



**Universidad de Cantabria  
Facultad de Medicina  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA**

# **Estudio de los efectos de los inhibidores de mTOR en el trasplante renal**

**Santander, Noviembre de 2009**



**Universidad de Cantabria  
Facultad de Medicina  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA**

*Tesis doctoral*

**Estudio de los efectos de los inhibidores  
de mTOR en el trasplante renal**

*presentada por*  
**Juan Carlos Ruiz San Millán**  
Licenciado en Medicina y Cirugía

Para optar al grado de

**DOCTOR POR LA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

Director:  
**Manuel Arias Rodríguez**

Santander, Noviembre de 2009



Facultad de Medicina  
*Departamento de Medicina y Psiquiatría*

**D. MANUEL ARIAS RODRIGUEZ**, Catedrático de Nefrología de la Universidad de Cantabria y Jefe de Servicio de Nefrología del Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla”

**CERTIFICA QUE,**

El trabajo de investigación titulado **Estudio de los efectos de los inhibidores de mTOR en el trasplante renal.**

Presentado por **D. JUAN CARLOS RUIZ SAN MILLÁN** para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizado en el Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Universidad de Cantabria y en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla” bajo mi dirección.

Examinado el trabajo considero que está adecuadamente elaborado para su lectura y defensa ante la Comisión que ha de juzgar la Tesis Doctoral.

Y para que conste donde convenga y surta los efectos oportunos, expido este certificado en Santander a 26 de Octubre de 2009.

Dedicada a mi familia y en especial a mis  
padres, quienes, con mucho esfuerzo, me pusieron en el camino.

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Manuel Arias Rodríguez**, mi jefe de toda la vida, por su continuo estímulo en el desarrollo de esta tesis doctoral y en otras muchas cosas más.

A **José M<sup>a</sup> Gómez Ortega**, por su inestimable y concienzuda labor en la evaluación de las biopsias renales.

A **Marcos López Hoyos** y a **David San Segundo** así como a todo el *Servicio de Inmunología* del *Hospital Universitario Marqués de Valdecilla* por su intenso trabajo en el estudio de las células T reguladoras en nuestros pacientes trasplantados.

A **Fritz Diekmann** y a **Jose M<sup>a</sup> Campistol** del Hospital Clinic de Barcelona por su inestimable ayuda para la realización del trabajo sobre proteinuria en pacientes convertidos a Sirolimus.

A todos mis compañeros del *Servicio de Nefrología* del *Hospital Universitario Marqués de Valdecilla*, tanto médicos como enfermeras, auxiliares o administrativos, incluyendo a nuestro informático Oscar García, porque es difícil hacer cualquier cosa sin la colaboración de muchos de los integrantes del mismo.

A **Rafael Escallada** (q.e.d.) porque seguro que algo le tengo que agradecer con respecto a esta tesis, aunque ya no esté entre nosotros hace tiempo.

A los laboratorios Wyeth (hoy en día Pfizer) por su ayuda continua y en especial a **Celia Cortijo**, por su entusiasmo, sin el cual no habiéramos podido conseguir todo el material necesario para el estudio de biopsias renales y a **Jim Burke**.

A los investigadores de otros centros tanto de España como de Portugal que participaron en los proyectos incluidos en esta tesis doctoral, en especial a **Jose M<sup>a</sup> Grinyó, Alfredo Mota, José Reimao Pinto, Jose M<sup>a</sup> Morales, Constantino Rivera, Juan Oliver y David Ramos**.

Y finalmente a **Ana Sánchez Fructuoso** que además de una incansable colaboradora en la mayoría de mis proyectos profesionales hace tiempo ya se convirtió en una gran amiga.

**ABREVIATURAS**

Anti-IL2r	Anti-receptor de la IL-2 (anticuerpos)
AZA	Azatioprina
CPA	Célula presentadora de antígenos
CsA	Ciclosporina A
DSA	Anticuerpos anti-HLA específicos contra el donante
EVE	Everolimus
ICN	Inhibidores de la Calcineurina (Ciclosporina A y Tacrolimus)
IF/TA NOS	Fibrosis intersticial y atrofia tubular sin evidencia de una etiología específica.
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
ISP	Inhibidores de la Señal de Proliferación
MHC	Sistema principal de histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MMF	Micofenolato Mofetil
MPS	Micofenolato Sódico
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORi	Inhibidores del mTOR
NCT	Nefropatía crónica del trasplante
SRL	Sirolimus, Rapamicina
TCR	Tacrolimus
T-regs	Células T reguladoras

## **ÍNDICE**

1. <a href="#">INTRODUCCIÓN:</a>	9
1.1. <a href="#">Resultados a largo plazo del trasplante renal.</a>	9
1.1.1. <a href="#">Causas de pérdida del injerto a largo plazo:</a>	11
1.2. <a href="#">Nefropatía crónica del trasplante</a>	12
1.2.1. <a href="#">Clasificación de Banff'97 de la NCT.</a>	13
1.2.2. <a href="#">Actualización a la clasificación de Banff'97 (Banff'01). Criterios para el diagnóstico del Rechazo Mediado por Anticuerpos.</a>	16
1.2.3. <a href="#">Clasificación de Banff'05.</a>	17
1.2.4. <a href="#">Clasificación de Banff'07.</a>	19
1.2.5. <a href="#">Factores implicados en el desarrollo de la NCT</a>	20
1.2.6. <a href="#">Diagnóstico de la NCT.</a>	25
1.2.7. <a href="#">Impacto de la NCT en la evolución del trasplante.</a>	26
1.3. <a href="#">Tolerancia inmunológica</a>	27
1.4. <a href="#">El problema de la muerte con injerto funcionante</a>	31
1.5. <a href="#">Los fármacos del grupo mTOR</a>	34
1.5.1. <a href="#">Vía metabólica del mTOR</a>	35
1.5.2. <a href="#">Efectos de los fármacos del grupo mTOR</a>	38
1.5.3. <a href="#">Desarrollo clínico del Sirolimus en trasplante renal.</a>	40
1.5.4. <a href="#">Los mTORi y el riesgo vascular</a>	42
2. <a href="#">JUSTIFICACIÓN GENÉRICA DEL TEMA:</a>	45
3. <a href="#">HIPÓTESIS:</a>	50
4. <a href="#">OBJETIVOS:</a>	52
5. <a href="#">RESULTADOS:</a>	54
6. <a href="#">DISCUSIÓN:</a>	62
7. <a href="#">CONCLUSIONES:</a>	72
8. <a href="#">BIBLIOGRAFÍA:</a>	74



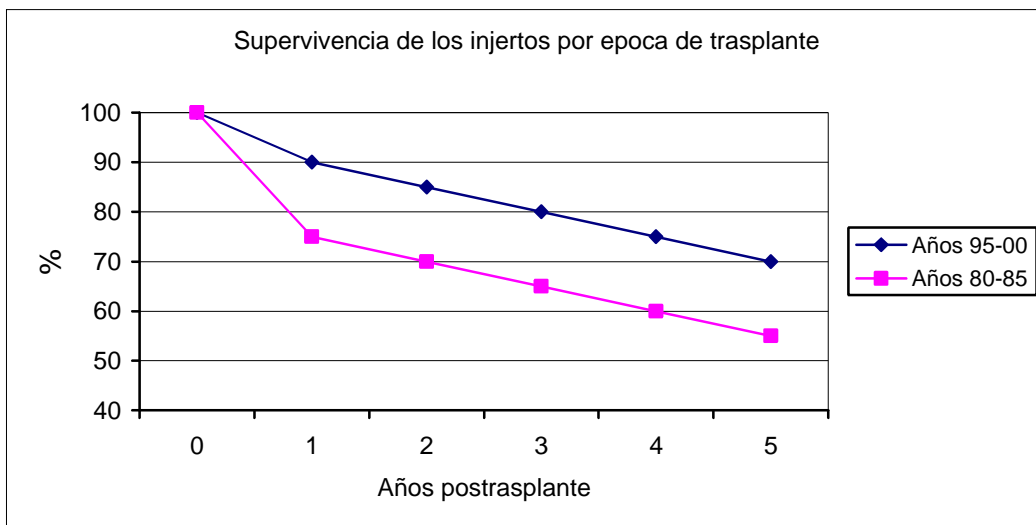
## 1. INTRODUCCIÓN

### ***1.1. RESULTADOS A LARGO PLAZO DEL TRASPLANTE RENAL***

Los resultados del trasplante renal han mejorado significativamente en las dos últimas décadas gracias a las mejoras en las técnicas quirúrgicas, la prevención y el tratamiento de las infecciones, los cuidados médicos y sobre todo la introducción de nuevos inmunosupresores, que ha permitido una reducción en las tasas de rechazo agudo muy significativa, desde aproximadamente un 40% a principios de los años 90 con ciclosporina A (CsA) y azatioprina (AZA) hasta cifras cercanas al 10% en los últimos años tras la introducción del tacrolimus (TCR), el micofenolato mofetil (MMF) y otros (1). Gracias a esto, la supervivencia al año del trasplante ronda en la actualidad el 90% en la mayoría de los registros (2).

En base a esto en el año 2000 Hariharan publica los resultados del registro americano de trasplantes y hace una estimación de la vida media de los injertos a largo plazo (estimación basada en los resultados a corto-medio plazo) en la que muestra un incremento significativo de la sobrevida de los injertos realizados en los años siguientes a la introducción de los nuevos inmunosupresores, comparada con la de los injertos realizados en años anteriores (3). Sin embargo, esta estimación se demuestra años más tarde que no se cumple, tras los trabajos de Meier-Kriesche (utilizando los datos del mismo registro), que demuestra, calculando ya la vida media real (no estimada), que la sobrevida de los injertos no ha mejorado significativamente (4;5).

Este es uno de los paradigmas del trasplante renal más discutido en los últimos años, el de que esta mejoría en los resultados a corto plazo no se sigue de una mejoría evidente a largo plazo en la supervivencia de los trasplantes renales, a pesar de la introducción de nuevos fármacos inmunosupresores, capaces de reducir marcadamente las tasas de rechazo agudo y ha obligado a pensar de forma diferente (buscando nuevos *end-points* en los ensayos clínicos) y a buscar objetivos nuevos en el diseño de nuevos inmunosupresores (6). Básicamente, durante el primer año se aprecia un incremento de la supervivencia de los injertos pero posteriormente el ritmo de pérdida de los mismos mantiene la misma pendiente que hace dos décadas (entre el 3 y el 5% de pérdida cada año), lo que hace pensar que los factores que condicionan esta pérdida a largo plazo no se han modificado significativamente a lo largo de los años (figura 1).



**Figura 1:** Supervivencia a largo plazo de los trasplantes renales por época de trasplante. Pasado el primer año el ritmo de pérdida es similar en ambas épocas.

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de las causas de pérdida de los injertos a largo plazo, causas que son marcadamente diferenciadas de las de pérdida en las fases iniciales (ver tabla 1).

**Tabla 1:** Causas de pérdida del injerto diferenciadas en función del tiempo postrasplante.

Causas durante el primer año	Causas después del primer año
Complicaciones quirúrgicas	Nefropatía crónica del trasplante
Problemas vasculares no quirúrgicos	Muerte del paciente con injerto funcionante
Rechazo agudo	Abandono de la medicación por el paciente
Infecciones	Recidiva de la nefropatía primaria

1.1.1. [Causas de pérdida del injerto a largo plazo:](#)

A partir del primer año de trasplante la pérdida del injerto se puede producir por dos causas fundamentales que son la nefropatía crónica del trasplante (NCT) y la muerte del paciente con injerto funcionante, siendo las causas de origen cardiovascular y las neoplasias las responsables en una gran mayoría de los casos (7).

Con todo, la NCT es la principal causa de pérdida de los injertos a largo plazo, siendo responsable de la pérdida de aproximadamente el 40-50% de los injertos renales.

La muerte del paciente con injerto funcionante es, tras la NCT, la segunda causa de pérdida de injertos renales y supone entre el 30 y el 40 de las pérdidas de injertos a largo plazo. Trataremos este tema en más extensión más adelante.

## 1.2. NEFROPATÍA CRÓNICA DEL TRASPLANTE

Aunque en los años 80 y principios de los 90 se hablaba de rechazo crónico para definir a esta entidad, el progresivo reconocimiento de otros factores no inmunológicos implicados en su desarrollo hicieron que se acuñara este término mucho más inespecífico, que refleja la heterogeneidad de causas y mecanismos que acaban produciendo el daño crónico del injerto. Esta entidad es una especie de cajón de sastre que, definido por unas características histológicas básicas, engloba un daño crónico del injerto ocasionado por una amplia variedad de causas que se pueden clasificar en dos grandes grupos según su origen sea *inmunológico* (rechazo crónico propiamente dicho) o *no inmunológico*, siendo en la mayoría de los pacientes producida por una mezcla de varios de estos factores en diferente intensidad.

Precisamente por esta heterogeneidad de causas a mediados de los 90 un grupo de patólogos se puso de acuerdo para definir esta entidad de cara a un diagnóstico más homogéneo que permitiera comparar resultados en los ensayos clínicos fundamentalmente, creando lo que desde entonces se define como la Clasificación de Banff de la patología del trasplante renal (*Banff Working Classification of Renal Allograft Pathology*) y que más tarde veremos en más detalle (8;9). Hasta entonces la definición y métodos de diagnóstico era muy variable de unas series a otras lo que hacía muy difícil la comparación y valorar con cierta exactitud la importancia de los diferentes factores etiopatogénicos así como la eficacia de diferentes estrategias terapéuticas. Esta clasificación con una primera versión publicada en 1993 (8) y posteriormente revisada en 1997 (9) ha sido validada por múltiples estudios (10-14) y

sigue en continua revisión en reuniones periódicas del grupo de expertos, fruto de lo cual han sido publicadas nuevas actualizaciones en la que cambian algunas definiciones y se profundiza en el diagnóstico diferencial del daño crónico del injerto como veremos más adelante (15;16).

1.2.1. Clasificación de Banff'97 de la NCT:

La clasificación de Banff valora una serie de lesiones renales básicas cuya severidad gradúa en una escala semicuantitativa con una serie de criterios que permiten el establecimiento de unas categorías diagnósticas como veremos más adelante, de las cuales el rechazo agudo (con sus diferentes tipos) y la NCT son las más importantes. Estas lesiones básicas son: la tubulitis (“t”), el infiltrado intersticial (“i”), la arteritis intimal (“v”) y la glomerulitis (“g”) como lesiones agudas y la fibrosis intersticial (“ci”), la atrofia tubular (“ct”), el daño crónico glomerular (“cg”), la expansión de la matriz mesangial (“mm”), el engrosamiento intimal (“cv”) y la hialinosis arteriolar (“ah”) como lesiones crónicas. Cada una de estas lesiones se puede graduar entre 0 y 3 en función de su severidad (ver tablas 2-11).

