

TESIS DOCTORAL

**DIAGNOSTICO NO INVASIVO DE LA ENFERMEDAD  
VASCULAR DEL INJERTO EN RECEPTORES DE UN  
TRASPLANTE CARDIACO**

**Sonia Mirabet Pérez**

Bajo la dirección de los doctores

**Eulàlia Roig Minguell**

**Joan Cinca Cuscollola**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

**FACULTAD DE MEDICINA**

Barcelona, 2015



*A Oscar, Maria, Marc*

*A ti mamá y a ti papá*



# **AGRADECIMIENTOS**



# AGRADECIMIENTOS

Gracias especialmente a Eulàlia Roig. Sin su motivación, su colaboración, su generosidad, sus enseñanzas, su dedicación, su confianza y su ayuda este proyecto no hubiera sido posible.

Al Dr. Joan Cinca gracias por el interés, la dedicación y el apoyo que he recibido.

A Marta Campreciós y Vicens Brossa, gracias por acogerme e introducirme en el mundo del trasplante, por todo lo que me han enseñado y por los años que hemos trabajado juntos.

A Andreu Farrero por su ayuda inestimable y su imprescindible colaboración en el análisis estadístico.

A la Dra. Gelpí y a Cristina Roldán, por su colaboración en los estudios inmunológicos.

Al Dr. Ordóñez –Llanos, a Pablo Garcia de Frutos, a Rosa Bonet y a Margarida Grau, por su asesoramiento y colaboración en el análisis de los biomarcadores.

Al Servicio de Cardiología, médicos, enfermeras, auxiliares y administrativos. En particular a mis compañeros de la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y de Trasplante por su colaboración y sus continuos ánimos y a las Unidades de Imagen y de Hemodinámica.

A todo el equipo de Cirugía Cardíaca y de Anestesia.

A mi familia y mis amigos que me han acompañado en los buenos y malos momentos.

A ti mamá por tu perseverancia y tu entrega. A ti papá por enseñarme a disfrutar viviendo.

A ti Maribel por tu sinceridad, tu honestidad y tu bondad.

A Maria y Marc por alegrar todos y cada uno de los días de mi vida. A Oscar por acompañarme en todas las aventuras con amor, paciencia y comprensión.



# INDICE



# INDICE

Resumen.....	18
Abreviaturas .....	22
<b>1.INTRODUCCION .....</b>	<b>26</b>
1. Generalidades.....	26
2. Fisiopatología de la enfermedad vascular del injerto .....	32
2.1. Papel de la disfunción endotelial en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto.....	33
2.2. Mecanismos inmunológicos implicados en la fisiopatología de la enfermedad vascular del injerto.....	38
2.2.1. Papel de la inmunidad celular en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto.....	39
2.2.2. Papel de la inmunidad mediada por anticuerpos en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto.....	45
2.2.3. Papel de la autoinmunidad en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto.....	47
2.3. Mecanismos no inmunológicos implicados en la fisiopatología de la enfermedad vascular del injerto.....	48
2.3.1. Citomegalovirus.....	48
2.3.2. Factores de riesgo cardiovascular clásicos.....	49
2.3.3. Otros factores no inmunológicos implicados en la fisiopatología de la enfermedad vascular del injerto.....	51

3.	Diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto.....	54
3.1	Técnicas no invasivas.....	54
3.1.1	Ecocardiograma de estrés.....	54
3.1.2	Estudio de perfusión miocárdica.....	55
3.1.3	Cardioresonancia magnética .....	56
3.1.4	Tomografía axial computarizada de las arterias coronarias .....	57
3.2	Técnicas invasivas .....	58
3.2.1	Coronariografía .....	58
3.2.2	Ecografía intracoronaria (IVUs).....	60
4.	Biomarcadores séricos en el diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto.....	64
4.1	Forma soluble del receptor de la Tirocinasa (sAxI) .....	68
4.2	GAS6.....	71
4.3	Lipoproteína fosfolipasa A2 (Lp-PLA2).....	72
4.4	GDF-15 .....	74
4.5	Troponina ultrasensible (cTnT-hs).....	75
5.	Tratamiento de la enfermedad vascular del injerto.....	77
6.	Prevención de la enfermedad vascular del injerto.....	79
6.1	Control de los factores de riesgo cardiovascular clásicos.....	79
6.2	Tratamiento y prevención de citomegalovirus.....	80
6.3	Papel del tratamiento inmunosupresor en la prevención de la EVI..	81
	<b>2-HIPOTESIS.....</b>	<b>86</b>
	<b>3- OBJETIVOS .....</b>	<b>90</b>
1.	Objetivo principal.....	90
2.	Objetivos secundarios.....	90

4-MATERIAL Y METODOS.....	94
4.1 Diseño del estudio.....	94
4.2 Población del estudio.....	94
4.3 Variables del estudio .....	97
4.3.1 Variables clínicas.....	97
4.3.2 Variables angiográficas.....	101
4.3.3 Biomarcadores	
4.3.3.1 Biomarcadores no inmunológicos .....	102
4.3.3.2 Poblaciones linfocitarias.....	103
4.4 Análisis estadístico.....	105
5- RESULTADOS.....	110
5.1 Análisis descriptivo.....	110
5.2 Análisis comparativo de la enfermedad vascular del injerto en el grupo a estudio.....	113
5.2.1 Enfermedad vascular del injerto, porcentaje de rechazo, infección por CMV.....	116
5.2.2 Enfermedad vascular del injerto y factores de riesgo Cardiovascular.....	119
5.2.3 Enfermedad vascular del injerto y tratamiento inmunosupresor.....	120
5.3 Biomarcadores y asociación con la presencia de EVI .....	122
5.3.1 Asociación de los biomarcadores sAXL, GAS6, Lp-PLA2,GDF-15 cTnT-hs con la presencia de EVI.....	123
5.3.2 Análisis de las poblaciones linfocitarias y su utilidad en la Identificación de EVI .....	128
5.4 Papel de los biomarcadores como predictores de eventos clínicos.....	131
5.5 Asociación de los biomarcadores con la presencia de eventos en los pacientes con EVI moderada-severa.....	133

## 6- DISCUSION

6.1 Discusión de las características clínicas.....	139
6.2 Discusión sobre las exploraciones diagnósticas en la enfermedad vascular del injerto.....	143
6.2.1 Angiografía invasiva o TAC de arterias coronarias.....	143
6.2.2 Biomarcadores no inmunológicos.....	144
6.2.3 Biomarcadores inmunológicos.....	146
6.3 Implicaciones clínicas de los biomarcadores.....	147
6.3.1 En el diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto.....	147
6.3.2 En la predicción de eventos.....	148
6.4 Limitaciones del estudio.....	149

## 7- CONCLUSIONES..... 154

## 8- BIBLIOGRAFIA ..... 160





# RESUMEN

La enfermedad vascular del injerto (EVI) es junto con las neoplasias uno de los principales factores limitantes de supervivencia a partir del primer año del trasplante cardíaco. Consiste en la afectación de los vasos de los corazones implantados, incluyendo arterias, venas y microcirculación. Se caracteriza desde el punto de vista histológico por una hiperplasia de la íntima con proliferación de células musculares lisas, depósito de proteoglicanos, matriz extracelular y fibrosis, que lleva a la obliteración progresiva de la luz vascular. Aunque la etiología de la EVI no es del todo bien conocida, se cree que la base de la enfermedad está en la disfunción endotelial causada por diferentes mecanismos inmunológicos y no inmunológicos.

La denervación de los corazones implantados condiciona que la EVI sea un fenómeno habitualmente silente y que las manifestaciones clínicas aparezcan en estadios avanzados de la enfermedad. El diagnóstico se realiza generalmente con coronariografía y últimamente disponemos del TAC de arterias coronarias. Ambos procedimientos no pueden realizarse de forma repetitiva debido a la morbilidad asociada.

Las opciones de tratamiento son limitadas. Si bien algunos inmunosupresores han demostrado ser eficaces en retrasar la aparición de EVI si se administran en los primeros meses tras el trasplante, el tratamiento farmacológico no ha mostrado ser útil en evitar la progresión de la EVI establecida; la revascularización quirúrgica a menudo no es técnicamente factible y los procedimientos de revascularización percutáneos no han demostrado hasta la actualidad impacto sobre la supervivencia. La única opción terapéutica definitiva es el retrasplante, cuya indicación se lleva a cabo de manera

excepcional y en casos muy seleccionados. Teniendo en cuenta las limitaciones terapéuticas cuando la enfermedad está evolucionada sería fundamental prevenir su aparición y realizar un diagnóstico precoz.

El objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad de los biomarcadores sAXI, GAS6, Lp-PLA2, GDF-15, c-TnT-hs y del cociente Th1/Treg en el diagnóstico de la EVI y en la predicción de eventos clínicos en un grupo de 96 pacientes trasplantados de corazón. La determinación de los biomarcadores se realizó en un margen de 6 meses respecto la coronariografía o TAC de coronarias programado de acuerdo con el protocolo asistencial de nuestro centro.

Los resultados muestran que la determinación de cTnT-hs y sAXL es útil en la detección de vasculopatía del injerto, siendo cTnT-hs el biomarcador con mayor poder predictivo independiente. El cociente Th1/Treg es el marcador que presenta mayor sensibilidad en el diagnóstico de EVI. Los niveles de cTnT-hs y sAXL se han asociado de manera independiente a mayor riesgo de eventos clínicos en pacientes receptores de trasplante cardíaco y las concentraciones de cTnT-hs son además predictoras de eventos clínicos en pacientes con EVI moderada-severa. Los biomarcadores GAS6, Lp-PLA2 y GDF-15 no han mostrado ser de utilidad en la detección de la EVI.

En consecuencia la determinación de las concentraciones de cTnT-hs y del cociente de poblaciones linfocitarias Th1/Treg en el seguimiento de los receptores de trasplante cardíaco podría plantearse como alternativa no invasiva en el diagnóstico de la vasculopatía del injerto.





# ABREVIATURAS

EVI : enfermedad vascular del injerto

ISHLT : Sociedad Internacional de Trasplante de corazón y pulmón

CAV: cardiac allograft vasculopathy (enfermedad vascular del injerto)

HLA: antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad

AMR: rechazo mediado por anticuerpos

TAC: tomografía axial computerizada

IVUs: intravascular ultrasound (ecografía intracoronaria)

CardioRM: cardio resonancia magnética

BEM: biopsia endomiocárdica

PCR: técnica de reacción en cadena de la polimerasa

CMV: citomegalovirus

TAM: familia de receptores de la tirosin kinasa

sAXL: forma soluble del receptor de la tirosin kinasa AXL

GAS6: growth-arrest specific gene 6

GDF-15: growth differentiation factor 15

cTnT-hs : troponinas ultrasensibles cardíacas



# **INTRODUCCION**



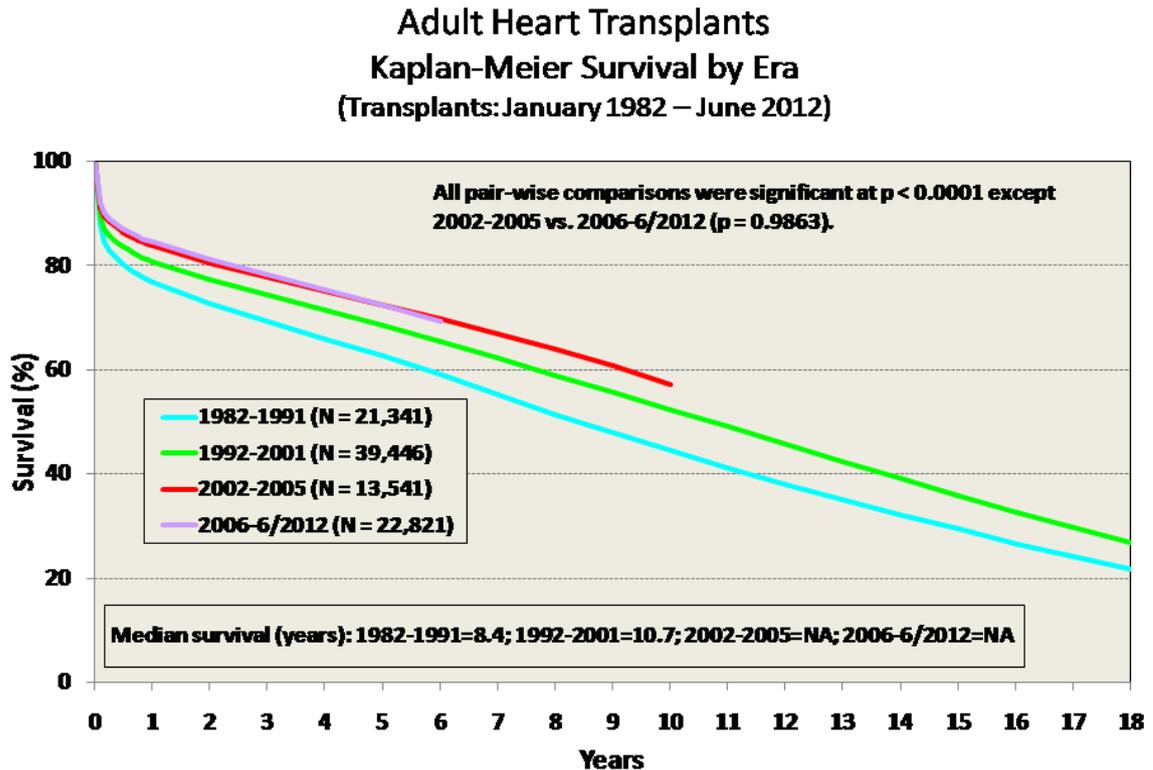
# INTRODUCCIÓN

## 1. GENERALIDADES

El trasplante cardíaco continúa siendo hoy en día, el tratamiento de elección para un grupo seleccionado de pacientes con insuficiencia cardíaca refractaria. Desde el primer trasplante cardíaco en 1967 hasta junio del 2013 se han realizado en todo el mundo 116.104 procedimientos, en receptores de todas las edades, según los datos publicados en el último Registro Internacional de Trasplante Cardíaco <sup>1</sup>, incluyendo 104.027 trasplantes en pacientes adultos. En España desde mayo de 1984 hasta diciembre del 2013, se han llevado a cabo 6.632 trasplantes en receptores de 16 o más años de edad <sup>2</sup>.

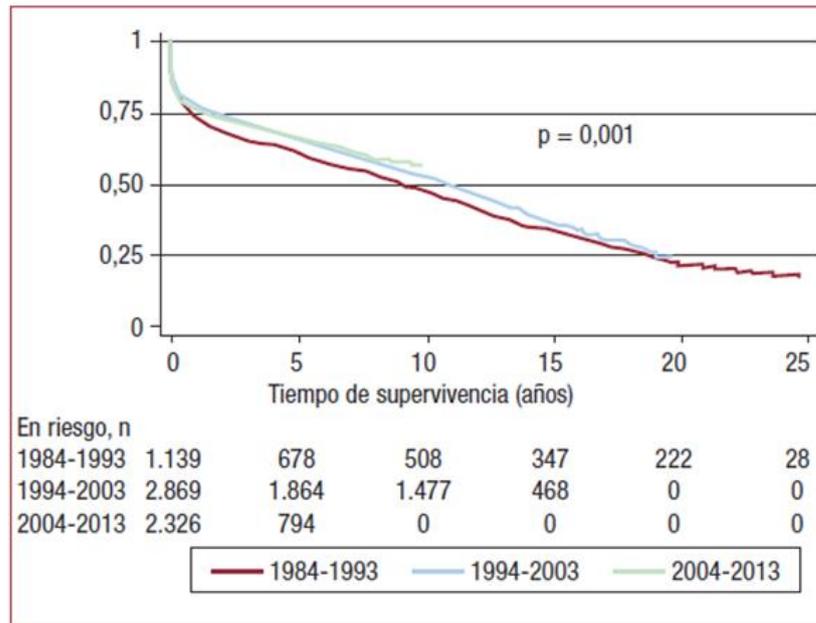
A lo largo de los años, la supervivencia de los pacientes trasplantados de corazón ha ido mejorando de manera significativa, consolidando el trasplante como la mejor opción de tratamiento en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada. Los progresos en la inmunosupresión han permitido un buen control del rechazo agudo. La incidencia actual de rechazo agudo significativo, definido como aquel con necesidad de tratamiento, es del 13% en el primer año según los datos del último registro de la ISHLT (Sociedad Internacional de Trasplante de corazón y pulmón)<sup>1</sup>, lo que representa un descenso significativo respecto al 23 % publicado hace 10 años. La baja incidencia de rechazo, junto con un mayor control de las infecciones, permite que en la actualidad la supervivencia al año del trasplante cardíaco sea del 85%.

Sin embargo, no ocurre lo mismo con la supervivencia a largo plazo. Los datos del Registro Internacional no muestran una mejoría significativa de la supervivencia más allá del año del trasplante en la última década, como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Supervivencia media por períodos en pacientes adultos receptores de Trasplante cardíaco. Datos del Registro Internacional de Trasplante Cardíaco. La supervivencia a corto plazo de los receptores de trasplante cardíaco ha aumentando comparando la década de los años 80 con la década de los 90. La supervivencia al año de la cohorte más reciente de pacientes trasplantados entre 2006 y 2012 es similar a la de los pacientes trasplantados entre 2002 y 2005. Asimismo, comparando las dos últimas cohortes de pacientes receptores de trasplante cardíaco tampoco se observa mejoría de la supervivencia a largo plazo. Tomado de J Heart Lung Transpl 2014;33:996-1008

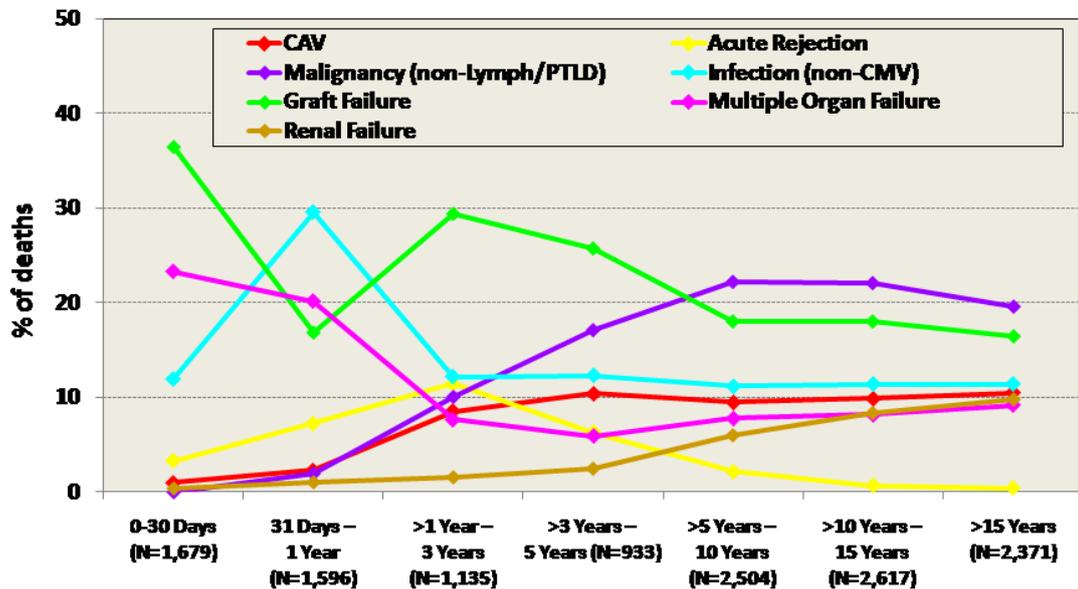
Los datos del Registro Nacional de Trasplante, como se recoge en la figura 2, parecen mostrar una tendencia hacia una mayor supervivencia a partir del octavo año de trasplante en los pacientes tratados entre los años 2004-2013 respecto a la década anterior aunque no alcanza significación estadística.



**Figura 2:** Curvas de supervivencia para los decenios 1984-1993, 1994-2003 y 2004-2013 del Registro Nacional de Trasplante Cardíaco. Se aprecian diferencias significativas ( $p = 0,001$ ) entre la supervivencia en el periodo 1984-1993 y las de 1994-2003 y 2004-2013 durante el primer año postrasplante. Las curvas de supervivencia a partir del primer año postrasplante son prácticamente paralelas entre todos los periodos. Parece haber una tendencia a mejor supervivencia a partir del octavo año de seguimiento en la cohorte 2004-2013 comparada con la cohorte previa, aunque sin alcanzar significación estadística. Tomado de Rev Esp Cardiol Supl. 2015;15 (B):31-42

Si bien la disfunción del injerto y las infecciones son las principales causas de mortalidad a lo largo del primer año de seguimiento en los receptores de un trasplante cardíaco, las neoplasias y la enfermedad vascular del injerto (EVI) son los principales limitantes de la supervivencia a largo plazo, como se observa en la figura 3.

### Adult Heart Transplants Relative Incidence of Leading Causes of Death (Deaths: January 2006 – June 2013)



**Figura 3:** Incidencia relativa de las causas de muerte por periodo de seguimiento tras el trasplante cardíaco. Datos del Registro Internacional de Trasplante. Las principales causas de muerte son la disfunción del injerto, el fallo multiórgánico y las infecciones, particularmente en los primeros años de seguimiento tras el trasplante. A partir del primer año postrasplante adquieren protagonismo las neoplasias y la enfermedad del injerto como principales responsables de mortalidad. Tomado de J Heart Lung Transpl 2014;33:996-1008

La prevalencia de EVI según los datos del último Registro Internacional<sup>1</sup> de trasplante es del 8 % al año, del 30 % a los 5 años y del 50 % a los 10 años. Su aparición conlleva peor pronóstico y aumenta de manera significativa la mortalidad a largo plazo. La detección de EVI precoz, en el primer año tras el trasplante, es un factor independiente de mortalidad a 5 años en los receptores de un trasplante cardíaco<sup>5</sup>.

La enfermedad vascular del injerto se caracteriza por la afectación de los vasos coronarios de los corazones implantados, incluyendo las arterias epicárdicas, las venas y la microcirculación. Desde el punto de vista histológico, como se aprecia en la figura 4, consiste en una hiperplasia concéntrica de la íntima por proliferación de las células musculares lisas, depósito de proteoglicanos, macrófagos, matriz extracelular y fibrosis, que lleva a la obliteración progresiva de la luz de los vasos afectados.

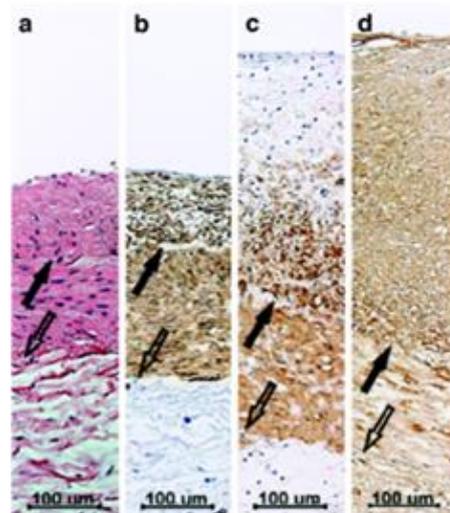
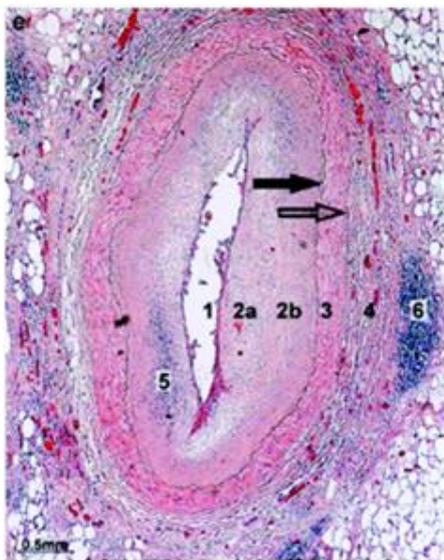


Figura 4A

Figura 4B

**Figura 4** 4A: Corte transversal de una arteria coronaria con enfermedad vascular del injerto. El estudio histológico identifica las siguientes capas: 1: endotelio; 2: neointima dividida en dos partes (segmento 2a en el que no hay células musculares lisas y encontramos un acúmulo de células mononucleares y el segmento 2b en el que sí están presentes células musculares lisas); 3: túnica media; 4: adventicia; 6: acumulación de células mononucleares en la pared del vaso. Figura 4B: estudio comparativo de una sección de la pared arterial entre una arteria coronaria sana (a y b) y una arteria coronaria de un paciente trasplantado con vasculopatía del injerto (c y d) en la que se aprecia la hiperplasia intimal. *Circulation* 2006;114:1599-1607

Aunque la vasculopatía del injerto en ciertos aspectos podría simular una aterosclerosis acelerada, presenta ciertas características diferenciales respecto a la misma<sup>3,4</sup>: a)afecta tanto a las arterias coronarias epicárdicas como a la micorcirculación; b)no tiene predilección por los segmentos proximales, sino que la lesión se asienta a lo largo de toda la longitud del vaso, provocando un estrechamiento concéntrico y difuso de los vasos coronarios, c)las lesiones focales, aunque a veces presentes, son menos características que en la aterosclerosis convencional.

## 2- FISIOPATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD VASCULAR DEL INJERTO

Si bien gran parte de los mecanismos implicados en el desarrollo de la EVI son desconocidos, se cree que el origen de la enfermedad estaría en la disfunción del endotelio de los vasos del órgano implantado<sup>6,7,8</sup>. Diferentes factores inmunológicos y no inmunológicos<sup>9,10,11</sup>, a través de la lesión endotelial llevarían a la aparición de las lesiones coronarias como se muestra en la figura 5.

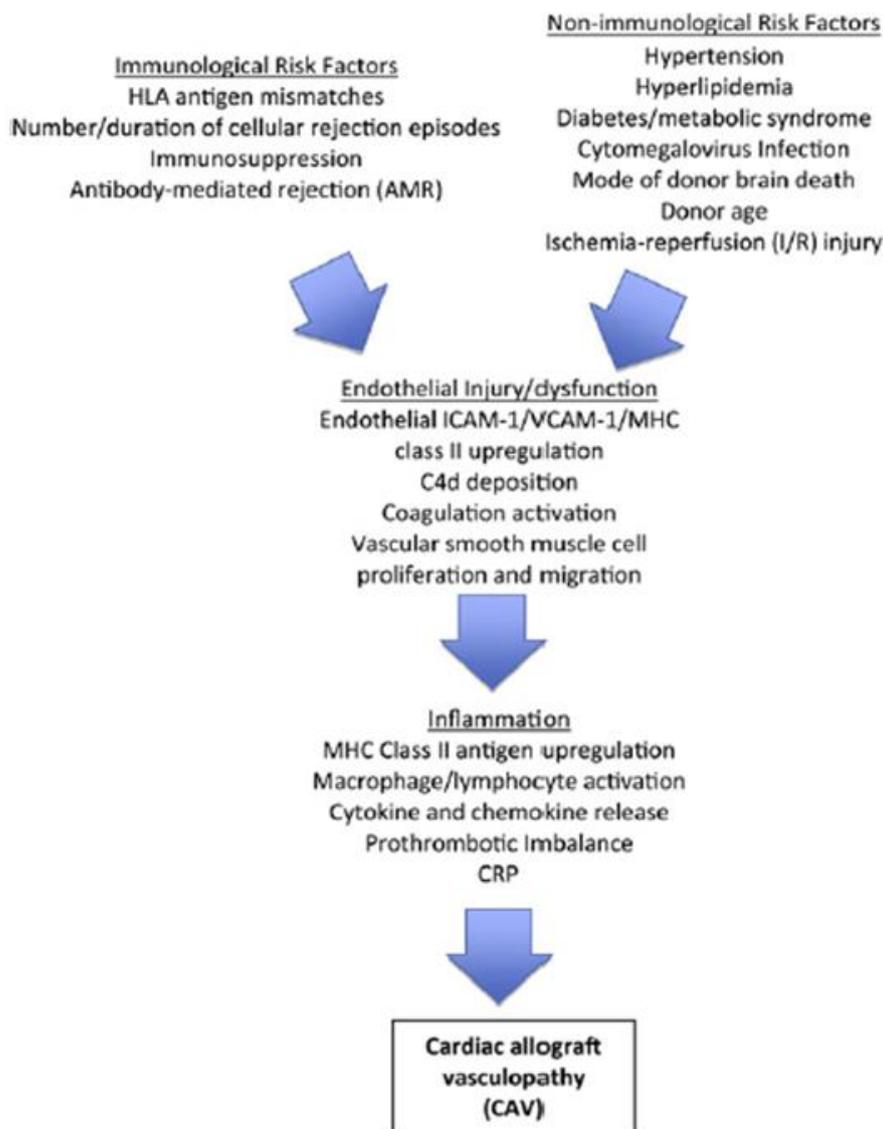
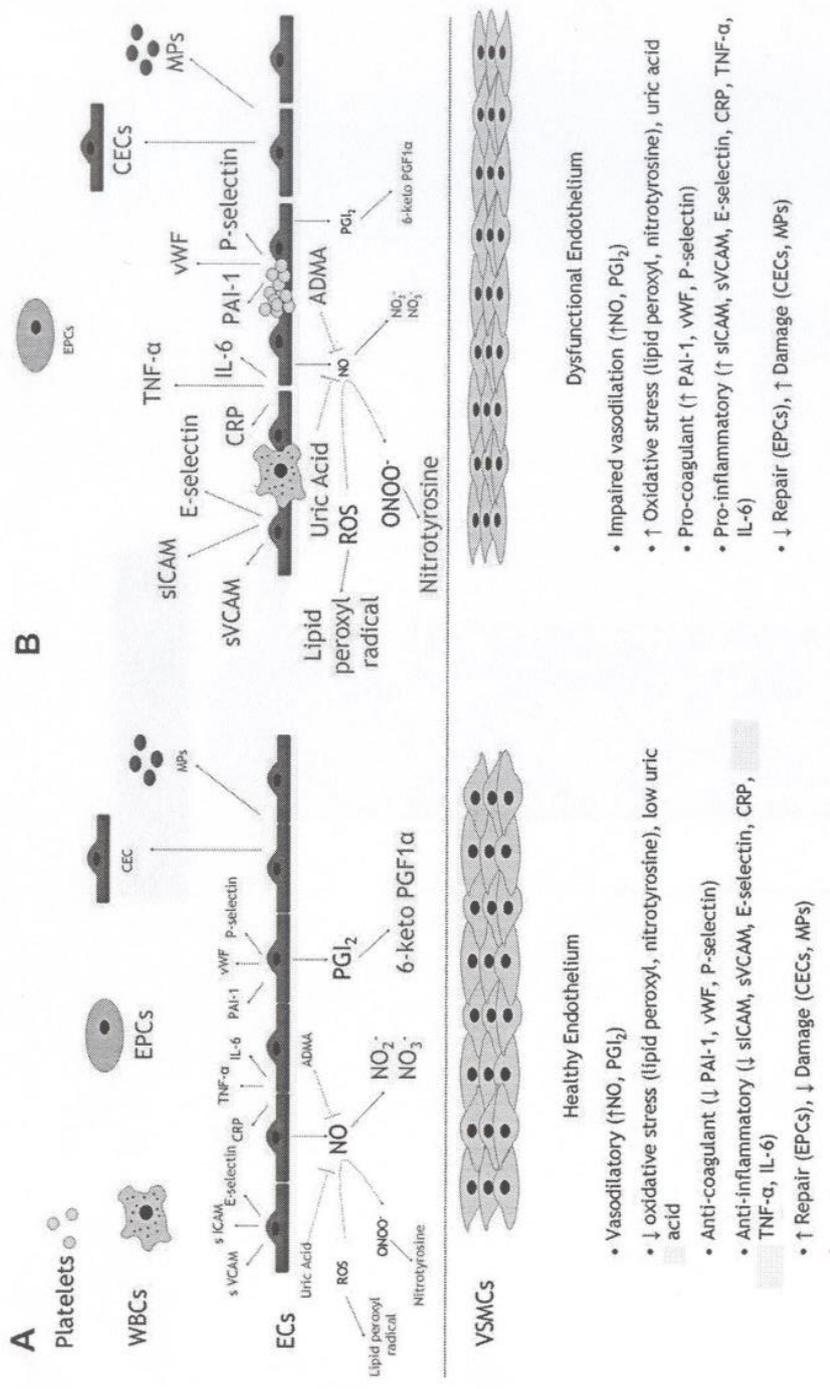


Figura 5: Esquema de los mecanismos implicados en el desarrollo EVI. Tomado de Translational Research 2012;159:238–251

## **2.1 Papel de la disfunción endotelial en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto**

Es conocido que la alteración de la función endotelial, presente en pacientes con factores de riesgo cardiovascular, insuficiencia renal y otras entidades, precede a la aparición de las lesiones ateroscleróticas. El endotelio no sólo ejerce de barrera protectora entre los tejidos y el torrente sanguíneo, sino que también es un órgano con funciones paracrinas y autocrinas que responde tanto a alteraciones hemodinámicas como a estímulos químicos. Juega un papel fundamental en la regulación del tono vasomotor, en la adhesión de diferentes células entre ellas linfocitos T y monocitos, en la migración de las células musculares lisas y en la resistencia a la trombosis. En consecuencia, en condiciones normales el endotelio mantiene una función vasodilatadora, anticoagulante y antiinflamatoria<sup>12</sup>. El término disfunción endotelial, o más bien activación endotelial, hace referencia a una alteración caracterizada por la pérdida de las funciones reguladoras, en la que los factores inflamatorios promueven la activación de monocitos y la adhesión de las células T, la formación de células espumosas, la síntesis de colágeno y proteoglicanos, la proliferación y migración de células musculares lisas vasculares, la vasoconstricción y la trombosis como se esquematiza en la figura 6. Estas alteraciones morfológicas y funcionales conducen a la formación de la placa aterosclerótica.



