles de ATP intracelular en un paciente tiene relación con el riesgo de infección por citomegalovirus en el trasplante hepático, especialmente con valores inferiores a 175 ng/ml.
- ImmuKnow supone una herramienta útil en el manejo de la inmunosupresión y el riesgo de infección postrasplante hepático.
- Es posible que las decisiones tomadas con el resultado del test modifiquen la actuación terapéutica de los especialistas en el trasplante hepático
- Son necesarios más estudios en trasplante hepático que incluyan el total de inmunosupresión de los pacientes para poder valorar globalmente la utilidad de medir el nivel de ATP.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chung RT, Dienstag JL. Trasplante hepático. In J. Larry Jameson ASFDLKSLHDLJL. Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e.: McGraw-Hill; Agosto 2018.
2. Trasplantes SEdTHONd. Registro español de trasplante hepático. Memoria de resultados. [Online].; 2016. Available from:
http://www.ont.es/infesp/Registros/MEMORIA%20RETH%202016_GENERAL.pdf.
3. Siddharth Sood, Adam G Testro. Immune monitoring post liver transplant. [Online].; 2014. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3964194/>.
4. Rubín Suárez A1, Bilbao Aguirre I2, Fernández-Castroagudin J3, Pons Miñano JA4, Salcedo Plaza M5, Varo Pérez E6, Prieto Castillo M7. Recommendations of everolimus use in liver trasplant. [Online].; 2017. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28743539>.
5. Baganate F, Beal EW, Tumin D, et al. Early mortality after liver transplantation: Defining the course and the cause. [Online].; Surgery 2018. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Early+mortality+after+liver+transplantation%3A+Defining+the+course+and+the+cause>.
6. Winston DJ ECBR. Infections in liver transplant recipients. [Online].; 1995;21: 1077-1089..
7. Wiesner RH DABSEL. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. [Online].; Hepatology 1998;28:638-645.
8. Watt KD PRKWHJCM. Evolution of causes and risk factors for mortality post-liver transplant: results of the NIDDK long-term follow-up study. [Online].; Am J Transplant. 2010 Jun;10(6):1420-7. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03126.x. Epub 2010 May 10.. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20486907>.
9. Eunkyong Jwa 1SHaYJKNKGWSDHJCSAETDBMKHKTYHGCPaSGL. In vitro immune cell monitoring as a guide for long-term immunosuppression in adult liver transplant recipients. [Online].; Korean J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2015. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4683916/>.

10. Kowalski R1 PDSMBJTJDMLARRSEHAREDCBCFJSRZA. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. [Online].; Clin Transplant. 2003 Apr;17(2):77-88. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12709071>.
11. Richard J. Kowalski AZRBMJAB&LMC. Immunodiagnostics: Evaluation of Functional T-Cell Immunocompetence in Whole Blood Independent of Circulating Cell Numbers, Journal of Immunotoxicology. [Online].; 2007.
12. López-Hoyos Marcos REAM. Utilidad de la medición de adenosina 5'-trifosfato intracelular en células CD4+ en trasplante renal. Nefrología (Madr.). [Online].; 2013 [citado 2019 Mayo 13] ; 33(3): 381-388. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0211-69952013000400013&lng=es.
<http://dx.doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2012.Oct.11540>.
13. Qu W1 ZZSLWLLYZZ. Correlation Between Immunosuppressive Therapy and CD4(+) T-Cell Intracellular Adenosine Triphosphate Levels in Liver Transplant Recipients. [Online].; Transplant Proc. 2016 Jul-Aug;48(6):2094-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2016.03.047. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27569951>.
14. Rodrigo E LHMCMFEFFGSSDPCAM. ImmuKnow as a diagnostic tool for predicting infection and acute rejection in adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. [Online].; Liver Transpl. 2012 Oct;18(10):1245-53. doi: 10.1002/lt.23497. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740321>.
15. Bhorade SM1 JKVWACGE. Cylex ImmuKnow assay levels are lower in lung transplant recipients with infection. [Online].; J Heart Lung Transplant. 2008 Sep;27(9):990-4. doi: 10.1016/j.healun.2008.06.005. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765191>.
16. Cadillo-Chávez R1 dESSDERTACCBATSPMCLGCZMOL. Assessing the risk of infection and rejection in Hispanic renal transplant recipients by means of an adenosine triphosphate release assay. [Online].; 2006 Apr;38(3):918-20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647510>.

PÓSTER DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO



UTILIDAD DE LA MONITORIZACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA DISFUNCIÓN DEL INJERTO HEPÁTICO

- SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO
- HOSPITAL UNIVERSITARIO RÍO HORTEGA

Autora: Laura Leal Casado
Tutora: Dra. Gloria Sánchez Antolín



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS:

El trasplante hepático ha supuesto un gran avance en las últimas décadas, suponiendo a día de hoy un tratamiento eficaz de la enfermedad hepática terminal. Dada la importancia de las infecciones en la evolución y pronóstico de los pacientes trasplantados es importante mantener un adecuado nivel de inmunosupresión en estos pacientes que a día de hoy no se ha conseguido con las herramientas disponibles. **IMMUKNOW** surge como herramienta para cuantificar de manera objetiva la respuesta inmune y tratar de mejorar el control del estado inmunosupresor de los pacientes.