**Tabla 2:** Criterios de tubulitis (“t”)

t0	Ausencia de células mononucleares en los túbulos
t1	Focos de 1-4 células por sección tubular (ó 10 células tubulares)
t2	Focos de 5-10 células por sección tubular
t3	Focos de >10 células por sección tubular o presencia de al menos dos áreas de destrucción de la membrana basal tubular acompañada de i2, i3 y t2 en cualquier zona de la biopsia

**Tabla 3:** Criterios de infiltrado intersticial (“i”)

i0	Sin inflamación intersticial o leve (<10% del parénquima)
i1	10-25% del parénquima inflamado
i2	26-50% del parénquima inflamado
i3	>50% del parénquima inflamado

**Tabla 4:** Criterios de arteritis intimal (“v”)

v0	Sin arteritis
v1	Arteritis intimal leve-moderada en al menos una sección arterial
v2	Arteritis intimal severa con al menos un 25% de pérdida del área luminal en al menos una sección arterial
v3	Arteritis transmural y/o necrosis fibrinoide con infiltrado linfocitario en el vaso

**Tabla 5:** Criterios de glomerulitis (“g”)

g0	Ausencia de glomerulitis
g1	Glomerulitis en menos del 25% de los glomérulos
g2	Glomerulitis global o segmentaria en el 25-75% de los glomérulos
g3	Glomerulitis en más del 75% de los glomérulos

**Tabla 6:** Criterios de fibrosis intersticial (“ci”)

ci0	Fibrosis intersticial en hasta un 5% del área cortical
ci1	Fibrosis leve-moderada en el 6-25% del área cortical
ci2	Fibrosis moderada en 26-50% del área cortical
ci3	Fibrosis severa en más del 50% del área cortical

**Tabla 7:** Criterios de atrofia tubular (“ct”)

ct0	Ausencia de atrofia tubular
ct1	Atrofia tubular de hasta el 25% del área tubular cortical
ct2	Atrofia tubular en el 26-50% de los túbulos corticales
ct3	Atrofia tubular en más del 50% de los túbulos corticales

**Tabla 8:** Criterios de daño crónico glomerular (“cg”)

cg0	Ausencia de glomerulopatía o dobles contornos en menos del 10% de los ovillos capilares periféricos en los glomérulos más afectados
cg1	Dobles contornos en hasta el 25% de los ovillos capilares periféricos en los glomérulos más afectados no esclerosados
cg2	Dobles contornos en el 26-50% de los ovillos capilares periféricos en los glomérulos más afectados no esclerosados
cg3	Dobles contornos en más del 50% de los ovillos capilares periféricos en los glomérulos más afectados no esclerosados

**Tabla 9:** Criterios de engrosamiento de la matriz mesangial (“mm”)

mm0	Ausencia de incremento de matriz mesangial
mm1	Afectación de hasta un 25% de los glomérulos no esclerosados
mm2	Afectación de 26-50% de los glomérulos no esclerosados (al menos engrosamiento moderado)
mm3	Afectación de más del 50% de los glomérulos no esclerosados (al menos engrosamiento moderado)

**Tabla 10:** Criterios de engrosamiento intimal (“cv”)

cv0	Ausencia de cambios crónicos vasculares
cv1	Estrechamiento de hasta un 25% del área luminal por engrosamiento fibrointimal de la arteria con o sin brechas en la lámina elástica interna o células espumosas o mononucleares
cv2	Incremento en la severidad de los cambios descritos con 26-50% de estrechamiento de la luz vascular
cv3	Cambios vasculares severos con >50% de estrechamiento del área luminal

**Tabla 11:** Criterios de hialinosis arteriolar (“ah”)

ah0	Ausencia de engrosamiento hialino PAS positivo de las arteriolas
ah1	Engrosamiento hialino PAS + leve o moderado en al menos una arteriola
ah2	Engrosamiento hialino PAS + moderado en más de una arteriola
ah3	Engrosamiento hialino PAS + severo en muchas arteriolas

Desde la primera clasificación de Banff en el año 93 la NCT se define por la presencia en la biopsia del injerto de fibrosis intersticial y atrofia tubular en variable intensidad, en una muestra con un número mínimo de glomérulos y arteriolas para que sea valorable. Pueden acompañarse otras lesiones crónicas a nivel glomerular o vascular pero no son imprescindibles para el diagnóstico de NCT, aunque pueden orientar hacia la etiología de la misma.

La Clasificación de Banff'97 considera *adecuada* una muestra de tejido renal (obtenida bien por punción con trucut o por cuña) de al menos 10 glomérulos y 2 arterias, aunque una muestra menor se puede aceptar para el diagnóstico, siempre que contenga al menos 7 glomérulos y 1 arteria (biopsia *marginal*). Por debajo de estas cifras la muestra se considera *no adecuada* para diagnóstico. Además se precisan al menos las tinciones de Hematoxilina-Eosina, PAS, Tricrómico y Plata-Metenamina, para poder identificar con seguridad todas las lesiones básicas.

Una vez cuantificadas estas lesiones básicas se pueden establecer las siguientes categorías diagnósticas (tabla 12):

**Tabla 12:** Categorías diagnósticas de Banff 97 para biopsias del injerto renal

1	Normal	
2	Rechazo mediado por anticuerpos	Rechazo debido, al menos en parte, a anticuerpos anti-donante
	a) Inmediato (hiperagudo)	
	b) Retrasado (agudo acelerado)	
3	Cambios borderline sospechosos de rechazo agudo	No hay arteritis intimal, pero hay focos de tubulitis leve (1 a 4 mononucleares por sección tubular) y al menos 1
4	<b>Rechazo agudo/activo</b>	
	<i>Tipo (Grado)</i>	<i>Hallazgos histopatológicos</i>
	IA	Infiltrado intersticial significativo (>25% del parénquima afectado) y focos de tubulitis moderada (>4 mononucleares

		por sección tubular o grupo de 10 células tubulares)
	IB	Infiltrado intersticial significativo(>25% del parénquima afectado) y focos de tubulitis severa (>10 mononucleares por sección tubular o grupo de 10 células tubulares)
	IIA	Arteritis intimal leve a moderada (v1)
	IIB	Arteritis intimal severa, que comprende >25% del área luminal (v2)
	III	Arteritis transmural y/o necrosis fibrinoide de la media (v3 con linfocitos acompañantes)
5	<b>Nefropatía crónica del trasplante</b>	
	<i>Grado</i>	<i>Hallazgos histopatológicos</i>
	Grado I (leve)	Fibrosis intersticial y atrofia tubular leves sin (a) o con (b)cambios de rechazo crónico
	Grado II (moderado)	Fibrosis intersticial y atrofia tubular moderadas (a) o (b)
	Grado III (severa)	Fibrosis intersticial y atrofia tubular severas y pérdida de túbulos (a) o (b)
6	<b>Otras</b> (cambios no considerados como debidos a rechazo)	
	Enfermedad linfoproliferativa postrasplante	
	Cambios no específicos	
	Necrosis tubular aguda	
	Nefritis intersticial aguda	
	Cambios agudos o crónicos asociados a Ciclosporina o a FK-506	
	Lesión subcapsular	
	Lesión endotelial aguda pretrasplante	
	Necrosis papilar	
	Glomerulonefritis de novo	
	Recurrencia de la enfermedad de base	
	Enfermedad preexistente en el donante	
	Infección viral	
	Obstrucción/reflujo, fistula urinaria	
	Otras	

1.2.2. [Actualización a la clasificación de Banff'97 \(Banff'01\). Criterios para el diagnóstico del Rechazo Mediado por Anticuerpos:](#)

En el 2001 se profundiza en el diagnóstico de la categoría 2 de la clasificación de Banff'97 (Rechazo mediado por anticuerpos), que hasta entonces era poco precisa y se relacionaba únicamente con aquellos casos de rechazo hiperagudo o de rechazo acelerado, en general diagnosticados por su presentación clínica. La incorporación de la



detección del subproducto de la cascada del complemento C4d en la biopsia renal permitió una más precisa y precoz identificación de aquellos casos en los que había una respuesta inmune mediada humoralmente y por tanto la instauración de tratamiento específico. Esta nueva técnica, junto con la detección de anticuerpos anti-HLA específicos contra el donante permitió una mejor definición de esta categoría, detectando más casos de este tipo (17) (tabla 13).

**Tabla 13:** Cambios en la clasificación de Banff'97 (Actualización de Banff'01)

<b>Rechazo mediado por anticuerpos</b>		Rechazo debido, al menos en parte, a anticuerpos anti-donante (cuando no se demuestren anticuerpos donante específicos se hablará de “sospecha de”)
<b>a) Agudo</b>		
	<i>Tipo (Grado)</i>	<i>Hallazgos histopatológicos</i>
	I	C4d (+) y lesiones similares a la necrosis tubular aguda. Mínima inflamación
	II	C4d (+) y marginación capilar y/o trombosis (capilaritis glomerular y leucocitos poli y/o mononucleares en los capilares peritubulares)
	III	C4d (+) y arteritis (v3)

1.2.3. Clasificación de Banff'05:

El concepto de NCT supuso un avance al sustituir a la terminología difusa que existía previamente y englobarla en un concepto común y sobre todo al eliminar el término antiguo de rechazo crónico que era asociado por la mayoría de los médicos de trasplante con un daño de origen inmunológico, que no siempre era la causa de la disfunción crónica del injerto. El reconocimiento de otros factores no inmunológicos implicados en esta entidad hizo que se consolidara el término de NCT. Sin embargo este término es más bien un cajón de sastre, más que una entidad concreta, que engloba muchas causas de daño crónico del injerto y de alguna manera dificulta una correcta

diferenciación de la entidad concreta que tiene un paciente y la elección del tratamiento más adecuado para cada paciente.

En el año 2005 el grupo de expertos de Banff decidió establecer una serie de cambios en las categorías diagnósticas con dos objetivos fundamentales, 1) profundizar en la etiología de la disfunción crónica del injerto, eliminando el término inespecífico de NCT y 2) describir una nueva entidad, el rechazo crónico mediado por anticuerpos (15), en base a la presencia de cambios sugestivos, sobre todo glomerulares y arteriales y C4d(+) en la biopsia.

El término NCT se elimina de la clasificación, diferenciando varios diagnósticos con etiopatogenia diferente y creando el término de *Fibrosis Intersticial y Atrofia Tubular Sin Causa Específica (IF/TA NOS*, del inglés *Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy Not Otherwise Specified*) para aquellos casos en los que no se encuentren alteraciones que sugieran una causa concreta (tabla 14).

De esta manera se supone que parte de los casos que antes eran clasificados como NCT ahora ya no serán clasificados dentro de la categoría IF/TA NOS sino que serán englobados en la 2b de rechazo crónico mediado por anticuerpos, con implicaciones pronósticas y de manejo terapéutico sensiblemente diferentes (aunque esto no está aun claramente definido).

**Tabla 14:** Nuevas categorías diagnósticas. Actualización Banff’05

1	Normal	
2	<b>Rechazo mediado por anticuerpos</b>	Rechazo debido, al menos en parte, a anticuerpos anti-donante
	a) <b>Agudo</b>	
	<i>Tipo (Grado)</i>	<i>Hallazgos histopatológicos</i>
	I	Sin cambios respecto a Banff’01

	II	Sin cambios respecto a Banff'01
	III	Sin cambios respecto a Banff'01
	<b>b) Crónico</b>	Dobles contornos glomerulares y/o multilaminación de las membranas basales de los capilares peritubulares y/o fibrosis intersticial/atrofia tubular y/o fibrosis intimal arterial, pero siempre con C4d (+)
3	Cambios borderline sospechosos de rechazo agudo mediado por células T	No hay arteritis intimal, pero hay focos de tubulitis leve (1 a 4 mononucleares por sección tubular) y al menos 1
4	<b>Rechazo mediado por células T</b>	
	<i>a) Agudo</i>	
	<i>Tipo (Grado)</i>	<i>Hallazgos histopatológicos</i>
	IA	Sin cambios respecto a Banff'97
	IB	Sin cambios respecto a Banff'97
	IIA	Sin cambios respecto a Banff'97
	IIB	Sin cambios respecto a Banff'97
	III	Sin cambios respecto a Banff'97
	<i>b) Crónico (Rechazo crónico activo mediado por células T)</i>	Arteriopatía crónica del injerto (fibrosis intimal con infiltración de células inflamatorias en la fibrosis, formación de neointima)
5	<b>Fibrosis intersticial con atrofia tubular sin causa específica (IF/TA NOS)</b>	
	<i>Grado</i>	<i>Hallazgos histopatológicos</i>
	I (leve)	Fibrosis intersticial y atrofia tubular leves (menos del 25% del área cortical)
	II (moderado)	Fibrosis intersticial y atrofia tubular moderadas (26-50% del área cortical)
	III (severa)	Fibrosis intersticial y atrofia tubular severas y pérdida de túbulos (más del 50% del área cortical)
6	<b>Otras</b> (cambios no considerados como debidos a rechazo agudo o crónico)	

#### 1.2.4. Clasificación de Banff'07:

En el año 2007, tras la 9ª conferencia de Banff celebrada en España (Coruña) se incluyen algunas modificaciones a la anterior. Concretamente se cuantifica el grado de capilaritis peritubular y se gradúa el depósito de C4d, ambos en una escala semicuantitativa y se reinterpreta el hallazgo de C4d (+) sin datos morfológicos de rechazo activo, entre otros cambios menores (tablas 15 y 16).

**Tabla 15:** Criterios cuantitativos de la capilaritis peritubular:

ptc0	No capilaritis significativa en la corteza o menos del 10% de los capilares inflamados
ptc1	10% o más de los capilares peritubulares corticales con capilaritis (máximo de 3-4 células inflamatorias en la luz)
ptc2	10% o más de los capilares peritubulares corticales con capilaritis (máximo de 5-10 células inflamatorias en la luz)
ptc3	10% o más de los capilares peritubulares corticales con capilaritis (más de 10 células)

	inflamatorias en la luz)
--	--------------------------

**Tabla 16:** Score para la tinción de C4d (porcentaje de la biopsia ó 5 campos de gran aumento):

C4d0	Negativo (0%)
C4d 1	C4d mínimo (1-<10%)
C4d 2	C4d positivo focal (10-50%)
C4d 3	C4d positivo difuso (>50%)

El significado del depósito focal de C4d aún no está claro, aunque en un porcentaje no desdeñable de casos se asocia con anticuerpos circulantes donante-específicos por lo que debe de ser tenido en cuenta. En esta actualización se hace hincapié en las diferencias entre las técnicas de detección del C4d. El *gold-standard* es la inmunofluorescencia pero en muchos centros se utiliza la inmunohistoquímica, una técnica algo menos sensible por lo que el hallazgo de C4d focal con esta segunda técnica debe ser confirmado si es posible con la primera, con la que muchas veces se demostrará que el depósito es difuso.

#### 1.2.5. Factores implicados en el desarrollo de la NCT:

Como decíamos más arriba la NCT es la consecuencia final de una amplia serie de factores que inducen daño crónico del injerto. Los *factores inmunológicos* son claramente reconocidos desde hace muchos años, aunque cada vez en los últimos años una serie de factores no inmunológicos van cobrando más importancia.

Tanto la respuesta inmune celular, directa o indirecta, como la humoral tienen importancia en el desarrollo del rechazo crónico, como se ha demostrado en múltiples estudios clínicos y experimentales (18-20). Diferentes estudios demuestran que el *rechazo agudo*, especialmente cuando es severo, recidivante o tardío es un factor de

riesgo de primera importancia en el rechazo crónico (21;22). El *número de incompatibilidades HLA* parece ser otro factor de riesgo reconocido, pero no está aun claro si su efecto es independiente de la presencia o ausencia de rechazo agudo (23). La producción después del trasplante de *anticuerpos anti-HLA donante-específicos*, tanto de la clase I como de la clase II también se ha demostrado que se correlaciona con la aparición de rechazo crónico posiblemente por la activación de la vía indirecta del aloreconocimiento (24-26). La detección de aloanticuerpos puede preceder las manifestaciones clínicas de la NCT (26) hasta en 1 año y hay autores que incluso recomiendan su monitorización postrasplante una vez al año para tratar de anticiparse al desarrollo de NCT, aunque esto no está aceptado por todos (27). El método de determinación de los anticuerpos anti-HLA tiene cierta importancia dado que los resultados son variables en función de la técnica utilizada. Los anticuerpos anti-HLA determinados por ELISA se han asociado con una mayor frecuencia de rechazo, tanto si están relacionados con el donante como si no lo están, sin embargo, si los anticuerpos se detectan por citotoxicidad, únicamente aquellos relacionados con el donante se asocian a rechazo agudo y crónico (28;29).

Recientes estudios también indican que pueden demostrarse depósitos del subproducto del complemento *C4d* en los capilares peritubulares, en biopsias de pacientes con NCT, sugiriendo la existencia de un proceso inmunológico activo en un subgrupo de pacientes (30-35) aunque el significado real de esto aun está por definir claramente.