**Figura 6.6.A.** Funciones del endotelio en condiciones normales y moléculas implicadas en el mantenimiento de la actividad vasodilatadora, anticoagulante, antitrombótica. 6.B. Alteraciones en el endotelio disfuncionante con incremento de la expresión de moléculas inflamatorias y procoagulantes y pérdida del tono vasomotor que conducen a un estado de vasoconstricción, proinflamatorio y protrombótico. Tomado de J Am Soc Hypertns 2012;6(2):85-99.

La alteración de la permeabilidad vascular es uno de los mecanismos que caracteriza el inicio del proceso de la disfunción endotelial. La pérdida de la capacidad del endotelio para controlar el tráfico de determinadas moléculas hacia el interior de la pared permite el depósito de moléculas circulantes, como el fibrinógeno y las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El endotelio disfuncionante, además, expresa proteínas de membrana (E-selectina, P-selectina, VCAM-1- molécula de adhesión vascular-, ICAM 1-2-3- molécula de adhesión intercelular- ) que actúan como moléculas de adhesión para receptores específicos de monocitos y linfocitos T<sup>12,13,14,15</sup>. Una vez adheridas al endotelio los monocitos y linfocitos T son activados produciendo diferentes citocinas implicadas en la estimulación de la elaboración de matriz extracelular (colágeno y proteoglicanos) y en la migración de las células musculares lisas hacia la intima. El resultado final de la activación endotelial es la formación de una placa aterosclerótica.

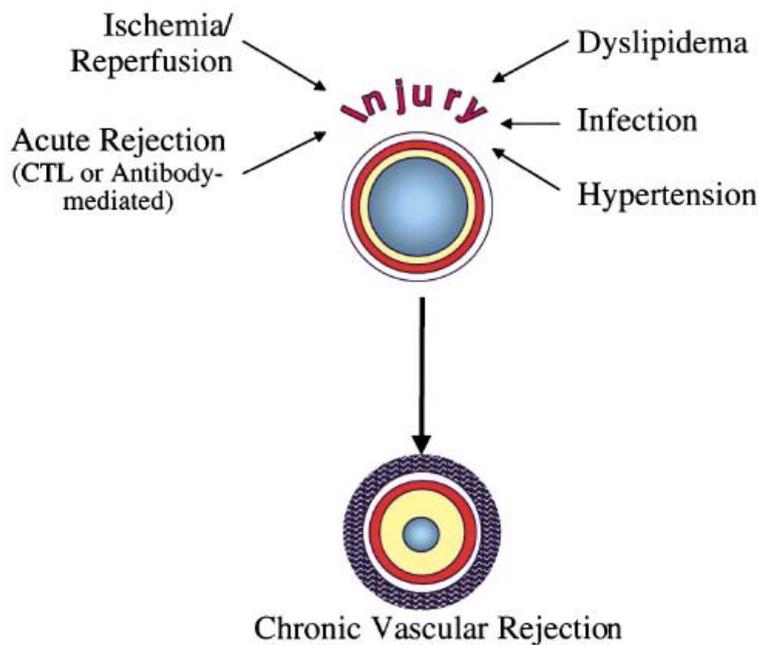
Otra de las características que acompaña a la disfunción endotelial es la alteración del tono vasomotor. En condiciones normales las células endoteliales sintetizan y liberan óxido nítrico y PGI<sub>2</sub>, que difunde hacia las células musculares lisas originando la relajación de las mismas y en consecuencia la vasodilatación arterial<sup>12,13,14,15</sup>. La disfunción endotelial altera la producción de dichas moléculas lo que predispone a la vasoconstricción.

Asimismo el endotelio normofuncionante tiene una actividad antitrombótica y anticoagulante, gracias a la producción del activador tisular del plasminógeno<sup>12,15</sup>. Sin embargo, el endotelio también puede elaborar sustancias procoagulantes y protrombóticas como el factor von Willebrand, molécula de adhesión plaquetar<sup>12</sup>. En el

endotelio disfuncionante hay un desequilibrio entre estas actividades a favor de un estado protrombótico.

En condiciones normales, las células endoteliales tienen un índice de recambio muy bajo, que aumenta en las zonas más propensas a la aparición lesiones, donde también se detectan un mayor número de células en proceso de apoptosis<sup>14,15</sup>. Esta observación sugiere que la apoptosis de las células endoteliales debe estar relacionada con el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas.

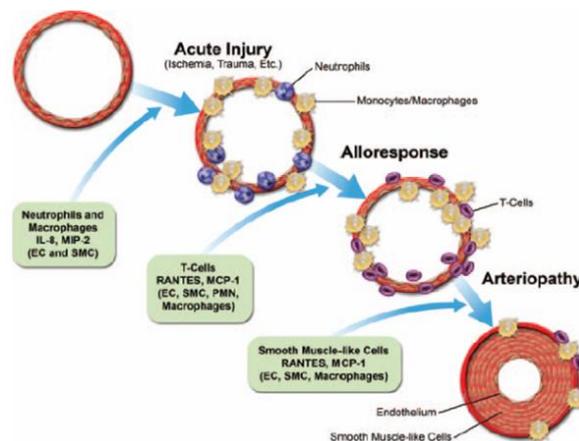
La enfermedad vascular del injerto sería el resultado del daño endotelial acumulado, ocasionado tanto por mecanismos inmunológicos como no inmunológicos<sup>4,9,10</sup>. El daño endotelial facilitaría la proliferación y migración de células musculares lisas desde la capa media de la pared vascular y la síntesis de matriz extracelular, responsables del engrosamiento progresivo de la íntima. Las células mononucleares y macrófagos que atraviesan el endotelio gracias al aumento de la permeabilidad por la activación de los mecanismos de inflamación, también se acumularían en esta nueva “neointima”. Estos cambios estructurales, que se muestran en la figura 7, provocan una disminución progresiva del calibre de la luz arterial, que condiciona isquemia miocárdica y lleva a la disfunción del injerto<sup>11</sup>.



**Figura 7:** Esquema de los cambios estructurales en los vasos coronarios en la EVI. Diferentes mecanismos inmunológicos y no inmunológicos lesionan el endotelio. Como consecuencia de la disfunción endotelial se produce la migración y proliferación de células musculares lisas desde la media (de color rojo), la síntesis y depósito de matriz extracelular y el paso de células mononucleares y macrófagos a la íntima (de color amarillo). Esta hiperplasia intimal lleva a una disminución progresiva del calibre de la luz arterial (en azul). Además los mecanismos inflamatorios e inmunológicos activados pueden ocasionar un engrosamiento de la adventicia responsable del remodelado constrictivo que también existe en la EVI. Tomada de Libby P, Pober J. *Immunity* 2001;14:387-397

## 2.2) Mecanismos inmunológicos implicados en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto

A lo largo de los años está adquiriendo cada vez mayor consistencia la base inmunológica de la enfermedad vascular del injerto <sup>16,17,18</sup>. La inmunorespuesta del huésped, en la que están implicados las células T, B y macrófagos, se postula como una de las principales causas de la disfunción endotelial del injerto. El reconocimiento de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y de determinados antígenos, conduce a la activación de las células T responsables de la respuesta citotóxica, como se muestra en la figura 8. El desarrollo de anticuerpos dirigidos contra determinadas moléculas del donante también se ha implicado en el desarrollo de EVI. Esta respuesta inmunológica en el receptor, ya sea a través de la activación linfocitaria o mediante anticuerpos antiHLA y no antiHLA puede dañar el endotelio mediante la fijación del complemento o promoviendo respuestas proinflamatorias a través de la activación de señales de transducción <sup>19</sup>.



**Figura 8.** Participación del sistema inmunológico en el desarrollo de EVI. Diferentes citocinas facilitan el reclutamiento de células implicadas en la inmunidad innata, de linfocitos T aloespecíficos y de células musculares lisas. Tomado de Mitchell, Libby. *Circ Research* 2007;100: 970.

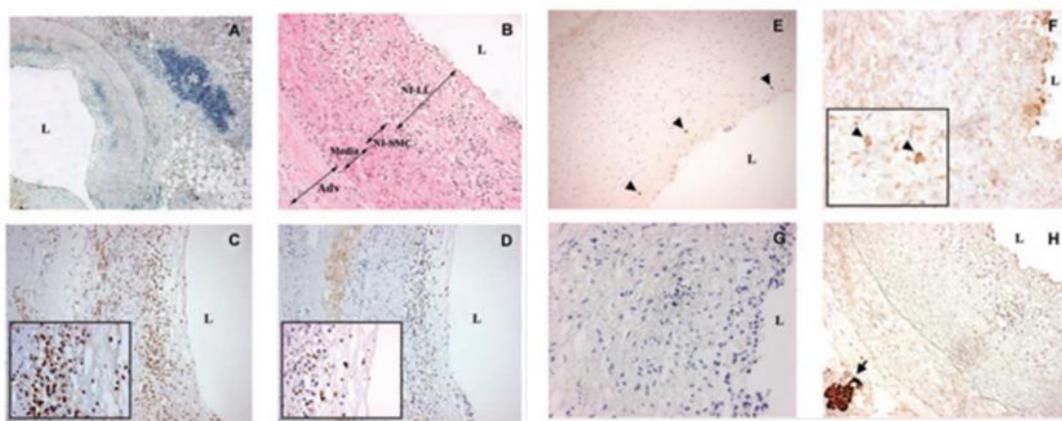
### **2.2.1 Papel de la inmunidad celular en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto**

A comienzos de los años 2000, varios estudios<sup>20,21</sup> realizados en modelos animales mostraron que la respuesta de linfocitos T juega un papel relevante en el desarrollo de vasculopatía en el injerto. Una vez activados los linfocitos T CD4+ se diferencian en Th1 o Th2, que expresan distintos receptores y liberan diferentes citocinas. Los linfocitos T, ya sea a través de las citocinas inflamatorias, entre ellas IL-2 e IFNgamma y de la activación de mecanismos de adhesión celular, contribuirían a la lesión endotelial y al desarrollo progresivo de la afectación vascular. Estudios experimentales<sup>22,23</sup> han mostrado que el IFNgamma juega un papel fundamental en el reclutamiento y migración de células mononucleares inflamatorias de la luz arterial a la neointima.

Methe y colaboradores<sup>24</sup> evaluaron en pacientes trasplantados de corazón la correlación entre distintas poblaciones de linfocitos T en sangre periférica con el desarrollo de disfunción endotelial como marcador precoz de EVI. En este estudio únicamente el incremento de células Th1 (CD3+IFNgamma+) y no de células Th2 se correlacionó con disfunción endotelial. Según estos autores los linfocitos T liberarían IFNgamma provocando la activación de macrófagos y produciendo factores de crecimiento que contribuirían a la proliferación de células neointimales, con el consiguiente desarrollo de lesiones obstructivas coronarias.

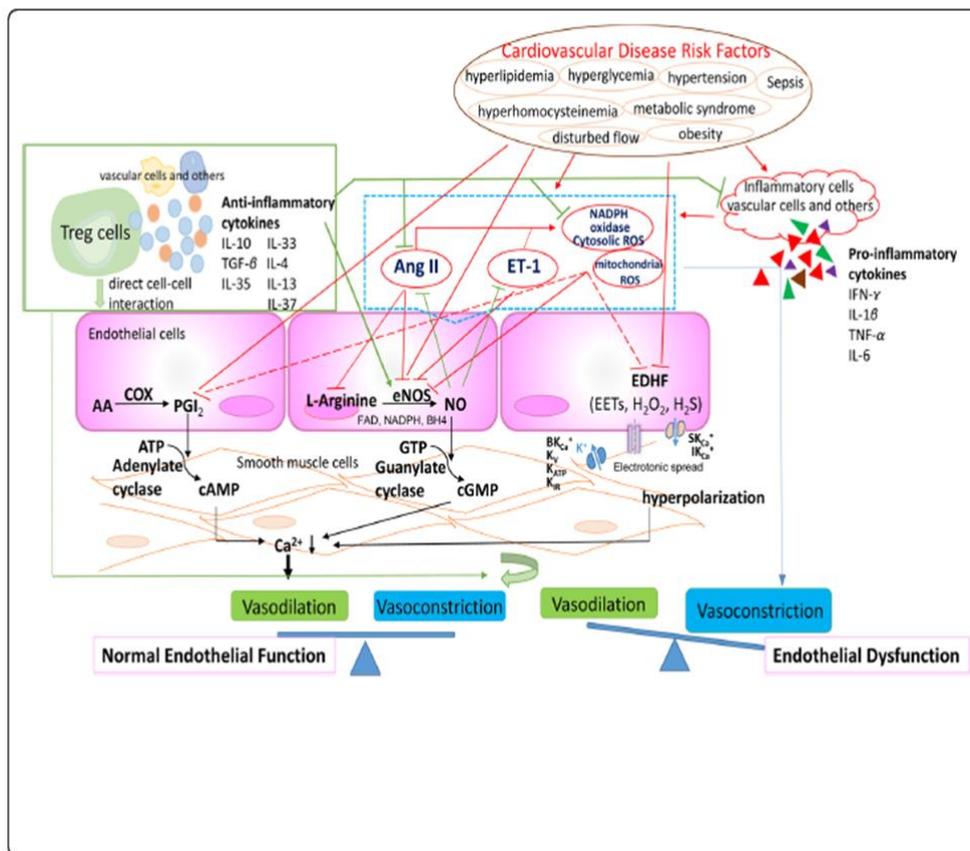
Cada vez está adquiriendo una mayor relevancia el análisis de mecanismos inmunoreguladores basados en el equilibrio entre las poblaciones linfocitarias efectoras (Th1 y Th17) y las poblaciones de linfocitos T reguladoras. Varios trabajos<sup>22,25-27</sup> apoyan la participación desigual de las diferentes poblaciones linfocitarias en el desarrollo de la EVI.

El estudio de piezas histológicas de arterias coronarias procedentes de autopsias de pacientes trasplantados de corazón, ha mostrado<sup>22</sup> que el infiltrado predominante en los pacientes con EVI es de linfocitos Th1. Como se aprecia en la figura 9 esta población de linfocitos se localiza fundamentalmente a nivel de la neointima y de la adventicia. Los mismos autores no encontraron prácticamente expresión de linfocitos T reguladores ni de Il-10 en las muestras histológicas de coronarias de pacientes con EVI, lo que les lleva a postular la participación e implicación desigual de las diferentes poblaciones linfocitarias en el desarrollo de la vasculopatía del injerto, con un papel predominante de los linfocitos Th1 en el desarrollo de la EVI.



**Figura 9:** Estudios histológicos de coronarias de autopsias de pacientes trasplantados de corazón con CAV. En la imagen A se aprecia el infiltrado de mononucleares extravascular; imagen B tinción de hematoxilina eosina donde se aprecia la pérdida de tejido conectivo de la íntima con infiltración de mononucleares, la neointima con células musculares lisas al igual que en la media y la adventicia; C y E muestran la presencia de linfocitos CD 3+ en la neointima con diferentes técnicas (immunohistoquímica en la figura C y hematoxilina eosina en la figura E). Tomado de Am J of Transplant 2008;8:1040-1050

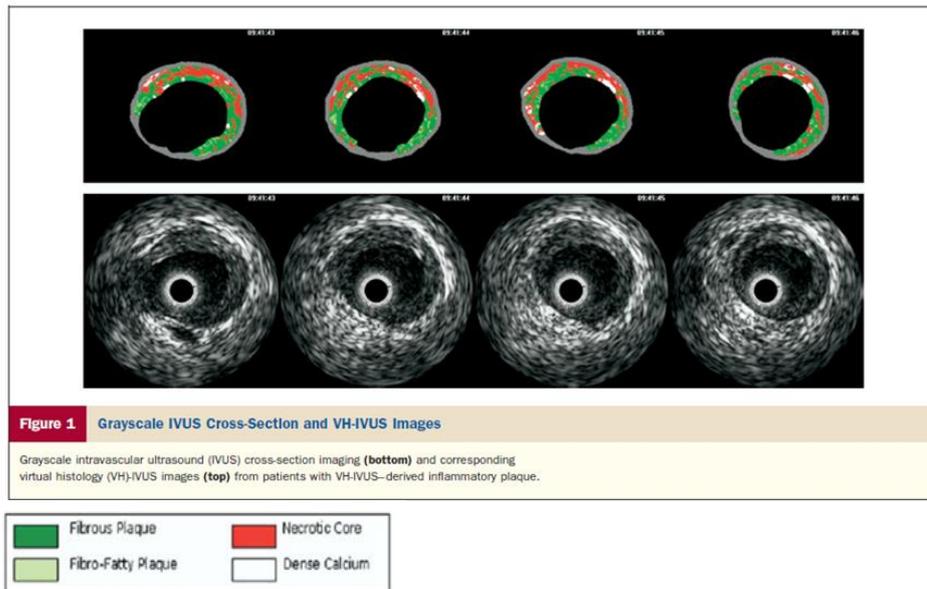
En una revisión reciente<sup>28</sup> sobre los mecanismos implicados en la disfunción endotelial se propone una nueva vía en la regulación de la función vascular, en la que los linfocitos T reguladores tendrían un papel protagonista. Las células T reguladoras, ya sea a través de la interacción directa con las células endoteliales o mediante la liberación de citocinas con propiedades antiinflamatorias, jugarían un papel relevante en la preservación de la función endotelial, como se esquematiza en la figura 10. Esta vía abriría nuevas perspectivas de conocimiento y tal vez de opciones terapéuticas.



**Figura 10:** Contribución del sistema inmunológico a través de los linfocitos T reguladores en el control de la función endotelial. Las células T reguladoras ya sea de manera directa sobre la célula endotelial o mediante la liberación de citocinas antiinflamatorias tendrían un papel relevante en la preservación de la función endotelial. Tomado de J Hematol Oncol 2014;7:80

Diferentes publicaciones<sup>29-34</sup> muestran una correlación entre el rechazo agudo y el desarrollo de vasculopatía del injerto, lo que apoyaría la base inmunológica de la EVI. En 1998 el grupo de Sant Pau publicó<sup>29</sup> la respuesta favorable del incremento del tratamiento inmunosupresor en pacientes que desarrollaron EVI tras el trasplante. En este estudio se consiguió la resolución de las lesiones coronarias diagnosticadas con angiografía y/o de los defectos de perfusión miocárdicos de los estudios isotópicos en el 68% de los pacientes con el incremento del tratamiento inmunosupresor. Los episodios de EVI tratados en el primer año postrasplante presentaron mayor probabilidad de resolución (92% respecto 40%). La respuesta más favorable en el primer año postrasplante, probablemente sea debida a que en este período predomina un componente inflamatorio en las lesiones y en consecuencia sería más susceptible al tratamiento inmunosupresor. Las alteraciones vasculares más allá del año vendrían caracterizadas fundamentalmente por la fibrosis y la proliferación intimal de células musculares lisas y no responderían de manera tan efectiva al incremento de la inmunosupresión.

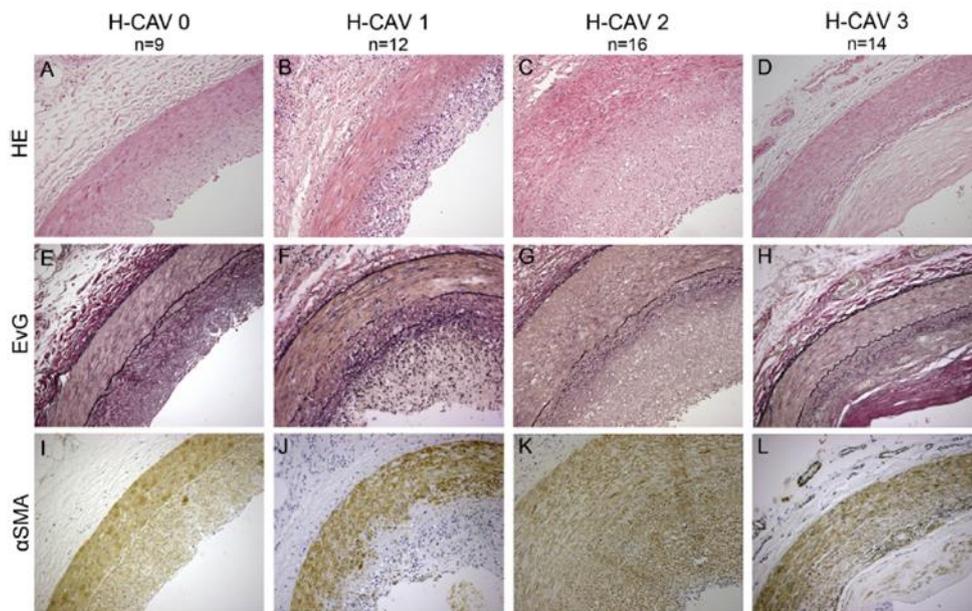
Raichlind y colaboradores<sup>31,32</sup>, estudiaron en pacientes trasplantados de corazón la correlación entre el rechazo celular en los primeros 6 meses postrasplante y el desarrollo de EVI angiográfica (definida por la presencia de lesiones coronarias >40% en algún vaso principal o secundario). Los pacientes con índices de rechazo más elevados durante los primeros seis meses tras el trasplante, presentaban mayor riesgo de desarrollar EVI y mayor incidencia de “placas inflamatorias” (definidas por un contenido de core necrótico y calcio >30%) en el estudio mediante histología virtual de las arterias coronarias como se ejemplifica en la figura 11.



**Figura 11.** Ejemplo de imágenes de una arteria coronaria de un paciente trasplantado de corazón obtenida mediante histología virtual (imagen superior) y por IVUs (imagen inferior). En la imagen del IVUs se puede apreciar y cuantificar el grado de hiperplasia intimal. La histología virtual perfila la composición de las placas ateroscleróticas visualizadas identificando cada componente con un color. El verde intenso correspondería a placas fibrosas, el verde pálido a placasa fibrolipídicas, el rojo al core necrótico y el blanco al calcio. Las imágenes mostradas en este ejemplo corresponderían a una placa inflamatoria con abundante core necrótico de color rojo. Tomado de J Am Coll Cardiol 2009;53:1279-86

En la misma línea en 2010 Arora y colaboradores<sup>34</sup> analizaron la correlación entre marcadores de inflamación en muestras de sangre periférica con el desarrollo de EVI al año del trasplante. El estudio angiográfico se completó con la realización de IVUs e histología virtual. Los pacientes con un grosor intimal por IVUS > 0.5 mm presentaban niveles significativamente más elevados de proteína C reactiva, sTNFR-1, VCAM-1 y neopterinina (todos ellos marcadores de inflamación). En los análisis de histología virtual aquellos pacientes con un componente inflamatorio de la placa > 30% también presentaban niveles mas elevados de proteína C reactiva, sTNFR-1, VCAM-1 y neopterinina, lo que sugeriría la relacion entre los mecanismos inflamatorios y el desarrollo de EVI.

Huibers y colaboradores<sup>35</sup> en estudios histológicos de arterias coronarias procedentes de autopsias de pacientes trasplantados de corazón definieron 4 fenotipos histológicos de EVI. La clasificación se realizó en función de la cantidad de infiltrado de mononucleares y de la proporción y densidad del tejido conectivo en el estudio histológico de las muestras. En la figura 12 se muestran los fenotipos histológicos de EVI que definieron H-CAV0, H-CAV1, H-CAV2 y H-CAV3.



**Figura 12:** Tipos histológicos de EVI: H-CAV 0: ausencia o escasas células mononucleares en la íntima con grosor normal de la misma. H-CAV1: pérdida de tejido conectivo de la íntima con infiltración de células mononucleares en la neointima. H-CAV 2: neointima con abundante tejido conectivo y presencia de células musculares. H-CAV 3: tejido conectivo muy denso en la neointima, escasas células musculares lisas y escasos mononucleares. Tomado de Atherosclerosis 2014;236:353-359

Encontraron una asociación significativa entre el tipo de alteración histológica y el tiempo de evolución postrasplante, predominando el infiltrado por macrófagos y la proliferación de células musculares lisas en los pacientes fallecidos con menor tiempo de evolución tras el trasplante (lesiones con un componente más inflamatorio H-CAV1) y un denso componente fibrótico con escasa infiltración de macrófagos en las autopsias de pacientes con mayor tiempo de evolución tras el trasplante (H-CAV3).

### ***2.2.2 Papel de la inmunidad mediada por anticuerpos en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto***

Cada vez están adquiriendo mayor importancia las consecuencias e implicaciones del rechazo mediado por anticuerpos (AMR) en la evolución y en el pronóstico de los pacientes trasplantados de corazón. Se define este tipo de rechazo como la disfunción del injerto que se acompaña de evidencia histológica de daño capilar mediado por la respuesta humoral (expresada como la positividad en las tinciones de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para CD68 y/o depósito de complemento) y de la detección de anticuerpos antidonantes específicos (DSA) circulantes<sup>36</sup>.

Al igual que el rechazo agudo, también se ha asociado la presencia de AMR con el desarrollo de vasculopatía del injerto. Así diferentes estudios<sup>37-40</sup> han mostrado que los pacientes con AMR tienen una mayor incidencia de EVI y esta aparece de manera más precoz. También se ha asociado el número de episodios de AMR y la severidad de los mismos con un incremento del riesgo de muerte cardiovascular<sup>40</sup>.

Taylor y colaboradores<sup>41</sup> mostraron en 36 pacientes receptores de un trasplante cardíaco, que aquellos que presentaban datos histológicos de AMR, tuvieron una incidencia de EVI a los 5 años significativamente superior (15.7 % vs 5.7 %;  $p= 0.002$ ). Tambur y colaboradores<sup>42</sup> estudiaron la aparición de Ac-antiHLA de novo en un grupo de 71 pacientes trasplantados de corazón. Un 35% de los pacientes desarrollaron Ac antiHLA de novo, predominantemente Ac antiHLA I. La aparición de Ac antiHLA de tipo I se asoció a una mayor incidencia de rechazo agudo en el primer año de seguimiento. A los 3 años de seguimiento, el 55 % de los pacientes que tenían datos de EVI mediante IVUs habían desarrollado Ac antiHLA de clase II, mientras que tan sólo el 14 % de los pacientes que no tenían EVI presentaban Ac antiHLA II ( $p<0.002$ ).

A pesar de la evidencia de la correlación entre rechazo mediado por anticuerpos y la vasculopatía del injerto, son poco conocidos los mecanismos fisiopatológicos que llevarían a la aparición de lesiones angiográficas. Se ha postulado<sup>15</sup> que la unión de anticuerpos a las células endoteliales activaría la cascada del complemento y el complejo de ataque de membrana así generado acabaría lesionando la célula endotelial. También se ha sugerido que el complejo de ataque de membrana tendría un papel crucial en la formación de poros en las membranas de las células endoteliales lo que activaría la señalización mediada por IL-1 conduciendo a una regulación al alza de sustancias procoagulantes y de la adhesión de moléculas inflamatorias.

### **2.2.3 Papel de la autoinmunidad en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto**

Aunque la respuesta aloinmune parece ser el principal factor implicado en el desarrollo de la EVI, la autoinmunidad también juega un papel en dicho proceso<sup>3,4,43,44</sup>. En este sentido, se ha identificado que no sólo la presencia de Ac dirigidos contra las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) en los pacientes trasplantados de corazón se ha asociado a peor función del injerto en el seguimiento, sino que los anticuerpos dirigidos contra los antígenos presentes en las células endoteliales como vimentina, el receptor de la angiotensina II o MICA también parecen tener un efecto deletéreo<sup>45,46</sup>. El análisis de Ac-antiMICA a lo largo del seguimiento de un grupo de pacientes trasplantados de corazón mostró<sup>46</sup> que su aparición se acompañó de mayor desarrollo de EVI. El 64.1 % de los pacientes que desarrollaron Ac-antiMICA presentaron datos angiográficos de EVI a los 5 años de seguimiento mientras que sólo el 19.2 % de los pacientes sin Ac-antiMICA desarrollaron EVI ( $p < 0.01$ ). MICA incluye un grupo de proteínas que se expresan en la superficie de las células endoteliales, epiteliales y fibroblastos y sus ligandos son las células NK y CD8+ activadas.

Se han propuesto diferentes mecanismos que explicarían la correlación entre la aparición de anticuerpos no antiHLA y el desarrollo de EVI. Los Ac-antiMICA podrían unirse a la célula endotelial e inducir su destrucción aunque también se ha postulado que la unión de los anticuerpos disminuiría la expresión de moléculas antitrombóticas con lo que facilitarían el estado protrombótico del endotelio.

## **2.3 Mecanismos no inmunológicos implicados en la fisiopatología de la enfermedad vascular del injerto**

A parte del papel de la inmunología celular y humoral, diferentes mecanismos pueden contribuir a lesionar el endotelio vascular y en consecuencia al desarrollo y progresión de la EVI, como se esquematiza en la figura 13. La isquemia que sufrirá el órgano tras la extracción, durante la preservación y tras el implante, es uno de los principales factores no inmunológicos que llevan a la lesión del endotelial. De hecho en el momento de la muerte cerebral del donante se activan mecanismos inflamatorios que pueden lesionar el endotelio. La infección por citomegalovirus o la respuesta inmunológica contra el mismo y más tardíamente los factores de riesgo clásicos de aterosclerosis, actuarían contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

### **2.3.1 *Citomegalovirus (CMV)***

El CMV continúa siendo uno de los principales patógenos oportunistas en el trasplante de órganos sólidos. Además de producir afectación sistémica, se estima que el virus puede jugar un papel tanto en el rechazo agudo como en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto. Uno de los mecanismos por los que se ha implicado al CMV con el desarrollo de EVI, es su contribución a la disfunción endotelial<sup>47</sup>. El propio virus puede directamente lesionar el endotelio vascular y conducir a la proliferación de células musculares lisas, a la liberación de citocinas y a estimular la actividad procoagulante del endotelio vascular. También la respuesta inmunológica desencadenada frente al virus puede ejercer un efecto sobre el endotelio vascular; en este sentido uno de los

mecanismos propuestos es el desarrollo de Ac antiendotelio como resultado de la infección por CMV.

Son varias las publicaciones que refuerzan la participación del CMV en el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto. Un estudio<sup>48</sup> en niños receptores de trasplante cardíaco mostró que aquellos habían tenido replicación activa o seroconversión por CMV, presentaban al año de seguimiento peor función endotelial sistémica (evaluada por el flujo en arteria braquial medido por ecodoppler). Delgado y colaboradores recientemente han publicado<sup>49</sup> en una cohorte de trasplantados de corazón que tanto la enfermedad, como la infección como la viremia por CMV asintomática se asocian de forma estadísticamente significativa al desarrollo de EVI. Estos datos, sugieren la implicación del CMV en la fisiopatología de la EVI y reforzarían la adopción de una estrategia profiláctica encaminada a evitar la replicación del virus para mejorar la evolución a largo plazo de los pacientes trasplantados de corazón.

### **2.3.2 Factores de riesgo cardiovascular clásicos**

Los factores de riesgo cardiovascular clásicos, como la obesidad, la diabetes, la hipertensión y la dislipemia son muy prevalentes en la población de pacientes trasplantados de corazón. Según los datos del último Registro Internacional de la ISHLT<sup>1</sup> el 71.8 % de los pacientes trasplantados de corazón presentan HTA al año del trasplante, el 59.8 % dislipemia y el 24.8 % diabetes mellitus. A los 5 años de seguimiento el 91.2 % de los pacientes presentan hipertensión arterial, el 87.6 % dislipemia y el 37.4 % diabetes mellitus.