Se pretende determinar la **correlación** entre el grado de inmunosupresión y niveles de ATP de los linfocitos T CD4 medidos por ImmuKnow en pacientes trasplantados hepáticos. También conocer si ImmuKnow es capaz de identificar pacientes **en riesgo de infección** y si existe **mejoría analítica** a los 6 meses.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio **RETROSPECTIVO, OBSERVACIONAL** con 119 pacientes trasplantados hepáticos a los que se realizó ImmuKnow desde 2014 hasta 2018 del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. Variables:

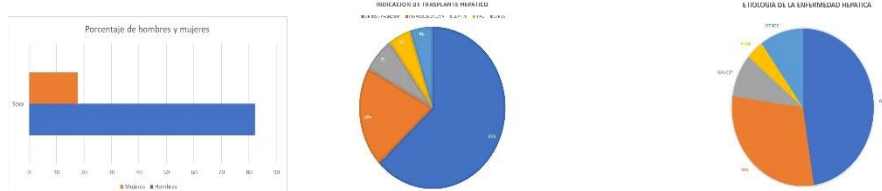


Se llevó a cabo un análisis de variables descriptivas y comparación de medias con T de student, prueba de chi-cuadrado. Se analizó grado de correlación con el coeficiente de correlación Rho de Spearman.

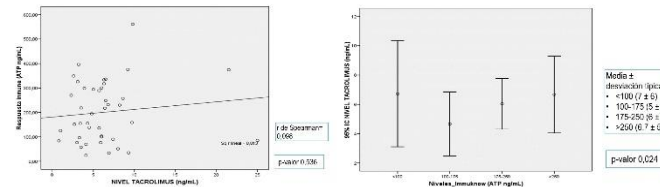
Interpretación de resultados: IBM SPSS Statistics

RESULTADOS:

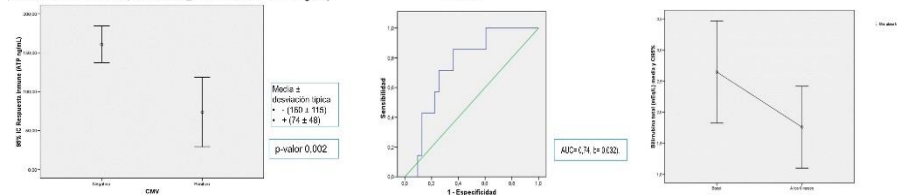
- **Variables demográficas:** se recogieron un total de 119 pacientes de los cuales **18 fueron excluidos** por no ser finalmente trasplantados. De los 101 pacientes incluidos, el **82,2 % eran hombres** siendo la **edad media** fue de **55,30 ± 11,04**. La **INDICACIÓN** de trasplante y **CAUSA** de enfermedad hepática más frecuente fueron, respectivamente, la **cirrosis avanzada** y el **alcohol**.



- **Correlación niveles inmunosupresor-ImmuKnow:** No se encontró correlación entre niveles de tacrolimus en sangre y niveles de ImmuKnow.



- **Relación con infección por CMV:** Si se ha demostrado una relación significativa entre los resultados obtenidos con el test y la infección por citomegalovirus, especialmente con valor por debajo de 175 ng/ml. Estos pacientes tuvieron un nivel de ImmuKnow más bajo comparado con los pacientes no infectados (**73,9 ± 48 ng/ml vs 160,5 ± 115,5 ng/ml**).
- **Variación analítica a los 6 meses:** Hubo una reducción significativa en los niveles de bilirrubina total y en la cifra de monocitos ($p < 0,05$).



CONCLUSIONES:

- No se encontró correlación entre niveles de tacrolimus y niveles de ImmuKnow en sangre.
- Parece que ImmuKnow es útil para valorar pacientes en riesgo de infección por CMV posttrasplante hepático.
- Decisiones tomadas a partir de ImmuKnow pueden resultar en una mejoría analítica de los pacientes.
- Es posible que las decisiones tomadas con el resultado del test modifiquen la actuación terapéutica de los especialistas en el trasplante hepático

BIBLIOGRAFÍA

- Chong RT, Dierbach JL. Transplante hepático. In: J. Linn-Jameson AG, F. J. SUNDLICH, L. Harrison. Principios de Medicina interna. 10a. McGraw Hill, Agosto 2018.
- Ponsio E. IMMUNOPRESSOR-CMV. ImmuKnow es un diagnóstico útil for predicting infection and acute rejection in adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. [BMC]. Liver Transpl. 2015;21(2):234-241. doi: 10.1002/liv.1247
- Qi W, ZHANG L, ZHANG C. Correla on Between Immunosuppressive Therapy and CMV T Cell Involvement Associated Transplant Level in Liver Transplant Recipients. [Chin J]. Transplant Proc. 2014 Jul-Aug; 46(8):2364-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.05.047.