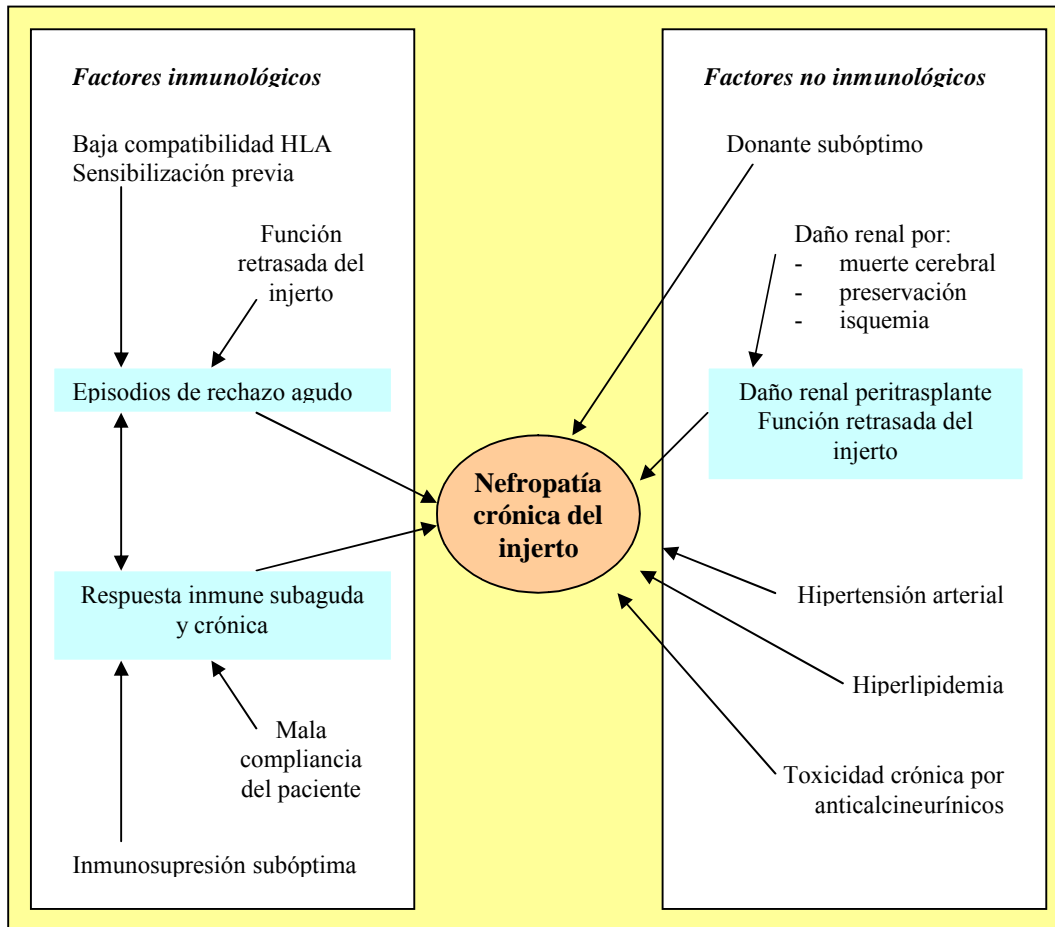
En la práctica clínica es difícil valorar la influencia de la inmunidad celular, más allá de la aparición de rechazo agudo clínicamente evidente o no. Únicamente la

realización de biopsias de protocolo para la detección de rechazo subclínico permitiría monitorizar este tipo de respuesta inmune con objeto de prevenir su efecto sobre la aparición de rechazo crónico. Por el contrario, la respuesta inmune humoral es más fácilmente detectable puesto que existen tests *in vitro* para la detección de anticuerpos anti-HLA circulantes (tanto inespecíficos como específicos del donante) (36).

Recientemente algunos trabajos muestran que la presencia en sangre periférica de células T memoria aloreactivas contra las células del donante se puede correlacionar con la función del injerto a largo plazo. Este parámetro puede ser estimado en base a la producción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), con una técnica disponible hoy en día conocida como ELISPOT (37-40) y abre una puerta en la monitorización inmunológica de cada paciente de cara a adecuar la intensidad de inmunosupresión que requiere cada paciente a largo plazo.

El objetivo ideal para prevenir la NCT desde el punto de vista inmunológico sería el desarrollo de tolerancia inmunitaria (ver más adelante, capítulo 1.3), pero hasta la actualidad no existe modo alguno de conseguirlo ni método de laboratorio que pueda medir dicho estado en la práctica clínica (41;42). La única manera de probarlo sería eliminando la inmunosupresión en un paciente dado, lo cual tendría un riesgo evidente de rechazo agudo.

Los *factores no inmunológicos* tienen un papel importante (y creciente) en la patogénesis de la NCT (figura 2).



**Figura 2:** Factores implicados en el desarrollo de la NCT [Adaptado de Pascual M et al (43)]

El uso de inhibidores de la calcineurina (ICN) es quizás uno de los factores no inmunológicos que más se relacionan con el desarrollo de NCT. Estos fármacos se asocian con el desarrollo de nefrotoxicidad aguda y crónica (**nefrotoxicidad por anticalcineurínicos**). La nefrotoxicidad crónica es un diagnóstico histológico que se caracteriza por fibrosis intersticial y atrofia tubular con hialinosis arteriolar (generalmente nodular), fibrosis en bandas, microcalcificaciones tubulares y finalmente glomerulosclerosis. Numerosos datos hoy en día sustentan la idea de que ambos ICN, CsA y TCR tienen efectos profibrogénicos y su uso continuado se asocia con grados similares de fibrosis, tanto en injertos de vivo como de cadáver (44), así como en

riñones propios de receptores de otros órganos sólidos (corazón, hígado, etc.) (45). Estos cambios estructurales en el injerto pueden ser ya muy avanzados en el momento del diagnóstico y posiblemente superar el umbral de reversibilidad, siguiéndose por tanto de un deterioro progresivo de la función renal (46).

El modelo de insuficiencia renal que se observa en los pacientes receptores de otros órganos diferentes del renal es muy clarificador a la hora de valorar la importancia de este fenómeno (la nefrotoxicidad por ICN) en el desarrollo de daño renal progresivo puesto que aquí todo componente inmunológico de daño renal está descartado y aunque puede haber otros factores que colaboren al daño renal (función renal pretrasplante, datos demográficos del receptor, comorbilidad, daño agudo durante el trasplante (AKI), nefroangioesclerosis, etc.) está claro hoy en día la relevancia de este fenómeno de toxicidad, que lleva a la IR Terminal a un número significativo de pacientes unos años después de recibir otro órgano (47).

Los cambios histológicos del cuadro conocido como IF/TA NOS pueden ser detectados incluso a los 3 meses del trasplante independientemente del origen del riñón (44;48-50). Se ha descrito recientemente que existe disfunción renal prácticamente en todos los receptores de trasplante cardíaco tratados con CsA a los 3 años del trasplante (51) y esta alta prevalencia se considera que es consecuencia de la exposición acumulativa a los ICN en el periodo postrasplante.

El deterioro progresivo de función renal y la pérdida progresiva de injertos tras el trasplante renal es consecuencia del lento e insidioso desarrollo de fibrogenesis, fenómeno mediado por una serie de citocinas y factores de crecimiento. Esta



fibrogénesis es iniciada y mantenida por una transformación epitelio-mesenquimal (EMT) (52), la cual resulta en la acumulación de matriz extracelular y conduce al desarrollo y progresión de la fibrosis intersticial y la atrofia tubular (53). Estas observaciones soportan la idea de que la IF/TA NOS es una lesión histológica acumulativa y progresiva relacionada con la dosis y la duración de la exposición a los ICN y que puede ser además influenciada por la presencia de otros factores inmunológicos o no inmunológicos (43;53).

1.2.6. Diagnóstico de la NCT:

El principal problema de la NCT es que su diagnóstico es exclusivamente histológico por lo que se requiere siempre la realización de una biopsia renal para poder hacerlo. Clínicamente se puede sospechar por la presencia de proteinuria, mal control de la tensión arterial y sobre todo un lento deterioro de la función renal, pero esto puede ser debido a otras causas y lo que es más importante, es posible detectar dicha entidad en biopsias de protocolo en pacientes que no muestran ninguno de los datos clínicos anteriores. Cuando se realizan biopsias de forma programada a intervalos fijos se demuestra que un porcentaje significativo de pacientes ya muestran esta entidad en fases tempranas del trasplante, incluso aunque no haya ningún dato clínico o analítico que lo sugiera (54-56). Aproximadamente un 40% de los pacientes trasplantados mostrarán datos histológicos compatibles con una NCT a los 3 meses del trasplante, un 50% a los 12 meses, un 66% a los 2 años y un 100% a los 10 años.

Para calcular la incidencia de la NCT hay que tener en cuenta que en aproximadamente un 15% de las biopsias del donante (ya antes del trasplante) existen lesiones crónicas indistinguibles de la NCT. La incidencia y severidad de la NCT aumenta rápidamente durante los primeros meses y de forma más lenta a partir del primer año del trasplante.

1.2.7. *Impacto de la NCT en la evolución del trasplante:*

La presencia de NCT en las biopsias de protocolo se asocia a una menor supervivencia del injerto (56-59) y además este valor predictivo de la NCT sobre la supervivencia del injerto es independiente de otras variables clínicas como la creatinina, el rechazo agudo o la proteinuria (48;57)

Sin embargo, no solo el diagnóstico histológico de NCT tiene influencia sobre la supervivencia del injerto a largo plazo, si no que hay otros factores histológicos que modifican el pronóstico. La presencia de **daño crónico vascular** (vasculopatía de injerto;  $cv \geq 1$  según la clasificación de Banff) se asocia con una supervivencia significativamente menor del injerto a largo plazo como demuestra Nankivell en una serie de 102 pacientes trasplantados con biopsia de protocolo a los 3 y a los 12 meses (59).

Recientemente Moreso y colaboradores publican su experiencia con biopsias de protocolo y demuestran que la existencia de **rechazo subclínico asociado a la NCT** en una biopsia de protocolo también se asocia con un peor pronóstico a largo plazo,

significativamente peor que el de aquellos pacientes con el mismo grado de NCT pero sin rechazo subclínico asociado (60).

Es precisamente en estos factores que pueden indicar un pronóstico diferente de la NCT en lo que se basan las modificaciones incluidas en la nueva clasificación de Banff anteriormente descrita (61).

### 1.3. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA:

El término *tolerancia* en sentido amplio se refiere a la ausencia de una respuesta inmune contra antígenos específicos (manteniéndose una respuesta normal contra el resto de antígenos extraños). Durante el desarrollo de un individuo una de las funciones críticas del sistema inmune es prevenir las respuestas dirigidas contra sus propios antígenos, para prevenir las enfermedades autoinmunes. Esto se consigue por dos mecanismos que son la *tolerancia central* (a nivel del timo) y la *tolerancia periférica* (a nivel del tejido linfoide extratímico). Durante el desarrollo de las células T, la gran mayoría de las que se encuentran en el timo tienen reactividades indeseadas y son destruidas o bien se hacen no respondedoras (selección negativa). Las células T que reconocen antígenos extraños son positivamente seleccionadas y comienzan a circular por la sangre. Sin embargo, el proceso de selección negativa (para destruir o inactivar a las células T que reaccionan contra antígenos propios) es imperfecto y se pueden encontrar células T autoreactivas en sangre periférica. Para prevenir los fenómenos de autoinmunidad entonces entra en juego la tolerancia periférica.

La tolerancia periférica es mantenida por una serie de mecanismos que incluyen la delección clonal, la anergia y la supresión. En contraste con la delección clonal de las células T (donde estas son destruidas selectivamente), las células T anérgicas están presentes pero son incapaces de responder por la ausencia de señales coestimuladoras entre otras causas (62). La existencia de células T supresoras se ha demostrado por experimentos de transferencia adoptiva de unos animales a otros (la transferencia de células de animales tolerantes puede inducir tolerancia en animales no tolerantes). Sin embargo, el fenotipo molecular de las células supresoras incluyendo sus moléculas de superficie y las moléculas solubles que liberan aun no está bien caracterizado. Un subtipo de células T que expresan CD25 en su superficie (la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2) parece ser importante en la supresión de respuestas inmunes.

En el campo del trasplante renal la tolerancia puede ser definida como la ausencia de una respuesta inmune destructiva contra el injerto en un huésped con una respuesta inmune por lo demás intacta. Muchos trabajos y experimentos han intentado ahondar en los mecanismos que producen esta tolerancia, así por ejemplo, la inyección intratímica de antígenos solubles es capaz de inducir tolerancia central. Otros experimentos consistentes en la ablación (farmacológica) del sistema inmune del receptor y posterior reconstitución con médula ósea del receptor y del donante, generando un sistema inmune quimérico, también han demostrado ausencia de respuesta inmune específica contra el donante (63).

Se han intentado diferentes estrategias para inducir tolerancia periférica, por ejemplo, se ha podido inducir la delección de células T por muerte celular programada o apoptosis. El bloqueo de la señal coestimuladora del linfocito T también induce

anergia, así como la manipulación del ambiente de citocinas alrededor del linfocito. Algunas estrategias han utilizado los efectos inmunomoduladores de algunos péptidos derivados de secuencias de aminoácidos encontradas en las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC).

Sin embargo, a pesar del éxito de los nuevos fármacos inmunosupresores para prolongar la supervivencia del injerto, la consecución de tolerancia específica contra los antígenos del donante sigue siendo un objetivo no conseguido, más que una realidad en el trasplante y uno de los principales avances a conseguir en el futuro. Lo que si es cierto es que aunque no se consiga la tolerancia completa, situaciones cercanas a la tolerancia, en las que se puede conseguir el funcionamiento del injerto con una inmunosupresión mínima si que se han conseguido.

En los últimos años varias publicaciones han resaltado la importancia de una subpoblación de linfocitos T que tienen un efecto regulador de la respuesta inmune una vez puesta en marcha y que se han definido como *células T reguladoras* o *T-regs* (64). Estas células podrían tener una importancia crucial en el desarrollo de tolerancia, ejerciendo un control sobre las células efectoras (65). Se caracterizan por un fenotipo específico, mostrando en su superficie las moléculas CD4 y CD25 además de FOXP3 en su citoplasma, por lo que se definen también como células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> (65;66). De hecho la expresión del factor de transcripción FOXP3 define a las células T reguladoras y se considera el gen principal de estas células(64;65). La expresión de FOXP3 modula la capacidad funcional de las células T reguladoras y de hecho, las mutaciones en el gen del FOXP3 se asocian con un síndrome autoinmune letal en ratones además de otras alteraciones (67). También se ha observado que la transfección

de FOXP3 en células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup> las convierte en células con capacidad supresora (68). Se desconoce hoy en día cual es el mecanismo por el que FOXP3 induce esta regulación.

Esta subpoblación de células representa aproximadamente entre el 5 y el 10% de las células esplénicas y se ha demostrado en experimentos con ratones que su infusión en ratones timectomizados en la época neonatal evita los fenómenos autoinmunes característicos de este tipo de ratones.(69). También se ha demostrado el efecto beneficioso de estas células en la enfermedad injerto contra huésped y en el trasplante de islotes pancreáticos (70;71).

La importancia de este tipo de células en el trasplante renal aun no está claramente definido, pero si que se han publicado trabajos que demuestran la presencia de células donante-específicas de este tipo en sangre periférica de receptores de trasplante renal (72), aunque no se ha conseguido encontrar una correlación entre su presencia y el grado de respuesta inmunológica, posiblemente por la interferencia en la respuesta inmune (vía activación del receptor del linfocito T) que ejercen los diferentes inmunosupresores (73).

El reconocimiento antigénico tras el trasplante renal parece tener dos mecanismos diferenciados, lo que se conoce como aloreconocimiento directo e indirecto. En el primero las células presentadoras de antígenos (CPA) procedentes del donante presentan las moléculas MHC intactas a los linfocitos del receptor desencadenando la respuesta inmune. Este mecanismo parece producirse durante las fases iniciales del trasplante y es el responsable del rechazo agudo. Por el contrario, en

el aloreconocimiento indirecto, son las CPA del propio receptor las que procesan los antígenos y se los presentan a los linfocitos. Este segundo mecanismo parece tener más importancia en la fase estable del trasplante (pasadas las fases iniciales) y parece estar controlado por las células T reguladoras (74). De ahí la importancia que pueden tener estas células reguladoras en la respuesta inmune a largo plazo y en la aparición de rechazo crónico (75) y por tanto en la supervivencia del injerto. Sin embargo, el efecto real de inducción de tolerancia que pueden tener estas células aun no está claramente establecido. Este es uno de los campos de más interés para investigar en el futuro.

En este sentido, la influencia que puedan tener los diferentes inmunosupresores sobre la aparición y cuantía de estas células reguladoras es un tema de creciente interés. Se sabe que la aparición de T-regs requiere la presencia de interleucina-2 (IL-2) en grandes cantidades (76), por lo que los anticalcineurínicos pueden, de alguna manera, al bloquear la síntesis de esta citocina, inhibir la formación de estas células y por tanto bloquear la posible aparición de tolerancia a largo plazo (77), algo que podría ser diferente en el caso de otros inmunosupresores con mecanismo de acción diferente.

#### **1.4. EL PROBLEMA DE LA MUERTE DEL PACIENTE CON INJERTO FUNCIONANTE:**

Después de la pérdida de injertos por disfunción crónica la muerte con injerto funcionante es la segunda causa de fracaso del injerto y entre las diferentes causas de muerte, la de origen cardiovascular es sin duda la más importante, seguida de las neoplasias malignas (78). Es, por tanto, de gran importancia el control de los factores de

riesgo que estas dos causas de muerte tienen para mejorar la supervivencia del paciente y por tanto de los injertos (79;80).