La elevada prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular clásicos en la población de pacientes trasplantados no sólo de corazón sino también de otros órganos

sólidos, se relaciona en parte con el tratamiento inmunosupresor. Por lo que respecta a la diabetes mellitus la cortisona es en gran parte responsable de la aparición de novo de diabetes mellitus y entre el resto de medicación inmunosupresora tacrolimus presenta un mayor efecto diabetogénico que ciclosporina. Existe evidencia de que en la aparición de HTA influye la administración de ciclosporina y también la denervación cardíaca.

Si bien está claramente establecida la asociación entre los factores de riesgo cardiovascular clásicos con el desarrollo de aterosclerosis en la población general, falta definir si la colaboración fundamental de los factores de riesgo cardiovascular en los receptores de trasplante cardíaco es en la aparición o en la progresión de la EVI. Varios factores, entre los que se encuentran los factores inmunológicos y diferentes tratamientos farmacológicos, pueden enmascarar la asociación entre los factores de riesgo cardiovascular clásicos y el desarrollo de EVI. A pesar de ello existen datos en la literatura<sup>4,9,10,50</sup> que refuerzan la colaboración de los factores clásicos de riesgo aterosclerótico con la progresión de la vasculopatía en el injerto de los receptores de trasplante cardíaco. Un análisis retrospectivo multicéntrico valoró la influencia de los factores de riesgo cardiovascular de novo en la evolución de los pacientes trasplantados de corazón. En un grupo de 208 pacientes que sobrevivieron al año del trasplante<sup>50</sup>, se correlacionaron de manera significativa el desarrollo de eventos cardíacos adversos no fatales con los niveles totales de colesterol (RR 4.34, IC 1.35-13.89, p=0.01) y con la aparición de diabetes (RR 3.96; IC 1.24-12.65 p=0.02).

En un estudio reciente<sup>51</sup> que incluyó 165 receptores de trasplante cardíaco y en el que se evaluó la EVI con IVUS e histología virtual se observó que el 35 % de los pacientes

trasplantados por una etiología isquémica presentaron eventos clínicos en el seguimiento (infarto, angina, insuficiencia cardiaca, arritmias ventriculares, muerte, muerte de causa cardiovascular, arritmias) frente al 16 % de los pacientes con cardiopatía no isquémica de base ( $p= 0.019$ ). En el análisis univariado la etiología isquémica, el tabaquismo, el índice de volumen de placa inicial en el IVUs al año y la edad del donante se asociaron de manera significativa con el desarrollo de eventos. En el análisis multivariado la etiología isquémica del receptor y la edad del donante fueron los dos factores que se correlacionaron de manera significativa con el desarrollo de eventos. Los autores concluyen que la persistencia en el receptor de los factores de riesgo cardiovascular previos al trasplante, se asociarían con mayor progresión de la EVI. En consecuencia en pacientes trasplantados de corazón por cardiopatía isquémica, recomiendan realizar una monitorización más estrecha y tener una mayor rigurosidad en su control.

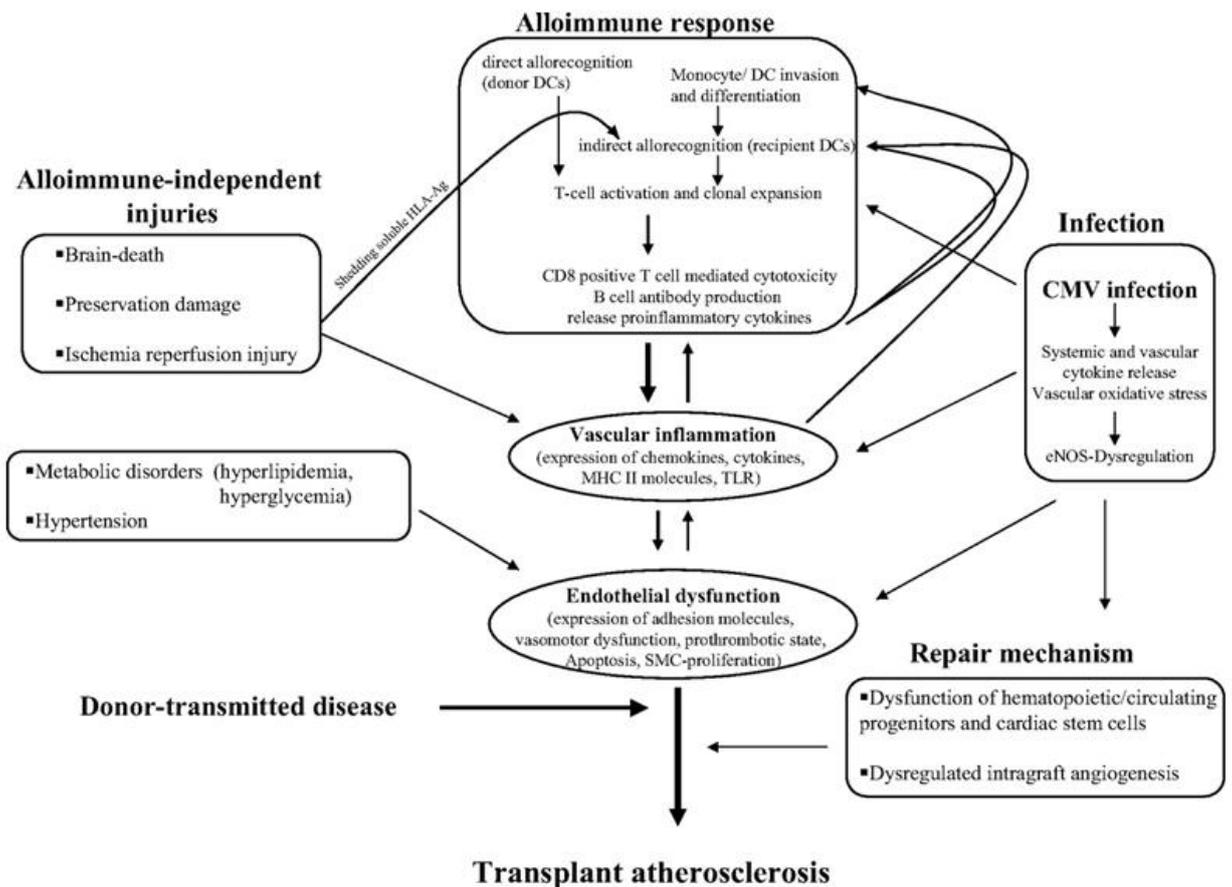
### **1.3.3 Otros factores no inmunológicos implicados en la fisiopatología de la EVI**

A lo largo de los años se han intentado identificar diferentes factores que pudieran colaborar con el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto. Los pacientes trasplantados cardíacos como consecuencia de la denervación del corazón implantado presentan habitualmente frecuencias cardíacas elevadas en reposo. En un estudio nacional<sup>52</sup> en el que colaboró el Hospital de Sant Pau, se apreció que los pacientes trasplantados de corazón que presentaban una frecuencia cardiaca al año  $>90$  x' presentaron mayor mortalidad por cualquier causa ( $HR=2.4$ ; IC 1.2-4.5,  $p=0.009$ ) así como mayor mortalidad relacionada con la EVI ( $HR =3.0$ ; IC 1.25-7.14,  $p=0.01$ ). Quizá el conocimiento de los mecanismos implicados en el aumento de la FC en estos pacientes y su

posible modulación puede ofrecer una nueva estrategia terapéutica para disminuir la aparición de vasculopatía en el seguimiento.

Diferentes estudios <sup>53-55</sup> han evaluado la influencia de la edad del donante en la aparición de enfermedad vascular del injerto. La escasez de órganos en los últimos años ha llevado a ampliar los criterios de aceptación, de manera que la edad de los donantes ha ido aumentando a lo largo de los años. En un estudio multicéntrico nacional<sup>56</sup> se analizaron 2012 receptores de trasplante cardíaco divididos en 2 grupos, aquellos que recibieron donantes menores de 50 años y los que recibieron donantes mayores de 50 años. No se encontraron diferencias en cuanto a mortalidad, pero sí la utilización de donantes añosos se acompañó de un incremento del riesgo a medio plazo de desarrollar EVI. También los donantes mayores de 50 años presentaban mayor incidencia de factores de riesgo cardiovascular, lo que quizá haya contribuido a un daño endotelial preexistente previo al trasplante que haya podido progresar y contribuir al desarrollo de EVI. Este dato deberá tenerse en cuenta en el análisis de los resultados a largo plazo en los próximos años y quizá pueda representar una limitación a la expansión de criterios de selección de donantes.

## ESQUEMA DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA EVI



**Figura 13:** La respuesta inmunológica tanto humoral como celular, la infección por CMV y otras injurias como la situación de muerte cerebral del donante, el daño del órgano durante la preservación o el daño por isquemia – reperfusión causarían de manera directa o indirecta activación la de diferentes mecanismos de inflamación que conduce a la disfunción endotelial. La propia activación de la inflamación y la enfermedad por CMV perpetuarían la respuesta inmunológica activa. Los factores de riesgo cardiovasculares clásicos contribuirían también a lesionar el endotelio. Los mecanismos de reparación activados serían insuficientes para contrarrestar este daño endotelial. Tomado de *Circulation* 2008;117-2131-2141

### **3- DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD VASCULAR DEL INJERTO**

El diagnóstico de la EVI se basa en la documentación de lesiones coronarias en el corazón implantado, siendo la coronariografía la técnica más comúnmente recomendada. La denervación de los corazones trasplantados, condiciona la ausencia de síntomas propios de la isquemia coronaria como en la cardiopatía isquémica que guíe la realización de exploraciones complementarias. Las manifestaciones clínicas aparecen en estadios avanzados de la enfermedad, de manera que la muerte súbita, la detección de un infarto o la aparición de insuficiencia cardíaca pueden ser los primeros síntomas.

#### **3.1 Técnicas no invasivas**

Habitualmente los pacientes trasplantados de corazón presentan alteraciones electrocardiográficas basales lo que no permite utilizar las pruebas de esfuerzo convencionales para la detección de EVI. Las alternativas, como métodos no invasivos, a las ergometrías convencionales son los test de isquemia ya sea mediante ecocardiogramas de estrés o con estudios de perfusión miocárdica. La detección de defectos de perfusión miocárdica o de alteraciones segmentarias de la contractilidad se establecería el diagnóstico indirecto de EVI.

##### ***3.1.1 Ecocardiograma de estrés***

Diferentes estudios<sup>57-60</sup> han mostrado una buena correlación entre los defectos segmentarios de la contractilidad en el eco de estos con dobutamina con la presencia lesiones coronarias angiográficas e incluso con la presencia de hiperplasia intimal moderada o severa en el IVUs. Se ha reportado<sup>57-60</sup> una sensibilidad del eco de estrés en el diagnóstico

de EVI entre el 55-95%, una especificidad entre el 41-95%, un valor predictivo positivo (VPP) 69-92% y un valor predictivo negativo (VPN) del 71-92 %. Comparado con IVUS la sensibilidad y el VPN es menor. En la tabla 1 se recogen los principales estudios comparativos entre eco y coronariografía en el diagnóstico de EVI.

También se ha valorado la utilidad de las técnicas no invasivas como marcadores pronósticos. Así se ha mostrado <sup>61</sup> que las alteraciones de la contractilidad segmentaria en reposo y en los estudios de estrés se correlacionan con el desarrollo de eventos adversos mayores cardiovasculares en el seguimiento.

### ***3.1.2 Estudios de perfusión miocárdica isotópicos***

Los estudios de perfusión miocárdica, con esfuerzo o con estrés farmacológico, también se han utilizado para la detección de vasculopatía del injerto. La sensibilidad y especificidad de los estudios de perfusión miocárdica en la detección de la EVI oscila entre el 21 y el 92% <sup>55</sup> y el 100% respectivamente <sup>59,60,62,63</sup>. Esta gran variabilidad se explica por diferentes motivos, entre ellos el momento en el que se realiza la exploración, el tipo de estrés o agente inductor de estrés utilizado y el criterio diagnóstico de EVI que se haya usado en su comparación con la angiografía <sup>63</sup>. Se ha cuestionado el poder de la técnica en la detección de lesiones coronarias inferiores al 50%, lo que limitaría su utilidad en la detección precoz de la vasculopatía. La utilización de los estudios de perfusión miocárdica al igual que el eco de estrés, estaría más respaldada por su valor pronóstico que por la capacidad de identificar lesiones coronarias.

**Table 1. Stress Tests In the Evaluation of CAV**

First Author (Ref. #)	Modality	Patients (N)	Comparator	CAV Diagnosis	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Derumeaux et al. (39)	DSE	37	ICA	Angiographic focal stenosis >50%	65	95	92	76
Akosah et al. (40)	DSE	41	ICA	Angiographic luminal irregularities or diffuse disease	95	55	69	92
Spes et al. (42)	DSE	98	ICA or IVUS	Angiographic luminal irregularities or IVUS MIT >0.3 mm	72	88	92	62
Spes et al. (43)	DSE	46	IVUS	MIT >0.3 mm	79	83	88	71
Derumeaux et al. (44)	DSE	41	ICA	Angiographic luminal irregularities or diffuse disease	86	91	86	91
Ciliberto et al. (49)	Dipyridamole technetium-99m sestamibi SPECT	78	ICA	Angiographic focal stenosis >50% or diffuse disease	92	86	55	98
Ciliberto et al. (49)	Dipyridamole technetium-99m sestamibi SPECT	78	ICA	Angiographic luminal narrowing (any CAV)	56	89	70	81
Wu et al. (50)	Dobutamine thallium SPECT	47	ICA	Angiographic focal stenosis >50% or diffuse disease	89	71	42	96
Elhendy et al. (51)	Dobutamine technetium-99m tetrofosmin SPECT	50	ICA	Angiographic focal stenosis >50%	90	55	75	79

CAV = cardiac allograft vasculopathy; DSE = dobutamine stress echocardiography; ICA = invasive coronary angiography; IVUS = intravascular ultrasound; MIT = maximal intimal thickness; SPECT = single-photon emission computed tomography; NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value.

**Tabla 1:** principales estudios que comparan la utilidad de las exploraciones no invasivas (eco de estrés y estudios de perfusión miocárdica) con coronariografía y/o IVUs en el diagnóstico de EVI. J Am Coll Cardiol Img 2013;6:613–23

### 3.1.3 Cardioresonancia magnética

En la actualidad disponemos de pocos datos sobre el papel de la cardioresonancia en el estudio y diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto. La valoración de la captación tardía de gadolinio puede ser de utilidad para detectar de manera indirecta la existencia de EVI. La presencia de captación de gadolinio identificaría zonas de necrosis silente. Se ha descrito que la prevalencia de patrones en la resonancia típicos de necrosis, aumentaría con el grado de severidad de la EVI y se asociarían a peor función sistólica<sup>64</sup>. Así se ha publicado que tan sólo el 25 % de los pacientes con EVI ligera presentarían estos patrones mientras que estarían presentes en el 84 % de los pacientes con EVI severa. A pesar del interés de estos hallazgos el significado clínico y las bases fisiopatológicas de los mimosos aún no están establecidos.

El ecocardiograma de estrés y los estudios de perfusión miocárdica permiten indirectamente estudiar la vasculopatía del injerto. No son útiles para un diagnóstico precoz y preciso de la enfermedad. A pesar de ello y teniendo en cuenta su valor predictivo negativo, son utilizadas en la monitorización de la vasculopatía del injerto en casos seleccionados, con el objetivo de diferir la realización de exploraciones invasivas. Las guías de práctica clínica de la Sociedad Internacional <sup>65</sup>, respecto al uso de las exploraciones no invasivas en el diagnóstico de la EVI establecen un grado de recomendación IIa con un nivel de evidencia B.

### ***3.1.4 Tomografía axial computerizada de arterias coronarias***

El TAC multidetector se ha erigido en los últimos años como una técnica no invasiva muy atractiva para evaluar la enfermedad coronaria. Los avances tecnológicos han conseguido una elevada resolución temporal que permite un análisis completo del árbol coronario en el 88-95 % de los pacientes, con una visualización de prácticamente la totalidad de los segmentos coronarios, entre el 83 y el 96% de los pacientes <sup>76-78</sup>. La principal limitación de la técnica se encuentra en el análisis de vasos de pequeños calibre, inferiores a 1.5 mm, lo que puede dificultar la valoración adecuada de las ramas de los vasos coronarios principales. Aún así, se ha hallado una elevada especificidad (92-95%), sensibilidad (83 %) y valor predictivo negativo (95%) de la técnica para el diagnóstico de EVI, aunque no se dispone de datos sobre el valor pronóstico de la misma <sup>57,76-78</sup>. Una ventaja adicional que ofrece el TAC de coronarias respecto la coronariografía es la capacidad de estudiar no sólo la luz arterial sino también la pared vascular. Un metanálisis recientemente publicado <sup>78</sup> sobre la utilidad del TAC coronario en la detección de EVI,

mostró una adecuada correlación entre el grado de engrosamiento intimal detectado por TAC coronario comparado con IVUS. Algunos de los inconvenientes de la técnica son compartidos con la coronariografía y el IVUS; la necesidad de utilizar contraste yodado nefrotóxico y la irradiación. Los avances tecnológicos han permitido disminuir las dosis de irradiación a 3-8 mSv, dosis similares a las de la coronariografía, por lo que la irradiación no representaría hoy en día una de las limitaciones a tener en cuenta. La frecuencia cardíaca habitualmente elevada en los corazones denervados de los pacientes trasplantados, puede dificultar la interpretación de las imágenes. A pesar de que no se considera que el TAC de arterias coronarias deba substituir a la coronariografía, no se cuestiona su utilidad para excluir la presencia de EVI.

### **3.2. Técnicas invasivas**

#### **3.2.1 Coronariografía**

El método más comúnmente empleado para el diagnóstico de la EVI es la angiografía coronaria. Los programas de trasplante incluyen la realización periódica de coronariografías, habitualmente al año y posteriormente cada 2 ó 5 años, encaminadas a la detección de las lesiones coronarias. Hasta el año 2010 no se dispuso de criterios homogéneos y uniformes para la clasificación y estratificación de la vasculopatía del injerto. Una de las primeras descripciones de EVI<sup>66</sup> se basó en la presencia de lesiones moderadas-severas en los segmentos proximales y medios de los vasos coronarios por angiografía. Dichas alteraciones se acompañaron de una mortalidad del 50% a los 2 años. Posteriormente se publicó la descripción angiográfica de EVI elaborada por Gao y colaboradores<sup>67</sup>, atendiendo a aspectos morfológicos de las lesiones, no se acompañó de

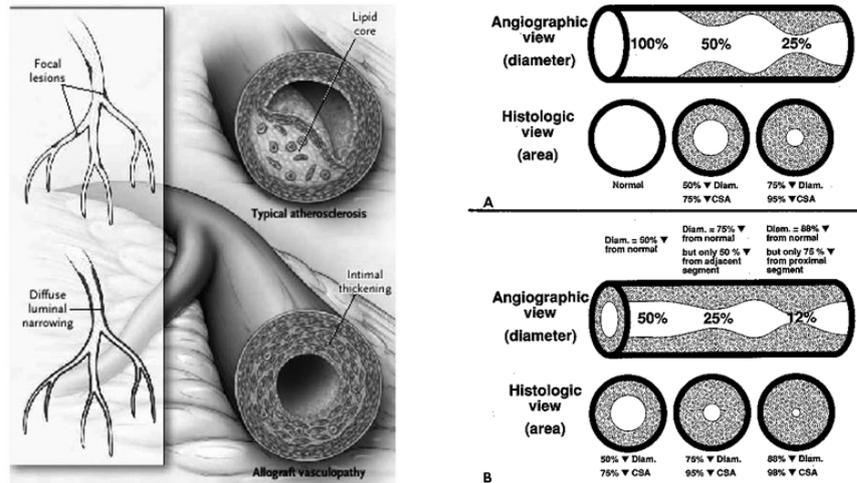
significado pronóstico. Costanzo y colaboradores<sup>68</sup> realizaron un estudio multicéntrico en el que clasificaron más de 4000 coronariografía de receptores de trasplantes cardíacos atendiendo a la severidad y localización de las lesiones coronarias. La probabilidad de muerte o retrasplante a 5 años fue del 50 % en aquellos pacientes con criterios severos de EVI. Es en esta clasificación de EVI en la que se basa el documento de consenso<sup>69</sup> elaborado en 2010 y que se recoge a continuación en la Tabla 2 .

**Tabla 2 . CLASIFICACION DE LA ENFERMEDAD VASCULAR DEL INJERTO**

<b>CAV0 (EVI no significativa)</b>	Ausencia de lesiones angiográficas
<b>CAV1 (EVI ligera)</b>	Lesión < 50% en tronco común o lesiones <70% en arterias principales y ramas de arterias principales, incluyendo adelgazamiento difuso coronario, sin disfunción del injerto
<b>CAV2 (EVI moderada)</b>	Lesión > 50% en tronco común, o lesiones >70% en un vaso principal o en ramas secundarias de 2 arterias coronarias diferentes sin disfunción del injerto
<b>CAV3 (EVI severa)</b>	Lesión > 50% en tronco común o en 2 ó más arterias principales con lesiones > 70% o lesiones en ramas de los 3 vasos principales > 70% o CAV1 o CAV 2 con disfunción del injerto (definida como FE <45% en presencia de defectos segmentarios) o evidencia de fisiología restrictiva

FE : fracción de eyección. CAV :cardiac allograft vasculopathy. Tomado de J Heart Lung Transplant 2010;29:717-727

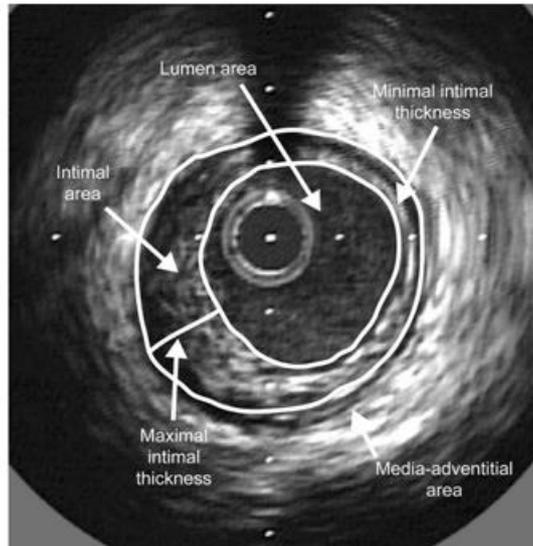
La coronariografía aporta información sobre la luz vascular pero no permite estudiar la pared vascular. Así, la afectación difusa y a menudo concéntrica del árbol coronario en la enfermedad vascular del injerto, disminuye la sensibilidad de la coronariografía en el diagnóstico de la EVI, como se muestra en la figura 14.



**Figura 14:** Diferencias entre aterosclerosis convencional y vasculopatía del injerto que limitan la sensibilidad diagnóstica de la angiografía coronaria en la EVI. La aterosclerosis convencional acostumbra a provocar lesiones focales que se visualizan fácilmente en la coronariografía por su repercusión en el luminograma, mientras que la enfermedad vascular del injerto con una afectación difusa de la pared vascular que puede no tener traducción en el luminograma de la coronariografía.

### 3.2.2 Ecografía intracoronaria (intravascular ultrasound: IVUs)

El eco intracoronario (IVUs), permite el estudio de la luz y de la pared vascular arterial por lo que se ha considerado la técnica de mayor sensibilidad para el diagnóstico precoz de la enfermedad vascular en el injerto. Gracias a esta técnica es posible cuantificar el grosor intimal mínimo, el grosor intimal máximo y el área intimal como se muestra en la figura 15.



**Figura 15:** Imagen con ecointracoronario en el estudio de la enfermedad vascular del injerto. En el centro de la imagen se encuentra la luz vascular en cuyo interior se identifica la sonda del eco intracoronario. Alrededor de la luz vascular se diferencia el engrosamiento intimal y por fuera del mismo la media y la adventicia. El eco intracoronario permite cuantificar el grosor intimal máximo, el grosor intimal mínimo y el área intimal entre otros parámetros. Tomada de Transpl Proc 2005; 37; (Suppl 4S),4S-17S

El engrosamiento de la íntima aparece ya en los primeros meses postrasplante y se sabe que el crecimiento es máximo en los primeros dos años tras el trasplante cardíaco. Varios estudios<sup>70-73</sup> han correlacionado el grado de hiperplasia intimal con el desarrollo posterior de lesiones angiográficas y con la mortalidad en el seguimiento.

En un estudio multicéntrico<sup>74</sup> publicado en 2004, el incremento del grosor intimal  $\geq$  0.5 mm al año del trasplante, se asoció a mayor mortalidad, mayor número de eventos cardíacos y pérdida del injerto a los 5 años de seguimiento.

La realización del eco intracoronario tiene varias limitaciones. Es un procedimiento más invasivo que una coronariografía convencional y el coste del material necesario para la exploración, es elevado. Además al igual que la coronariografía el análisis se encuentra

limitado a los vasos epicárdicos, precisa de irradiación y de la utilización de contraste yodado nefrotóxico. La irradiación puede favorecer el desarrollo de neoplasias, que constituyen una de las principales causas de mortalidad tardía del trasplante, por lo que es conveniente restringir su exposición. La insuficiencia renal es una de las principales comorbilidades en el seguimiento de los pacientes trasplantados de corazón, de ahí la relevancia de evitar el abuso de contraste yodado.

En resumen, la técnica universalmente utilizada y recomendada en el diagnóstico de la EVI es la coronarigrafía a pesar de los inconvenientes que conlleva la realización de procedimientos invasivos y la limitada sensibilidad diagnóstica. El IVUS sería la técnica de elección para el diagnóstico precoz de la enfermedad, en la fase de hiperplasia intimal. El TAC coronario se plantea en la actualidad como la alternativa diagnóstica a la coronarigrafía en la evaluación de la EVI en los pacientes trasplantados de corazón, con una elevada sensibilidad y valor predictivo negativo y probablemente con la capacidad de estudiar la pared vascular durante el mismo procedimiento. La Tabla 3 resume las técnicas diagnósticas de que disponemos y en investigación, y su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto en sus diferentes estadios.

**Tabla3: TECNICAS DIAGNOSTICAS EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE LA EVI**

Estadío de la enfermedad vascular del injerto	Técnicas diagnósticas aceptadas clínicamente	Técnicas en investigación
Disfunción endotelial	Estudio doppler flujo coronario <sup>8</sup>	Biomarcadores?
Hiperplasia intimal	IVUs <sup>70-74</sup>	TAC coronario
Estenosis coronarias epicárdicas	IVUs <sup>70-74</sup> Coronariografía <sup>65</sup> TAC coronario <sup>76-78</sup>	X
Enfermedad de pequeño vaso		CardioRM <sup>163-164</sup> Estudio doppler flujo coronario
Detección de isquemia miocárdica	Eco de estrés <sup>57-61</sup> Estudios de perfusión miocárdica <sup>59-63</sup>	Eco contraste
Fibrosis Miocárdica	Cardioresonancia magnética <sup>64</sup>	X
Disfunción sistólica VI	Ecocardiograma <sup>65</sup> Estudios isotópicos <sup>59-63</sup> Cardioresonancia magnética <sup>65</sup>	TAC
Disfunción diastólica VI	Ecocardiograma <sup>60</sup> (strain rate, doppler tisular)	X

IVUs: eco intracoronario; VI: ventrículo izquierdo, CardioRM: cardioresonancia magnética

**Tabla 3:** utilidad de las diferentes técnicas aceptadas en la práctica clínica y en investigación, para el diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto en sus diferentes estadios. Los biomarcadores podrían ser útiles en el diagnóstico de la EVI en la fase de la disfunción endotelial, aunque como se muestra no está aceptada su utilidad en la práctica asistencial. Para el diagnóstico de la hiperplasia intimal la técnica aceptada es el IVUS y quizá en el futuro el TAC coronario sea la alternativa. El diagnóstico de las estenosis coronarias se acepta que puede realizarse con la coronariografía o con el TAC coronario. Para el estudio de la microcirculación no disponemos de ninguna técnica ni en la actualidad ni en estudio. El ecocardiograma de estrés y los estudios de perfusión miocárdica son aceptados en la práctica asistencial como exploraciones útiles en la detección de isquemia y estaría en fase de investigación el eco con contraste. La cardioresonancia magnética en la actualidad está limitada para la detección de fibrosis miocárdica. La función ventricular sistólica la podemos valorar con el ecocardiograma, mediante los estudios de perfusión miocárdica o la cardioresonancia. Para la evaluación de la función diastólica en la actualidad las técnicas aceptadas son el ecocardiograma doppler y las nuevas técnicas de strain rate y doppler tisular. Modificado de J Am CollCardiolImaging 2013;6:613-23.

## **4- BIOMARCADORES SERICOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD**

### **VASCULAR DEL INJERTO**

Los biomarcadores son parámetros bioquímicos o moleculares que indican o se asocian con una alteración fisiológica clínicamente significativa<sup>81</sup>.

El uso de biomarcadores en el diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto y como predictores del pronóstico en pacientes con CAV ofrece una alternativa no invasiva de monitorización muy atractiva en el seguimiento de receptores de trasplante cardiaco.

En la búsqueda de biomarcadores hay dos aproximaciones. La primera es una aproximación clásica basada en la selección de proteínas implicadas en la fisiopatología de la enfermedad. Aunque los mecanismos que conducen a la EVI no son del todo bien conocidos, una estrategia sería la utilización de moléculas relacionadas con el desarrollo de aterosclerosis convencional. Uno de los mecanismos implicados en la disfunción endotelial es la activación de la inflamación, por lo que diferentes marcadores de inflamación se han postulado de utilidad en el estudio de la función endotelial. Las moléculas de adhesión celular juegan un importante papel en la regulación de la inflamación atrayendo leucitos y controlando la migración a través de la pared vascular. Las formas solubles de algunas de estas moléculas de adhesión (VCAM, ICAM, E-selectina) se encuentran en plasma y se cree que pueden reflejar el estado de inflamación celular y correlacionarse con el grado de disfunción endotelial. Como se comentó previamente, Arora y colaboradores<sup>34</sup>, publicaron la correlación entre los niveles plasmáticos de proteína c reactiva, VCAM-1 y neopterina (proteínas implicadas en vías inflamatorias lesivas para el endotelio) y el grado de hiperplasia intimal en los estudios IVUS de pacientes receptores de corazón. Los pacientes

con un grosor intimal por IVUS > 0.5 mm además de presentar niveles significativamente más elevados de dichas moléculas presentaban en los análisis por histología virtual de las lesiones coronarias un componente inflamatorio de la placa > 30%.

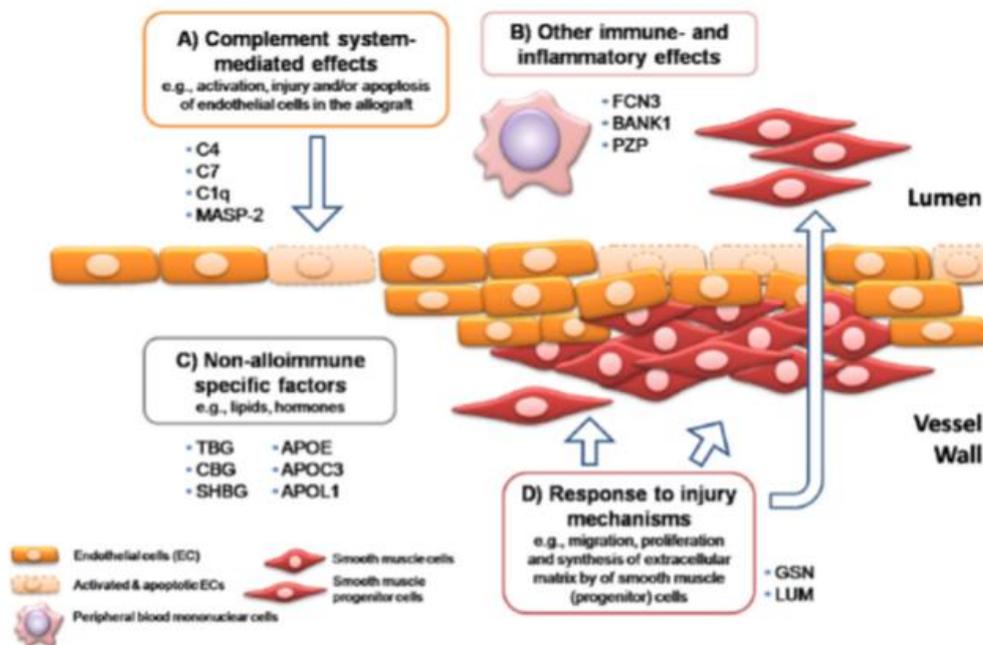
También marcadores de daño endotelial, como el factor de Von Willebrand se han encontrado elevados en pacientes con EVI<sup>82</sup>. La presencia de un estado protrombótico caracterizado por la elevación de los niveles de factor tisular y fibrina y por la reducción del activador tisular del plasminógeno se ha asociado tanto con la aparición como con el grado de severidad de la EVI, así como con disfunción del injerto<sup>83,84</sup>.