Con respecto al riesgo cardiovascular se sabe que los factores clásicos conocidos en la población general (diabetes, HTA, tabaquismo, hiperlipemia, etc.) juegan un papel importante en la determinación del riesgo vascular de estos pacientes, estando la mayoría aumentados con respecto a la población general (81;82), pero no justifican en su totalidad el riesgo y de hecho los scores habituales de riesgo cardiovascular en la población general tienden a subestimar el riesgo y esto es consecuencia de que se asocian factores de riesgo específicos de la población trasplantada como son la insuficiencia renal, la proteinuria y los efectos de los fármacos inmunosupresores (83-85). Así en un estudio americano que incluía 8786 pacientes se demostró una correlación clara entre la proteinuria y la función renal por un lado y la mortalidad de origen cardiovascular por otro (86)

Especial importancia por las implicaciones que tiene es el riesgo cardiovascular inducido por los fármacos inmunosupresores. Estos tienen una influencia variable sobre los factores de riesgo, siendo, en general, los esteroides los que tienen un efecto más perjudicial, seguidos de los ACN, condicionando un aumento de la frecuencia y severidad de hipertensión arterial, dislipemia y diabetes mellitus y en general los estudios de eliminación de estos fármacos han demostrado una mejoría en el perfil de riesgo cardiovascular, especialmente en el perfil lipídico y en la tensión arterial (87;88). El efecto nefrotóxico de los ICN por su efecto sobre la función renal también se puede considerar un factor de riesgo cardiovascular. Entre los ICN hay algunas diferencias claras y existen estudios que demuestran una mejoría en el perfil de riesgo



cardiovascular en pacientes que son convertidos de CsA a TCR, sobre todo por reducción de la TA y de las cifras de lípidos, aunque el perfil lipídico no suele modificarse o incluso pueda empeorar ligeramente, sin embargo este cambio no parece tener influencia sobre los factores de riesgo específicos de esta población (89). En este sentido el encontrar fármacos inmunosupresores con un mejor perfil de riesgo cardiovascular es un objetivo prioritario a la hora de mejorar los resultados a largo plazo del trasplante renal.

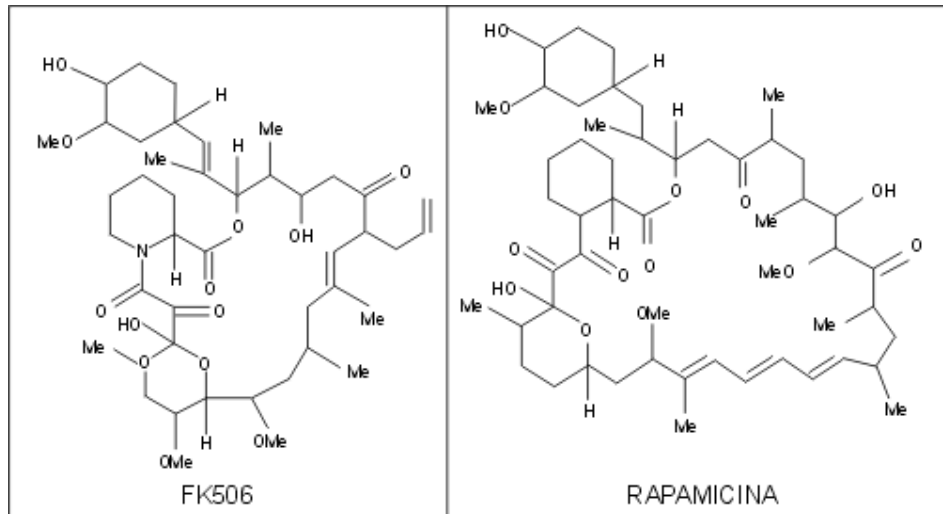
Finalmente dentro de este apartado es necesario hablar del riesgo de desarrollo de neoplasias como causa de mortalidad, especialmente en los pacientes con supervivencia elevada del injerto. Los pacientes trasplantados renales tienen mayor riesgo de cáncer que la población general e incluso que los pacientes en diálisis de la misma edad. Este riesgo se ha cuantificado en varios estudios, siendo variable en función de varios factores como la localización geográfica, llegando en uno de ellos a ser del 40% de los pacientes que llegan a los 20 años de trasplante (90). El mecanismo por el que se produce este aumento no está completamente clarificado hoy en día pero se sabe que el principal factor que interviene es la infección oportunista por virus oncogénicos, de hecho, no todos los cánceres están aumentados en la misma frecuencia y los más frecuentes están claramente relacionados con mecanismos de origen viral (enfermedad linfoproliferativa postrasplante por el virus de Epstein-Barr, sarcoma de Kaposi por el Herpesvirus tipo 8 y cánceres de piel debidos a los papilomavirus humanos).

El tipo de fármacos inmunosupresores que se usan, las dosis y la duración del tratamiento influyen directamente en la incidencia y el tipo de neoplasia que se

desarrolla, es decir no solo es un problema de inmunosupresión (descenso de la inmunovigilancia antineoplásica) de forma inespecífica sino también de efectos directos de cada inmunosupresor. De hecho, se ha demostrado que la ciclosporina induce un gran incremento en las metástasis de carcinoma en animales de laboratorio que carecen de sistema inmune (91). Los anticuerpos monoclonales anti-IL2r, el TCR y el MMF se han asociado con un mayor incremento del riesgo de neoplasias. Parece por tanto razonable intentar encontrar fármacos con la misma potencia inmunosupresora pero que carezcan de este efecto potenciador del desarrollo y extensión de neoplasias en los receptores (79).

### 1.5. LOS FÁRMACOS DEL GRUPO mTOR:

El SRL es un antibiótico macrólido producido por la fermentación natural de un hongo actinomiceto (*Streptomyces Hygroscopicus*) descubierto en la isla de Pascua (Rapa Nui) y presentado por primera vez en 1975 como fármaco antifúngico (92;93), demostrando posteriormente su actividad inmunosupresora *in vitro* (94). Este fármaco, de estructura molecular muy parecida al tacrolimus tiene, sin embargo, un mecanismo de acción completamente diferente, siendo el primer representante de un nuevo grupo terapéutico definido por su mecanismo de acción que es la inhibición de la vía metabólica intracelular denominada mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (figura 3).



**Figura 3:** Estructura molecular de Tacrolimus (FK-506) y Rapamicina

En los últimos años se ha desarrollado un segundo fármaco con mecanismo de acción prácticamente idéntico, el Everolimus (EVE), con algunas ventajas teóricas desde el punto de vista farmacocinético, al menos. Este grupo terapéutico también ha sido llamado *Inhibidores de la Señal de Proliferación* (ISP o en inglés PSI de *Proliferation Signal Inhibitors*) y tiene algunas ventajas sobre los inmunosupresores clásicos que han hecho despertar un gran interés en los últimos años.

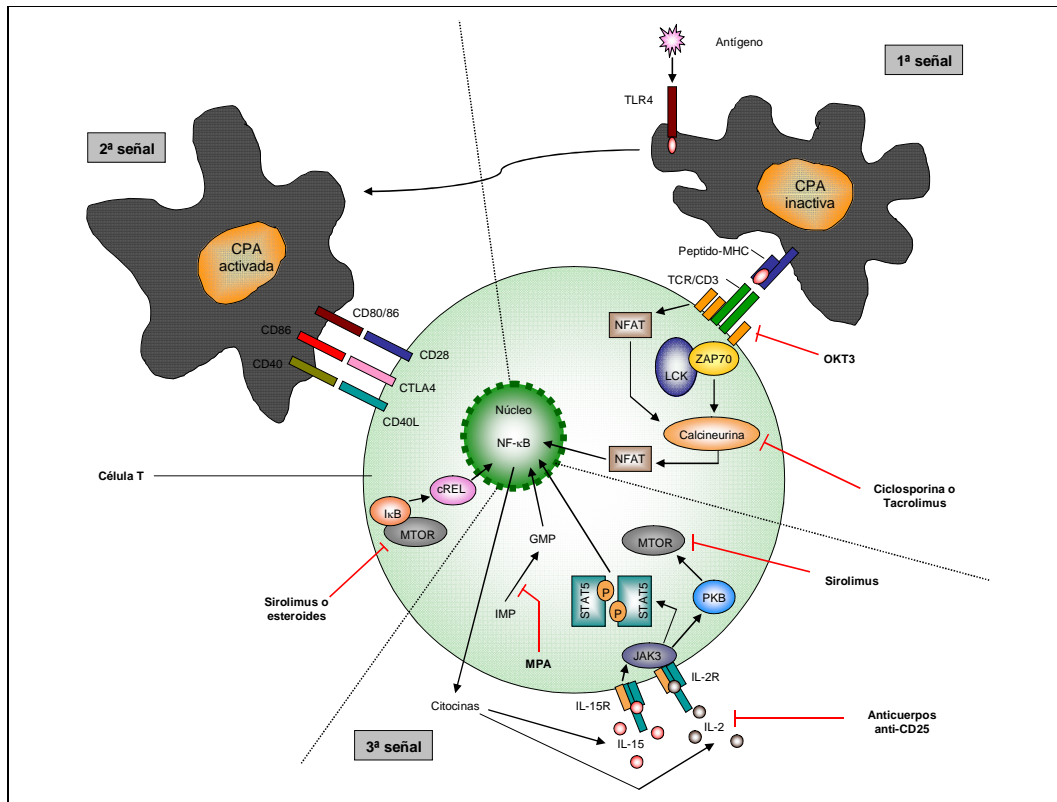
1.5.1. [Vía metabólica del mTOR:](#)

La activación del linfocito T comprende dos fases principales, la primera que sigue a la activación del receptor del linfocito T resulta en la activación de la transcripción de genes de citocinas y conduce al linfocito T desde el estado quiescente, de reposo (G0) al estado competente o activo (G1). La segunda fase comprende la respuesta del linfocito T, incluyendo la secreción de citocinas promotoras del crecimiento, como la interleucina-2 (IL-2) o la 4 (IL-4), de forma autocrina (para actuar sobre la misma célula) o paracrina (sobre las células cercanas). Además hace que los

linfocitos T competentes entren en la fase de proliferación celular (paso de la fase G1 a la fase S, de síntesis de DNA) con la subsiguiente expansión clonal y la adquisición de las funciones efectoras por parte del linfocito T.

El mecanismo de acción del SRL es distinto del de la CsA o del TCR (95), que inhiben la primera fase de la activación del linfocito T. Estas drogas interrumpen la señal desde el receptor bloqueando la calcineurina, una serin-treonin fosfatasa que es necesaria para la activación transcripcional del gen de la IL-2 en respuesta a la unión del antígeno con el receptor de la célula T. Por tanto inhiben la producción de IL-2 y la subsiguiente estimulación de la célula T. Por el contrario el SRL interfiere con la segunda fase de la estimulación de la célula T. Interrumpe la señal desde el receptor de la IL-2 y los receptores de otras citocinas y factores de crecimiento. Los mTORi bloquean la señal de transducción requerida para la progresión de las células estimuladas por la IL-2 desde la fase G1 a la fase S, por tanto suprimiendo la proliferación de las células T estimuladas por las citocinas. La mayoría de los efectos adversos producidos por los ACN son consecuencia de la inhibición de la calcineurina (hipertensión arterial, neurotoxicidad, nefrotoxicidad, etc) por lo que los fármacos del grupo mTOR no tienen estos efectos.

Es interesante destacar que el TCR y el SRL tienen la misma diana intracelular, la proteína FKBP12, mientras que la CsA se une a otro receptor intracelular, la ciclofilina P (95). Figura 4.



**Figura 4:** El OKT3, la ciclosporina y el tacrolimus actúan sobre la progresión de la fase G0 a G1, requerida por la primera señal de activación. El sirolimus y los esteroides actúan sobre la coestimulación (2ª señal), que también interviene en el paso G0-G1. Los anticuerpos monoclonales anti-CD25 impiden la unión de la IL2 con su receptor. El sirolimus actúa sobre la traducción de la señal de las citocinas (3ª señal). Y finalmente el ácido micofenólico inhibe la síntesis de guanosina (fase S). CPA: célula presentadora de antígenos; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; GMP, guanosine monophosphate; IκB, inhibitory κB; IMP, inosine monophosphate; JAK3, Janus kinase 3; L, ligand; MTOR, mammalian target of rapamycin; NFAT, nuclear factor of activated T cells; NF-κB, nuclear factor-κB; PKB, protein kinase B; R, receptor; STAT5, signal transducer and activator of transcription 5; TCR, T-cell receptor; TLR4, Toll-like receptor 4; ZAP70, ζ-chain-associated protein 70.

Por este mecanismo de acción inicialmente se pensaba que el efecto del SRL podría ser complementario de los ICN y que podría ser más adecuado su combinación con la CsA para evitar la teórica competencia con el TCR por el FKBP12, pero esto se ha demostrado que no es así. Por un lado no parece haber competencia entre ambas drogas y por otro la combinación con CsA ha demostrado una potenciación de la nefrotoxicidad de la misma que en general la han desaconsejado.

El bloqueo del mTOR induce por tanto una inhibición de la proliferación de los linfocitos dependiente de citocinas como la IL-2. Además interfieren en el reconocimiento antigénico, a través de la inhibición de la maduración de las células presentadoras de antígenos.

1.5.2. *Efectos de los fármacos inhibidores del mTOR:*

La vía del mTOR no solo participa en la activación de la respuesta inmune a nivel del linfocito sino que su distribución celular es mucho más amplia, participando en la regulación del crecimiento y proliferación celular de forma generalizada por los diferentes tejidos (líneas celulares mesenquimal y epitelial especialmente). Esto hace que no solo tenga efectos inmunosupresores, sino también otros, entre los que los efectos antiproliferativos (y entre ellos los antifibróticos) y los antineoplásicos cobran particular importancia por los potenciales beneficios que pueden implicar en los pacientes que los reciban.

SRL y EVE son potentes inhibidores de la proliferación y emigración de las células del músculo liso. A nivel del trasplante de órganos sólidos, este efecto antiproliferativo y antifibrótico se ha especulado que podría tener un efecto beneficioso (independiente de la respuesta inmune) dado que la fibrosis es la consecuencia final del daño del injerto, sea cual sea la causa del mismo. Este efecto lo llevan a cabo a través de la estimulación de la expresión de la kinasa inhibidora de la división celular p27<sup>Kip1</sup>. En modelos experimentales de lesión vascular mecánica inducida por la insuflación del balón de un catéter se produce una lesión en el vaso similar a la producida en el rechazo

crónico. Estos dos fármacos, SRL y EVE previenen la aparición de esta lesión como demostró el grupo de Morris en el año 2000 en un modelo de primates (96).

Es conocido el papel del TGF- $\beta$  en el desarrollo de la nefropatía crónica del injerto. El CD40 es un miembro de la familia de receptores del TNF y se sobreexpresa en los túbulos renales de pacientes con NCT. Esta molécula de superficie interactúa con su ligando en las células T activadas e induce mediadores proinflamatorios y profibróticos, como PAI-1 y MCP-1, a través de la vía Akt, la cual a su vez es bloqueada por los inhibidores del mTOR. La adición de SRL en un cultivo de células tubulares inhibe el eje mTOR-Akt y por tanto la expresión de los genes PAI-1 y MPC-1. Estos datos avalan que la activación de Akt por la vía del CD40 favorece la expresión de factores profibróticos y sugiere que el SRL por medio del bloqueo de esta vía puede prevenir la fibrosis y por tanto la nefropatía crónica del injerto (97). Sin embargo, es necesario destacar también que estos efectos antiproliferativos son causa de algunos de los efectos adversos producidos por estos fármacos, como es el retraso en la cicatrización de las heridas, el desarrollo de linfocitos o el retraso en la recuperación de la necrosis tubular aguda postrasplante. Este efecto es también la base para la utilización de stents recubiertos de rapamicina que evita la proliferación neointimal en la zona de implantación de un stent intravascular, reduciendo, por tanto, el riesgo de reestenosis (98;99).

Otro efecto de gran importancia es el efecto antitumoral de estos fármacos que se ha atribuido a diferentes efectos moleculares. Uno de estos efectos es la E-cadherina que está disminuida en aquellos tumores que se hacen invasivos y se ha demostrado que la E-Cadherina se sobreexpresa en presencia de SRL (100). Un segundo efecto,

reconocido a nivel experimental en el año 2002 es la inhibición por parte del SRL de la producción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), de vital importancia en la neoangiogénesis imprescindible para el crecimiento y la diseminación tumoral (101). Este efecto se ha demostrado también en algunos tumores en humanos (102). Se ha demostrado en humanos, en diferentes ensayos clínicos que el uso de SRL como inmunosupresión primaria en sustitución de ACN se asocia con una reducción significativa del riesgo de desarrollar neoplasias, tanto cutáneas como de órganos sólidos (103).

Sin embargo, a pesar de los efectos beneficiosos que pueden aportar los fármacos de este grupo terapéutico en los pacientes trasplantados renales, su uso no ha crecido todo lo esperado desde su comercialización debido a su perfil de toxicidad que hace que en manos expertas la tasa de retirada del fármaco sea de aproximadamente el 20% durante el primer año (pero especialmente durante los primeros 3 meses). En este sentido, la proteinuria se ha convertido en uno de los principales efectos adversos y uno de los motivos de retirada del fármaco en un porcentaje significativo de pacientes. No se conocen bien los mecanismos por los que se produce este efecto adverso, aunque se han implicado varios, desde la toxicidad directa del fármaco sobre los podocitos hasta los cambios en la hemodinámica glomerular derivados de la retirada de anticalcineurínicos cuando se realiza una conversión.

### 1.5.3. [Desarrollo clínico del Sirolimus en trasplante renal:](#)



En los estudios preclínicos el SRL demostró una eficacia similar a la CsA en el mantenimiento de injertos renales y cardiacos, pero sin mostrar nefrotoxicidad (104-109) y cuando se añadió SRL a CsA en los estudios de fase I se demostró una reducción significativa en las tasas de rechazo agudo en comparación con un grupo control de CsA y esteroides, sin observar efectos deletéreos sobre la función renal ni aumento en la incidencia de neurotoxicidad o hipertensión arterial (110), identificándose como principales efectos adversos la hiperlipidemia y la trombo y leucopenia.

Los estudios en la fase II exploraron la utilización de SRL en combinación con CsA y también como inmunosupresor primario en sustitución de la misma. La utilización en combinación demostró una reducción significativa de las tasas de rechazo agudo incluso cuando se utilizaron dosis bajas de ciclosporina (111) aduciéndose un efecto sinérgico de la combinación derivado de los diferentes mecanismos de acción de ambos fármacos. Asimismo cuando se utilizó como inmunosupresor primario se demostró una potencia inmunosupresora similar a la CsA expresada en unas tasas de rechazo agudo comparables (112). Sin embargo, un segundo ensayo de comparación con ciclosporina en el que se incluyó micofenolato mofetil en ambas ramas no consiguió demostrar resultados equivalentes (113), teniendo la combinación de CsA y MMF una mayor potencia inmunosupresora.

En el año 2000 y 2001 se publican los primeros ensayos de fase III en combinación con CsA, con casi 1300 pacientes, explorando diferentes dosis fijas de SRL, en los que se vuelve a demostrar la elevada potencia inmunosupresora de esta combinación pero se pone de manifiesto por primera vez el efecto del SRL potenciando

la nefrotoxicidad de la CsA, secundario a la interacción farmacocinética entre ambos que eleva los niveles de esta y hace que los pacientes que reciben dosis más altas de SRL (5 mg al día) tengan peor función renal (114;115).

Con los resultados de estos ensayos de fase II y fase III se llega a la conclusión de que tras una fase inicial de administración de CsA (en los primeros meses del trasplante), para prevenir de forma óptima el rechazo agudo, la suspensión de la misma para evitar sus efectos nefrotóxicos puede ser la mejor estrategia, manteniendo una inmunosupresión basada en SRL. Con esta hipótesis se diseña el ensayo 310 (RMR, *Rapamune Maintenance Regimen*) que aporta resultados muy interesantes a lo largo de sus 5 años de seguimiento. Este ensayo demuestra que la retirada precoz de la CsA manteniendo el SRL a los 3 meses del trasplante se sigue de un cierto riesgo de rechazo agudo (aproximadamente un 6%), pero a pesar de ello la función renal es significativamente mejor en el grupo de SRL ya al año del trasplante (9 meses tras la randomización), así como la tensión arterial (116), diferencia que se mantiene (e incluso aumenta) a los dos años del trasplante (117).

Sin embargo, los excelentes resultados de este ensayo no se confirman en ensayos de conversión realizados posteriormente, especialmente el ensayo 316 (CONVERT), en el que se convierte de un régimen basado en ICN a SRL a pacientes en fase estable (3 años postrasplante de media), observándose un aumento de la proteinuria en un número significativo de pacientes y un beneficio muy moderado en cuanto a la función renal, limitado a aquellos pacientes sin o con mínima proteinuria en el momento de la conversión (118). Estos resultados hacen pensar que la presencia de daño crónico en el injerto (sea del origen que sea) puede limitar los beneficios del uso de un régimen

libre de ICN por lo que el uso precoz de estrategias de este tipo es probablemente lo más adecuado, aunque no se ha demostrado aun definitivamente.

1.5.4. Los mTORi y el riesgo vascular:

El efecto global que tienen los fármacos mTORi sobre el riesgo cardiovascular no ha sido completamente aclarado aun. Se conoce con bastante detalle cual es el efecto de estos fármacos sobre los principales factores de riesgo vascular, pero no se ha definido aun cual es la repercusión final que tienen estos factores hasta el punto de que no hay consenso aun sobre si aumentan el riesgo o lo disminuyen.

Los estudios que comparan la tensión arterial en pacientes que reciben SRL con aquellos que reciben ICN muestran una clara mejoría en el control tensional, tanto cuando se usa en fases precoces del trasplante como en conversiones más tardías, reduciéndose, en general, el número de fármacos hipotensores que precisan para el control (116).

La hiperlipidemia fue uno de los efectos adversos definidos más precozmente y está universalmente aceptado, observándose una elevación tanto de las cifras de colesterol como de triglicéridos, con un pico máximo durante los primeros meses de tratamiento y una reducción progresiva posteriormente, aunque en general manteniéndose por encima de las cifras basales, previas a la introducción del mTORi (119), sin embargo no está claro que este efecto suponga una mayor incidencia de eventos cardiovasculares, aunque no hay estudios diseñados para valorar este efecto y

las series descriptivas que hay tienen un seguimiento no demasiado largo. Existen incluso evidencias experimentales de que el SRL puede proteger a nivel vascular del desarrollo de arteriosclerosis como consecuencia de la dislipidemia, probablemente en relación con su efecto antiproliferativo (120).

Con respecto a la función renal y la proteinuria como vimos anteriormente, dos factores de riesgo específicos de este grupo de pacientes, la mejoría de la función renal reportada en algunos ensayos tras la suspensión del ICN en presencia de SRL se podría considerar un efecto protector del riesgo vascular, pero sin embargo, la proteinuria, un efecto adverso reconocido en algunos pacientes tras el uso de SRL (como veremos más adelante) podría incrementar el riesgo vascular (121).

En conjunto, la mejoría del perfil tensional y de la función renal junto con el efecto antiproliferativo intrínseco de los mTOR podría inclinar la balanza hacia una reducción en el riesgo vascular siempre que las cifras de lípidos y la proteinuria estuvieran aceptablemente controladas, aunque esto requiere estudios específicos antes de que pueda ser afirmado.

## 2. JUSTIFICACIÓN GENÉRICA DEL TEMA

*PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL* (3 publicaciones)

Índice de impacto global: **11,2**

1. **Ruiz JC**, Campistol JM, Grinyo JM, Mota A, Prats D, Gutierrez JA, et al. **Early cyclosporine a withdrawal in kidney-transplant recipients receiving sirolimus prevents progression of chronic pathologic allograft lesions**. *Transplantation* 2004 Nov 15;78(9):1312-8 (*Índice de impacto: 3,816*)

En este trabajo se hizo una valoración retrospectiva de las biopsias renales realizadas en el momento del trasplante y un año después en todos los pacientes incluidos en un ensayo clínico multicéntrico en España y Portugal (ensayo 310) para comparar el efecto histológico de la retirada programada de la ciclosporina a los 3 meses del trasplante en presencia de sirolimus con el mantenimiento de la misma es un régimen de ciclosporina y sirolimus usados desde el momento del trasplante. La valoración de las lesiones crónicas por un único patólogo (ciego para el tipo de tratamiento y para el momento de la biopsia) demostró un beneficio significativo en cuanto al riesgo de desarrollar nefropatía crónica del trasplante al año en el grupo de pacientes con sirolimus al que se le había retirado la ciclosporina a los 3 meses del trasplante. Estos hallazgos sugieren un beneficio que posiblemente a largo plazo se pueda traducir en una mejoría en la supervivencia del injerto.

2. Segundo DS, **Ruiz JC**, Izquierdo M, Fernandez-Fresnedo G, Gomez-Alamillo C, Merino R, et al. **Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in renal transplant recipients.** Transplantation 2006 Aug 27;82(4):550-7 (*Índice de impacto: 3,816*)

Este trabajo se centra en el estudio de las células T-reguladoras (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>) en pacientes receptores de un trasplante renal con diferentes protocolos de inmunosupresión. Esta subpoblación de los linfocitos T se relaciona con el desarrollo de tolerancia y por tanto parece tener una gran importancia en el pronóstico del injerto a largo plazo. Se seleccionó una población de 64 pacientes trasplantados renales en fase estable dividiéndola en 2 grupos de tratamiento, uno con anticalcineurínicos y otro con rapamicina (tanto pacientes que la recibieron desde el principio del trasplante como pacientes que fueron convertidos a posteriori) y se midieron los niveles de células Treg por citometría de flujo, demostrando unos niveles significativamente superiores en aquellos pacientes que recibían rapamicina, independientemente de que previamente hubieran recibido anticalcineurínicos o no. Este hallazgo sugiere un efecto beneficioso desde el punto de vista inmunológico de los fármacos del grupo mTOR sobre los anticalcineurínicos.

3. **Ruiz JC**, Campistol JM, Sanchez-Fructuoso A, Rivera C, Oliver J, Ramos D, et al. **Increase of proteinuria after conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus-based treatment in kidney transplant patients with chronic allograft dysfunction.** *Nephrol Dial Transplant* 2006 Nov;21(11):3252-7 (*Indice de impacto: 3,568*)

Este trabajo analiza la evolución de la proteinuria tras la conversión a sirolimus en un grupo de 149 receptores de trasplante renal convertidos en 5 centros de trasplante de España, demostrando el aumento significativo de la misma así como un deterioro progresivo de la función renal en aquellos pacientes convertidos con una proteinuria basal importante (de rango nefrótico), lo que sugiere que no todos los pacientes se benefician igualmente de este tipo de fármacos y probablemente refleje la importancia de establecer estrategias de prevención del daño del injerto de forma precoz, más que de tratamiento del daño crónico ya establecido.

**OTRAS PUBLICACIONES DEL DOCTORANDO RELACIONADAS CON EL TRABAJO PRESENTADO**

1. Ruiz JC, Campistol JM, Mota A, Prats D, Gutierrez A, Castro A, et al. Early cyclosporine withdrawal in kidney transplant recipients under a sirolimus-based immunosuppressive regimen: pathological study of graft biopsies at 1-year posttransplant. *Transplant Proc* 2002 Feb;34(1):92-3.
2. Oberbauer R, Kreis H, Johnson RW, Mota A, Claesson K, Ruiz JC, et al. Long-term improvement in renal function with sirolimus after early cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients: 2-year results of the Rapamune Maintenance Regimen Study. *Transplantation* 2003 Jul 27;76(2):364-70.
3. Franco A, Hernandez D, Capdevilla L, Errasti P, Gonzalez M, Ruiz JC, et al. De novo hemolytic-uremic syndrome/thrombotic microangiopathy in renal transplant patients receiving calcineurin inhibitors: role of sirolimus. *Transplant Proc* 2003 Aug;35(5):1764-6.
4. Ruiz JC, Campistol JM, Mota A, Prats D, Gutierrez JA, Castro A, et al. Early elimination of cyclosporine in kidney transplant recipients receiving sirolimus prevents progression of chronic pathologic allograft lesions. *Transplant Proc* 2003 Aug;35(5):1669-70.
5. Ruiz JC, Diekmann F, Campistol JM, Sanchez-Fructuoso A, Rivera C, Oliver J, et al. Evolution of proteinuria after conversion from calcineurin inhibitors (CNI) to sirolimus (SRL) in renal transplant patients: a multicenter study. *Transplant Proc* 2005 Nov;37(9):3833-5.
6. Palomar R, Mayorga M, Ruiz JC, Cuevas J, Rodrigo E, Cotorruelo JG, et al. Markers of fibrosis in early biopsies of renal transplants. *Transplant Proc* 2005 Apr;37(3):1468-70.
6. Ruiz JC, Sanchez-Fructuoso A, Rodrigo E, Conesa J, Cotorruelo JG, Gomez-Alamillo C, et al. Conversion to everolimus in kidney transplant recipients: a safe and simple procedure. *Transplant Proc* 2006 Oct;38(8):2424-6.
7. San SD, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, Izquierdo M, Gomez-Alamillo C, Cacho E, et al. Calcineurin inhibitors affect circulating regulatory T cells in stable renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2006 Oct;38(8):2391-3.
8. Rodrigo E, Fernandez-Fresnedo G, Valero R, Ruiz JC, Pinera C, Palomar R, et al. New-onset diabetes after kidney transplantation: risk factors. *J Am Soc Nephrol* 2006 Dec;17(12 Suppl 3):S291-S295.
9. Ramos-Barron A, Pinera-Haces C, Gomez-Alamillo C, Santiuste-Torcida I, Ruiz JC, Buelta-Carrillo L, et al. Prevention of murine lupus disease in (NZBxNZW)F1 mice by sirolimus treatment. *Lupus* 2007;16(10):775-81.
10. Ruiz JC, Sanchez A, Rengel M, Beneyto I, Plaza JJ, Zarraga S, et al. Use of the new proliferation signal inhibitor everolimus in renal transplant patients in Spain: preliminary results of the EVERODATA registry. *Transplant Proc* 2007 Sep;39(7):2157-9.
11. Ruiz JC, Campistol JM, Sanchez-Fructuoso A, Mota A, Grinyo JM, Paul J, et al. Early sirolimus use with cyclosporine elimination does not induce progressive proteinuria. *Transplant Proc* 2007 Sep;39(7):2151-2.
12. Sanchez-Velasco P, Rodrigo E, Valero R, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, Lopez-Hoyos M, et al. Intracellular ATP concentrations of CD4 cells in kidney transplant patients with and without infection. *Clin Transplant* 2008 Jan;22(1):55-60.



13. Campistol JM, Cockwell P, Diekmann F, Donati D, Guirado L, Herlenius G, et al. Practical recommendations for the early use of m-TOR inhibitors (sirolimus) in renal transplantation. *Transpl Int* 2009 Apr 6.
14. Segundo DS, Fernandez-Fresnedo G, Ruiz JC, Rodrigo E, Benito MJ, Arias M, et al. Two-year follow-up of a prospective study of circulating regulatory T cells in renal transplant patients. *Clin Transplant* 2009 Sep 11.
15. Pinto JR, Arellano Torres EM, Franco A, Morales JM, Ruiz JC, Diekmann F, et al. Sirolimus monotherapy as maintenance immunosuppression: a multicenter experience. *Transpl Int* 2009 Oct 15.

### 3. HIPÓTESIS

El problema de la supervivencia a largo plazo del trasplante renal aun no ha sido resuelto, dado que aunque el rechazo agudo se ha conseguido controlar de forma adecuada en los últimos años utilizando potentes inmunosupresores las pérdidas progresivas de injertos a lo largo de los años siguen produciéndose a un ritmo similar al de hace dos décadas y esto hace pensar que los inmunosupresores actuales considerados “idóneos” desde el punto de vista inmunológico (los anticalcineurínicos), no lo sean tanto desde otros puntos de vista.

En este sentido la nefrotoxicidad de los anticalcineurínicos a largo plazo, así como su efecto negativo sobre el desarrollo de tolerancia inmunológica y sobre el perfil de riesgo cardiovascular y el desarrollo de neoplasias parecen tener un papel fundamental en esta pérdida progresiva de injertos lo que hace que haya que buscar otras alternativas terapéuticas que mejoren esta perspectiva.

Los fármacos inhibidores del mTOR, rapamicina y everolimus, tienen una serie de ventajas teóricas en este sentido como es la ausencia de nefrotoxicidad y un perfil de toxicidad diferente con menor efecto sobre los factores de riesgo cardiovascular y sobre los factores predisponentes al desarrollo de neoplasias. Además por la vía metabólica en la que intervienen tienen un efecto antiproliferativo y antifibrótico que podría añadir un beneficio para evitar el daño crónico del injerto y el desarrollo de daño vascular sistémico, aunque esto aun no ha sido claramente demostrado. Finalmente algunos trabajos apuntan al efecto positivo de estos fármacos sobre la inducción de tolerancia

inmunológica, un factor que podría tener también un efecto significativo sobre la supervivencia a largo plazo del injerto.