Otros biomarcadores que se han evaluado en el diagnóstico de vasculopatía del injerto son ST2, BNP y troponinas. La determinación de ST2 no se ha correlacionado con el desarrollo de EVI en el único estudio publicado hasta la actualidad<sup>85</sup>. En relación a los péptidos natriuréticos un estudio en 2004 mostró que los niveles elevados de BNP en el seguimiento a largo plazo de pacientes trasplantados de corazón se asocian con disfunción del injerto y enfermedad vascular y que son potentes predictores independientes de mortalidad cardiovascular<sup>86</sup>. Con NT-ProBNP, a pesar de confirmarse su papel como predictor de mortalidad, no se ha documentado una correlación significativa con el desarrollo de vasculopatía<sup>87</sup>.

La determinación de Troponina I durante el primer año de seguimiento tras el trasplante también se ha mostrado útil en el diagnóstico de EVI. Se ha publicado<sup>88,89</sup> que aquellos pacientes con niveles de troponina I persistentemente elevados durante el primer año presentaron un riesgo significativamente mayor de enfermedad vascular del injerto. En un estudio que evaluó los niveles de cTnT-hs en el seguimiento de pacientes

trasplantados de corazón, se observó su utilidad en la predicción de eventos adversos en el seguimiento <sup>89</sup>.

La monitorización de Ac anti-HLA o dirigidos contra diferentes Ag como se ha comentado en el apartado del papel de la autoinmunidad en la enfermedad vascular del injerto <sup>37,40,42-45</sup>, también podría representar un biomarcador para monitorizar la vasculopatía del injerto. La figura 16 ejemplifica potenciales biomarcadores en la EVI a través de los mecanismos patológicos en los que estarían implicados.



**Figura 16:** Potenciales biomarcadores de la EVI. Moléculas derivadas de la activación del sistema del complemento, citocinas relacionadas con la activación del sistema inmunológico o con la inflamación, moléculas relacionadas con el metabolismo de lípidos y sustancias liberadas en respuesta a una lesión endotelial responsables de la migración y proliferación celular y de síntesis de la matriz extracelular podrían ser planteadas como biomarcadores. Tomada de J Heart Lung Transplant 2013;32:723-733

La segunda aproximación en la búsqueda de biomarcadores se basa en la utilización de técnicas de alto rendimiento como la proteómica. Mediante la comparación de muestras de sangre de pacientes con las de sujetos sanos y a modo de rastreo se puede detectar diferente expresión de proteínas entre unas muestras y otras. Se generarían así listados de proteínas potencialmente involucradas en esta enfermedad entre las cuales se seleccionarían aquellas cuyas función y/o propiedades indiquen que tienen más probabilidades de ser buenos biomarcadores. Siguiendo esta aproximación, en 2013 Lin y colaboradores<sup>90</sup> mediante proteómica detectaron un panel con 18 proteínas capaz de diferenciar y clasificar pacientes con EVI significativa angiográfica (definida como estenosis >40% en descendente anterior) con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 89%. Gran parte de las proteínas identificadas están asociadas con la activación o regulación del sistema del complemento, con la regulación del sistema inmunológico y con la actividad inflamatoria. Aunque muchos de los biomarcadores propuestos son plausibles en el contexto de la EVI son necesarios más estudios in vivo e in vitro para conocer el significado individual de cada uno de ellos y las interrelaciones a las que están sujetos.

El análisis en sangre periférica del perfil de expresión génica se ha evaluado fundamentalmente en la monitorización no invasiva de rechazo agudo<sup>91</sup>. En el estudio CARGO<sup>92</sup>, que identificó y validó un grupo de 11 genes predictores de rechazo agudo, se elaboró el score AlloMap con elevado valor predictivo negativo. En 2008 la FDA (US Food and Drug Administration) aprobó la utilización del test AlloMap en el diagnóstico del rechazo en pacientes ambulatorios a partir de los 2 meses postrasplante. Son escasos los datos respecto a la utilidad del Test AlloMap en el diagnóstico de EVI. Se dispone de un

estudio publicado<sup>93</sup> en el que se observó que los pacientes con EVI presentaban Scores AlloMap significativamente más elevados que el grupo control.

También la utilización de miRNAs (MicroRNAs)<sup>4</sup> se ha evaluado en el diagnóstico no invasivo de la vasculopatía del injerto<sup>94</sup>. En un grupo de 52 pacientes entre 5 y 15 años de evolución tras el trasplante se analizaron los niveles plasmáticos de miRNAs endoteliales, observando niveles significativamente superiores en pacientes con EVI que en pacientes sin EVI. Aunque son datos iniciales, tal vez puedan ser en el futuro una herramienta diagnóstica no invasiva en la detección de EVI.

Diferentes biomarcadores se pueden plantear en el estudio no invasivo de la enfermedad vascular del injerto. Entre ellos se encuentran sAXL y GAS6, moléculas relacionadas con la inflamación, Lp-PLA2 y GDF 15 predictores de riesgo cardiovascular, vinculados con la disfunción endotelial y cTnT-hs (Troponina cardiaca ultrasensible) marcador de daño miocárdico microscópico.

#### **4.1 sAXL (forma soluble del receptor de la tirosin kinasa AXL)**

AXL forma parte de un grupo de receptores de la familia de las tirosin kinasas (TAM) que incluye Tyro3, AXL y Mer. Los receptores TAM son una de las 20 subfamilias de receptores de la tirosin kinasa. Dos de los ligandos del receptor TAM identificados son la proteína S y GAS 6 (growth arrest-specific gene 6).

En los últimos años se ha descrito la expresión de receptores TAM en diferentes tipos celulares y su participación en varias vías de señalización. Entre sus funciones se ha descrito la participación en la estimulación de la proliferación y crecimiento celular, la

inhibición de la apoptosis, la mediación de la esferocitosis, la estimulación de la hemostasia y la modulación de la inflamación. También se ha observado que la activación de los receptores TAM inhibe la señalización de los Toll-like receptor y estimula el desarrollo de las células natural killer (NK), lo que ha llevado a especular sobre su papel en la prevención de la autoinmunidad<sup>95</sup>.

Se ha propuesto que los receptores TAM actuarían inhibiendo la inflamación por diferentes mecanismos<sup>97,98</sup>. En las células presentadoras de antígenos actuarían inhibiendo la liberación de determinadas citocinas proinflamatorias y las vías de señalización de determinadas células implicadas en los mecanismos de inflamación e inducirían la liberación de mediadores antiinflamatorios. De esta manera limitarían la intensidad y quizá la duración de la respuesta inmunológica. Otro importante mecanismo antiinflamatorio en el que participan los receptores TAM es la eferocitosis, que consiste la fagcitosis de las células apoptóticas. Los residuos acumulados de células apoptóticas, cuando fracasa la eferocitosis, contienen una variedad de autoantígenos que pueden estar implicados en la fisiopatología de determinadas enfermedades autoinmunes

También se ha estudiado el papel de los receptores TAM en la homeostasis vascular. El daño endotelial lleva a la exposición de colágeno y factor de von Willebrand a nivel subendotelial, lo que facilita la adhesión y activación de las plaquetas. Al mismo tiempo la exposición del factor tisular activa la vía extrínseca de la coagulación. Se ha descrito que los receptores TAM promoverían la estabilización de la agregación plaquetaria, la restitución de la función de la barrera endotelial contribuyendo con ello a mantener la integridad de la pared vascular.

Es posible detectar en plasma la forma soluble del receptor Axl del TAM, sAXL. Varios estudios clínicos <sup>98,99</sup> han evaluado los niveles plasmáticos de sAxl y sus implicaciones pronósticas en diferentes enfermedades con base inflamatoria. Liu y colaboradores<sup>98</sup> evaluaron la correlación de sAXL en 64 pacientes con enfermedad coronaria; 34 con síndrome coronario agudo, 30 con enfermedad coronaria estable y 24 controles sanos. Los niveles de sAXL fueron significativamente más elevados en pacientes con síndrome coronario agudo que en controles ( $p=0.005$ ) y se correlacionaron con los niveles en plasma de proteína c reactiva, troponina I y TNF-alfa. Según los autores estos resultados confirmaban una vinculación entre sAXL y los mecanismos inflamatorios implicados en el síndrome coronario agudo. Otro grupo de investigadores publicaron<sup>100</sup> que en pacientes con isquemia crítica de la extremidad inferior, los niveles de sAXL no sólo fueron significativamente más elevados respecto los controles sino que se correlacionaron con la supervivencia en el seguimiento. Los pacientes que concentraciones plasmáticas más elevadas de sAXL presentaron mayor mortalidad a 3 años ( $p =0.0011$ ). De nuevo los niveles de sAXL se correlacionaron con los proteína C reactiva, IL-6 y TNF-alfa, lo que según los autores respaldaba la implicación de sAXL en los procesos inflamatorios, la activación endotelial y la regulación inmunitaria.

#### **4.2 GAS6 (growth-arrest specific gene 6)**

GAS6 es el ligando para el receptor de la tyrosine kinasa AXL.

Se ha descrito su participación fundamentalmente en la supervivencia celular frente a apoptosis pero diferentes estudios experimentales también han mostrado su implicación en los mecanismos de proliferación, adhesión y migración celular<sup>95</sup>

Como se ha mencionado previamente varios estudios clínicos han evaluado los niveles plasmáticos de sAxl y su ligando GAS6 y sus implicaciones pronósticas en diferentes enfermedades con base inflamatoria como la sepsis, la obesidad o el lupus eritematoso sistémico, encontrando correlación entre los niveles de GAS6 y el grado de actividad de la inflamación y de severidad de la enfermedad.

Por su colaboración en la activación endotelial se ha implicado a GAS6 en la aterosclerosis<sup>101</sup>. Se ha publicado que su expresión está inducida por citocinas antiinflamatorias y que actúa a nivel de la pared vascular disminuyendo la expresión de TNF (proinflamatorio) y de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1). Estos datos harían pensar en un papel protector del GAS6 en la aterosclerosis, a través de la disminución de la actividad proinflamatoria.

En la misma línea está un estudio publicado evaluando los niveles circulantes de GAS6 en adolescentes con obesidad o sobrepeso<sup>102</sup>, considerando la obesidad como una enfermedad inflamatoria crónica. Los niveles circulantes de GAS6 y AXL se correlacionaron con los niveles plasmáticos de TNF-alfa, IL-6 y proteína c reactiva (citocinas inflamatorias). Estos estudios clínicos parecen confirmar la participación de los receptores TAM y sus ligandos en la regulación de la inflamación.

### 4.3 Lipoproteína fosfolipasa A2 (Lp-PLA2)

La fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2) es una enzima asociada con el cLDL, especialmente con las partículas pequeñas densas de cLDL. Es secretada principalmente por macrófagos y linfocitos T. Dos terceras partes circulan unidas a LDL y el resto unido a HDL y lipoproteínas de muy baja densidad. En consecuencia, se asume que el efecto final de la Lp-PLA2 depende de su distribución entre LDL y HDL. Actúa hidrolizando fosfolípidos y ácidos grasos oxidados, contribuyendo a la formación de las partículas LDL oxidadas que tienen un elevado efecto aterogénico y proinflamatorio<sup>103</sup>. Esta acción tiene lugar en la capa íntima de las arterias y conduce al desarrollo de aterosclerosis. El estrés oxidativo es una pieza clave en la aterogénesis ya que los productos derivados de la oxidación de lípidos generan radicales libres responsables de la inflamación de la pared vascular, contribuyendo a la formación, progresión y ruptura de lesiones ricas en lípidos.

Teniendo en cuenta el papel de Lp-PLA2 en el desarrollo de la aterosclerosis, los niveles circulantes de Lp-PLA2 se han propuesto como marcadores de riesgo cardiovascular en base a numerosos estudios epidemiológicos<sup>103,104-106</sup>. La asociación entre los niveles de Lp-PLA2 y el riesgo cardiovascular fue inicialmente descrita por el estudio WOSCOPS de prevención primaria, en que los valores elevados de Lp-PLA2 en individuos aparentemente sanos condicionaba un aumento del 18% del riesgo de presentar eventos cardiovasculares en el futuro. Resultados muy similares se publicaron con el estudio MONICA que incluyó casi mil individuos sanos, con valores de colesterol moderadamente elevados, y en los que en un seguimiento a 6 años, los niveles elevados de Lp-PLA2 también se asociaron a mayor riesgo de sufrir eventos coronarios en el seguimiento. Varios

estudios en prevención secundaria<sup>107,108</sup> de enfermedad cardiovascular también han mostrado la utilidad de Lp-PLA2 en la predicción de eventos cardiovasculares. Todos estos trabajos han contribuido a considerar la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2) un biomarcador del desarrollo de lesiones arterioscleróticas en la población general. Además de los estudios epidemiológicos clínicos, a nivel experimental, se ha reportado un incremento de la expresión de Lp-PLA2 en macrófagos de lesiones ateroscleróticas y una asociación entre la expresión de Lp-PLA2 y la vulnerabilidad de la placa, tanto en humanos como en animales<sup>109-111</sup>.

Pocos datos hay en la literatura sobre el papel de Lp-PLA2 como predictor de eventos cardiovasculares en pacientes trasplantados de corazón. Un estudio previo en pacientes con enfermedad vascular del injerto mostró niveles significativamente más elevados de Lp-PLA2 en pacientes con lesiones coronarias en el IVUs<sup>112</sup>. Otro estudio publicado en un grupo de 140 pacientes trasplantados de corazón valoró el papel de everolimus en la modificación de los factores de riesgo cardiovascular. Respecto al régimen de inmunosupresión convencional basado en el uso de anticalcineurínicos y micofenolato mofetil, la introducción de everolimus se asoció a una significativa menor actividad de la Lp-PLA2 en plasma y de marcadores de estrés oxidativo (LDL oxidado)<sup>113</sup>. No hubo diferencias en el nivel de lípidos ni de glucosa ni de los marcadores de inflamación. No se valoró la repercusión en cuanto a la aparición de eventos clínicos en el seguimiento.

#### **4.4 GDF15 (growth differentiations factor 15)**

El factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF-15), es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). GDF-15 se sintetiza inicialmente como un precursor inactivo que posteriormente es escindido para liberar el fragmento C-terminal que será biológicamente activo.

En los seres humanos, GDF-15 puede ser secretado por una gran variedad de células en condiciones fisiológicas por lo que se han descrito diversas funciones biológicas<sup>114</sup>. En diferentes tipos de cánceres, como el colorrectal, el de mama y próstata, la expresión de GDF-15 se incrementa de forma espectacular y los niveles de GDF-15 en suero parecen ser útiles en la estratificación pronóstica en estos pacientes.

A nivel cardiovascular se sabe que la expresión de GDF está incrementada en los miocitos, en las células endoteliales, en las células musculares lisas y en los adipocitos en respuesta al estrés mecánico, a la isquemia y a diferentes citocinas proinflamatorias. Este incremento de su expresión parece tener como objetivo contrarrestar el daño cardiovascular por lo que a la molécula de GDF15 se le confieren propiedades antiapoptóticas, antihipertróficas y antiinflamatorias. Diferentes estudios<sup>115-117</sup> han mostrado que los niveles elevados de GDF-15 son predictores de eventos y de mortalidad cardiovascular en diferentes circunstancias; en pacientes sanos de edad avanzada, en individuos que han sufrido un evento coronario, en pacientes con insuficiencia cardíaca o fibrilación auricular. Podría ser interpretado como un marcador de severidad de la enfermedad en diferentes patologías cardiovasculares.

No disponemos de datos sobre la determinación de este biomarcador en pacientes trasplantados de corazón.

#### 4.5 Troponina ultrasensible (cTnT-hs)

La troponina cardíaca (cTn) es un marcador muy sensible y específico de lesión miocárdica y es en la actualidad el biomarcador recomendado para el diagnóstico de infarto agudo de miocardio. La mayoría de los inmunoanálisis actuales no permiten detectar algunos de los valores de cTn ligeramente superiores al percentil 99 que puede haber en las fases iniciales de los infartos de miocardio sin elevación del segmento ST y no detectar algunos infartos de pequeño tamaño. Sin embargo los métodos de alta sensibilidad (hs-cTn), permiten determinar concentraciones de cTn 5-10 veces menores que las detectadas por los métodos actuales y con menos imprecisión analítica, lo que ha convertido a la hs-cTn en el marcador del daño microcelular.

En los pacientes receptores de un trasplante cardíaco, en los últimos años se ha analizado la utilidad de la determinación de cTn como alternativa no invasiva en el diagnóstico del rechazo agudo. Estudios recientes<sup>118-119</sup> utilizando cTnT-hs, han mostrado que los pacientes con mayores grados histológicos de rechazo en las biopsias endomiocárdicas presentan niveles significativamente superiores de cTnT-hs con una elevada sensibilidad (84-100%) y valor predictivo negativo (cercano al 100%) aunque con baja especificidad (60%) y valor predictivo positivo del 18%.

También se ha evaluado la utilidad de la determinación de cTnT-hs en la enfermedad vascular del injerto. Un estudio previo mostró una correlación entre los niveles de cTnI, el grado de severidad de las lesiones coronarias detectadas en el cateterismo cardíaco y la aparición de eventos cardíacos en el seguimiento de receptores de trasplante cardíaco<sup>88</sup>. Los niveles de cTnT-hs también han mostrado ser más útiles en la predicción de eventos adversos en el seguimiento que otros parámetros<sup>89</sup>. En un estudio de receptores de

trasplante cardiaco se evaluó la utilidad de la cardioRM y de las cTnT-hs en la predicción de eventos clínicos en pacientes con EVI angiográfica. El índice de reserva de perfusión miocárdica cuantitativa por cardioRM, utilizado como marcador de integridad microvascular y los niveles de cTnT-hs, marcador de daño miocárdico microcelular, fueron predictores independientes de eventos cardiacos<sup>120</sup>

La tabla 4 esquematiza los diferentes biomarcadores plasmáticos objetivo de nuestro estudio y los estudiados hasta la actualidad, así como los mecanismos fisiopatológicos con los que están relacionados.

**Tabla 4: BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA EVI**

Mecanismos	Biomarcadores Estudiados	Biomarcadores Objetivo del estudio
Inflamación	PCR <sup>4</sup> V-CAM <sup>26</sup> I-CAM <sup>9</sup>	sAXL GAS6
Insuficiencia cardiaca	BNP <sup>86,87</sup> ST2 <sup>85</sup>	
Disfunción endotelial	Von Willebrand <sup>82</sup> tPA <sup>83,84</sup>	Lp-PLA2 GDF-15
Daño miocárdico	cTnT-hs <sup>88,89</sup>	cTnT-hs
Proteómica	Panel de 18 proteínas <sup>90</sup>	
Genéticos	AlloMap <sup>93</sup>	
miRNAs	niRNAs endoteliales <sup>4,94</sup>	
Inmunológicos	DSA <sup>4,37,40,42,43</sup> anti-MICA <sup>46</sup>	Poblaciones linfocitarias

PCR: proteína C reactiva, V-CAM: molécula de adhesión celular, I-CAM: molécula de adhesión intercelular; cTnT-hs: troponina T de alta sensibilidad; DSA: anticuerpos antidonante específico; tPA :activador tisular del plasminógeno

## 5- TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD VASCULAR DEL INJERTO

Probablemente una de las principales limitaciones para conseguir mejorar la supervivencia a largo plazo de los pacientes trasplantados de corazón es la ausencia de un tratamiento eficaz. Cuando la EVI está establecida ningún tratamiento ha demostrado ser de utilidad en el control de su desarrollo, la enfermedad continúa progresando y conduce a la pérdida del injerto.

El tratamiento inmunosupresor de mantenimiento en los receptores de un trasplante cardíaco, habitualmente incluye la combinación de un fármaco inhibidor de la calcineurina (tacrolimus o ciclosporina) con un fármaco inhibidor del ciclo celular (azatioprina o micofenolato) junto o no a esteroides. Esta estrategia inmunosupresora es la que ha demostrado ser más útil en la prevención del rechazo celular, sin embargo no ha demostrado ser útil en prevenir la aparición de enfermedad vascular del injerto ni en modificar la progresión de la misma. Tampoco existe evidencia consistente sobre el papel de los nuevos fármacos inmunosupresores (everolimus y sirolimus) en evitar la progresión de la enfermedad una vez está establecida. Sirolimus demostró reducir la progresión de la vasculopatía del injerto y se asoció a menor incidencia de eventos clínicos adversos en el seguimiento en un grupo de pacientes diagnosticados de EVI por la presencia de lesiones angiográficas o hiperplasia intimal en el IVUS <sup>121-124</sup>. En el estudio EVEROSTAT<sup>125</sup>, en pacientes con EVI, la adición de everolimus al tratamiento inmunosupresor convencional no redujo la incidencia de eventos cardiovasculares mayores. No se dispone pues, de suficiente evidencia científica a favor del papel de los nuevos inmunosupresores,

everolimus y sirolimus, en la prevención de la progresión de la EVI una vez ya está establecida, para establecer una recomendación formal al respecto.

La afectación difusa del árbol coronario en la EVI dificulta la aplicación de las técnicas de revascularización quirúrgicas y percutáneas. La opción quirúrgica es excepcional y se asocia a una elevada mortalidad<sup>126</sup>. Por el contrario la revascularización percutánea de las lesiones focales significativas es una práctica habitual. La introducción de los stents farmacoactivos ha permitido disminuir la tasa de reestenosis<sup>127-128</sup>, que ha sido siempre superior a la de los pacientes con cardiopatía isquémica. Recientemente se ha publicado<sup>129</sup> que en pacientes con EVI y lesiones angiográficamente severas la revascularización percutánea acompañó de una disminución significativa de la mortalidad a 2 y 5 años respecto a pacientes con EVI severa y anatomías no favorables para las técnicas de revascularización. Aunque son escasas las publicaciones que valoran el impacto sobre la supervivencia de las técnicas de revascularización, en ausencia de un tratamiento definitivo, la revascularización percutánea si es factible, probablemente deba plantearse en los pacientes trasplantados de corazón con EVI severa.

El retrasplante sería el tratamiento definitivo para la enfermedad vascular del injerto. A parte del riesgo quirúrgico y de la recidiva de la EVI en el nuevo corazón implantado<sup>130</sup>, las connotaciones éticas de esta decisión, en la situación actual de escasez de donantes, hacen que el retrasplante sea una opción excepcional<sup>65</sup>.

## **6- PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD VASCULAR DEL INJERTO**

En ausencia de un tratamiento eficaz para la EVI la prevención se plantea como el mejor abordaje de la enfermedad. La prevención debe iniciarse precozmente, ya que los cambios a nivel de la pared vascular ocurren en gran parte durante el primer año postrasplante.

### **6.1 Control de los factores de riesgo cardiovascular clásicos**

Los factores de riesgo cardiovascular clásicos son muy prevalentes en la población de pacientes trasplantados de corazón como se ha mencionado previamente. En el apartado de fisiopatología de la EVI se explicó la correlación entre los factores de riesgo cardiovascular con el desarrollo de la enfermedad. En este apartado se mencionará la evidencia sobre la influencia del tratamiento de dichos factores de riesgo en la prevención de su aparición y las recomendaciones establecidas al respecto.

En los pacientes con diabetes mellitus se han correlacionado los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) con la severidad de la EVI detectada tanto por angiografía como por IVUs<sup>131</sup>, por lo que se recomienda un manejo estricto de la glucemia. En general se considera que el tratamiento de la diabetes mellitus postrasplante debe regirse de acuerdo con las guías de práctica clínica de la diabetes mellitus de la población general buscando los mismos objetivos en cuanto a cifras de hemoglobina glicada y protección de órganos diana.

La hipertensión arterial es otro de los factores de riesgo que debe tratarse farmacológicamente si es preciso con el objetivo de evitar la progresión de la EVI.

Diferentes estudios han mostrado una reducción del diámetro angiográfico luminal arterial, menor incidencia de EVI y mortalidad asociada al uso de antagonistas del calcio tipo diltiazem <sup>132</sup>. El grupo de Stanford <sup>133</sup> realizó un estudio prospectivo randomizado valorando el efecto del diltiazem en el desarrollo de EVI. En un seguimiento a 5 años los pacientes que recibieron diltiazem presentaron mayor supervivencia, menos trasplante y menos evidencia de EVI angiográfica que aquellos que no recibieron diltiazem (56 % vs 30%, p= 0.04). Recientemente Delgado y colaboradores <sup>49</sup> en un estudio encaminado a valorar la influencia del CMV en el desarrollo de la EVI, observaron en el análisis multivariado que el uso de diltiazem se acompañó de un efecto protector respecto a la aparición de EVI. A pesar de estos datos, la ausencia de grandes estudios randomizados no permite realizar una recomendación farmacológica específica para el control de la TA. La elección del tratamiento depende del grado del control tensional alcanzado, siendo preferible la utilización de IECAs o ARA II en pacientes diabéticos, aunque pudiendo contemplar la introducción de un antagonista del calcio como primera elección <sup>65</sup>.

La dislipemia también puede contribuir a la progresión de la aterosclerosis, en parte mediado por mecanismos inmunológicos. En pacientes trasplantados de corazón el uso de estatinas se acompañó de una disminución significativa del rechazo con compromiso hemodinámico y de la detección de EVI por IVUS al año del trasplante <sup>134</sup>, por lo que en base a estos resultados, independientemente de los niveles de colesterol, en los pacientes trasplantados de corazón, se recomienda la utilización de estatinas a partir de la primera o segunda semana del trasplante <sup>65,135,136</sup>.

## **6.2 Tratamiento y prevención de citomegalovirus**

La prevención frente a la infección por CMV puede abarcar desde la profilaxis universal hasta el tratamiento anticipado mediante la detección de replicación del virus en sangre. Algunos trabajos han mostrado que una pauta de profilaxis agresiva contra CMV se asocia a una reducción de la incidencia de rechazo así como a una atenuación de la vasculopatía del injerto<sup>137,138</sup>. Esta misma conclusión es la que se extrae de los resultados del estudio de Delgado y colaboradores<sup>49</sup> sobre el impacto de la infección por CMV en el desarrollo de EVI, que abogaría por la profilaxis universal en vez de la terapia de anticipación. Aún así no está consensuada la profilaxis universal y las guías de la ISHLT recomiendan profilaxis en aquellos pacientes con discordancia donante/receptor (serología positiva en donante y negativa en receptor), mientras que en el caso de que la serología del receptor sea positiva sería válido realizar tanto profilaxis como terapia anticipada con monitorización de la replicación viral.

## **6.3 Papel del tratamiento inmunosupresor en la prevención de la EVI**

El tratamiento inmunosupresor convencional con inhibidores de la calcineurina asociados a micofenolato con o sin esteroides, ha conseguido un buen control del rechazo. Sin embargo no es tan efectivo en la prevención del desarrollo de la enfermedad vascular del injerto. La introducción de micofenolato mofetil en sustitución de azatioprina se acompañó de una reducción significativa de la mortalidad y del rechazo con compromiso hemodinámico al año y 3 años de seguimiento en un estudio randomizado<sup>139</sup>. Además, respecto al desarrollo de EVI, Kobashigawa y colaboradores publicaron menor hiperplasia intimal por IVUS al año del trasplante en pacientes que recibían micofenolato respecto los

que se trataron con azatioprina<sup>140</sup>. La aparición a principios de los años 2000 de everolimus y sirolimus, útiles en el control de la proliferación de las células musculares lisas y fibroblastos, ofrecía nuevas estrategias terapéuticas atractivas para conseguir el control de la enfermedad vascular<sup>141</sup>. Everolimus asociado a ciclosporina de novo<sup>142</sup> se acompañó de menor grado de hiperplasia intimal al año, menor incidencia de rechazo agudo y de infección por CMV en los primeros seis meses, que la asociación clásica de ciclosporina y azatioprina. Resultados similares se publicaron en un seguimiento a 12 y 24 meses, con sirolimus de novo asociado a ciclosporina<sup>143</sup>. También respecto a micofenolato everolimus se asoció a menor grado de hiperplasia intimal al año por IVUS (12.5 % vs 26.7 % p=0.018)<sup>144</sup>.

Este efecto beneficioso de everolimus y sirolimus de novo en la prevención de la enfermedad vascular del injerto a los 12-24 meses del trasplante sin embargo no ha demostrado mantenerse a lo largo del seguimiento. Dos estudios recientes<sup>145-146</sup> han mostrado que tras un seguimiento de 4 y 8 años respectivamente, el uso de everolimus de novo junto con un inhibidor de la calcineurina no se acompañó de menor incidencia de EVI a largo plazo respecto la estrategia convencional de un inhibidor de la calcineurina y micofenolato.

Las guías de la Sociedad Internacional de Trasplante sugieren que el uso de mTOR debe incluirse en los regímenes inmunosupresores con el objetivo de reducir el inicio o la progresión de la EVI con un grado de recomendación IIa y un nivel de evidencia B<sup>65</sup>. A pesar de ello la elevada incidencia de efectos adversos con estos fármacos representa uno de los principales inconvenientes para su utilización<sup>147</sup>.



# **HIPOTESIS**



## **HIPÓTESIS**

La monitorización en sangre periférica de moléculas implicadas en la inflamación y disfunción endotelial, en la respuesta aloinmune mediada por linfocitos T y marcadores de daño miocárdico, detectará de manera no agresiva y precoz el desarrollo de EVI y permitirá predecir el riesgo de desarrollar eventos clínicos a lo largo del seguimiento en pacientes receptores de un trasplante de corazón.



# OBJETIVOS



### **3- OBJETIVOS**

El objetivo principal del estudio es analizar si los biomarcadores séricos sAXL, GAS6, Lp-PLA2, GDF-15 y cTnT-hs permiten identificar la presencia de enfermedad vascular del injerto en los receptores de trasplante cardíaco.

#### Objetivos secundarios

- 1- Evaluar la utilidad del estudio de la respuesta aloinmune en los receptores de trasplante cardíaco mediante el análisis de las poblaciones linfocitarias en la identificación de EVI.
- 2- Evaluar el uso combinado de diferentes biomarcadores en la mejoría discriminativa del diagnóstico de EVI.
- 3- Estudiar la asociación de las variables clásicamente relacionadas con el desarrollo de la EVI y los biomarcadores sAXL, Lp-PLA2, GAS 6, GDF15 y cTnT-hs.
- 4- Estudiar el valor pronóstico de los niveles en sangre periférica de los biomarcadores sAXL, GAS6, Lp-PLA2, GDF-15 y cTnT-hs en los receptores de trasplante cardíaco.
- 5- Analizar el valor pronóstico de los niveles en sangre periférica de los biomarcadores sAXL, GAS6, Lp-PLA2, GDF-15 y cTnT-hs en los pacientes con enfermedad vascular del injerto moderada-severa.



# **MATERIAL Y METODOS**



## **4- MATERIAL Y METODOS**

### **4.1-Diseño del estudio**

Se ha realizado un estudio transversal en pacientes trasplantados de corazón para evaluar la utilidad de los biomarcadores en sangre en detectar la enfermedad vascular del injerto.

Se han obtenido muestras sanguíneas para realizar determinaciones de sAXL, Lp-PLA2, GAS6, GDF15 y cTnT-hs y se han correlacionaron los resultados de las determinaciones con la presencia y severidad de la enfermedad vascular del injerto en la coronariografía o TAC coronario. En un subgrupo de pacientes se analizaron las poblaciones linfocitarias y se correlacionaron con la presencia de EVI.

### **4.2 -Población a estudio**

Desde el año 1984 en que se inició en nuestro centro el programa de Trasplante Cardíaco se han llevado a cabo 508 procedimientos. En la actualidad existen 201 pacientes en seguimiento activo, de los cuales 96 fueron incluidos en el estudio. Se excluyeron 56 por no disponer de una coronariografía o TAC coronario recientes o no estar programada su realización durante el tiempo en el que se desarrolló este estudio, 26 pacientes por tener menos de un año de evolución, 17 por presentar insuficiencia renal que contraindicaba el uso de contraste yodado para la realización del TAC coronario o coronariografía y 6 pacientes por residir y realizar seguimiento fuera de nuestra comunidad. La figura 17 muestra el esquema de selección de pacientes para su inclusión en el estudio.

De acuerdo con el protocolo asistencial del hospital se realiza coronariografía al año del trasplante y posteriormente coronariografía o TAC coronario a los dos años, 5 años y sucesivamente cada 5 años y siempre que exista alguna situación clínica en la que se considere que está indicada su realización. La selección de los pacientes se llevó a cabo en el momento de la realización del estudio angiográfico.

Para realizar el análisis de los biomarcadores en sangre se elaboró una seroteca. Las muestras sanguíneas se obtuvieron en el momento de la extracción de la analítica rutinaria por punción venosa. Tras ser centrifugadas se almacenaron a -80°C. Las muestras de sangre podían diferir como máximo 6 meses desde la realización del estudio coronario.

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado en el momento de su inclusión en lista de espera de trasplante que incluye la aceptación de la obtención de muestras sanguíneas para el análisis con fines de investigación. Asimismo firmaron consentimiento informado para la realización de las exploraciones complementarias necesarias para el estudio de la evolución del injerto, en este caso coronariografía y/o TAC coronario.

El período de estudio en el que se reclutaron los pacientes incluyó desde enero del 2012 hasta febrero de 2014.

## SELECCIÓN DE PACIENTES PARA SU INCLUSION EN EL ESTUDIO

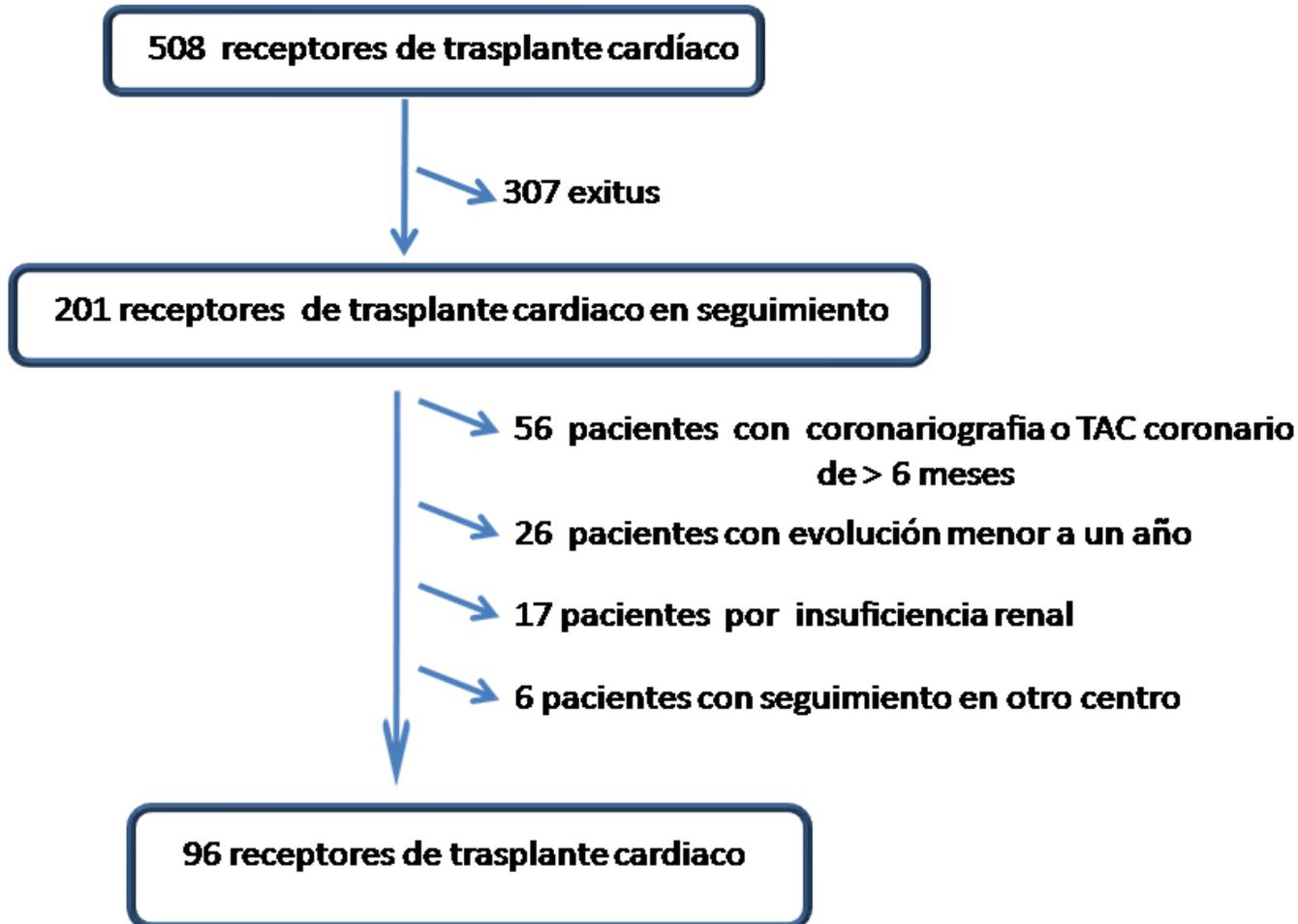


Figura 17: esquema de selección de pacientes para el estudio. Del total de 508 pacientes trasplantados en nuestro centro 201 están en seguimiento activo. De ellos finalmente 96 participaron en el estudio tras diferentes motivos de exclusión, siendo el principal el no disponer de un estudio coronario.

En un estudio piloto analizamos las poblaciones linfocitarias Th1 y T reguladoras, en un grupo de 33 pacientes receptores de trasplante cardíaco; 20 pacientes en seguimiento a lo largo de su primer año postrasplante y 13 pacientes en seguimiento crónico. Se estudió la evolución de las poblaciones linfocitarias Th1/Treg a lo largo de 2 años de seguimiento y la asociación del cociente Th1/Treg con el desarrollo de EVI.

En la muestra de 96 pacientes, que son objeto de este estudio, se analizó la asociación del cociente Th1/Treg con la presencia de EVI en un subgrupo de 24 pacientes.

### **4.3 -Variables del estudio**

La Tabla 6 muestra las variables incluidas en el estudio.

#### **4.3.1 Variables clínicas**

De manera retrospectiva se recogieron aquellas variables que clásicamente se han correlacionado con el desarrollo de la enfermedad vascular del injerto: edad del receptor, edad del donante, enfermedad de base que conduce al trasplante, tiempo de isquemia, factores de riesgo cardiovascular clásicos en el receptor, porcentaje de rechazo en el primer año de seguimiento y la infección por CMV a lo largo del primer año tras el trasplante<sup>3,4,9,10,47-50,52-54</sup>. También se recogieron los datos en relación al tratamiento inmunosupresor y a la función renal.

Factores de riesgo cardiovascular clásicos. Se recogieron de manera retrospectiva los factores de riesgo cardiovascular clásicos, hipertensión arterial, diabetes, dislipemia en el momento de la inclusión del paciente en lista de espera. Se consideró presencia de HTA

la determinación en 2 o más ocasiones de cifras de TA>140/90. Se consideró presencia de DM y/o dislipemia en caso que fuera acompañada de tratamiento farmacológico.

Infeción por CMV. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes para registrar la presencia o no de infección por CMV. El estudio incluye pacientes de diferentes cohortes y los criterios y métodos diagnósticos han sido diferentes a lo largo de los años.

En las cohortes iniciales el diagnóstico de infección por CMV se basó en la detección de antigenemias positivas para CMV en sangre u orina, normalmente coincidiendo con manifestaciones clínicas o determinadas alteraciones analíticas como elevación de transaminasas o leucopenia.

Tras la introducción de la técnica de reacción de la polimerasa cuantitativa para CMV (PCR de CMV) la detección de replicación de CMV se ha aplicado, de acuerdo con el protocolo asistencial del centro, de manera mensual durante el primer año de seguimiento. En las cohortes más recientes la enfermedad por CMV se definió como la presencia de replicación en sangre que se siguió de tratamiento antiviral.

Porcentaje de rechazo en el primer año: se revisaron los resultados de las biopsias endomiocárdicas (BEM) realizadas durante el primer año en los pacientes incluidos en el estudio. Se reclasificaron según la nomenclatura actualizada en 2004 por la ISHLT<sup>148</sup>, como se muestra en la Tabla 5.

La variable porcentaje de rechazo en el primer año se definió como el cociente entre el número de biopsias con un grado de rechazo significativo ( $\geq 2R$ ) respecto del total de biopsias practicadas en el primer año de seguimiento.

Porcentaje de rechazo primer año=  $BEM_{\geq 2R} / BEM \text{ totales en el primer año}$

Tratamiento inmunosupresor. Se recogió el tratamiento inmunosupresor en los pacientes trasplantados de corazón. De acuerdo con el protocolo asistencial de nuestro centro, habitualmente los pacientes realizan triple terapia que incluye: un anticalcineurínico (tacrolimus o ciclosporina), un antimetabolito (micofenolato, micofenólico o azatioprina) o un inhibidor de la señal de proliferación (everolimus o sirolimus) y esteroides (dosis y niveles establecidos según protocolo).

Función renal: se recogió la función renal de la analítica que coincidió con la obtención de la muestra sanguínea para seroteca. Se expresó la cifra de creatinina en mg /dl.

Todos los pacientes incluidos en el estudio siguieron los controles ambulatorios rutinarios y se recogió la presencia o aparición de eventos clínicos cardiovasculares. Se definió un objetivo clínico combinado que incluyó: muerte de causa cardiovascular, infarto de miocardio, descenso de la fracción de eyección en el ecocardiograma (excluyendo el rechazo agudo) y/o signos o síntomas de insuficiencia cardíaca. El diagnóstico de la causa de muerte si no se produjo en nuestro centro se recogió de los informes de la historia clínica compartida de Catalunya, el diagnóstico de infarto se realizó por la presencia de cambios en el ECG y/o elevación de marcadores de lesión miocárdica y/o datos en las técnicas de imagen compatibles con infarto de miocardio (cardioRM o ecocardiograma). Se evaluó la fracción de eyección de manera rutinaria con ecocardiograma y en algún caso con cardioresonancia.

**Tabla 5: Nomenclatura recomendada por la ISHLT en el diagnóstico de rechazo cardíaco y correlación con los hallazgos histológicos**

<b>Grado 0R</b> <b>Sin rechazo</b>	Sin rechazo. Miocardio sin lesiones
<b>Grado 1R</b> <b>Rechazo leve</b>	Incluye los grados de la clasificación antigua -Grado 1A: rechazo leve focal. Infiltrado linfocitario focal (perivascular o intersticial) sin miocitolisis en una o más piezas. -Grado 1B: rechazo leve multifocal. Infiltrado linfocitario disperso, difuso, sin miocitolisis en una o más piezas -Grado 2: rechazo moderado focal. Infiltrado agresivo focal con miocitolisis o distorsión del miocardio. Infiltrado compuesto de linfocitos y a veces eosinófilos
<b>Grado 2R</b> <b>Rechazo moderado</b>	Rechazo moderado multifocal. Infiltrados agresivos con miocitolisis multifocal en una o más piezas
<b>Grado 3R</b> <b>Rechazo severo</b>	Incluye los grados de la clasificación antigua -Grado 3B: rechazo moderado-grave. Inflamación agresiva difusa con miocitolisis. Puede haber polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos y hemorragia - Grado 4: rechazo grave. Inflamación difusa agresiva con miocitolisis, endotelitis y vasculitis, hemorragia, polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos.

J Heart LungTransplant 2005; 24(11):1710-1720

#### **4.3.2 Variables angiográficas**

El diagnóstico de EVI se hizo mediante coronariografía o TAC de arterias coronarias. Se revisaron las TACs de coronarias y las coronariografías realizadas a los pacientes del estudio, clasificándolas según la nomenclatura recomendada por la ISHLT.

La TAC de arterias coronarias se realizó con un tomógrafo de 256 cortes (iCT 256, Philips Healthcare, Amsterdam, Países Bajos). La técnica utilizada se describe a continuación: Obtención de un volumen cardíaco mediante adquisición prospectiva en 2 latidos cardíacos, sincronizada con el ECG, y ajustada a fases diastólicas. Reconstrucción con espesor de corte de 0.8 mm. Análisis multiplanar y 3D de la anatomía cardio-torácica. Se administró premedicación con metoprolol (ev) 15 mg. si se consideró indicado por el cardiólogo radiólogo. Se utilizó contraste yodado (concentración 350 mg/ml). El volumen administrado de contraste promedio fue de 70 ml, por infusión endovenosa periférica a 6 ml/s. Las imágenes se analizaron en estaciones de trabajo off-line.

La coronariografía se realizó en el Laboratorio de Hemodinámica. La técnica se describe a continuación. Tras obtener el acceso arterial (radial o femoral) se inserta el catéter y se progresa hasta los senos de Valsalva bajo control fluoroscópico. Una vez se accede al árbol coronario se administra contraste yodado, habitualmente 8 ml para las proyecciones del árbol izquierdo y volúmenes de 6 ml para las proyecciones del árbol derecho. Para el análisis del árbol coronario se realizaron 5 proyecciones del árbol izquierdo y 3 proyecciones del árbol coronario derecho.

La nomenclatura recomendada por la ISHLT y la que se ha seguido para la clasificación de la EVI en este estudio es la que se recoge en la tabla 2.

### 4.3.3 Biomarcadores

En las muestras sanguíneas obtenidas y almacenadas se determinaron las concentraciones de los biomarcadores sAxl, GAS6, Lp-PLA2, cTn-hs y GFD-15. En un subgrupo de pacientes se analizaron las poblaciones linfocitarias.

#### 4.3.3.1 Biomarcadores no inmunológicos

- sAXL: Los estudios de las concentraciones sAxl se realizaron mediante un sistema ELISA modificado en el Departamento de muerte y proliferación celular del Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) y IDIBAPS. Las concentraciones de sAxl se expresaron en ng/l.

- GAS6: La determinación de las concentraciones de GAS6 se realizaron mediante un sistema de ELISA validado en el Departamento de muerte y proliferación celular del Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) y IDIBAPS. Las concentraciones de GAS6 se expresaron en ng/l.

- Lp-PLA2: Para la medición de la actividad total de la LP-PLA2, así como la respectiva actividad asociada a las lipoproteínas LDL y HDL, se utilizó 2-tio-PAF (Cayman) como sustrato<sup>149</sup>. La actividad de Lp-PLA2 se expresó en  $\mu\text{mol}/\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}$ . Para determinar la distribución de la Lp-PLA2 entre las fracciones de lipoproteínas, se precipitaron las lipoproteínas que contienen ApoB (VLDL, LDL-C, y la Lp (a) a partir de suero utilizando sulfato de dextrano. La actividad Lp-PLA2 del sobrenadante no precipitado corresponde a la actividad asociada con HDL (HDL-Lp-PLA2); la actividad Lp-PLA2 asociada a LDL (LDL-Lp-PLA2) se obtuvo por diferencia entre la actividad total del suero y la asociada a HDL. La determinación de los niveles plasmáticos de Lp-PLA2 se ha llevado a cabo en el Laboratorio de lípidos del Departamento de Bioquímica del Hospital de Sant Pau.

- GDF-15: La determinación de los niveles de GDF-15 en plasma se realizó mediante un sistema ELISA en el Laboratorio del Departamento de Bioquímica del Hospital de Sant Pau. La concentración de GDF-15 se midió en pg/ml

- cTnT-hs: La determinación de cTnT-hs se analizó mediante un método electroquimioluminométrico (Roche-Diagnostics; Basilea, Suiza), en el Laboratorio del Departamento de Bioquímica del Hospital de Sant Pau. La concentración de cTnT-hs se expresó en ng/l.

#### 4.3.3.2 Biomarcadores inmunológicos

- El estudio de poblaciones linfocitarias, CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, Th1 (CD3+ CD4+ IFN+) y Treg (CD4+ CD25high FoxP3+), se realizó en el Laboratorio de inmunología por técnicas de citometría de flujo. Se definió el cociente Th1/Treg como la relación entre las poblaciones Th1 y las poblaciones Treguladoras (Treg).

**Tabla 6. VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO**

<b>VARIABLES CLÍNICAS</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Receptor: edad , sexo, etiología de la Miocardiopatía, función renal factores de riesgo cardiovascular : HTA, DM , DLP</li><li>-Donante : edad</li><li>- Tiempo de isquemia</li><li>- Tiempo de seguimiento postrasplante</li><li>- Porcentaje de rechazo en el primer año postrasplante</li><li>- Tratamiento inmunosupresor</li><li>- Infección por CMV en el primer año postrasplante</li><li>-Eventos cardiovasculares en el seguimiento (muerte de causa cardiovascular, infarto de miocardio, descenso de la fracción de eyección y/o signos y síntomas de insuficiencia cardíaca)</li></ul>
<b>VARIABLES ANGIOGRAFICAS</b>	Clasificación de EVI angiográfica según la nomenclatura de la ISHLT : CAV0, CAV1, CAV2, CAV3
<b>VARIABLES ANALITICAS</b>	sAXL GAS6 Lp-PLA2 GDF-15 cTnT-hs Poblaciones linfocitarias y cociente Th1/Treg

HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus, DLP: dislipemia.

#### **4.4 -Análisis estadístico**

Las variables continuas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar o mediana (rango intercuartil) cuando fue apropiado. Las variables categóricas se presentaron como porcentajes, se realizaron análisis descriptivos, pruebas de chi-cuadrado. Para comparar las variables continuas se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) y se usó la prueba t de Student para muestras independientes.

Los análisis multivariantes se realizaron utilizando regresiones logísticas binarias. Las variables que en primer lugar resultaron significativas en el modelo univariado ( $p < 0,1$ ) se incluyeron en segundo lugar en el modelo multivariado y se utilizó el método "por pasos hacia atrás" para identificar los factores de riesgo independientes. Además, se evaluó el ajuste de los modelos con variables clínicamente relevantes.

Finalmente, se estudió la capacidad discriminativa de los marcadores mediante curvas ROC, se calculó la sensibilidad y especificidad y el índice "Integrated Discrimination Improvement" (IDI)<sup>150</sup> para evaluar la mejora discriminativa en la adición de un nuevo marcador.

Se consideró estadísticamente significativa una  $p < 0,05$  bilateral.

Para realizar el análisis se utilizó el programa estadístico SPSS 22.





# RESULTADOS



## 5- RESULTADOS

### 5.1- Análisis descriptivo

Las características demográficas basales de los 96 pacientes se resumen en la Tabla 7

Tabla 7. CARACTERISTICAS PACIENTES (n=96)

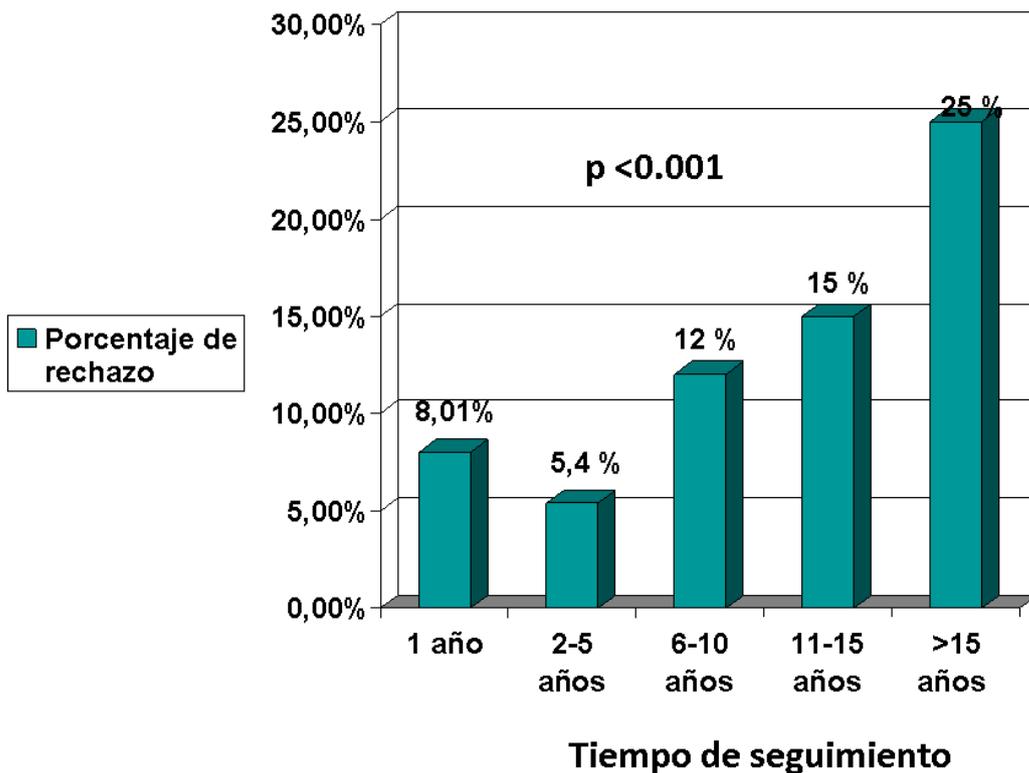
<b>Edad del receptor</b>	47,7 ± 1 años
<b>Sexo</b>	78 % varones
<b>Etiología Insuficiencia Cardíaca</b>	
- Miocardiopatía Dilatada	46,8 %
- Miocardiopatía Isquémica	24 %
- Miocardiopatía Valvular	8,3 %
- Miocardiopatía Hipertrófica	7,3 %
- Otras	13,6 %
<b>Edad del donante</b>	39,4 ±1 años
<b>Tiempo de isquemia</b>	182,05 ±5 minutos
<b>Factores de riesgo cardiovascular clásicos</b>	
- Hipertensión arterial	55 %
- Diabetes Mellitus	27,1 %
- Dislipemia	29.2 %
<b>Función renal</b>	
- Creatinina ≥ 1,5 mg/dl	80.2 %
- Creatinina < 1.5 mg/dl	16,6 %
- Diálisis	3,1 %
<b>Infección por CMV</b>	36,5 %
<b>Porcentaje de rechazo primer año</b>	12,5 %
<b>Tratamiento inmunosupresor</b>	
- Ciclosporina	36,5 %
- Tacrolimus	59,4 %
- Azatioprina	19,8 %
- Micofenolato	71,9 %
- Esteroides	100 %

El tiempo de seguimiento postrasplante del global de pacientes en el momento de su inclusión en el estudio fue de 3293.87 días (9.02 años). En 15 pacientes (15.6 %) el seguimiento era en el primer año postrasplante, 27 pacientes (28,1 %) tenían entre 2 y 5 años de seguimiento, 26 pacientes (27%) entre 6 y 10 años, 13 pacientes (13,5 %) entre 11 y 15 años y 15 pacientes (15,6%) tenían más de 15 años de seguimiento.

La insuficiencia renal avanzada fue un criterio de exclusión dado el riesgo de empeoramiento con el uso de contraste yodado. En el estudio el 80.2 % de los pacientes presentaban una creatinina <1.5 mg/dl. El 16.6 % (16 pacientes) presentaron una creatinina > 1,5 mg /dl, de los cuales 8 pacientes (8,3 % del total) tenían cifras de creatinina > 2 mg/dl. Sólo 3 pacientes (3,1 %) de todos los que formaron el grupo de estudio estaban en programa de diálisis (dos en diálisis convencional y uno en diálisis peritoneal).

El 72.2% de los pacientes presentaban serología positiva para CMV previa al trasplante. EL 71.4 %de los donantes eran seropositivos para CMV. Se realizó profilaxis contra el CMV en el 26.3 % de los pacientes.Un 36.8 % presentaron infección por CMV. Si analizamos la infección a lo largo de las diferentes épocas de seguimiento vemos que la infección por CMV ha sido más prevalente en las últimas décadas, aunque sin alcanzar la significación estadística. Un 41.2% de los pacientes estudiados con un año de seguimiento presentaron infección por CMV , mientras que tan sólo el 18.8 % de los pacientes de más de 15 años de evolución habían presentado infección por CMV en el primer año de seguimiento.

El porcentaje de rechazo en el primer año ha ido disminuyendo de manera significativa a lo largo del tiempo. Si clasificamos a los pacientes por cohortes en función del tiempo de seguimiento, como se muestra en la Figura 18 , aquellos que se incluyeron con un año de evolución presentaron un porcentaje de rechazo en el primer año del 8.01%, entre 2 y 5 años de seguimiento el porcentaje fue del 5.4 %, entre 6 y 10 años del 12%, entre 11 y 15 años del 15.1 % y en los pacientes de mas de 15 años de evolución el porcentaje de rechazo que tuvieron en el primer año postrasplante fue de 28.1 % ( $p < 0.001$ ).



**Figura 18:** Evolución del porcentaje de rechazo en el primer año postrasplante según períodos de seguimiento de los pacientes receptores de trasplante cardíaco. Como se aprecia en la figura el porcentaje de rechazo ha ido disminuyendo de manera significativa en las cohortes más recientes de pacientes.

## **5.2 -Análisis comparativo de la enfermedad vascular del injerto en el grupo a estudio**

Siguiendo la clasificación de la ISHLT, del total de 96 pacientes estudiados, en 51 pacientes (el 53.2 % del total), se documentó EVI; en 27 pacientes (28.1%) había signos de EVI ligera (CAV1), en 5 pacientes (el 5.2 %) la EVI era moderada (CAV2) y en 19 pacientes (19.79%) la EVI fue severa (CAV3). Los restantes 45 pacientes (46.8 %) no presentaron evidencia de enfermedad vascular del injerto (CAV 0). Estos datos se muestran en la Figura 19.

La prevalencia de EVI en el grupo de población estudiada fue del 6.6 % al año del trasplante, del 48.8% entre los 2 y 5 años de seguimiento, del 42.3% entre los 6 y los 10 años, del 84.6% entre los 11 y los 15 años. El 100 % de los pacientes de más de 15 años de seguimiento presentaron algún dato angiográfico de EVI. Estos datos se muestran en la Figura 20.

En la figura 21 se muestra la presencia o no de EVI y su severidad en función del tiempo de evolución postrasplante. De acuerdo con el carácter progresivo de la enfermedad los pacientes con menos tiempo de evolución tras el trasplante tienen menos vasculopatía del injerto y en caso de presentarla es menos severa; a partir de los 10 años del trasplante la mayoría de pacientes presentan datos de enfermedad vascular y en ellos la afectación es más severa.

### Enfermedad vascular del injerto

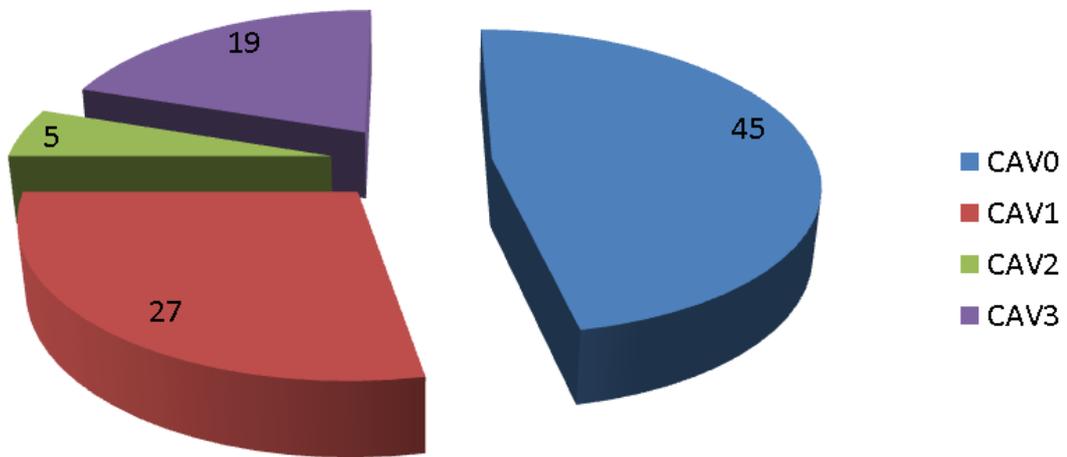


Figura 19: Distribución de la EVI en el grupo de 96 pacientes estudiados.

### Prevalencia EVI

—●— Prevalencia EVI

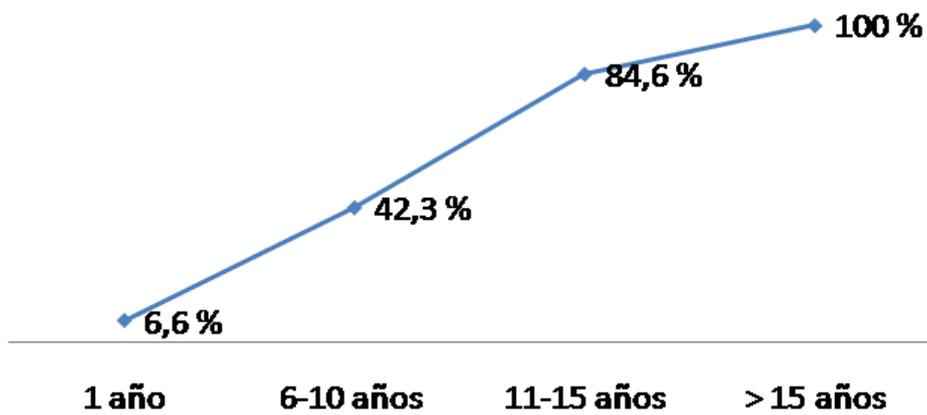
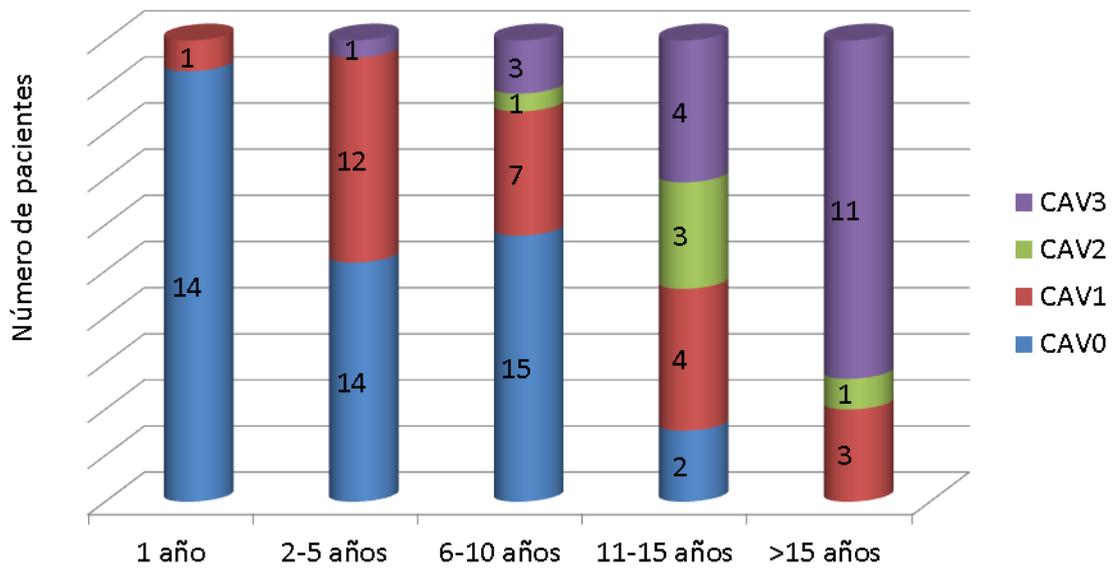


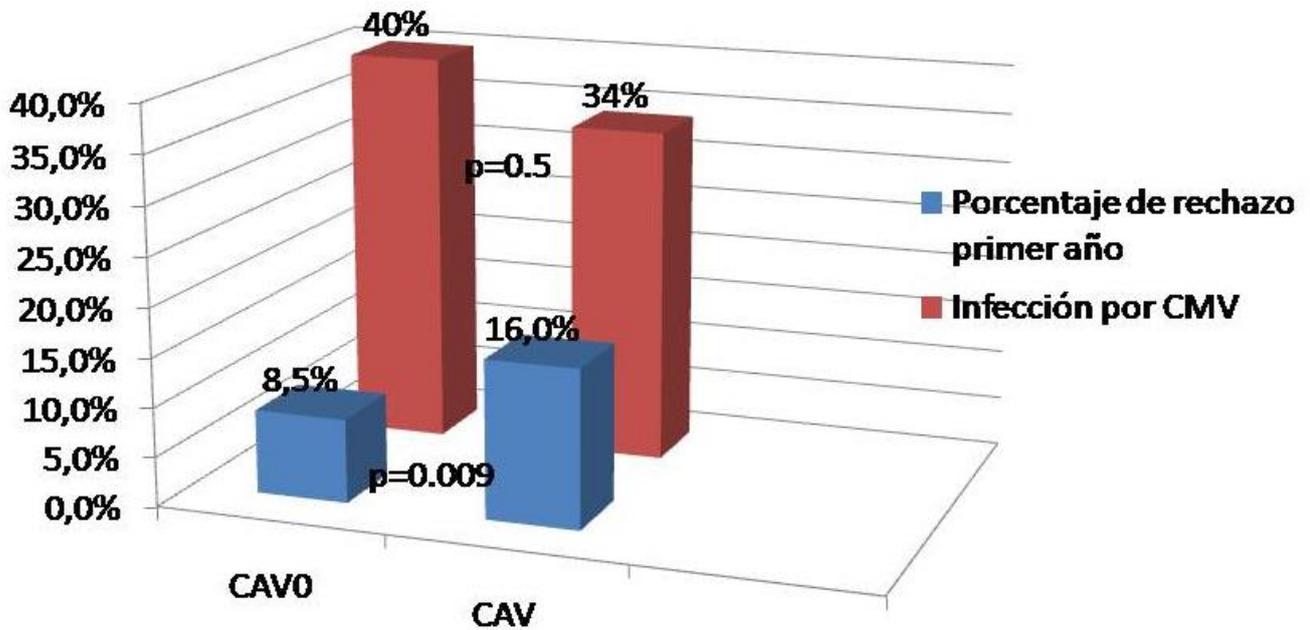
Figura 20: Evolución de la prevalencia de EVI en función del tiempo de evolución de los pacientes tras el trasplante cardíaco

### Clasificación pacientes según EVI y tiempo de evolución postrasplante



**Figura 21:** Distribución de los pacientes en función de la presencia o no de EVI y grado de severidad de la misma según el tiempo de evolución postrasplante

### 5.2.1. Enfermedad vascular del injerto, porcentaje de rechazo, infección por CMV



**Figura 22:** Correlación entre porcentaje de rechazo en el primer año y desarrollo de enfermedad vascular del injerto. Los pacientes sin EVI (CAV0) presentan un porcentaje de rechazo en el primer año de seguimiento significativamente inferior. No se encontraron diferencias significativas entre la infección por CMV y el desarrollo de EVI.