Por tanto, la hipótesis de esta tesis doctoral es que la utilización de fármacos del grupo mTOR conduciría a un menor daño crónico del injerto a consecuencia de los efectos anteriormente descritos y a una mejoría en los factores de riesgo de mortalidad del paciente a largo plazo, que se traducirían en una mejor supervivencia del injerto a largo plazo.

#### 4. OBJETIVOS

1. Evaluar la progresión de las lesiones de cronicidad en la biopsia del injerto renal durante el primer año del trasplante comparando un grupo de pacientes que recibe ciclosporina y Sirolimus durante todo el tiempo con otro en el que se suspende la ciclosporina a los 3 meses del trasplante, manteniendo el Sirolimus.
2. Comparar la incidencia de nuevos casos de nefropatía crónica del trasplante de acuerdo a la clasificación de Banff'97 durante el primer año postrasplante entre los grupos de tratamiento descritos en el objetivo 1.
3. Evaluar si las diferencias en el daño crónico del trasplante definidas en los objetivos 1 y 2 se traducen en diferencias en la función renal al año del trasplante entre las dos series de tratamiento.
4. Evaluar si el tipo de inmunosupresión influye en los niveles de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>) en pacientes trasplantados renales en fase estable.
5. Evaluar si el tipo de inmunosupresión utilizado influye sobre la funcionalidad de las células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>) en un modelo de cultivo mixto linfocitario con células del donante en pacientes trasplantados renales en fase estable.
6. Valorar los efectos que la introducción de un inhibidor de mTOR tiene sobre la aparición o incremento de la proteinuria en receptores de un trasplante renal en

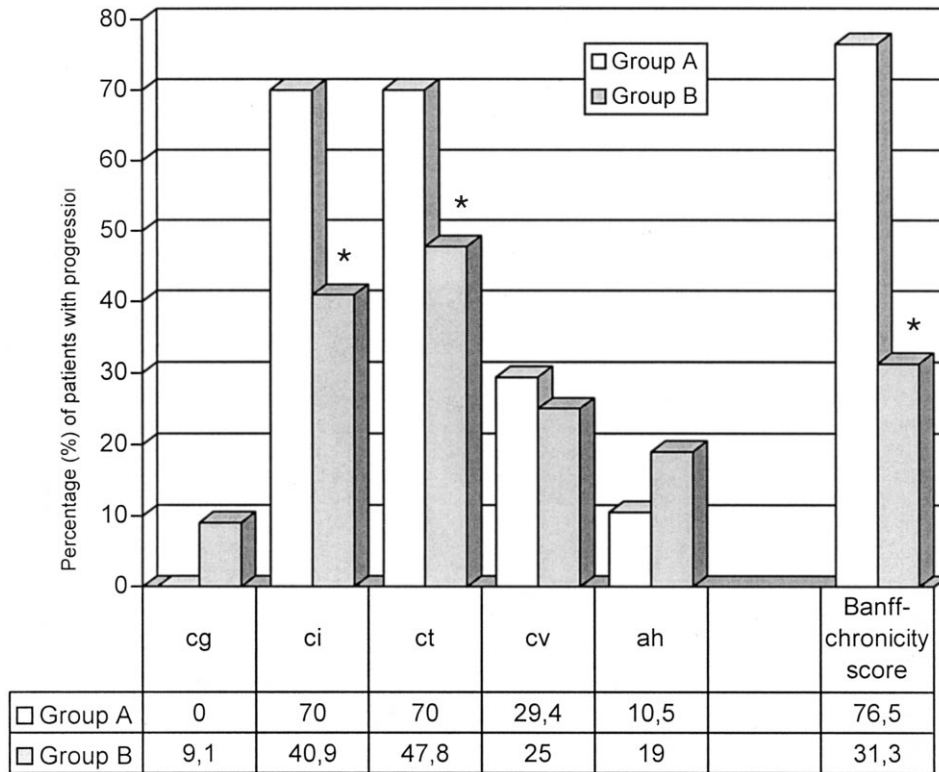
fase estable y los efectos que esto pueda tener sobre la función renal a medio plazo.

7. Valorar los efectos del desarrollo de proteinuria tras la conversión a sirolimus sobre la evolución de la función renal.
8. Definir que tipo de pacientes se pueden beneficiar más claramente del uso de fármacos del grupo mTOR.

## 5. RESULTADOS

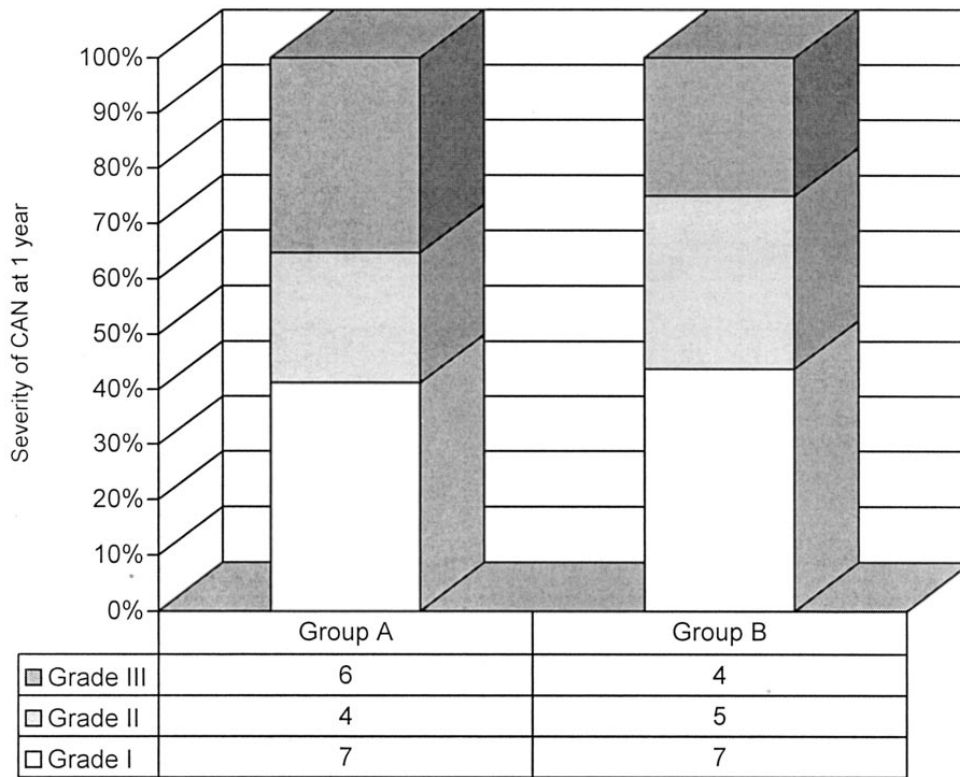
### 1. Efectos del sirolimus sobre el desarrollo de lesiones histológicas crónicas en el injerto:

El análisis de las 2 biopsias de cada paciente (basal y al año), valoradas de acuerdo con la clasificación de Banff demostró una menor progresión de las lesiones en el grupo en el que se suspendió la CsA a los 3 meses, manteniendo el SRL (grupo B) que fue estadísticamente significativa para las lesiones intersticiales y tubulares crónicas, que son precisamente las que definen la NCT (70% en el grupo A vs. 40,9% en el grupo B para la *ci* y 70% vs. 47,8%, respectivamente para la *ct*;  $p < 0,05$  en ambos casos). Cuando se agruparon las lesiones formando un score de cronicidad ( $ci+ct+cv+cg$ ) esta diferencia se mantuvo e incluso fue más evidente (76,5% vs. 31,3% respectivamente;  $p < 0,01$ ). En cuanto a las lesiones agudas prácticamente estaban ausentes en ambos grupos (no se encontró ningún caso de rechazo subclínico) y no se observaron diferencias entre los grupos (figura 3).



**Figura 3:** Porcentaje de pacientes con progresión de las lesiones crónicas de Banff y del score de cronicidad de Banff (cg+ci+ct+cv) desde el momento del trasplante al primer año postrasplante. \*p<0,05 entre grupos. cg: daño glomerular crónico, ci: fibrosis intersticial, ct: atrofia tubular, cv: engrosamiento intimal vascular.

Adicionalmente se analizó la incidencia de nuevos casos de NCT al año del trasplante en ambos grupos de tratamiento, considerando como tal a aquellos casos que no cumplían los criterios para tal diagnóstico en el momento del trasplante (biopsia basal) y que si lo cumplían al año del trasplante. En este caso se demostró también una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de forma que en el grupo A un 65% habían desarrollado NCT *de novo* al año del trasplante, mientras que en el grupo B (SRL sin CsA) únicamente el 31,8% cumplían este diagnóstico (p<0,05). No solo el diagnóstico de CAN fue más frecuente en los pacientes que mantenían la CsA sino que su severidad también fue mayor, aunque en este caso sin alcanzar significación estadística (figura 4).



**Figura 4:** Distribución de pacientes diagnosticados de NCT al año del trasplante de acuerdo a su severidad. La NCT severa fue más frecuente en el grupo A que mantenía la CsA, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Por último el análisis de la función renal también mostró diferencias significativas entre ambos grupos probablemente como consecuencia de las diferencias en las lesiones histológicas descritas, de forma que la creatinina al año fue de 166,2  $\mu\text{m/L}$  en el grupo A y de 130,8  $\mu\text{m/L}$  en el grupo B ( $p < 0,05$ ).

**2. Efectos del sirolimus sobre la subpoblación de células T reguladoras en el receptor de un trasplante renal:**

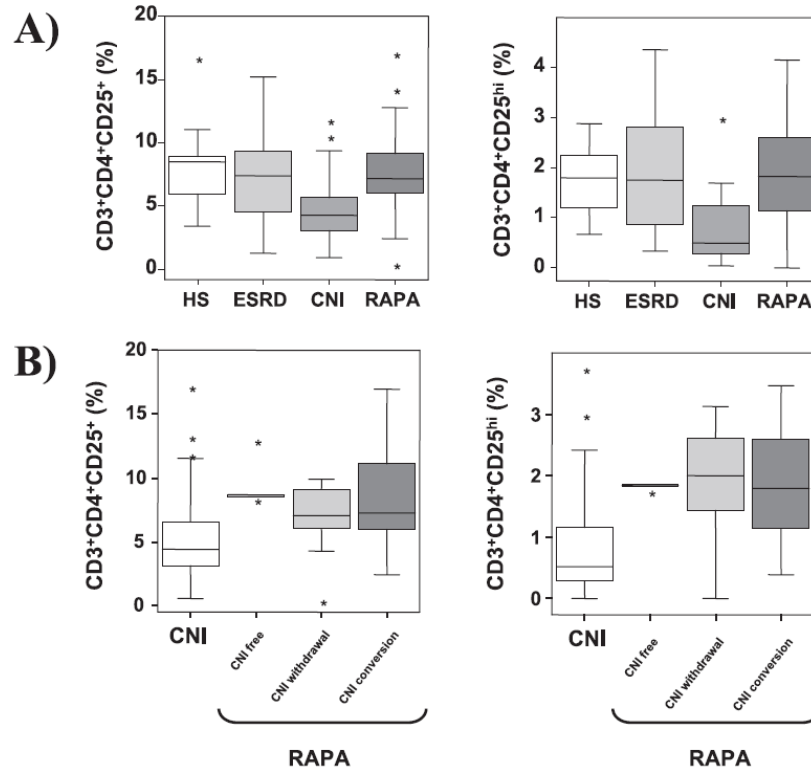
El análisis por citometría de flujo de las muestras de sangre de pacientes tratados con rapamicina y con inhibidores de la calcineurina demostró una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células  $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$  y de células



CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup> que era menor en los pacientes tratados con ICN que en los tratados con SRL en el momento del estudio (independientemente de que hubieran recibido ICN previamente o no). Los niveles observados en los pacientes tratados con SRL eran similares a los observados en voluntarios sanos y en pacientes con IRC Terminal no trasplantados.

Se demostró asimismo que estas células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup> eran células T reguladoras por la presencia de FOXP3. Todas las células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>, ninguna de las CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup> y solo un 20% de las CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>low</sup> de los pacientes de ambos grupos de tratamiento mostraron expresión de FOXP3 y no se observaron diferencias cuantitativas en la expresión de FOXP3 (medida por la intensidad media de fluorescencia) entre ambos grupos.

Cuando se analizó la frecuencia de estas células en los pacientes del grupo de SRL en función de si habían recibido ICN previamente o no, no se encontraron diferencias, por lo que en principio la administración previa de ICN no parece tener influencia en este aspecto (figura 5).

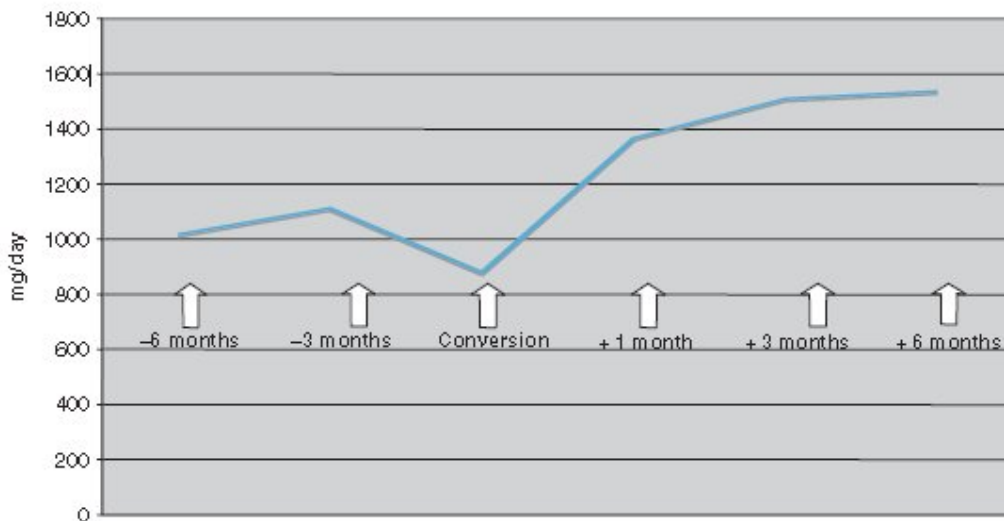


**Figura 5:** Cuantificación de células T reguladoras en sangre periférica de pacientes trasplantados renales. HS: voluntarios sanos, ESRD: pacientes con IRC Terminal no trasplantados, CNI: pacientes en tratamiento con anticalcineurínicos, RAPA: pacientes en tratamiento con rapamicina.

Finalmente se analizó el efecto que estas células podrían tener sobre la respuesta inmune por medio de cultivo mixto linfocitario, incubando células efectoras (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>) con linfocitos del donante irradiados. La adición de las células T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup> al cultivo produjo una reducción de la respuesta inmune medida por la proliferación de las células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup> (que se redujo entre un 25 y un 44%).

### 3. Efectos del sirolimus sobre el desarrollo de proteinuria en el paciente trasplantado renal:

En la serie de 149 pacientes analizados (trasplantados renales en fase estable y convertidos a SRL) se observó que en un 31% de los casos la proteinuria no se modificó o bien se redujo en los meses siguientes a la conversión con respecto a las cifras previas a la conversión, mientras que en 103 pacientes (69%) se observó un incremento de la proteinuria, de los cuales en 64 pacientes este aumento fue mayor del 100%. El número de pacientes con proteinuria de rango nefrótico pasó de 6 antes de la conversión a 19. El nivel medio de proteinuria fue de 864 mg/d (0-12125) en el momento de la conversión y de 1541 mg/d (0-10976) a los 6 meses ( $p < 0,001$ ) (figura 6).



**Figura 6:** Evolución de la proteinuria antes y durante los 6 meses siguientes a la conversión a SRL.

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo con la proteinuria basal en tres grupos: I (menor de 300 mg/d), II (entre 301 y 3500 mg/d) y III (mayor de 3500 mg/d) correspondiendo al 43%, 53% y 4% de los pacientes respectivamente. Se apreció un aumento significativo de la proteinuria en los tres grupos de pacientes aunque fue más intenso en los del grupo II (proteinuria moderada preconversión), donde pasó de 1041 a 1995 mg/d (figura 7).