En nuestra serie el desarrollo de EVI se asoció de manera significativa a un mayor porcentaje de rechazo en el primer año (8.5 % vs 16 %;  $p=0.009$ ). Los datos se muestran en la figura 22. Gran parte de los pacientes que presentan mayor severidad de EVI, son los pacientes de épocas más antiguas en los que como hemos visto, la prevalencia de rechazo fue significativamente más elevada.

En nuestro estudio no hemos encontrado una correlación significativa entre la infección por CMV y el desarrollo de EVI. Los datos se muestran en la figura 22. Analizando la infección por CMV según las cohortes de pacientes observamos que los pacientes con un año de seguimiento presentaron una incidencia de infección por CMV del 42.9 %, entre 2 y 5 años del 40 %, entre 5 y 10 años del 56.5 %, entre 11 y 15 años del 0% y los de más de 15 años de evolución del 15.4 %, como se recoge en la figura 23. En los pacientes con más años de evolución tras el trasplante la determinación de la infección por CMV se hizo mediante antigenemia, habitualmente coincidiendo con manifestaciones clínicas y/o con la presencia de alteraciones analíticas (transaminitis, leucopenia). Por lo tanto gran parte de las infecciones fueron enfermedades clínicas. Desde la introducción de las técnicas de PCR cuantitativa de CMV, se monitoriza la replicación de manera mensual a lo largo del primer año en todos los pacientes trasplantados de corazón. La técnica es mucho más sensible y en la mayoría de pacientes el diagnóstico se ha realizado en ausencia de manifestaciones clínicas.

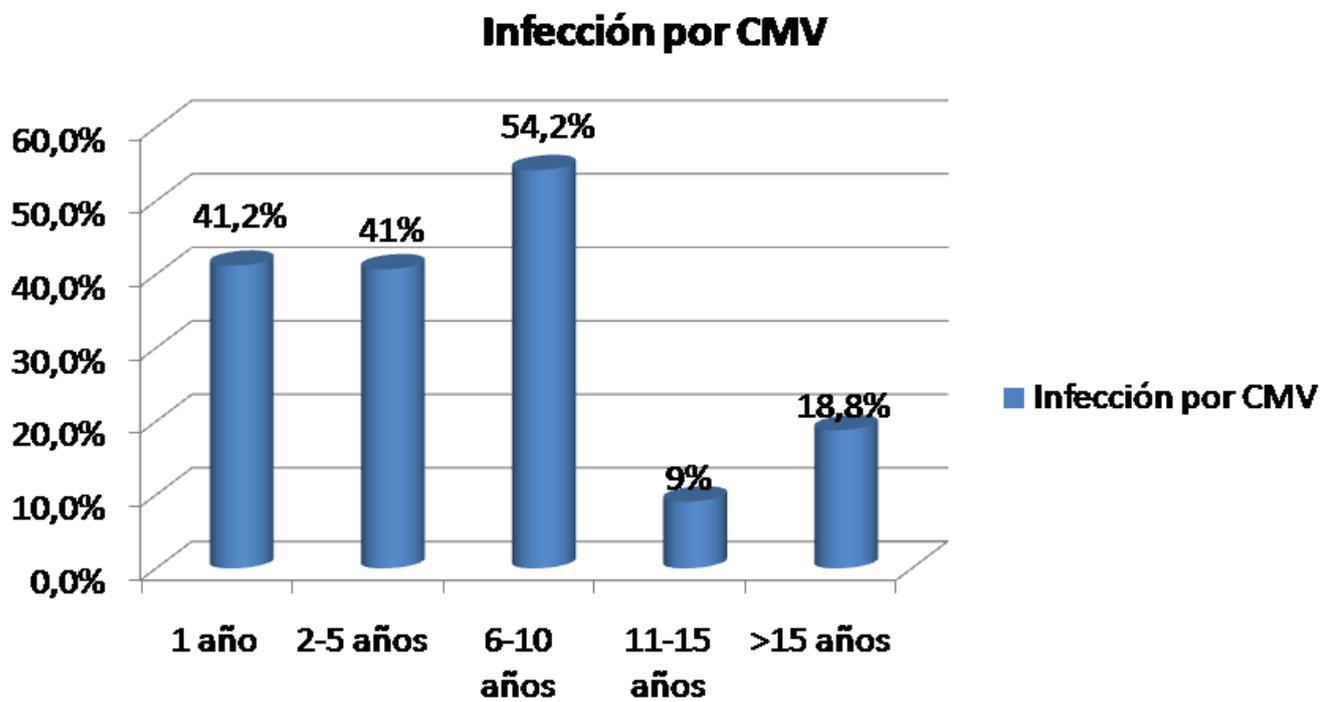
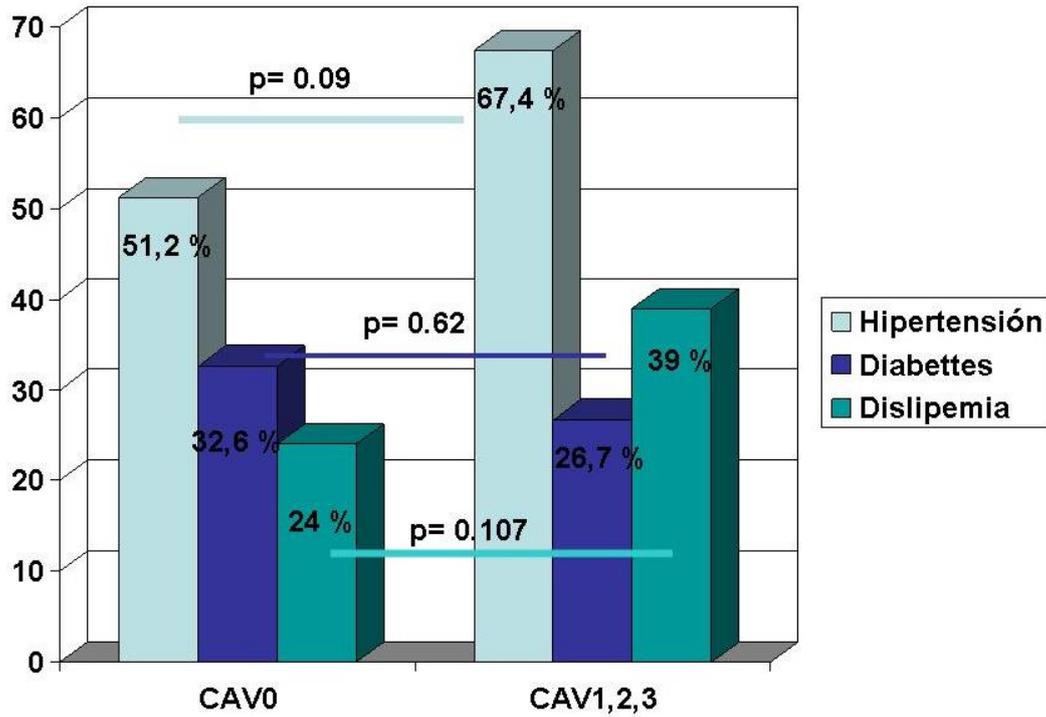


Figura 23: Evolución de la infección por CMV en el primer año postrasplante en receptores de trasplante cardíaco por períodos de seguimiento. En las cohortes más recientes el diagnóstico de infección por CMV se realiza en un mayor porcentaje de pacientes que en las cohortes más antiguas.

### 5.2.2. Enfermedad vascular del injerto y factores de riesgo cardiovascular clásicos

Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular clásicos entre pacientes sin EVI (CAV0) y con EVI (CAV1,2,3) como se muestra en la figura 24.



**Figura 24 :** Correlación entre EVI y los factores de riesgo cardiovascular clásicos de los pacientes receptores de trasplante cardíaco. No existen diferencias significativas en la prevalencia de HTA, DM ni DLP en los pacientes con EVI (CAV 1,2,3) o sin EVI (CAV0)

### 5.2.3. Enfermedad vascular del injerto y tratamiento inmunosupresor

Por lo que respecta al tratamiento inmunosupresor, la terapia con tacrolimus y micofenolato es la que se asocia a un menor desarrollo de vasculopatía del injerto. Los datos se muestran en la figura 25.

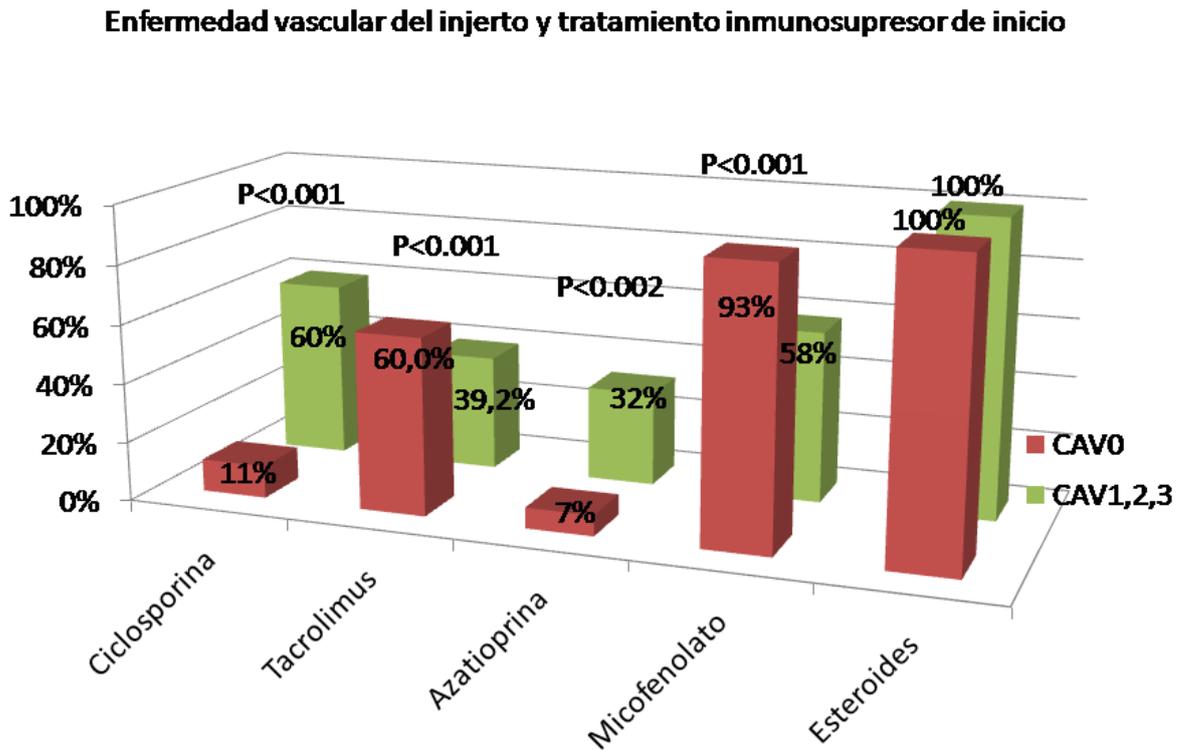


Figura 25 : Correlación entre el tratamiento inmunosupresor y el desarrollo de EVI (CAV 1,2,3). El uso de tacrolimus y micofenolato se asoció de manera significativa con menor aparición de EVI.

La terapia inmunosupresora que se asoció a un menor riesgo de EVI fue el uso de tacrolimus y micofenolato. Este régimen es el más frecuentemente usado según los datos del registro nacional e internacional desde los últimos 10 años. Previamente el tratamiento se basaba en ciclosporina y azatioprina.

La tabla 8 muestra la comparación entre las diferentes variables clínicas implicadas en el desarrollo de vasculopatía del injerto entre pacientes sin EVI (CAV0) y pacientes con EVI (CAV1,2,3).

**Tabla 8: Variables clínicas y relación con EVI**

VARIABLES A ESTUDIO	CAV0	CAV 1,2,3	p
<b>Porcentaje de rechazo</b>	8.6 +/- 1 %	16.7 +/-2 %	p =0.009
<b>Infección por CMV</b>	40 %	34 %	p =0.347
<b>Tiempo de isquemia</b>	190.5 +/-7 min	174.29+/- 8 min	p =0.151
<b>Factores de riesgo cardiovascular</b>			
- <b>Hipertensión arterial</b>	51.2 %	67.4 %	p= 0.09
- <b>Diabetes Mellitus</b>	32.6 %	26.7 %	p = 0.62
- <b>con ADO</b>	4.7 %	8.9%	
- <b>con insulina</b>	27.9 %	17.8 %	
- <b>Dislipemia</b>	24 %	39 %	p = 0.107
<b>Tratamiento inmunosupresor</b>			
- <b>Ciclosporina</b>	11.6 %	60 %	p < 0.005
- <b>Tacrolimus</b>	86 %	39 %	p < 0.005
- <b>Azatioprina</b>	7 %	32 %	p = 0.002
- <b>Micofenolato</b>	93 %	58 %	p < 0.005
- <b>Esteroides</b>	100 %	100 %	

CMV: citomegalovirus, ADO; antidiabéticos orales

### 5.3 Biomarcadores y asociación con la presencia de EVI

Los valores obtenidos de los biomarcadores sAXL, GAS6, Lp-PLA2, GDF-15 y cTnT-hs en los pacientes a estudio se muestran en la tabla 9.

Biomarcador	N	media	DE	Máximo	Mediana	Minimo	unidades
SAXL	96	72,5	35,3	239,3	67,9	20,8	ng/l
GAS6	81	14,8	4,6	27,2	14,0	7,0	ng/l
Lp-PLA2	55	21,4	6,9	55,3	21,3	9,0	Umol/min*ml
GDF-15	75	383	217	1046	324,6	16	pg/ml
cTnT-hs	92	25.82	28.0	161	15	2	ng/l

Tabla 9: valores medios de niveles de biomarcadores a estudio

No hubo correlación con los niveles de biomarcadores y el tiempo de evolución tras el trasplante cardiaco. (Rho de Spearman sAXL = 0,123, p=0,234; GAS6= 0,146 p=0,193; GDF-15 = 0,132, p= 0,259; cTnT-hs= 0,168, p=0,109; Lp-PLA2 = 0,063, p=0,646).

Encontramos correlación entre los niveles de creatinina y los valores de cTnT-hs (Rho de Spearman 0.347, p= 0.001)

### 5.3.1 Asociación de los biomarcadores sAXL, GAS6, Lp-PLA2, GDF-15 y cTnT-hs con la presencia de EVI

Se estudió la asociación de los cinco biomarcadores sAXL, GAS6, Lp-PLA2, GDF-15 y cTnT-hs con la presencia de EVI.

#### Análisis univariado

En el análisis univariado los pacientes con EVI (CAV 1,2,3) presentaron niveles de sAXL y cTnT-hs significativamente más elevados que los pacientes sin EVI (CAV0). No encontramos diferencias significativas en el resto de biomarcadores estudiados. Estos datos se expresan en la tabla 10.

**Tabla 10: análisis univariado. Asociación biomarcadores con presencia de EVI**

Biomarcador	N	CAV 0 Niveles	CAV 1,2,3 Niveles	p valor
sAXL	96	65 $\pm$ 24	79 $\pm$ 42	<b>0,036</b>
GAS6	81	14,4 $\pm$ 4,3	15,1 $\pm$ 4,9	0,473
Lp-PLA2 nmol.min*ml	55	21,2 $\pm$ 5,2	21,9 $\pm$ 9,5	0,712
GDF-15	75	353,7 $\pm$ 179,0	413,9 $\pm$ 249,2	0,235
cTnT-hs	92	18,0 $\pm$ 16,9	33,0 $\pm$ 33,9	<b>0,008</b>

Para calcular la capacidad discriminativa de sAXL y cTnT-hs en el diagnóstico de EVI, se elaboró la curva ROC (receiver operating characteristics, características operativas del receptor) de ambos biomarcadores.

El área bajo la curva de sAXL fue de 0,588 (95%IC 0,474-0,702) con un valor de  $p=0,137$ . Se muestra en la figura 25.

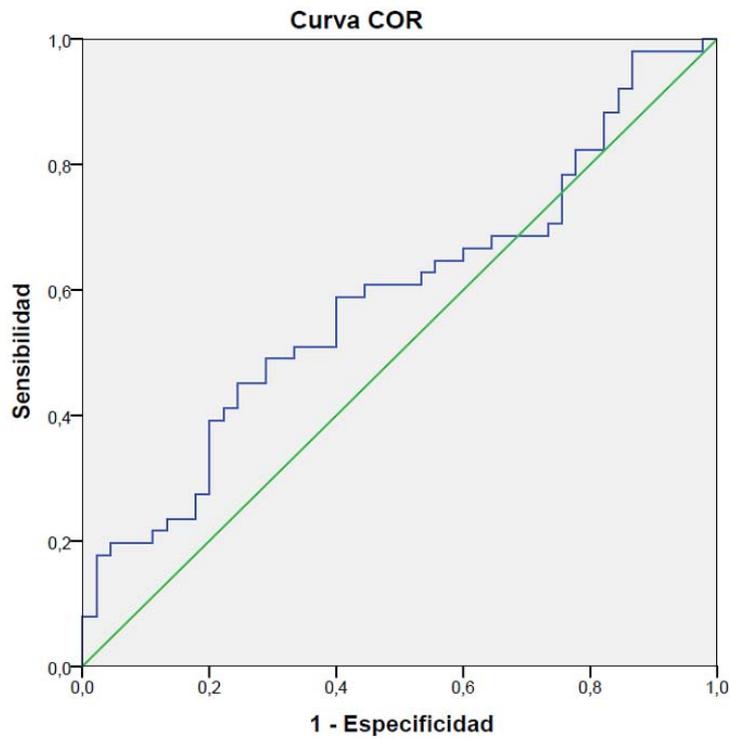


Figura 25: Curva ROC no paramétrica de sAXL en el diagnóstico de EVI.

El análisis mediante curva ROC de los valores de cTnT-hs objetivó la asociación con la presencia de EVI. El área bajo la curva fue de 0.658 (IC95% 0,547-0,769) con un valor de  $p= 0,009$ . Se muestra en la figura 26.

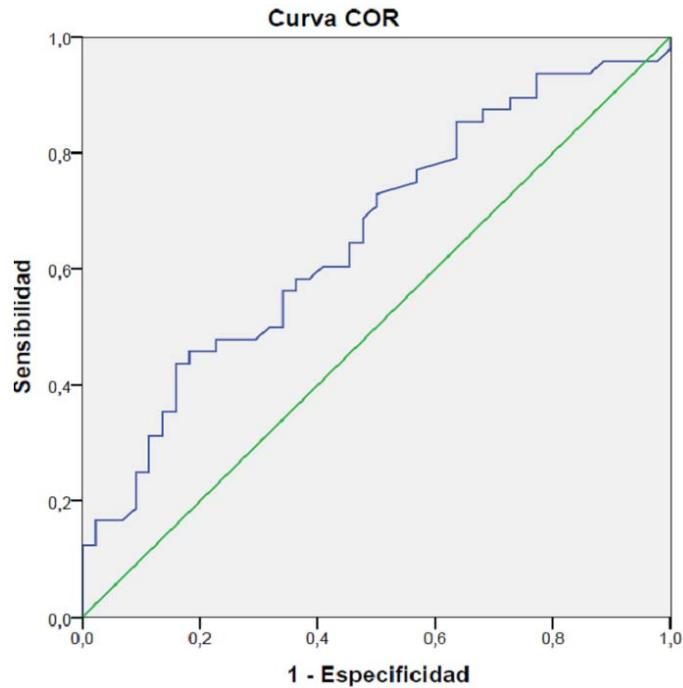


Figura 26: curva ROC no paramétrica de cTnT-hs en el diagnóstico de EVI

A partir de las curvas ROC se obtuvo el punto de corte de los biomarcadores sAXL y cTnT-hs, y así calcular su especificidad y sensibilidad en la detección de EVI.

El mejor punto de corte para los valores de cTnT-hs fue de 21 ng/l con una especificidad del 82% y una sensibilidad del 44%. El mejor punto de corte para los niveles de sAXL fue 74 ng/l con una especificidad del 71% y una sensibilidad del 49%. Los resultados se muestran en la tabla 11 y 12.

**Tabla 11: Capacidad predictiva de EVI de sAXL y cTnT-hs. Modelos univariados de regresión logística**

Niveles Biomarcador	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
sAXL $\geq$ 74 ng/l	49 %	71 %	55,2 %	65,8 %
cTnT-hs $>$ 21ng/l	44 %	82 %	57,1 %	72,4 %

VPN : valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo

**Tabla 12: Capacidad predictiva de EVI de sAXL y cTnT-hs. Modelos univariados de regresión logístca**

Niveles Biomarcador	OR	95 % IC	p valor
sAXL $\geq$ 74 ng/l	2,367	1,01-5,52	<b>0,04</b>
cTnT-hs $>$ 21ng/l	3,500	1,347-9,096	<b>0,01</b>

Se evaluó el aumento de la capacidad discriminativa del modelo con cTnT-hs  $\geq$ 21 ng/l más la adición de sAXL $\geq$  74 ng/l, mediante el índice “Integrated Discrimination Improvement” (IDI). El aumento en la discriminación resultó ser de 1.2 % con un p-valor de 0.336. Por lo tanto observamos como la adición del biomarcador sAXL, no aportó a las cTnT-hs mejoras discriminativas en la identificación de EVI.

### Análisis multivariado

Realizamos un estudio multivariado de los biomarcadores en el que se incluyeron las variables que resultaron significativas en el modelo univariado ( $p < 0,1$ ), utilizando el método "por pasos hacia atrás" para identificar los factores de riesgo independientes. En el análisis multivariado sólo los niveles de cTnT-hs se mostraron predictores de la presencia de enfermedad vascular del injerto (OR 1,029; 95%IC 1,006-1,052;  $p= 0,013$ ).

Se ajustó un modelo de regresión logística (variable dependiente presencia de enfermedad vascular del injerto), introduciendo aquellas variables que se consideraron clínicamente relevantes. Se incluyeron en el modelo las siguientes variables: factores de riesgo cardiovascular, porcentaje de rechazo primer año, tiempo de isquemia, edad del donante, edad del receptor, infección por CMV y etiología de la enfermedad de base. Ajustando por factores de confusión sólo los niveles de cTnT-hs fueron predictores de EVI (OR1.029; 95% IC 1,006-1,052;  $p=0,013$ ). Los datos se recogen en la tabla 13.

**Tabla 13: Análisis multivariado de regresión logística: factores asociados con la presencia de enfermedad vascular del injerto**

Variable	N	OR	95 % IC	P
SAXL	89	1,014	0,992-1,026	0,276
cTn-hs	89	1,029	1,006-1,052	<b>0,013</b>
Porcentaje rechazo primer año	89	1,049	1,006-1,094	<b>0,026</b>
Etiología Miocardiopatía (isquémica/no isquémica)	89	2,8	0,889-9,088	0,078
Edad receptor	89	0,94	0,910-0,981	<b>0,003</b>

Entre los diferentes factores que clásicamente se han relacionado con el desarrollo de vasculopatía, el mayor porcentaje de rechazo en el primer año también en nuestro estudio se ha asociado de manera significativa a la presencia de EVI. La edad del receptor mostró una asociación inversa, a mayor edad del receptor menos presencia de EVI. La etiología isquémica de la enfermedad de base en el receptor mostró una tendencia a asociarse con mayor presencia de vasculopatía del injerto aunque no alcanzó significación estadística.

### **5.3.2 Análisis de las poblaciones linfocitarias y su utilidad en la identificación de EVI**

En los 33 pacientes del estudio piloto el análisis de las poblaciones linfocitarias mostró que aquellos pacientes que presentaban EVI tenían un incremento significativo del porcentaje de linfocitos Th1:  $18\% \pm 4,8\%$  versus  $4,8\% \pm 1,1\%$  ( $p < 0,005$ ). El porcentaje de linfocitos T reg no mostró variaciones significativas a lo largo del seguimiento. En consecuencia el cociente Th1/Treg se incrementó a lo largo del seguimiento. Clasificamos a los pacientes en 3 grupos en función del cociente Th1/Treg: rango bajo  $< 10$ ; rango medio 10-20; rango alto  $> 20$ .

De los 33 pacientes estudiados 16 presentaron cocientes Th1/Treg en los rangos medio-alto y 17 en el rango bajo. Ninguno de los pacientes con cociente Th1/Treg en el rango bajo presentaron EVI. De los 16 pacientes con cocientes en el rango medio- alto, 5 desarrollaron EVI y uno presentó una muerte súbita.

La sensibilidad del cociente Th1/Treg en la identificación de EVI fue del 100%, la especificidad del 61%, el valor predictivo positivo del 31% y el valor predictivo negativo del 100%. La curva ROC mostró un área bajo la curva de 0.79. Se muestra en la figura 27.

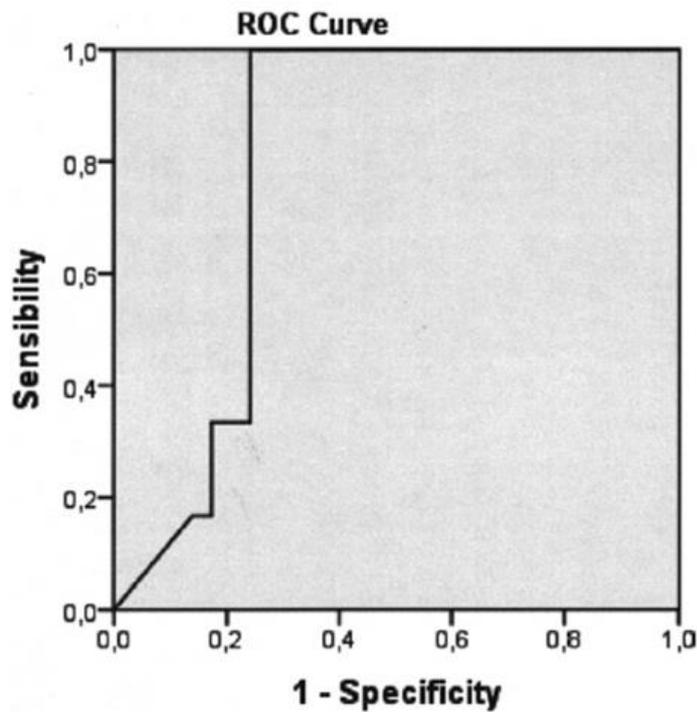


Figura 27: curva ROC no paramétrica del cociente Th1/Treg y la presencia de EVI

Estos resultados indicarían que el cociente Th1/Treg, a través de la valoración de la respuesta aloespecífica mediada por linfocitos T en el receptor, puede ser útil en la monitorización de la vasculopatía del injerto.

En el subgrupo de 24 pacientes del total de los 96 que formaron parte de la población objeto de este estudio, el análisis mediante la curva ROC del cociente Th1/Treg mostró una asociación significativa con la presencia de EVI. El área bajo la curva fue de 0,762 (IC 95% 0,563-0,960) con una  $p = 0,035$ . La curva ROC se muestra en la figura 28.

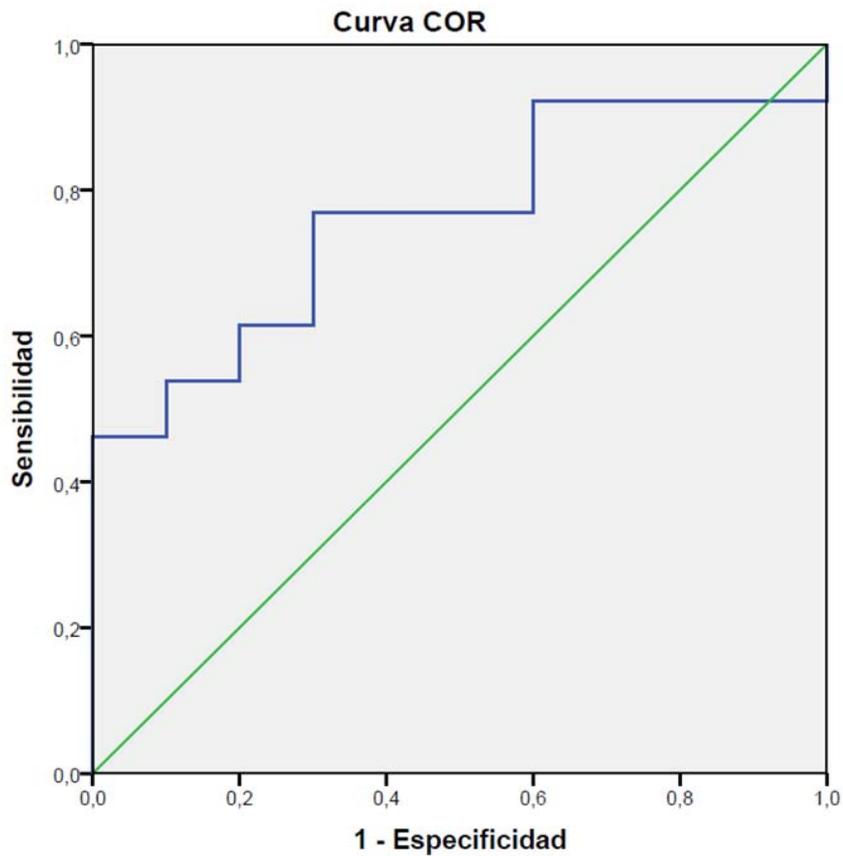


Figura 28: curva ROC asociación cociente Th1/Treg con la presencia de EVI

Dado que las troponinas (cTnT-hs) se habían mostrado el biomarcador no inmunológico con mayor utilidad para discriminar la presencia de EVI, se estudió además la mejora de la capacidad discriminativa de cTnT-hs si se tenía en cuenta la adición del cociente Th1/Treg. La evaluación de este parámetro mediante el índice IDI mostró una mejora relevante del 16.7 %, aunque no llegó a la significación estadística (tendencia de  $p=0,058$ ). A pesar de ello, dado el tamaño de la muestra, creemos relevante la mejoría discriminativa de un 16.7%.

## 5.4. Papel de los biomarcadores como predictores de eventos clínicos

El 19.8 % de los pacientes presentaron el evento clínico combinado de muerte de causa cardiovascular, IAM, descenso de la fracción de eyección y/o signos o síntomas de insuficiencia cardiaca.

### Análisis univariado

Respecto a los biomarcadores estudiados, en el análisis univariado los niveles de sAXL y cTnT-hs se asociaron con la presencia de eventos clínicos. GAS6, GDF-15 y LpPLA2 no mostraron diferencias significativas. Los datos se muestran en la tabla 14.

**Tabla14: análisis univariado de la asociación de los biomarcadores con eventos clínicos. Comparación de medias independientes (t- student)**

Biomarcador	Eventos no Niveles	Eventos si Niveles	P
sAXL	67,1 ± 27,4	94,1 ± 53,0	<b>0,044</b>
GAS6	14,3 ± 4,1	16,8 ± 6,2	0,156
Lp-PLA2	21,5 ± 7,4	21,0 ± 5,2	0,802
GDF-15	362,9 ± 196,8	516,4 ± 299,4	0,147
cTnT-hs	19,9 ± 19,4	50,1 ± 42,5	<b>0,008</b>

### Análisis multivariado

En el análisis multivariado seleccionando las variables que resultaron significativas en el modelo univariado ( $p < 0,1$ ), utilizando el método "por pasos hacia atrás" para identificar los factores de riesgo independientes, sólo los niveles de cTnT-hs tuvieron una

asociación significativa con la presencia de eventos clínicos, mostrando sAXL una importante tendencia a la significación. Los datos se muestran en la Tabla15.

**Tabla 15: análisis multivariado asociación biomarcadores con eventos clínicos**

<b>Biomarcador</b>	<b>N</b>	<b>OR</b>	<b>95% IC</b>	<b>P</b>
<b>sAXL</b>	92	1,017	1,000-1,034	<b>0,054</b>
<b>cTnT-hs</b>	92	1,030	1,010-1,050	<b>0,004</b>

En la estrategia para encontrar un modelo con los dos biomarcadores ajustados por posibles variables de confusión se tuvieron en cuenta en el modelo completo las siguientes variables: porcentaje de rechazo en el primer año, infección por CMV, edad del donante, edad del receptor, tiempo de isquemia, factores de riesgo cardiovascular y etiología de la enfermedad de base. Se obtuvo un modelo igual de eficiente para el ajuste de los efectos (odds ratios) pero más parsimonioso con un modelo de 3 variables (sAXL, cTnT-hs y edad del receptor). Este modelo es más simple, pero ajusta de manera similar los efectos de los biomarcadores que un modelo completo.

Ajustando por variables de confusión, sAXL y cTnT-hs fueron las únicas variables que se relacionaron de manera independiente con la aparición de eventos. La edad del receptor no se asoció con la aparición de eventos en los pacientes con EVI. Estos resultados se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16: análisis multivariado de regresión logística: factores asociados con la aparición de eventos clínicos.**

Biomarcador	N	OR	95% IC	P
sAXL	92	1.024	1,002-1,044	<b>0,029</b>
cTnT-hs	92	1.029	0,914-1,001	<b>0,005</b>

### **5.5 Asociación de los biomarcadores con la presencia de eventos clínicos en pacientes con EVI moderada severa**

Realizamos un subanálisis en el grupo de pacientes con EVI identificada para estudiar la utilidad de los biomarcadores en la predicción de eventos clínicos. Del total de 51 pacientes que presentaron EVI, en 27 era ligera (CAV1) y en 24 era moderada-severa (CAV2-3).

#### Análisis univariado

En el análisis univariado sólo los niveles de cTnT-hs fueron predictores de eventos clínicos (cTnT-hs  $p=0,019$ ). sAXL mostró una tendencia importante aunque sin alcanzar la significación estadística ( $p=0,052$ ).

El resto de biomarcadores no mostraron utilidad en la predicción de eventos (GAS6  $p=0,157$ ; GDF15  $p=0,130$ ; Lp-PLA2  $p=0,592$ ). Los datos se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17: Asociación biomarcadores con la presencia de eventos clínicos. Comparación de medias independientes (t-sudent)**

Biomarcador	N	Eventos no Niveles	Eventos si Niveles	P
sAXL ng/l	51	70,6 ± 31,7	94,1 ± 52,9	0,052
GAS6	43	14,2 ± 3,9	16,8 ± 6,2	0,157
Lp-PLA2 nmol.min*ml	19	23,5 ± 14,8	21,0 ± 5,2	0,592
GDF-15 pg/ml	37	376,0 ± 222,3	516,4 ± 299,4	0,130
cTnT-hs ng/l	48	22,7 ± 22,6	50,1 ± 42,5	<b>0,019</b>

#### Análisis multivariado

En el análisis multivariado sólo la cTnT-hs se mostró predictor de eventos clínicos (OR 1,029; 95%IC 1,005-1,053; p= 0,017). Los niveles de sAXL mostraron una tendencia sin alcanzar la significación estadística (p=0,07). Debe tenerse en cuenta que en este subanálisis sólo se incluyeron 35 pacientes.

Ajustando por factores de confusión (porcentaje de rechazo en el primer año de rechazo, edad receptor, edad del donante, factores de riesgo cardiovascular, tiempo de isquemia, infección por CMV y etiología de la enfermedad de base) los niveles de cTnT-hs continúan manteniéndose como predictores de eventos clínicos (OR 1,026; IC 1,004-1,050; p= 0,022).



# **DISCUSSION**



## 6- DISCUSION

La búsqueda de biomarcadores en sangre periférica útiles en el diagnóstico y monitorización de la EVI en pacientes trasplantados de corazón, es una de las principales prioridades en la investigación en el mundo del trasplante cardíaco. En nuestro estudio los niveles elevados de cTnT-hs en sangre periférica permiten detectar la presencia de EVI en los receptores de trasplante cardíaco e identificar a los pacientes con mayor riesgo de presentar eventos cardiovasculares durante el seguimiento. El cociente entre las poblaciones linfocitarias Th1/Treg aunque se evaluó en una muestra reducida de pacientes, ha demostrado igualmente tener un elevado poder predictivo en la detección de la vasculopatía del injerto.

La enfermedad vascular del injerto continúa siendo una de las principales causas de mortalidad a largo plazo en los receptores de trasplante de corazón. La denervación de los corazones trasplantados hace que a menudo sea un fenómeno silente, lo que obliga a la monitorización y detección de la vasculopatía del injerto de manera activa. No disponemos de la técnica diagnóstica ideal para su detección precoz. Las técnicas de mayor sensibilidad son invasivas, lo que no permite su realización de forma repetitiva. Las técnicas diagnósticas no invasivas de que se dispone en la actualidad, tienen una sensibilidad limitada en las fases incipientes de la enfermedad.

## 6.1 Características clínicas

Uno de los aspectos importantes del estudio es que la muestra es representativa de la población de receptores de trasplante cardíaco, población objeto del estudio.

De los diferentes factores que se han implicado clásicamente con el desarrollo de EVI, nuestra población presentó características similares a las reportadas en los registros<sup>1,2</sup>. Nuestros pacientes fueron predominantemente del sexo masculino y presentaron la misma incidencia de factores de riesgo cardiovascular que la descrita<sup>1,2</sup>. No encontramos diferencias tampoco en relación a la edad del donante ni al tiempo de isquemia. La edad media de los receptores en nuestro estudio es ligeramente inferior a la del Registro Internacional (edad media en nuestro estudio 47.7 años, en el registro internacional 54 años). Asimismo, nuestra población presentaba una mayor proporción de etiología no isquémica de su miocardiopatía de base (57%) respecto los datos globales del Registro Internacional (47%). Sin embargo si analizamos sólo los últimos 10 años del Registro Internacional, los datos son muy similares (55% con miocardiopatía dilatada y el 36.4 % con miocardiopatía isquémica). La prevalencia de EVI en nuestra población (6.6% al año y 42.3 % a los 10 años) tampoco difiere respecto a los datos del Registro Internacional (6.9 % al año y 49% a los 10 años).

En nuestra serie el porcentaje de rechazo en el primer año se ha asociado de forma independiente a mayor desarrollo de EVI. El rechazo agudo es uno de los factores que clásicamente se ha relacionado con el desarrollo de vasculopatía del injerto<sup>3,4,18,24,25,30,33</sup>, lo que refuerza el papel predominante del sistema inmunológico en la fisiopatología de la EVI. A lo largo de los años hemos observado una reducción significativa del rechazo agudo, siendo en la actualidad inferior al 10% en el primer año, datos similares a los publicados en

el registro nacional e internacional<sup>1,2</sup>. Esta disminución del rechazo agudo probablemente debiera acompañarse en el futuro de un menor desarrollo de vasculopatía del injerto.

No sólo el rechazo agudo intersticial, sino que también el rechazo mediado por anticuerpos (AMR) se asocia con el desarrollo de vasculopatía del injerto<sup>37,38,42</sup>. Dado que no se disponía de criterios diagnósticos consensuados para el diagnóstico de AMR hasta 2013, no se estudió de manera rutinaria en nuestro centro hasta entonces, por lo que no hemos podido valorar la repercusión de este tipo de rechazo en el desarrollo de EVI.

Los avances en el tratamiento inmunosupresor son los principales implicados la disminución de la incidencia de rechazo. En concreto, la combinación Tacrolimus y Micofenolato es la terapia inmunosupresora que se ha asociado a un mejor control del rechazo agudo, como se ha publicado en diferentes trabajos<sup>151-153</sup>. En nuestra serie, además tacrolimus y micofenolato han sido los fármacos inmunosupresores que se han asociado con menor presencia de vasculopatía del injerto. Este dato reforzaría la asociación entre rechazo agudo y desarrollo de EVI y la implicación de los mecanismos inmunológicos en la fisiopatología de la vasculopatía del injerto. En la interpretación de estos resultados debe tenerse en cuenta que no es un estudio randomizado. Las diferencias en cuanto al tipo de inmunosupresión administrada traducen las disponibilidades de fármacos en función de las diferentes cohortes de seguimiento. Al inicio del trasplante sólo se disponía de ciclosporina asociada a azatioprina con o sin esteroides. Esta es la pauta que recibieron los pacientes de más años de evolución y los que presentaron mayor porcentaje de rechazo en el primer año. Posteriormente la combinación de tacrolimus y micofenolato con o sin esteroides ha sido la pauta inmunosupresora habitual en la última década. Además se debe tener presente que a lo

largo del seguimiento de los pacientes se puede haber modificado el tratamiento inmunosupresor con lo que es difícil confirmar la diferente relación entre tacrolimus y ciclosporina en el desarrollo de EVI. Varios estudios muestran que micofenolato se asocia a menor desarrollo de EVI que azatioprina<sup>139, 156,157</sup>. Las publicaciones valorando las diferencias entre tacrolimus y ciclosporina en la prevención del desarrollo de EVI muestran resultados dispares<sup>151-156</sup>.

No hemos podido valorar el papel de los nuevos inmunosupresores, sirolimus y everolimus, en la prevención del desarrollo de EVI pues su utilización de novo ha sido anecdótica en la población a estudio.

La edad del receptor es otro de los factores que se ha asociado al desarrollo de vasculopatía del injerto. En nuestro estudio una edad más avanzada en el receptor se asoció a menor desarrollo de vasculopatía. Quizá la menor incidencia de rechazo agudo en los receptores de mayor edad que se ha publicado en diferentes trabajos pueda contribuir a explicar la menor prevalencia de EVI en receptores de mayor edad<sup>158-161</sup>.

Los resultados en relación al papel que pueda jugar la infección por CMV en el desarrollo de EVI en nuestra serie, deben ser valorados con cautela. A diferencia de los diferentes trabajos en la literatura en los que se asocia la infección por CMV con la aparición de vasculopatía en el injerto<sup>47-49</sup>, no hemos encontrado una correlación significativa entre la infección por CMV y el desarrollo de EVI. Estos datos están sin duda influenciados por las diferentes técnicas y criterios diagnósticos utilizados para definir la infección por CMV en las diferentes cohortes de pacientes. Si analizamos la infección por CMV según las cohortes de seguimiento observamos en nuestra serie que los pacientes con un año de evolución tras el trasplante presentaron una incidencia de infección por CMV

mayor que los pacientes trasplantados hace 10 o 15 años. En los últimos años el diagnóstico de infección por CMV se ha realizado mediante la determinación de PCR cuantitativa y de acuerdo con nuestro protocolo asistencial se ha monitorizado mensualmente la replicación en sangre del CMV mediante la técnica de PCR. Probablemente esta nueva técnica y estrategia diagnóstica en relación al CMV ha condicionado el diagnóstico de mayor número de casos de casos en los últimos años.

No hemos encontrado diferencias significativas en los factores de riesgo cardiovascular basales entre los pacientes que desarrollaron EVI y los que no desarrollaron EVI. No se ha cuantificado el grado de severidad de dichos factores de riesgo ni la progresión a lo largo del seguimiento.

Las concentraciones de troponina, tradicionalmente se han visto influenciadas por las cifras de creatinina. A pesar de que en nuestro estudio hemos encontrado una correlación entre las cifras de creatinina y los valores de cTnT-hs, es cierto que el porcentaje de pacientes con un grado de insuficiencia renal relevante ha sido pequeño. Un metanálisis reciente ha evaluado la utilidad de las cTnT-hs en el diagnóstico de infarto de miocardio en pacientes con insuficiencia renal y ha mostrado que las concentraciones de las troponinas ultrasensibles de que disponemos en la actualidad mantienen una elevada precisión diagnóstica en pacientes con insuficiencia renal para el diagnóstico de síndrome coronario agudo <sup>162</sup>. Por ello pensamos que la función renal no debería modificar la interpretación de los datos en nuestro estudio.

## 6.2 Exploraciones diagnósticas en la enfermedad vascular del injerto

### 6.2.1- *Angiografía invasiva y TAC de arterias coronarias*

En el diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto se han utilizado dos técnicas diagnósticas, la coronariografía y el TAC de arterias coronarias. La coronariografía es considerada la técnica de referencia en el diagnóstico de la vasculopatía del injerto. Diferentes estudios han mostrado una excelente sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo del TAC de coronarias en el diagnóstico de la EVI, por lo que hoy en día se considera una alternativa no invasiva a la coronariografía y es razonable su uso para descartar la presencia de vasculopatía del injerto en los receptores de trasplante cardiaco <sup>60,65,78-79</sup>.

Aunque la utilización de dos técnicas diagnósticas podría representar una limitación del estudio, la clasificación de EVI se realizó en ambos casos, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de trasplante y por lo tanto en función del grado de estenosis luminal visualizada. En el momento de gradar la vasculopatía del injerto (CAV0, CAV1, CAV2 o CAV3) se tuvo en cuenta el tipo y número de arterias lesionadas, la gradación de la severidad de las lesiones y datos adicionales como la función ventricular del ecocardiograma y la presencia de patrón restrictivo o no en los casos indicados.

A pesar de que los estudios del TAC de arterias coronarias pueden aportar datos sobre la pared vascular, no se tuvieron en cuenta estos datos adicionales en la clasificación de los pacientes con EVI. Siguiendo la nomenclatura recomendada por la ISHLT para clasificar la vasculopatía del injerto<sup>69</sup>, no hemos encontrado diferencias en la prevalencia de EVI en nuestra población de estudio respecto los datos publicados en los Registros.

### 6.2.2 – Biomarcadores no inmunológicos

Las concentraciones de troponinas ultrasensibles (cTnT-hs) y sAXL son los biomarcadores no inmunológicos en sangre periférica que han demostrado aportar mayor beneficio en el diagnóstico no invasivo de la enfermedad vascular del injerto y en la predicción del riesgo de eventos clínicos.

La cTnT-hs es el biomarcador que ha mostrado en nuestro estudio mayor utilidad en la detección de la vasculopatía del injerto y en la predicción de eventos cardiovasculares en el seguimiento de los receptores de un trasplante cardíaco. Encontramos diferencias significativas entre los niveles de cTnT-hs en los pacientes con EVI y sin EVI, diferencias que se mantuvieron en el análisis multivariado. Los niveles de cTnT-hs  $\geq 21$  ng/l se asociaron a mayor presencia de EVI (OR 3,5; IC 95% 1,347-9,096;  $p=0,010$ ), con una alta especificidad (82%). Sin embargo la sensibilidad es baja (44%). La elevación de cTnT-hs puede traducir la existencia de daño miocárdico por isquemia como consecuencia de la obliteración progresiva de la luz vascular, fenómeno que inicialmente no se acompañan de manifestaciones clínicas. La denervación cardíaca condiciona que la EVI sea habitualmente silente y que los pacientes trasplantados de corazón no presenten clínica anginosa en presencia de isquemia miocárdica. No obstante diferentes circunstancias tales como el rechazo agudo o el rechazo mediado por anticuerpos pueden acompañarse de lesión miocárdica y en consecuencia elevar los niveles de troponinas plasmáticas<sup>118, 119</sup>, sin que exista enfermedad vascular del injerto asociada. En general es poco frecuente el rechazo agudo pasado el primer año del trasplante, y los pacientes incluidos en el estudio llevaban tenían más de un año de evolución tras el trasplante. También, hasta la actualidad, el

porcentaje de pacientes que presentan rechazo mediado por anticuerpos ha sido relativamente poco importante. La elevación de cTnT-hs en ausencia de lesiones coronarias epicárdicas y sin evidencia de rechazo cardíaco asociado, puede traducir la afectación de la microcirculación por la vasculopatía del injerto. La EVI afecta no sólo a los vasos coronarios epicárdicos, sino también a la microcirculación y hasta la actualidad son escasas las técnicas de que disponemos para su estudio y evaluación<sup>163,164</sup>. La afectación microvascular se ha asociado a peor función del injerto en el seguimiento de los pacientes receptores de un trasplante cardíaco<sup>165</sup>.

El biomarcador sAXL también ha mostrado ser útil en la identificación de EVI. En los últimos años se ha descrito que el receptor sAXL se activa en respuesta a la inflamación y al daño tisular y actuaría como mecanismo contraregulador. La forma soluble del receptor en plasma, sAXL, de forma indirecta traduciría el grado de inflamación existente. En consecuencia niveles plasmáticos elevados de sAXL se asociarían a un estado de mayor actividad inflamatoria. A pesar de que sAXL es un biomarcador útil en la identificación de EVI, no parece aumentar el poder de discriminación de las cTnT-hs en el diagnóstico de la vasculopatía del injerto.

Los niveles de cTnT-hs y de sAXL no mostraron correlación con el tiempo de evolución tras el trasplante, por lo que su utilidad en el diagnóstico y en la predicción de eventos clínicos cardiovasculares es independiente del momento en el que hagamos la valoración del paciente.

A pesar de la abundante literatura<sup>103-112</sup> que muestra la utilidad de Lp-PLA2 como predictor de eventos cardiovasculares tanto en estudios epidemiológicos como en población con enfermedad aterosclerótica, la determinación de Lp-PLA2 en nuestro estudio no ha mostrado ser de utilidad en el diagnóstico de EVI ni en la predicción de eventos clínicos cardiovasculares. La expresión de Lp-PLA2 se asocia especialmente con la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica y está incrementada en placas con core necrótico y abundante contenido de macrófagos<sup>109-111</sup>. La enfermedad vascular del injerto en sus fases iniciales tiene un componente fibrótico predominante según han mostrado estudios con histología virtual<sup>166</sup> con escaso core necrótico. Tal vez este dato puede explicar la ausencia de utilidad de este biomarcador en el diagnóstico de EVI.

GDF-15 es un novedoso biomarcador que también se ha evaluado como predictor de eventos cardiovasculares en pacientes con factores de riesgo y con patología aterosclerótica<sup>142-144</sup>. En nuestro estudio tampoco la determinación de GDF-15 ha sido útil en la detección de vasculopatía del injerto ni en la predicción de eventos clínicos.

### 6.2.3 Biomarcadores inmunológicos

El cociente entre las poblaciones linfocitarias Th1 y Treguladoras (Th1/Treg) es un marcador inmunológico que también ha demostrado en nuestro estudio, ser útil en el diagnóstico de EVI. Este cociente traduciría los cambios de la respuesta aloespecífica mediada por linfocitos T en el receptor de un trasplante cardíaco. Cada vez parece tener más trascendencia el origen inmunomediado de la EVI y se cree que el desbalance entre las diferentes poblaciones linfocitarias efectoras y reguladoras estaría en su origen<sup>19, 22-25</sup>. Un incremento en el porcentaje de linfocitos Th1, implicados en la disfunción endotelial, o una

disminución del porcentaje de linfocitos T reguladores, relacionados con los mecanismos de tolerancia, facilitarían la aparición de EVI. Los niveles elevados del cociente Th1/Treg, aunque en una muestra pequeña del estudio, han mostrado ser el biomarcador con mayor sensibilidad en la identificación de EVI. Además, en adición a las cTnT-hs, consigue una mejoría discriminativa del 16.7 % en el diagnóstico de la vasculopatía del injerto. Tal vez, la inflamación secundaria a la activación del sistema inmunológico juegue un papel más relevante en la fisiopatología de la EVI que la disfunción endotelial secundaria a los factores de riesgo clásicos asociados a la enfermedad cardiovascular. Aunque la muestra es reducida, el beneficio que aporta el cociente Th1/Treg, en adición a la determinación de cTnT-hs, es superior al que ofrece sAXL para el diagnóstico de la vasculopatía del injerto.

### **6.3- Implicaciones clínicas de la utilidad de los biomarcadores**

#### *6.3.1- En el diagnóstico de la EVI*

Gracias a la elevada especificidad de las cTnT-hs en el diagnóstico de la enfermedad vascular del injerto, la principal implicación en la práctica clínica sería reducir el número de exploraciones rutinarias a realizar (coronariografía y/o TAC coronario) para el diagnóstico de EVI, en los pacientes de bajo riesgo.

En aquellos pacientes a los que debiera realizarse una coronariografía o TAC de arterias coronarias por protocolo y que presentaran niveles de cTnT-hs  $\leq 21$  ng/l podría deferirse la realización de dichas exploraciones. Con esta actuación además de evitar el riesgo inherente al propio procedimiento (especialmente en el caso de la coronariografía),

disminuiríamos la exposición de los pacientes a la irradiación y la nefrotoxicidad del contraste yodado.

La elevada sensibilidad mostrada del cociente Th1/Treg podría contribuir a identificar la EVI en fases más precoces de la enfermedad.

La introducción en la rutina asistencial de la determinación de cTnT-hs y de la monitorización inmunológica mediante el cociente Th1/Treg podría en consecuencia plantear un abordaje personalizado en el seguimiento de los pacientes trasplantados de corazón con el objetivo de disminuir la morbilidad en el seguimiento y mejorar la supervivencia.

### 6.3.2 *En la predicción de eventos*

La monitorización de cTnT-hs y sAXL a lo largo del seguimiento podría identificar a aquellos pacientes en riesgo de sufrir eventos clínicos cardiovasculares adversos. Estos pacientes serían candidatos a un control clínico más estricto. La identificación de pacientes de riesgo de eventos clínicos debería guiar el tratamiento inmunosupresor de forma individualizada y establecer un mayor grado de exigencia en el control de los factores de riesgo cardiovascular.

#### **6.4- Limitaciones del estudio**

Una de las limitaciones es el propio diseño del estudio. Al tratarse de un estudio transversal sólo disponemos de una determinación de biomarcadores en un momento puntual de la evolución del paciente. No podemos conocer la cinética ni la evolución de los biomarcadores a lo largo de los diferentes periodos de seguimiento, su modificación por los diferentes tratamientos inmunosupresores o sus variaciones en el contexto de infecciones. No obstante no se ha encontrado una correlación entre los niveles de los biomarcadores estudiados y el tiempo de evolución tras el trasplante, por lo que parecería que su utilidad en el diagnóstico y en la predicción de eventos clínicos cardiovasculares sería independiente del momento en el que hagamos la valoración del paciente.

Otra limitación es el tamaño de la muestra que viene determinada por el número de trasplantes cardiacos realizados anualmente y que en nuestro estudio estuvo condicionada fundamentalmente por la no disponibilidad de una coronariografía o TAC coronario con menos de 6 meses de diferencia respecto a la extracción sanguínea. La muestra poblacional no ha sido constante en el análisis de los diferentes biomarcadores debido a que no se dispuso de suficientes alícuotas en los pacientes, para realizar todas las determinaciones.





# CONCLUSIONES



## 7- CONCLUSIONES

- 1- En los receptores de un trasplante cardíaco la determinación en sangre periférica de cTnT-hs puede ser útil en la identificación de pacientes en riesgo de presentar vasculopatía del injerto, con alta especificidad pero baja sensibilidad.
- 2- Dada la elevada especificidad de los niveles de cTnT-hs en la detección de EVI, en los pacientes con un valor de cTnT-hs inferior o igual a 21 ng/l podría diferirse la realización del cateterismo o TAC para el diagnóstico de enfermedad vascular del injerto.
- 3- sAXL fue el segundo marcador con poder predictivo independiente para detectar EVI, pero no aportó poder discriminativo al asociarlo a la determinación de cTnT-hs.
- 4- El cociente entre las poblaciones linfocitarias Th1 y Treguladoras (cociente Th1/Treg) es el marcador que presenta una mayor sensibilidad en la detección de EVI.
- 5- El alto poder predictivo del cociente Th1/Treg en el diagnóstico de EVI confirma que el mecanismo inmunológico es el principal factor implicado en el desarrollo de la vasculopatía del injerto
- 6- La combinación de los niveles de cTnT-hs con del cociente Th1/Treg parece ser la estrategia más útil en la detección de la vasculopatía del injerto de manera no invasiva.

7- cTnT-hs es marcador independiente de mayor riesgo de eventos clínicos en pacientes receptores de trasplante cardiaco. Es además predictor de eventos clínicos en pacientes con EVI moderada-severa.

8- Entre los factores que clásicamente se han correlacionado con la vasculopatía del injerto, el mayor porcentaje de rechazo en el primer año y la menor edad del receptor, son los que se han asociado de manera significativa a la presencia de EVI en nuestro estudio.

9- Un mejor control del rechazo agudo en el primer año tras el trasplante puede contribuir a un menor desarrollo de vasculopatía en el injerto.

10- Los biomarcadores GAS6, Lp-PLA2 y GDF-15 no han mostrado ser de utilidad en la detección de la EVI ni en la predicción de eventos clínicos cardiovasculares en el seguimiento.





# **BIBLIOGRAFIA**



## 8- BIBLIOGRAFIA

1. Lund L, Leah E, Kucheryavaya A, Benden C, Christie J, Dipchand A, Dobbels F, Goldfarb S, Levvey B, Meiser B, Yusen R, Stehlik J for the International Society of Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-first Official Adult Heart Transplant Report-2014; Focus Theme: Retransplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014; 10:996-1008
2. Gonzalez-Vilchez F, Gomez-Bueno M, Almenar Bonet L, Crespo-Leiro M, en representacion de los equipos españoles de Trasplante Cardíaco. Treinta años de trasplante cardíaco en España. Registro Español de Trasplante Cardíaco (Adultos). XXV Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2013). *Rev Esp Cardiol Supl.* 2015;15(B):31-42.
3. Costello J, Mohanakumar T, Nath D. Mechanisms of chronic cardiac allograft rejection. *Tex Heart Inst J.* 2013;40 (4) 395-9.
4. Seki A, Fishbein M. Predicting the development of cardiac allograft vasculopathy. *Cardiovasc Pathol* 2014;23:253-260
5. Colvin-Adams M, Agnihotri A. Cardiac allograft vasculopathy: current knowledge and future direction. *Clin Transplant* 2011; 25:175–84.
6. Marti V, Romeo I, Aymat R et al. Coronary endothelial dysfunction as a predictor of intimal thickening in the long term after heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:1174-80
7. Valentine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant “atheroma”. *Transplantation* 2003;76:891-899
8. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE. Changes in coronary endothelial function predict progress of allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23:266-71
9. Schauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy. Recent developments. *Circulation* 2008; 117-2131-2141

10. Mehra M. Contemporary concepts in prevention and treatment of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2006;6:1248-1256
11. Labarrere C, Jaeger B. Biomarkers of heart transplant rejection: the good, the bad, and the ugly! *Translational Research* 2012;159:238–251
12. Steyers C, Miller F. Endothelial Dysfunction in Chronic Inflammatory Diseases. *Int J. Mol. Sci.* 2014,15,11324-11349
13. Esper R, Nordaby R, Vilariño J, Paragano A, Cacharrón JL, Machado R. Endothelial dysfunction : a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetology* 2006;5:4;1-18
14. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endothelial. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2006;6:21A-30A
15. Burger D, Touyz R.M. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cell, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertns* 2012;6(2):85-99.
16. Mitchell R, Libby P. Remodeling in Transplant Vasculopathy . *Circ. Res.* 2007;100;967-978
17. Caforio A, Tona F, Fortina A, Angelini A, Piaserico S, Gambino A, Feltrin G, Ramondo A, Valente ML, Illiceto S, Thiene G, Gerosa G. Immune and Nonimmune Predictors of Cardiac Allograft Vasculopathy Onset and Severity: Multivariate Risk Factor Analysis and Role of Immunosuppression. *Am J Transplant* 2004; 4: 962–970.
18. Poggio E, Roddy M, Riley J, Clemente M, Hrick D, Starling R, Young J, Gus B, Yamani M, Heeger P. Analysis of immune markers in human cardiac allograft recipients and association with coronary artery vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1606-13
19. Libby, Pober. Chronic Rejection. *J Immunol* 2001;14:387-397
20. Raisanen – Sokolowski A, Glysing-Jensen T, Mottram PL. Sustained anti-CD4/CD8 treatment blocks inflammatory activation and intimal thickening in mouse heart allografts. *Arterioscler Throm Vasc Biol*;1997: 17:2115
21. Koglin J, Glysing-Jensen T, Gadiraju J et al. Attenuated cardiac allograft vasculopathy in mice with targeted deletion of the transcription factor STAT4. *Circulation* 2000;101:1034.

22. Hagemeyer M, van Oosterhout M.F, van Kuik J, Siera –de Koning E, Gmelig Meyling, Schipper M, de Jonge N, de Weger. T cells in cardiac allograft vasculopathy are skewed to memory Th-1 cells in the presence of a distinct Th-2 population. *Am J of Transplant* 2008;8:1040-1050
23. ZhaoDx, Hu Y, Miller GG, Luster AD, Mitchell RN, Libby P. Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts. Association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. *J Immunol* 2002;169:1556-1560
24. Methe H, Wiegand D, Welsch U, Krombach F, Meiser B, Nabauer M, Koglin J. Peripheral expansion of circulation T-helper 1 cells predicts coronary endothelial dysfunction after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:833-40
25. Van Loosdretg J, Van Oosterhout M, Bruggink A, van Wichen D, van Kuik J, Erica de Koning, Baan C, de Jonge N, Gmelig-Meyling, d Weger. R. The chemokine and chemokine receptor profile of infiltrating cells in the wall of arteries with cardiac allograft vasculopathy is indicative of a memory T-helper 1 response. *Circulation* 2006;114:1599-1607
26. Mirabet S, Gelpí C, Roldan C, BrossaV, Mendoza C, Lopez L, Molto E, Alvaro Y, Martinez V, Padró JM, Roig E. Assessment of immunological markers as mediators of graft vasculopathy development in heart transplantation. *Transplantation Proceedings* 2011; 43: 2253-2256
27. Roldan C, Mirabet S, Brossa V, Moltó E, López L, Alvaro Y, Sole E, Padró JM, Gelpí C, Roig E. Correlation of immunological markers with graft vasculopathy development in heart transplantation. *Transplant Proc* 2012; Nov 44(9): 2653-6
28. Shao Y, Cheng Z, Li X, Chernaya V, Wang H, Yang X. Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction- a novel mechanism for maintaining vascular function. *J Hematol Oncol* 2014;7:80.
29. Lamich R, Ballester M, Martí V, Brossa V, Aymat R, Carrió I, Bernà LI, Campreciós M, Puig M, Estorch M, Flotats A, Bordes R, Garcia J, Augè J, Padró JM, Caralsp JM, Narula J. Efficacy of augmented immunosuppressive therapy for early vasculopathy in heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:413-9

30. Mehra M, Ventura HO, Chambers RB, Ramireddy K, Smart FW, Stapleton DD. The prognostic impact of immunosuppression and cellular rejection on cardiac allograft vasculopathy: Time for a reappraisal. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:850-859
31. Raichlin E, Bae J, Kushwaha S, Lennon R, Prasad , Rihal Ch, Lerman A. Inflammatory burden of cardiac allograft coronary atherosclerotic plaque is associated with early recurrent cellular rejection and predicts a higher risk of vasculopathy progression. *J Am coll cardiol* 2009;53:1279-86
32. Raichlin E, Brooks E, Kremers W, Clavell A, Rodeheffer R, Frantz R, Pereira N, Daly R, McGregor Ch, Lerman A, Kushkawa S. Acute cellular rejection and the subsequent development of allograft vasculopathy after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:320-7
33. Stoica SC, Cafferty F, Pauriah M, Taylor CJ, Sharples LD, Wallwork J, Large SR, Parameshwar J . The cumulative effect of acute rejection on development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2006 Apr;25(4):420-5. Epub 2006 Feb 28.
34. Arora S, Gunther , Wennerblom B, Ueland T, Andreassen K, Gude E, Endresen K, Geiran O, Wilhelmsen N, Andersen R, Aukrust P, Gullestad L. Systemic markers of inflammation are associated with cardiac allograft vasculopathy and an increased intimal inflammatory component. *Am J Transplant* 2010;10:1428-1436
35. Huibers M, Vink A, Kaldeway J, Huisman A, Timmermans K, Leenders M, Schipper M, Lahpor J, Kirkels H, Klöpping C, de Jonge N, de Weger R. Distinct phenotypes of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: a histopathological study. *Atherosclerosis* 2014;236:353-359 els tipus histològics de CAV.
36. Berry G, Burke M, Andersen C, Bruneval P, Fedrigo M, Fishbein M.C, Goddard M, Hammond E, Leone O, Marboe Ch, Miller D, Neil D, Rassl D, Revelo M.P. Rice A, ReneRodriguez E, Stewart S, Tan C, Winters G, West L, Mehra M, Angelini . The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J HeartLungTransplant*2013;32:1147–1162
37. Kfoury AG , Stehlik J, Renlund DG, Snow G, Seaman JT, Gilbert EM, Stringham JS, Long JW, Hammond ME. Impact of repetitive episodes of antibody-mediated or cellular

rejection on cardiovascular mortality in cardiac transplant recipients: defining rejection patterns. *J Heart Lung Transplant*. 2006 Nov;25(11):1277-82.