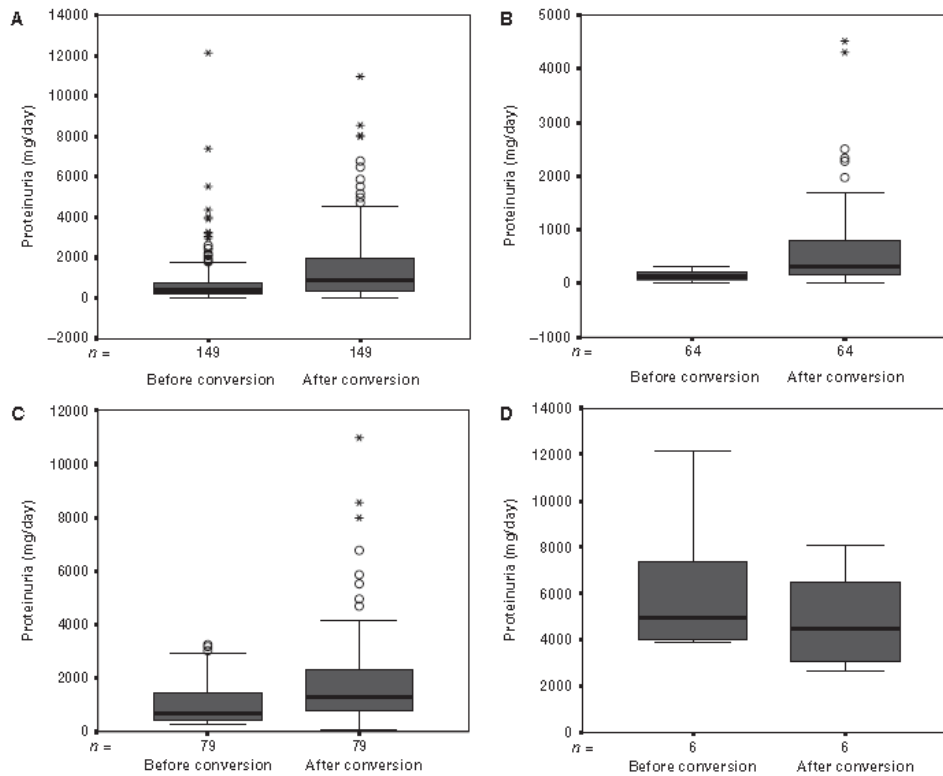


Figura 7: (A) Proteinuria de 24 horas pre y postconversión en el grupo completo de 149 pacientes;  $p<0,001$ . (B-D) Evolución en cada uno de los subgrupos definidos de acuerdo con la proteinuria basal (B: grupo I,  $p<0,001$ ; C: grupo II,  $p<0,001$ ; D: grupo III, pNS).

Secundariamente se clasificó a los pacientes en dos grupos de acuerdo al aumento absoluto de la proteinuria en más de 500 mg/d independientemente de la proteinuria basal. Se observó que en los pacientes con un aumento de la proteinuria mayor de 500 mg/d eran más elevadas la proteinuria basal ( $956\pm 1123$  vs.  $794\pm 1624$ ;  $p=0,014$ ) y la creatinina sérica basal ( $2,5\pm 0,8$  vs.  $2,15\pm 0,72$ ;  $p=0,002$ ) que en el otro grupo, indicando que los pacientes con más daño crónico basal tienen más riesgo de incremento de la proteinuria. Pero además, lo que es más importante, en estos pacientes en los que aumentó la proteinuria más de 500 mg/d la creatinina al final del seguimiento era significativamente más elevada ( $2,8\pm 1,0$  vs.  $2,1\pm 1,2$ ;  $p<0,001$ ), lo que probablemente refleja el efecto perjudicial de este fenómeno sobre la función renal.

Por otro lado se observó una relación estadísticamente significativa entre no tener proteinuria antes de la conversión y no presentar un incremento de la proteinuria mayor de 500 mg/d a los 6 meses ( $p=0,038$ ).

No se encontró ninguna correlación entre dosis y/o niveles de SRL y el riesgo de desarrollar proteinuria.

## 6. DISCUSIÓN

El uso de fármacos que permita evitar con máxima seguridad el rechazo del órgano y al mismo tiempo, carentes de efectos adversos es el objetivo siempre buscado en el campo del trasplante de órganos sólidos. Aunque progresivamente nos hemos ido acercando a este objetivo desde los primeros tiempos del trasplante en los años 50, aun queda mucho camino por recorrer.

La aparición de la ciclosporina a principios de los 80, como primer representante de los inhibidores de la calcineurina supuso un hito sin igual en este campo y hasta ahora no ha habido avances de similar magnitud en los aproximadamente 25 años transcurridos desde entonces (ni probablemente los habrá). Sin embargo, esto no quiere decir que no se haya avanzado considerablemente en este tiempo, consiguiéndose una mayor potencia inmunosupresora y en general una menor toxicidad, derivada de los nuevos fármacos menos tóxicos (Tacrolimus entre otros) y de la reducción en las dosis de esteroides, o incluso su rápida eliminación, uno de los fármacos que mayor toxicidad producía en las primeras décadas del trasplante.

En este sentido, la aparición en los primeros años de esta década del SRL como primer fármaco del nuevo grupo terapéutico de los inhibidores del mTOR despertó unas expectativas considerables a consecuencia sobre todo de su ausencia de nefrotoxicidad y de sus efectos añadidos antiproliferativos y antineoplásicos. Por primera vez se demostró que era factible una inmunosupresión sin anticalcineurínicos con una eficacia inmunosupresora “suficiente”. Esta tesis doctoral es un reflejo de este interés que se inició en 1997 con la participación del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario

Valdecilla (y de mi mismo como co-investigador) en uno de los ensayos clínicos multicéntricos de fase III que sirvieron para el registro posterior del fármaco, el 302 (115) y se ha mantenido vigente durante este tiempo lo que ha supuesto una actividad investigadora importante que incluye la participación en 11 ensayos clínicos multicéntricos (en 4 de ellos como investigador principal) además de otros estudios, la publicación de 15 artículos en revistas internacionales, además de los 3 que justifican esta tesis doctoral y la impartición de más de 40 charlas en diferentes congresos, simposios o cursos durante este tiempo.

A lo largo de estos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los pros y los contras de estos fármacos, se ha ido poco a poco aclarando cual puede ser su forma óptima de uso, aunque aun quedan muchas incógnitas por despejar.

El primer trabajo de esta tesis doctoral, basado en el ensayo 310 demostró que ya al año del trasplante y solo unos meses después de la randomización, la eliminación de ciclosporina se seguía de una reducción significativa en los parámetros de daño histológico (nefropatía crónica del trasplante) a consecuencia, probablemente, de la prevención de la nefrotoxicidad por la CsA (122). Pero lo más importante, estos resultados se siguieron a largo plazo de una mejoría mantenida en la función renal y más aun, de una mejoría en la supervivencia del injerto ya a los 4 años del trasplante, algo muy difícil de demostrar en un ensayo clínico, dado que este parámetro habitualmente necesita seguimientos muy largos para observar diferencias claras (123;124).

Es importante destacar la relación que existe entre los fármacos del grupo mTORi y la respuesta inmunológica. La mayoría de los estudios en los que se realiza conversión de un anticalcineurínico a un mTORi muestran una tasa significativa de rechazo agudo, que suele estar entre un 5 y un 10% adicional de rechazos agudos en los meses siguientes a la conversión con respecto al grupo control de los pacientes que mantienen el ACN. Esto se observó en el ensayo 310 en el que se basa la primera publicación de esta tesis doctoral (116). Esto hace pensar en una teórica menor potencia inmunosupresora de forma global en comparación con los ACN, algo que hoy en día está aceptado de forma casi universal. Sin embargo, esta mayor tasa de rechazos agudos no parece tener una consecuencia significativa sobre la función renal del injerto a medio/largo plazo, e incluso en dicho ensayo se demostró una mejoría progresiva de la función renal con respecto al grupo control, a pesar de esta mayor tasa de rechazo agudo y resultados similares se han observado en otros trabajos.

Por otro lado, en el segundo trabajo en el que se basa esta tesis demostramos como el uso de Sirolimus se asocia con una mayor tasa de células T reguladoras, algo que podría tener un efecto beneficioso sobre la respuesta aloinmune a largo plazo (dependiente del aloreconocimiento indirecto) sobre el injerto, favoreciendo la acomodación inmunológica y justificar, al menos en parte, el que la evolución a largo plazo sea favorable, a pesar de la mayor tasa de rechazo agudo en las fases iniciales. De todas formas, hay que tener en cuenta que este estudio se basó en un corte transversal de una serie de pacientes en los que se analizó el porcentaje de células T reguladoras en un momento dado (en fase estable del trasplante) y esto se correlacionó con la inmunosupresión que el paciente recibía en ese momento. En este sentido, nuestro grupo ha publicado recientemente un segundo estudio, esta vez prospectivo en el que se



analiza la evolución de las células T reguladoras durante los 2 primeros años del trasplante en una serie de 33 pacientes tratados con Tacrolimus, observando un nivel mínimo de Tregs a los 6 meses del trasplante, con una progresiva recuperación durante los meses siguientes hasta los 2 años (125). Queda, por tanto, por definir mejor el papel de las células T reguladoras, qué subpoblación puede ser más útil y qué mecanismos de expansión pueden ser más eficaces y seguros y también definir cual es el papel de los mTOR sobre el desarrollo de tolerancia y por tanto sobre el daño inmunológico que pueda sufrir el injerto a largo plazo.

A pesar de los buenos resultados observados en los ensayos iniciales con Sirolimus, la estrategia inmunosupresora definida en el ensayo 310 de una inmunosupresión inicial basada en ICN y SRL con retirada precoz del ICN (hacia los 3 meses) no se ha impuesto en la práctica clínica de forma más o menos generalizada y esto es consecuencia de varios factores que revisaremos a continuación.

El perfil de toxicidad de los mTORi es completamente diferente al de los ICN y esto ha hecho que su manejo clínico no haya sido fácil. Se han identificado una serie de problemas o efectos adversos cuando se usan precozmente, como es el retraso en la cicatrización de heridas (126), la aparición de linfoceles (127;128) o el retraso en la recuperación de la necrosis tubular aguda (129;130) que se relacionan directamente con el efecto antiproliferativo de estos fármacos y que han hecho que en general se recomiende una introducción retrasada de los mismos (entre 5 y 7 días) (131). Además el uso en combinación con los ICN potencia la nefrotoxicidad de estos lo que hace que se deban plantear estrategias de minimización del ICN durante la fase de convivencia de

ambos fármacos y en cualquier caso, que no haya unanimidad sobre la idoneidad de esta combinación.

Por esta cierta dificultad en la combinación con los ICN se han desarrollado varios ensayos clínicos explorando la eficacia del SRL como inmunosupresor principal, sin ICN desde el trasplante (IS libre de ICN), en general asociando inducción con anticuerpos anti-IL2r, pero los resultados se han considerado mediocres y en general inferiores a la inmunosupresión estándar hoy en día con TCR y MMF (132) e incluso varios ensayos clínicos que incluían una rama de SRL de novo sin ICN fueron interrumpidos prematuramente (318 y ORION, datos no publicados), por lo que esta opción no se considera hoy en día aceptable. Únicamente algunos ensayos que incluían inducción con Timoglobulina han mostrado resultados satisfactorios en cuanto al riesgo de rechazo agudo y evolución de la función renal (133) y es posible que una pauta sin ICN que incluya Timoglobulina y un mTOR de inicio se utilice de forma creciente en los próximos años, si se confirman estos buenos resultados.

Por otro lado varios ensayos clínicos multicéntricos y múltiples trabajos unicéntricos han explorado la utilidad de la conversión a un mTOR en pacientes en fase estable, en general tras el diagnóstico clínico o histológico de disfunción crónica del injerto (118;134-137), con el objetivo de frenar una evolución negativa a consecuencia de nefrotoxicidad por ICN. Varias series unicéntricas han mostrado una cierta mejoría de la función renal tras la conversión a un mTOR, aunque en general los seguimientos han sido cortos, habiéndose identificado que la proteinuria basal es un factor predictor de primer orden de esta evolución y desde hace unos años se acepta que la conversión en pacientes con proteinuria moderada (cuyo límite se ha fijado en torno a los 800 mg/d

después de la publicación de los resultados de Diekmann (138)) se acompaña de un riesgo elevado de mala evolución de la función renal y por tanto se desaconseja.

Es importante destacar los hallazgos de otro trabajo publicado por nuestro grupo en colaboración con otros 9 centros de España y Portugal en el que se valoró la evolución de la proteinuria en los pacientes incluidos en el ensayo 310 en ambos países. En estos pacientes, en los que se suspendía la CsA y permanecían con SRL a los 3 meses del trasplante no se apreció un incremento significativo de la proteinuria comparado con el grupo control. En cambio, cuando se suspendió la CsA en el grupo control más allá de los 4 años del trasplante se apreció un comportamiento diferente, con un importante aumento de la misma, reflejando probablemente una situación basal diferente, con mayor daño crónico de base en este segundo grupo y mayor riesgo de proteinuria cuando se hacen cambios en fases tardías y no así en fases iniciales del trasplante, donde aun las estructuras renales tienen poco daño (139).

Los resultados del ensayo de conversión a gran escala, el estudio CONVERT que incluyó más de 800 pacientes randomizados para conversión a SRL o mantenimiento del ICN mostró unos beneficios muy limitados en términos de mejoría de la función renal, demostrando un incremento de la proteinuria en un grupo significativo de pacientes (118) y confirmando los hallazgos del tercer trabajo incluido en esta tesis doctoral y publicado casi 3 años antes (121). Además en este ensayo, en el que la inclusión de pacientes fue estratificada en base a la función renal basal (aclaramiento de creatinina mayor o menor de 40 mL/min) fue preciso detener prematuramente el reclutamiento de pacientes en el estrato de peor función renal porque se demostró una mala evolución y también se acepta hoy en día que los pacientes con

mala función renal tienen menos probabilidades de mejoría de la misma tras la conversión, aunque este límite de 40 mL/min no está universalmente aceptado y hay series que muestran mejoría en pacientes con peor función renal.

En conjunto la conversión a un mTOR en un paciente en fase estable, con deterioro progresivo de la función renal por NCT o con función renal deteriorada pero estable no ha conseguido demostrar un beneficio claro en términos globales y esto es probablemente consecuencia de que una intervención de este tipo cuando ya hay un daño crónico establecido de una cierta severidad no consigue detener la evolución. En este sentido es importante tener en cuenta que la valoración clínica de la función renal utilizando la creatinina sérica es probablemente muy inadecuada dado que es este un marcador muy grosero, que se mantiene “estable” durante mucho tiempo aunque haya un daño subyacente importante y solo se eleva en fases finales, cuando probablemente hay poco que hacer ya. Por esta razón en los últimos años se ha abogado por la utilización de otros métodos más precisos para valorar el daño renal, como es la medida del filtrado glomerular, la utilización del índice de resistencia en la exploración doppler del injerto (140;141) o incluso la indicación de biopsias de protocolo (o cuando menos la indicación de biopsias ante deterioros leves pero mantenidos de la función renal). En este sentido, la experiencia en el HUMV con más de 150 pacientes convertidos en fase estable a un mTORi es de una progresiva anticipación de forma que los pacientes son convertidos cada vez de forma más temprana y por tanto con mejor función renal (menos deteriorada) y menos proteinuria (por indicar la conversión más precozmente y por la exclusión de casos con proteinuria más importante).

Sin embargo, parece claro que el objetivo de una intervención de este tipo, si lo que se pretende es prolongar la supervivencia del injerto, no debería de ser el tratamiento de una entidad ya establecida, como es la NCT, en la que predominan cambios irreversibles, especialmente la fibrosis y atrofia, sino que debería de ir dirigido a la prevención (primaria, en caso de ausencia completa de lesiones o secundaria, en caso de demostración de lesiones incipientes). Desde un punto de vista conceptual, esperar a que haya deterioro de la función renal no parece ser la opción más correcta si queremos maximizar el beneficio.

En esta línea de pensamiento y teniendo en cuenta todas las consideraciones que hemos hecho previamente la estrategia óptima de utilización de estos fármacos debería de ser aquella en la que se haga un *uso relativamente temprano* de un fármaco de este tipo, antes de que se establezcan lesiones irreversibles significativas, *evitando su uso en los primeros días del trasplante* (para prevenir las complicaciones relacionadas con la cirugía y la recuperación de la función renal) y en general, reduciendo el solapamiento con el ICN al máximo para evitar la potenciación de la nefrotoxicidad de este.

Esta es la filosofía de un número considerable de ensayos clínicos puestos en marcha en los últimos 3-4 años, tanto con SRL como con EVL, y la mayoría incluyen un diseño en dos fases, con una fase inicial en la que la inmunosupresión se basa en una terapia convencional con un ICN, un antiproliferativo (MMF o MPS) y esteroides (con el objetivo de minimizar el riesgo de rechazo agudo) y una fase de mantenimiento a partir en un momento determinado, pasada la fase de mayor riesgo de rechazo, en la que el ICN es sustituido por un mTORi (con el objetivo de minimizar la nefrotoxicidad). Este momento del cambio es el que no está aun bien definido, pero se sabe por estudios

de biopsias de protocolo que aproximadamente a los 3-4 meses del trasplante se pueden ya observar lesiones de nefropatía crónica (44;48;50) por lo que la mayoría de los estudios en marcha consideran momentos cercanos a estas fechas como óptimos para hacer el cambio (entre 6 semanas y 4-6 meses postrasplante). La mayoría de estos estudios han reportado resultados iniciales hasta ahora, en general con diferencias significativas en la función renal en comparación con el grupo control de mantenimiento del ICN, aunque aun no hay publicaciones al respecto (142;143).