38. Topilsky Y, Gandhi MJ, Hasin T, Voit LL, Raichlin E, Boilson BA, Schirger JA, Edwards BS, Clavell AL, Rodeheffer RJ, Frantz RP, Kushwaha SS, Lerman A, Pereira NL. Donor-specific antibodies to class II antigens are associated with accelerated cardiac allograft vasculopathy: a three-dimensional volumetric intravascular ultrasound study. *Transplantation*. 2013 Jan 27;95(2):389-96.
39. Starling RC, Stehlik J, Baran DA, Armstrong B, Stone JR, Ikle D, Morrison Y, Bridges ND, Putheti P, Strom TB, Bhasin M, Guleria I, Chandraker A, Sayegh M, Daly KP, Briscoe DM, Heeger PS; CTOT-05 consortium. Multicenter Analysis of Immune Biomarkers and heart transplantant Outcomes: results of the Clinical Trials in Organ Transplantation-05 Study. *Am J Transplant* 2015; ahead of print
40. Michaels PJ, Espejo ML, Kobashigawa J, et al. Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:58–69.
41. Taylor D, Yowell R, Kfoury A, Hammond E, Renlund D. Allograft coronary artery disease: clinical correlations with circulating anti-HLA antibodies and the immunohistopathologic pattern of vascular rejection. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:518-521
42. Tambur . *Transplantation* 2005; 80:1019-1025 Wehner J, Morrell C, Reynolds T, Rene Rodriguez E, Baldwin III W. Antibody and complement in transplant vasculopathy. *Circ Res* 2007;100:191-203
43. Nath DS, Basha HI, Mohanakumar T. Antihuman leukocyte antigen antibody-induced autoimmunity: role in chronic rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15(1):16–20
44. Win T, Pettigrew G. Humoral autoimmunity and transplant vasculopathy: when allo is not enough. *Transplantation* 2010;90:113-120.
45. Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A, Smith JD, Robinson DR, Dunn MJ, Yacoub MH, Rose ML. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation*. 2001 Apr 15;71(7):886-92.

46. Kauke T, Kaczmarek I, Dick A, Schmoeckel M, Deutsch M-A, Beiras Fernandez A, Recihart B, Spannagl. Anti-MICA antibodies are related to adverse outcome in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:305–11
47. Weis M, Kledal TN, Link HY, Panchal SN, Gao SZ, Valantine H, Mocarski ES, Cooke JP. Cytomegalovirus infection impairs nitric oxide synthase pathway role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation* 2004;109:500-505
48. Simmonds J, Fenton M, Dewar C, Ellins E, Storry C, Cubitt D, Deanfield J, Klein N, Halcox J, Burch M. Endothelial dysfunction and cytomegalovirus replication in pediatric heart transplantation. *Circulation* 2008; 117:2657-2661
49. Delgado J, Garica Reyne A, de Dios S, López-Medrano F, Jurado A, San Juan R, Ruiz-Cano MJ, Folgueira M.D, Gómez Sanchez MA, Aguado JM, Lumbreras C. Influence of cytomegalovirus infection in the development of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2015;34:1112-1119
50. Kobashigawa J, Starling R, Mehra M, Kormos R, Bhat G, Barr M, Sigouin C, Kolesar J, and others. Multicenter retrospective analysis of cardiovascular risk factors affecting long-term outcome of de novo cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 1063–1069
51. Guddeti R, Matsuo Y, Matsuzawa Y, Aoki T, Lennon R, Lerman L, Kushwaha S, Lerman L. Ischemic Cardiomyopathy is Associated With Coronary Plaque Progression and Higher Event Rate in Patients After Cardiac. *J Am Heart Assoc.* 2014;3:e001091
52. Castel MÁ, Roig E, Rios J, Tomas C, Mirabet S, Cardona M, Brossa V, López L, Vargas L, Sionis A, Vallejos I, Pérez-Villa F. Long-term prognostic value of elevated heart rate one year after heart transplantation. *Int J Cardiol.* 2013; 3;168(3):2003-7
53. Prieto D, Correia P, Baptista M, Antunes MJ. Outcome after heart transplantation from older donor age: expanding the donor pool. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015 Apr;47(4):672-8.
54. Nagji AS, Hranjec T, Swenson BR, Kern JA, Bergin JD, Jones DR, Kron IL, Lau CL, Ailawadi G. Donor age is associated with chronic allograft vasculopathy after adult heart transplantation: implications for donor allocation. *Ann Thorac Surg.* 2010 Jul;90(1):168-75

55. Lietz K, John R, Mancini DM, Edwards NM. Outcomes in cardiac transplant recipients using allografts from older donors versus mortality on the transplant waiting list; Implications for donor selection criteria. *J Am Coll Cardiol*. 2004 May 5;43(9):1553-61.
56. Roig E, Almenar L, Crespo-Leiro M, Segovia J, Mirabet S, Delgado J, Pérez-Villa F, Luís Lambert J, Teresa Blasco M, Muñiz J; rest of the participants of the Spanish Heart Transplantation Registry. Heart transplantation using allografts from older donors: Multicenter study results. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Jun;34(6):790-6
57. Derumeaux G, Redonnet M, Mouton-Scheifer D. Dobutamine stress echocardiography in orthotopic heart transplant recipients. VACOMED Research Group. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1665-72
58. Eroglu E, D'Hooge J, Sutherland GR et al. Quantitative dobutamine stress echocardiography for the early detection of cardiac allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *Heart* 2008;94: e3.
59. Estep J, Shah D, Nagueh S.F, Mahmarian J, Torre-Amione G, Zoghbi W. The role of multimodality cardiac imaging in the transplanted heart. *J Am Coll Cardiol Img* 2009;2:1126-40.
60. Pollack A, Nazif T, Mancini D, Weisz G. State of the art. Detection and Imaging of Cardiac Allograft Vasculopathy. *J Am Coll Cardiol Img* 2013;6:613–23
61. Bacal F, Moreira L, Souza G et al. Dobutamine stress echocardiography predicts cardiac events or death in asymptomatic patients long-term after heart transplantation: 4 –year prospective evaluation. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:1238-44
62. Ciliberto GR, Ruffini L, Mangiavacchi M et al. Resting echocardiography and quantitative dipyridamole technetium-99m sestamibi tomography in the identification of cardiac allograft vasculopathy and the prediction of long-term prognosis after heart transplantation. *Eur Heart J* 2001; 22:964-71
63. Carlsen J, Toft JC, Mortensen SA, Arendrup H, Aldershvile J, Hesse B. Myocardial perfusion scintigraphy as a screening method for significant coronary stenosis in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:873-8
64. Steen H, Merten C, Refle S et al. Prevalence of different gadolinium enhancement patterns in patients after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1160-7

65. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Taylor D, Meiser B, Webber S, Hunt Sh, Burch M et al. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 914-956
66. Keogh AM, Valantine HA, Hunt SA, et al. Impact of proximal or midvessel discrete coronary artery stenoses on survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:892-901
67. Gao SZ, Alderman EL, Schroeder JS, et al. Accelerated coronary vascular disease in the heart transplant patient: coronary arteriographic findings. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:334-40
68. Costanzo M, Naftel D, Pritzker M, et al. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: A multi-institutional study of preoperative donor and recipient risk factors. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:744-53
69. Mehra M, Crespo-Leiro M, Dipchand MA, Ensminger S, Hiemann N, Kobashigawa J, Madsen J, Parameshwar J, Starling R, Uber P. International Society for Heart and Lung transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:717-727
70. Rickenbacher P, Pinto FJ, Chenzbraun A et al. Incidence and severity of transplant coronary artery disease early and up to 15 years after transplantation as detected by intravascular ultrasound. *Am J Cardiol.* 1995;76:463-466
71. Rikcenbacher P, Pinto FJ, Lewis N et al. Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation. *Circulation* 1995;92:3445
72. Mehra R, Ventura HO, Stapleton DD, Smart FW, Collins TC, Ramee SR: Presence of severe intimal thickening by intravascular ultrasonography predicts cardiac events In cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:632
73. Kobashigawa J: First year intravascular ultrasound results as a surrogate marker for outcomes after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:711
74. Kobashigawa J. Multi-center intravascular ultrasound validation study among heart transplant recipients: outcomes after 5 years. *Am J Transplant* 2004 (suppl 8):549

75. Romeo G, Houyel L, Angel C, Brenot Ph, Riuo J, Paul J. Coronary stenosis detection by 16-slice computed tomography in heart transplant patients. Comparison with conventional angiography and impact on clinical management. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1826-31
76. Mastrobuoni S, Bastarrika G, Ubilla M, Castaño S, Azcarate P, Alegria E, Castellano JM, Herreros J, Rabago G. Dual-source CT coronary angiogram in heart transplant recipients in comparison with dobutamine stress echocardiography for detection of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* 2009;87: 587-590
77. Pichler Ph, Loewe Ch, Roedler S, Syeda B, Stadler A, Aliabadi A, Schukro Ch, Wolf F, Zuckermann A, Lammer J, Sochor H, Glogar D. Detection of high-grade stenoses with multislice computed tomography in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:310-6
78. Wever-Pinzon O, Romero J, Kelesidis I, Wever-Pinzon J, Manrique C, Budge D, Drakos S, Piña I, Kfoury A, Garcia M, Sthelik J. Coronary computed tomography for the detection of cardiac allograft vasculopathy. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:1992-2004
79. Kobashigawa J. Coronary Computed Tomography Angiography. Is it time to replace the conventional coronary angiogram in heart transplant patients? *J Am Coll Cardiol* 2014;19:2005-6
80. N Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE, Scherer M, Burns D, Tamburro P, Oberoi M, Johnson MR, Costanzo MR. Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation*. 2001 Dec 18;104(25):3091-6.
81. Martin-Ventura JL, Blanco-COlio L, Tuñón J, Muñoz Garcia B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Vega de Céniga M, Egido J. Biomarcadores en la medicina cardiovascular. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:677-88. - Vol. 62 Núm.06
82. Martínez-Dolz L, Almenar L, Reganon E, Vila V, Chamorro C, Andrés L, Martínez-Sales V, Moro J, Agüero J, Sánchez-Lázaro I, Salvador A. Follow-up study on the utility of von Willebrand factor levels in the diagnosis of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27(7):760-6.
83. Labarrere C, Woods R, Hardin J, Campana G.L, Ortiz M.A, Jaeger B, Reichart B, Bonnin JM, Currin A, Cosgrove S, Pitts DE, Kirlin P.C, O'Donnell J.A, Hormuth D.A, Wozniak T.C

- . Early Prediction of Cardiac Allograft Vasculopathy and Heart Transplant Failure. *Am J of Transplant* 2011; 11: 528–535
84. Yen M, Pilkington G, Starling R. Increased tissue factor expression predicts development of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 2002;106:1379–83.
  85. M Januzzi JL, Horne BD, Moore SA, Galenko O, Snoww GL, Brunisholz KD, Muhlenstein JB, Alharethi R, Carlquist JF, Budge D, Rasmussen K, Kfoury AG. Interleukin receptor family member ST2 concentrations in patients following heart transplantation. *Biomarkers* 2013;18 (3):250-6
  86. Mehra MR, Uber PA, Potluri S, Ventura HO, Scott RL, Park MH. Usefulness of an elevated B-type natriuretic peptide to predict allograft failure, cardiac allograft vasculopathy, and survival after heart transplantation. *Am J Cardiol* 2004;94:454-458
  87. Ambrosi P, Oddoze C, Ribéri A, Arques S, Portugal H, Métras D, Habib G. Usefulness of N-terminal-pro-brain natriuretic peptide levels in predicting survival in heart transplant recipients. *Am J Cardiol* 2004;94:1585-1587
  88. Labarrere C, Nelson D, Cox C., Pitts D., Kirlin Ph., Halbrook H. Cardiac-Specific Troponin I Levels and Risk of Coronary Artery Disease and Graft Failure Following Heart Transplantation. *JAMA*. 2000;284(4):457-464.
  89. Ambrosi P, Kreitmann B, Fromont J, Habib G, Guieu R. Plasma ultrasensitive cardiac troponin during long-term follow-up of heart transplant recipients. *J Card Fail* 2014; 21 (2): 103-107
  90. Lin D, Cohen G, Hollander Z, Mancini J, Sasaki M, Mui A, Wilson-MxManus J, Ignaszewski A, Imai C, Meredith A, Balshaw R for the biomarkers in transplantation team and the networks of centres of excellence for commercialization and reserch-prevention of òrgan failure centre of excellence. Plasma protein biosignatures for detrection of cardíac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:723-733 .
  91. Kittleson MM1, Kobashigawa JA. Long-term care of the heart transplant recipient. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014 Oct;19(5):515-2
  92. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR et al. Non invasive discrimination of rejection in cardíac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 2006;6 (1):1389-1395

93. Yamani MH1, Taylor DO, Rodriguez ER, Cook DJ, Zhou L, Smedira N, Starling RC. Transplant vasculopathy is associated with increased AlloMap gene expression score. *J Heart Lung Transplant*. 2007 Apr;26(4):403-6.
94. Singh N, Heggermont W, Fieuws S, Vanhaecke J, Van Cleemput J, De Geest B. Endothelium-enriched microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Jun 17. Ahead of print
95. Van der Meer J, van der Poll T, van't Veer C. TAM receptors, GAS6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood* 2014;123:2460-2469
96. Rothlin C, Carrera-Silva E, Bosurgi L, Ghosh S. TAM receptors signaling in immune homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2015;33:355-391
97. Axelrod H, Pienta K. Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget*, 2014; 5:19:8818-8852
98. Liu YW, Yang QF, Zuo PY, Xiao CL, Chen XL, Liu CY. Elevated serum levels of soluble Axl in acute coronary syndrome. *Am J Med Sci*. 2015;349(2):124-9
99. Mm Hurtado B, García de Frutos P. GAS6 in systemic inflammatory diseases: with and without infection. *Critical Care* 2010, 14: 1003
100. Ekman C1, Gottsäter A, Lindblad B, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 and soluble Axl correlate with disease and predict mortality in patients with critical limb ischemia. *Clin Biochem*. 2010 Jul;43(10-11):873-6.
101. Clauser S, Meilhac O, Bieche I, Raynal P, Bruneval P, Michel JB, Borgel D. Increased secretion of GAS6 by smooth muscle cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost* 2012;107:140-9
102. Hsiao FC1, Lin YF, Hsieh PS, Chu NF, Shieh YS, Hsieh CH, Lee CH, Hung YJ. Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin resistance among overweight and obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Feb;98(2):E267-74.
103. Piñon P, Kaski JC. Inflamación, aterosclerosis y riesgo cardiovascular: PAPP-A, Lp-PLA2 y cistatina C. ¿Nuevas aportaciones o información redundante?. *Rev Esp Cardiol* 2006;59(3):247-58

104. Sudhir K. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2, Vascular Inflammation and Cardiovascular Risk Prediction. *W Vasc Health Risk Manag.* 2006; 2(2): 153–156.
105. Packard CJ, O'Reilly DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343(16):1148-1155
106. Corson MA, Jones PH, Davidson MH. Review of the evidence for the clinical utility of lipoprotein-associated phospholipase A2 as a cardiovascular risk marker. *Am J Cardiol* 2008; 101(12A):41F-50F
107. Koenig W, Twardella D, Brenner H, Rothenbacher D. Lipoprotein-Associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function and hemodynamic stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26: 1586-1593
108. Tsimikas S, Tsironis L, Tselpeis A. New insights into the role of Lipoprotein –associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2094-2099
109. Herrmann J1, Mannheim D, Wohler C, Versari D, Meyer FB, McConnell JP, Gössl M, Lerman LO, Lerman A. Expression of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in carotid artery plaques predicts long-term cardiac outcome. *Eur Heart J.* 2009 Dec;30(23):2930-8
110. Sarlon-Bartoli G, Boudes A, Buffat C, Bartoli MA, Piercecchi-Marti MD, Sarlon E, Arnaud L, Bennis Y, Thevenin B, Squarcioni C, Nicoli F, Dignat-George F, Sabatier F, Magnan PE; RISC Study Group. Circulating lipoprotein-associated phospholipase A2 in high-grade carotid stenosis: a new biomarker for predicting unstable plaque. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012 Feb;43(2):154-9
111. Dohi T, Miyauchi K, Okazaki S, Yokoyama T, Ohkawa R, Nakamura K, Yanagisawa N, Tsuboi S, Ogita M, Yokoyama K, Kurata T, Yatomi Y, Daida H. Decreased circulating lipoprotein-associated phospholipase A2 levels are associated with coronary plaque regression in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis.* 2011 Dec;219(2):907-12
112. M Raichlin E, McConnell J, Bae J, Kremers W, Lerman A, Frantz R. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts progression of cardiac allograft vasculopathy and increased

- risk of cardiovascular events in heart transplant patients. *Transplantation* 2008;85(7):963-968
113. Rosing K, Fobker M, Kannenberg F, Gunia S, Dell'Aquila AM, Kwiecien R, Stypmann J, Nofer JR. Everolimus therapy is associated with reduced lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-Pla2) activity and oxidative stress in heart transplant recipients. *Atherosclerosis*. 2013 Sep;230(1):164-70
  114. Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, Heineke J, Kotlarz D, Xu J, Molkentin JD, Niessen HW, Drexler H, Wollert KC. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2006;17:581-588
  115. M Velders M, Wallentin L, Becker R, van Boven A, Himmelmann A, Husted S, Katus H, Lindholm D, Morais J, Siegbahn A, Storey R, Wernroth L, James S on behalf of the PLATO investigators. Biomarkers for risk stratification of patients with ST-elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention: insights from the platelet inhibition and patient outcomes trial. *Am Heart J* 2015; 169-879-889 e7.
  116. Wallentin L, Hijazi Z, Andersson U, Alexander J, De Caterina R, Hanna M, Horowitz J, Hylek E, Lopes R, Asberg S, Granger C, Siegbahn A, on behalf of the ARISTOTLE Investigators. Growth differentiation factor 15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation. Insights from the Apixaban for reduction in stroke and other thromboembolic events in atrial fibrillation (ARISTOTLE) Trial. *Circulation* 2014;130:1847-1858.
  117. Wang T, Wollert K, Larson M, Coglianese E, McCabe E, Cheng S, Ho J, Fradley M, Ghorbani A, Xanthakis V, Kemps T, Benjamin E, Levy D, Vasan R, Januzzi J. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress. The Framingham heart study. *Circulation* 2012;126:1596-1604
  118. M Patel PC, Hill DA, Ayers CR, Lavingia B, Kaiser P, Dyer AK, Barnes AP, Thibodeau JT, Mlshkin JD, Mammen PP, Markham DW, Stastny P, Ring WA, de Lemos JA, Drazner MH. High-sensitivity cardiac troponin I assay to screen for acute rejection in patients with heart transplant. *Circ Heart Fail* 2014; 7 (3):463-9
  119. Mendez A.B, Cardona M, Ordóñez-Llanos J, Mirabet S, Pérez-Villa F, Roig E. Valor predictivo de la troponina T de alta sensibilidad para descartar el rechazo agudo tras un trasplante cardíaco. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67:775-6.

120. Hofmann NP, Steuer C, Voss A, Erbel C, Celik S, Doesch A, Ehlermann P, Giannitsis E, Bruss SJ, Katus HA, Korosoglou G. Comprehensive bio-imaging using myocardial perfusion reserve index during cardiac magnetic resonance imaging and high-sensitive troponin T for the prediction of outcomes in heart transplant recipients. *Am J Transplant* 2014; 14(11):2607-16
121. Segovia J, Gomez Bueno M, Alonso Pulpon L. Treatment of allograft vasculopathy in heart transplantation. *Expert Opin Pharmacother* 2006;7:2369-2383
122. Mancini D, Pinney S, Burkhoff D, LaManca J, Itescu S, Burke E, Edwards N, Oz M, Marks A. Use of rapamycin slows progression of cardiac transplantation vasculopathy. *Circulation* 2003;108:48-53
123. Segovia J, Alonso Pulpon L, Ortiz P et al. Rapastat: evaluation of the role of oral sirolimus in the treatment of established graft vessel disease. A prospective, randomized intravascular ultrasound study. *J Heart Lung Transplant* 2004;23 (suppl)S51-S52
124. Ortiz P, Segovia J, Alonso Pulpón L et al. Valoración mediante ecografía intracoronaria del efecto del sirolimus en la enfermedad vascular del injerto cardíaco de grado avanzado. *Rev Esp Cardiol* (2004)57 (Suppl):42
125. Manito N, Delgado J, Crespo M, Arizón JM, Segovia J, González-Vilchez F, Mirabet S, Lage E, Pascual D, Díaz B, Palomo J, Rábago G, Sanz M, Blasco T, Roig E. 12-month efficacy and safety of the conversion to everolimus in maintenance heart transplant recipients. *World Journal of Transplantation*. In press
126. Bhamra J, Nguyen D, Scolieri S, Teuteberg J, MD, Toyoda Y, MD, PhD, Kormos R, MD, aMcCurry K, McNamara D, Bermudez Ch. Surgical revascularization for cardiac allograft vasculopathy: Is it still an option? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:1488-92
127. Zakliczynski M, Lekston A, Osuch M, Swierad M, Nadziakiewicz P, Przybylski R, Zembala M. Comparison of long-term results of drug-eluting stent and bare metal stent implantation in heart transplant recipients with coronary artery disease. *Transplant Proc.* 2007 Nov;39(9):2859-61 et al. *Transplant proceedings* 2007;2859-2861
128. Aqel R, Hage FG. Drug-eluting stents in heart transplant recipients. *Am J Cardiol.* 2009 Jun 1;103(11):1624-5ev

129. Agarwal S, Parashar A, Kapadia SR, Tuzcu EM, Modi D, Starling RC, Oliveira GH. Long-term mortality after cardiac allograft vasculopathy: implications of percutaneous intervention. *JACC Heart Fail.* 2014 Jun;2(3):281-8.
130. Musci M, Loebe M, Wellnhofer E, Meyer R, Pasic M, Hummel M, Bocksch W, Grauhan O, Weng Y, Hetzer R. Coronary angioplasty, bypass surgery, and retransplantation in cardiac transplant patients with graft coronary disease. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Oct;46(5):268-74
131. Kato T, Chan MC, Gao SZ et al. Glucose intolerance as reflected by hemoglobin A1c level, is associated with the incidence and severity of transplant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1034-1041
132. Paul L. Calcium channel blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in the prevention of graft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:409-413
133. Schroeder JS, Gao SZ, Hunt SA, Stinson EB. Accelerated graft coronary artery disease: diagnosis and prevention. *E J Heart Lung Transplant.* 1992 Jul-Aug;11(4 Pt 2):S258-65.
134. Kobashigawa JA, Katznelson L, Laks et al. Effects of pravastatin on outcomes after heart transplantation. *N Engl Med* 1995;333:621-627
135. Wenke K, Meiser B, Thierry J et al. Simvastatin initiated early after 8 year prospective study. *Circulation* 2003;107:93-97
136. Weis M, Pehlivanli S, Meiser B et al. Simvastatin treatment is associated with improvement in coronary endothelial function and decreased cytokine activation in patients after heart transplantation. *J Am Coll. Cardiol* 2001;38:814-818
137. Potena L, Grigioni F, Magnani G, Lazzarotto T, Musuraca A, Ortolani P, Coccolo F, Fallani F, Russo, Branzi A. Prophylaxis versus preemptive anti-cytomegalovirus approach for prevention of allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28: 461-7
138. Potena L, Holweg CT, Chin C, Luikart H, Weisshaar D, Narasimhan B, Fearon WF, Lewis DB, Cooke JP, Mocarski ES, Valentine HA. Acute rejection and cardiac allograft vascular

disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation*. 2006; 82(3):398-405

139. Eisen HJ, Kobashigawa J, Khogoh A et al. Three-years results of a randomized , double – blind , controlled trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:517-525
140. Kobashigawa JA, Tobis JM, Mentzer RM et al. Mycophenolate mofetil reduces intimal thickness by intravascular ultrasound after heart transplantation. *Am J Transplant* 2006;6:993-997
141. Eisen H, Kobashigawa J, Starling R.C, Valantine H, Mancini D. Improving outcomes in heart transplantation: the potential of proliferation signal inhibitors. *Transpl Proc* 2005;37:suppl4S, 4S-17S
142. Eisen H, Murat Tuzcu E, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppler H, Starling RC, Sorensen K, Hummel M, Lind J, Abeywickrama K, Bernhardt P for teh RAD B253 Study group. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Eng J Med* 2003;349:9:847-58
143. Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt Ph, Galbraith A, O’Driscoll G, Macdonald P, Esmore D, Muller D, Faddy S. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years. A randomized clinical trial. *Circulation* 2004;110:2694-2700
144. Kobashigawa JA, Pauly DF, Starling RC, Eisen H, Ross H, Wang SS, Cantin B, Hill JA, Lopez P, Dong G, Nicholls SJ; A2310 IVUS Substudy Investigators. Cardiac allograft vasculopathy by intravascular ultrasound in heart transplant patients: substudy from the Everolimus versus mycophenolate mofetil randomized, multicenter trial. *Heart Failure* 2013;1:389-99
145. M. Masetti, L. Potena, M. Nardoza, P. Prestinenzi, N. Taglieri, F. Saia, V. Pece, G. Magnani, F. Fallani, F. Coccolo, A. Russo, C. Rapezzi, F. Grigioni and A. Branzi . Differential Effect of Everolimus on Progression of Early and Late Cardiac Allograft Vasculopathy in Current Clinical Practice. *Am J Transplant* 2013; 13: 1217–1226

146. Guethoff S, Stroeh K, Grinninger C, Koenig M, Kleinert E, Rieger A, Mayr T, von Ziegler F, Reichart B, Hagl B, Schramm R, Kaczmarek I, Meiser B. De novo sirolimus with low dose tacrolimus versus full-dose tacrolimus with mycophenolate mofetil after heart transplantation- 8 years results. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34: 634-642
  
147. Delgado JF, Manito N, Segovia J, Almenar L, Arizón JM, Campreciós M, Crespo-Leiro MG, Díaz B, González-Vílchez F, Mirabet S, Palomo J, Roig E, de la Torre JM. The use of proliferationsignalinhibitors in the prevention and treatment of allograft vasculopathy in heart transplantation. *Transplant Rev* 2009 Apr;23(2):69-79.
  
148. Steward S, Winters G, Fishbein M et al. Revision of the 1990 working formulation for standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1710
  
149. Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Ribas V, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* 2003;108:92e6
  
150. Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med*. 2008 Jan 30;27(2):157-72; discussion 207-12
  
151. Ye F, Ying-Bin X, Yu-Guo W, Hetzer R. Tacrolimus versus cyclosporine microemulsion for heart transplant recipients: a meta-analysis. *J Heart Lung Transplant* 2008;1-9
  
152. Reichart B, Meiser B, Vigano M et al. European Multicenter Tacrolimus (FK506) Heart pilot study: one year results- European Tacrolimus Multicenter Heart Study Group. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:775-781
  
153. Kobashigawa JA<sup>1</sup>, Patel J, Furukawa H, Moriguchi JD, Yeatman L, Takemoto S, Marquez A, Shaw J, Oeser BT, Subherwal S, Wu GW, Kawano J, Laks H. Five-year results of a randomized, single-center study of tacrolimus vs microemulsion cyclosporine in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2006 Apr;25(4):434-9.

154. Koglin J, Muscholl M, Petrakopoulou P et al. Tacrolimus excels cyclosporine A in prevention of cardiac allograft vasculopathy- a prospective IVUS, angiography and Doppler study. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:68 Abstract
155. Guethoff S, Meiser BM, Groetzner J, Eifert S, Grinninger C, Ueberfuhr P, Reichart B, Hagl C, Kaczmarek I. Ten-year results of a randomized trial comparing tacrolimus versus cyclosporine a in combination with mycophenolate mofetil after heart transplantation. *Transplantation*. 2013 Feb 27;95(4):629-34
156. Kaczmarek I, Ertl B, Schmauss D, Sadoni S, Knez A, Daebritz S, Meiser B, Reichart B. Preventing cardiac allograft vasculopathy: long-term beneficial effects of mycophenolate mofetil. *J Heart Lung Transplant*. 2006 May;25(5):550-6.
157. Meiser BM, Groetzner J, Kaczmarek I, Landwehr P, Müller M, Jung S, Ueberfuhr P, Fraunberger P, Stempfle HU, Weis M, Reichart B. Tacrolimus or cyclosporine: which is the better partner for mycophenolate mofetil in heart transplant recipients?. *Transplantation*. 2004 Aug 27;78(4):591-8
158. Eskandary FA, Kohl M, Dunkler D, Aliabadi A, Grömmner M, Schiferer A, Gökler J, Wieselthaler G, Laufer G, Zuckermann A. Lack of donor and recipient age interaction in cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Jun;33(6):629-35
159. Almenar-Bonet L, Sánchez-Lázaro IJ, Martínez-Dolz L. Is age a limiting factor for access to transplantation?. *Transplant Proc*. 2011 Jul-Aug;43(6):2151-3.
160. George JF, Pamboukian SV, Tallaj JA, Naftel DC, Myers SL, Foushee MT, Brown RN, Pajaro OE, McGiffin DC, Kirklin JK. Balancing rejection and infection with respect to age, race, and gender: clues acquired from 17 years of cardiac transplantation data. *J Heart Lung Transplant*. 2010 Sep;29(9):966-72.
161. Weiss ES, Nwakanma LU, Patel ND, Yuh DD. Outcomes in patients older than 60 years of age undergoing orthotopic heart transplantation: an analysis of the UNOS database. *J Heart Lung Transplant*. 2008 Feb;27(2):184-91.

162. Twerenbold R, Wildi K, Jaeger C, Rubini Gimenez M, Reiter M, Reichlin T, Walukiewicz A, Gugala M, Krivoshei L, Marti N, Moreno Weidmann Z, Hillinger P, Puelacher Ch, Rentsch K, Honegger U, Schumacher C, Zurbriggen F, Freese M, Stelzig C, Campodarve I, Bassetti S, Osswald S, Mueller Ch. Optimal Cutoff Levels of More Sensitive Cardiac Troponin Assays for the Early Diagnosis of Myocardial Infarction in Patients With Renal Dysfunction. *Circulation*. 2015;131:2041-2050
163. Mirelis JG, García-Pavía P, Cavero MA, González-López E, Echavarría-Pinto M, Pastrana M, Segovia J, Oteo JF, Alonso-Pulpón L, Escaned J. Magnetic Resonance for Noninvasive Detection of Microcirculatory Disease Associated With Allograft Vasculopathy: Intracoronary Measurement Validation. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015 Jul;68(7):571-8
164. Miller CA, Sarma J, Naish JH, Yonan N, Williams SG, Shaw SM, Clark D, Pearce K, Stout M, Potluri R, Borg A, Coutts G, Chowdhary S, McCann GP, Parker GJ, Ray SG, Schmitt M. Multiparametric cardiovascular magnetic resonance assessment of cardiac allograft vasculopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Mar 4;63(8):799-80.
165. Haddad N F, Khazanie F, Deuse T, Weisshaar D, Zhou J, Wook Nam Ch, Vu T, Gomari F, Skhiri M, Simos A, Schnittger I, Vrovec B, Hunt S, Fearon W. Clinical and Functional Correlates of Early Microvascular Dysfunction After Heart Transplantation. *Circ Heart Fail*. 2012 Nov;5(6):759-68
166. De la Torre Hernandez, Vazquez de Prada J.A. , Burgos V, Sainz Laso F, Fernandez Valls M, Gonzalez Vilchez F, Llano M, Ruano J, Zueco J , Colman T, and Martín Duran R. Virtual Histology Intravascular Ultrasound Assessment of Cardiac Allograft Vasculopathy From 1 to 20 Years After Heart Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:156–62