Es importante tener en cuenta que prácticamente todos los estudios realizados sobre la utilidad de los mTOR en la prevención o tratamiento de la NCT se han realizado en pacientes de riesgo inmunológico normal y por tanto los resultados no son extrapolables a pacientes de riesgo inmunológico elevado, ya sea por factores pretrasplante (hiperinmunizados o retrasplantes) como por factores postrasplante (rechazo vascular o humoral). En este sentido, los cambios en la clasificación de Banff dirigidos a un mejor reconocimiento del daño inmune del injerto agudo o crónico (reconocimiento del rechazo humoral, sobre todo la presencia de depósitos de C4d) y la presencia de anticuerpos postrasplante donante específicos (DSA) deben ser tenidos en cuenta a la hora de plantearse una intervención de este tipo y en general se debe desaconsejar la suspensión del ICN en pacientes que muestren una actividad inmunológica subyacente. Por esta razón se debe de aconsejar siempre la realización de una biopsia renal (determinando la presencia de C4d) y de anticuerpos donante-específicos antes de una conversión de este tipo, sea precoz o tardía.

En estos casos de actividad inmunológica subyacente demostrada, la introducción de un mTOR manteniendo el ICN podría considerarse como una opción

con el objetivo de aumentar la inmunosupresión global y aportar los efectos beneficiosos adicionales del mTORi aunque se necesitan más estudios para confirmar la idoneidad de esta estrategia, que como hemos dicho previamente puede incrementar el riesgo de nefrotoxicidad del ICN.

## 7. CONCLUSIONES

1. La suspensión de la CsA a los 3 meses del trasplante renal en un régimen de mantenimiento con SRL se sigue de una disminución en la progresión de las lesiones histológicas de cronicidad en la biopsia realizada al año del trasplante en comparación con los pacientes en los que se mantiene la misma.
2. La suspensión de la CsA a los 3 meses del trasplante renal en un régimen de mantenimiento con SRL se asocia con una menor incidencia de nuevos casos de NCT al año del trasplante en comparación con los pacientes en los que se mantiene la misma.
3. Asimismo, esta mejoría histológica observada en estos pacientes se asocia con una mejor función renal al año del trasplante.
4. Los pacientes que reciben un régimen inmunosupresor basado en SRL tienen un porcentaje de células T-reguladoras ( $CD4^+/CD25^+/FOXP3^+$  y  $CD4^+/CD25^{high}/FOXP3^+$ ) significativamente superior al de los que reciben un régimen basado en ICN (CsA o TCR) y muy similar al de los individuos sanos. Esta diferencia es independiente de que los pacientes que reciben SRL hubieran recibido previamente un ICN o no.
5. La adición de células T  $CD4^+/CD25^{high}/FOXP3^+$  a un cultivo mixto linfocitario entre células efectoras ( $CD4^+/CD25^-$ ) y células del donante (estimuladoras) se asocia con una reducción en la proliferación de las células efectoras.



- 6. La conversión de pacientes trasplantados renales en fase de mantenimiento de un régimen inmunosupresor basado en ICN a uno basado en SRL se asocia con un aumento significativo de la proteinuria en más de 2/3 de los pacientes y esto es independiente del nivel basal de proteinuria, aunque la elevación es más importante en aquellos pacientes con una proteinuria basal mayor de 300 mg/d.**
  
- 7. Los pacientes en los que la proteinuria se incrementa significativamente tras la conversión a SRL tienen una peor evolución de la función renal.**
  
- 8. Los pacientes con escasa proteinuria en las fases precoces del trasplante son probablemente los que más se puedan beneficiar de una conversión a un mTORi.**

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004 Dec 23;351(26):2715-29.
- (2) Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999 Mar 27;353(9158):1083-91.
- (3) Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000 Mar 2;342(9):605-12.
- (4) Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004 Mar;4(3):378-83.
- (5) Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004 Aug;4(8):1289-95.
- (6) Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002 Feb 21;346(8):580-90.
- (7) Meyer MM, Norman DJ, Danovitch GM. Long-term post-transplant management and complications. In: Danovitch GM, editor. *Handbook of Kidney Transplantation*. 2<sup>a</sup> ed. Boston: Little, Brown & Company; 1996. p. 154-86.
- (8) Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993 Aug;44(2):411-22.
- (9) Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999 Feb;55(2):713-23.
- (10) Corey HE, Greenstein SM, Tellis V, Schechner R, Greifer I, Bennett B. Renal allograft rejection in children and young adults: the Banff classification. *Pediatr Nephrol* 1995 Jun;9(3):309-12.
- (11) Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Flax SD, Shokouh-Amiri MH, Schroder T, et al. Correlation between Banff classification, acute renal rejection scores and reversal of rejection. *Kidney Int* 1996 Feb;49(2):481-7.
- (12) Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 1995 Feb 27;59(4):511-4.
- (13) Gaber LW, Schroeder TJ, Moore LW, Shakouh-Amiri MH, Gaber AO. The correlation of Banff scoring with reversibility of first and recurrent rejection episodes. *Transplantation* 1996 Jun 27;61(12):1711-5.
- (14) Croker BP, Clapp WL, bu Shamat AR, Kone BC, Peterson JC. Macrophages and chronic renal allograft nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1996 Dec;57:S42-S49.
- (15) Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007 Mar;7(3):518-26.

- (16) Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008 Apr;8(4):753-60.
- (17) Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003 Jun;3(6):708-14.
- (18) Poggio ED, Clemente M, Riley J, Roddy M, Greenspan NS, DeJelo C, et al. Alloreactivity in renal transplant recipients with and without chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004 Jul;15(7):1952-60.
- (19) Joosten SA, Sijpkens YW, van KC, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int* 2005 Jul;68(1):1-13.
- (20) Sayegh MH. Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int* 1999 Nov;56(5):1967-79.
- (21) Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, et al. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993 Apr;55(4):752-6.
- (22) Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999 Jan;10(1):167-81.
- (23) Massy ZA, Guijarro C, Kasiske BL. Clinical predictors of chronic renal allograft rejection. *Kidney Int Suppl* 1995 Dec;52:S85-S88.
- (24) Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med* 1970 Jan 15;282(3):111-7.
- (25) Abe M, Kawai T, Futatsuyama K, Tanabe K, Fuchinoue S, Teraoka S, et al. Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation* 1997 Jun 15;63(11):1616-9.
- (26) Davenport A, Younie ME, Parsons JE, Klouda PT. Development of cytotoxic antibodies following renal allograft transplantation is associated with reduced graft survival due to chronic vascular rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9(9):1315-9.
- (27) Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002 Oct 27;74(8):1192-4.
- (28) McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000 Feb 15;69(3):319-26.
- (29) Fernandez-Fresnedo G, Pastor JM, Lopez-Hoyos M, Ruiz JC, Zubimendi JA, Gonzalez-Cotruello J, et al. Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2003 May;18(5):990-5.
- (30) Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001 Mar;12(3):574-82.
- (31) Regele H, Bohmig GA, Habicht A, Gollwitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S, et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002 Sep;13(9):2371-80.

- (32) Mroz A, Durlik M, Cieciora T, Lao M. [Complement split product C4 as the indicator of immunological activity in chronic allograft rejection]. *Pol Merkur Lekarski* 2003 Oct;15(88):363-5.
- (33) Vongwiwatana A, Gourishankar S, Campbell PM, Solez K, Halloran PF. Peritubular capillary changes and C4d deposits are associated with transplant glomerulopathy but not IgA nephropathy. *Am J Transplant* 2004 Jan;4(1):124-9.
- (34) Sijpkens YW, Joosten SA, Wong MC, Dekker FW, Benediktsson H, Bajema IM, et al. Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int* 2004 Jun;65(6):2409-18.
- (35) Herman J, Lerut E, Van Damme-Lombaerts R, Emonds MP, Van DB. Capillary deposition of complement C4d and C3d in pediatric renal allograft biopsies. *Transplantation* 2005 May 27;79(10):1435-40.
- (36) Lopez-Hoyos M, Fernandez-Fresnedo G, Pastor JM, Arias M. [Anti HLA post-transplant antibodies. A new method of monitorization]. *Nefrologia* 2004;24 Suppl 4:62-6.
- (37) Nather BJ, Nickel P, Bold G, Presber F, Schonemann C, Pratschke J, et al. Modified ELISPOT technique--highly significant inverse correlation of post-Tx donor-reactive IFN-gamma-producing cell frequencies with 6 and 12 months graft function in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 2006 Nov;16(3-4):232-7.
- (38) Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, Schoenemann C, Boenisch O, Sefrin A, et al. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2008 Jul;19(7):1419-29.
- (39) Augustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE. Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005 Aug;5(8):1971-5.
- (40) Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schonemann C, Tullius SG, et al. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation* 2004 Dec 15;78(11):1640-6.
- (41) Najafian N, Albin MJ, Newell KA. How can we measure immunologic tolerance in humans? *J Am Soc Nephrol* 2006 Oct;17(10):2652-63.
- (42) Newell KA, Larsen CP. Tolerance assays: measuring the unknown. *Transplantation* 2006 Jun 15;81(11):1503-9.
- (43) Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002 Feb 21;346(8):580-90.
- (44) Cosio FG, Grande JP, Larson TS, Gloor JM, Velosa JA, Textor SC, et al. Kidney allograft fibrosis and atrophy early after living donor transplantation. *Am J Transplant* 2005 May;5(5):1130-6.
- (45) Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med* 2003 Sep 4;349(10):931-40.
- (46) Tullius SG, Hancock WW, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Reversibility of chronic renal allograft rejection. Critical effect of time after transplantation suggests both host immune dependent and independent phases of progressive injury. *Transplantation* 1994 Jul 15;58(1):93-9.
- (47) Bloom RD, Reese PP. Chronic kidney disease after nonrenal solid-organ transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2007 Dec;18(12):3031-41.

- (48) Seron D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Canas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997 Jan;51(1):310-6.
- (49) Kuypers DR, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD, Nankivell BJ. Predictors of renal transplant histology at three months. *Transplantation* 1999 May 15;67(9):1222-30.
- (50) Yilmaz S, Tomlanovich S, Mathew T, Taskinen E, Paavonen T, Navarro M, et al. Protocol core needle biopsy and histologic Chronic Allograft Damage Index (CADI) as surrogate end point for long-term graft survival in multicenter studies. *J Am Soc Nephrol* 2003 Mar;14(3):773-9.
- (51) Greenberg A, Egel JW, Thompson ME, Hardesty RL, Griffith BP, Bahnson HT, et al. Early and late forms of cyclosporine nephrotoxicity: studies in cardiac transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 1987 Jan;9(1):12-22.
- (52) Vitalone MJ, O'Connell PJ, Jimenez-Vera E, Yuksel A, Wavamunno M, Fung CL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in early transplant tubulointerstitial damage. *J Am Soc Nephrol* 2008 Aug;19(8):1571-83.
- (53) Davies DR, Bittmann I, Pardo J. Histopathology of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity. *Transplantation* 2000 Jun 27;69(12 Suppl):SS11-SS13.
- (54) Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003 Dec 11;349(24):2326-33.
- (55) Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1998 Dec 27;66(12):1736-40.
- (56) Seron D, Moreso F, Fulladosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyo JM. Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney Int* 2002 Feb;61(2):727-33.
- (57) Seron D, Moreso F, Ramon JM, Hueso M, Condom E, Fulladosa X, et al. Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2000 May 15;69(9):1849-55.
- (58) Dimeny E, Wahlberg J, Larsson E, Fellstrom B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant* 1995 Apr;9(2):79-84.
- (59) Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DR, Cheung E, Allen RD, O'Connell PJ, et al. Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation* 2001 Feb 27;71(4):515-23.
- (60) Moreso F, Seron D, O'Valle F, Ibernón M, Goma M, Hueso M, et al. Immunophenotype of glomerular and interstitial infiltrating cells in protocol renal allograft biopsies and histological diagnosis. *Am J Transplant* 2007 Dec;7(12):2739-47.
- (61) Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007 Mar;7(3):518-26.
- (62) Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St GB, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005 Jun 2;435(7042):590-7.
- (63) Lakkis FG. Role of cytokines in transplantation tolerance: lessons learned from gene-knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 1998 Dec;9(12):2361-7.

- (64) Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005 Apr;6(4):345-52.
- (65) Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005 Apr;6(4):331-7.
- (66) Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004 Nov;114(9):1198-208.
- (67) Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001 Jan;27(1):20-1.
- (68) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
- (69) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
- (70) Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001 Jun 4;193(11):1311-8.
- (71) Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + C. *Am J Transplant* 2004 Oct;4(10):1614-27.
- (72) Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003 Jun;14(6):1643-51.
- (73) Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Chaudhry AN, Lechler RI. CD4+CD25+ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2003 Jun;14(6):1652-61.
- (74) Jiang S, Tsang J, Game DS, Stevenson S, Lombardi G, Lechler RI. Generation and expansion of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation* 2006 Dec 27;82(12):1738-43.
- (75) Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al ST, Hudrisier D, Romagnoli P, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008 Jan;14(1):88-92.
- (76) Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005 Nov;6(11):1142-51.
- (77) Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, Mol WM, Peeters AM, Korevaar SS, et al. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation* 2005 Jul 15;80(1):110-7.
- (78) Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Port FK. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int* 2000 Jan;57(1):307-13.
- (79) Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005 Mar 31;352(13):1371-3.

- (80) Boots JM, Christiaans MH, van Hooff JP. Effect of immunosuppressive agents on long-term survival of renal transplant recipients: focus on the cardiovascular risk. *Drugs* 2004;64(18):2047-73.
- (81) Rigatto C, Parfrey P, Foley R, Negrijn C, Tribula C, Jeffery J. Congestive heart failure in renal transplant recipients: risk factors, outcomes, and relationship with ischemic heart disease. *J Am Soc Nephrol* 2002 Apr;13(4):1084-90.
- (82) Lentine KL, Brennan DC, Schnitzler MA. Incidence and predictors of myocardial infarction after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005 Feb;16(2):496-506.
- (83) Marcen R, Morales JM, Fernandez-Juarez G, Andres A, Pascual J, Rodicio JL, et al. Risk factors of ischemic heart disease after renal transplantation. *Transplant Proc* 2002 Feb;34(1):394-5.
- (84) Marcen R. Cardiovascular risk factors in renal transplantation--current controversies. *Nephrol Dial Transplant* 2006 Jul;21 Suppl 3:iii3-iii8.
- (85) Meier-Kriesche HU, Baliga R, Kaplan B. Decreased renal function is a strong risk factor for cardiovascular death after renal transplantation. *Transplantation* 2003 Apr 27;75(8):1291-5.
- (86) Muntner P, He J, Hamm L, Loria C, Whelton PK. Renal insufficiency and subsequent death resulting from cardiovascular disease in the United States. *J Am Soc Nephrol* 2002 Mar;13(3):745-53.
- (87) Abramowicz D, del Carmen RM, Vitko S, del CD, Manas D, Lao M, et al. Cyclosporine withdrawal from a mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimen: results of a five-year, prospective, randomized study. *J Am Soc Nephrol* 2005 Jul;16(7):2234-40.
- (88) Pascual J, Quereda C, Zamora J, Hernandez D. Steroid withdrawal in renal transplant patients on triple therapy with a calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Transplantation* 2004 Nov 27;78(10):1548-56.
- (89) Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, Roodnat JJ, Christiaans MH, Vos PF, et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus improves quality-of-life indices, renal graft function and cardiovascular risk profile. *Am J Transplant* 2004 Jun;4(6):937-45.
- (90) London NJ, Farmery SM, Will EJ, Davison AM, Lodge JP. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet* 1995 Aug 12;346(8972):403-6.
- (91) Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999 Feb 11;397(6719):530-4.
- (92) Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975 Oct;28(10):727-32.
- (93) Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975 Oct;28(10):721-6.
- (94) Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 1977 Feb;55(1):48-51.
- (95) Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996;14:483-510.
- (96) Ikonen TS, Gummert JF, Hayase M, Honda Y, Hausen B, Christians U, et al. Sirolimus (rapamycin) halts and reverses progression of allograft vascular disease in non-human primates. *Transplantation* 2000 Sep 27;70(6):969-75.

- (97) Saurina A, Campistol JM, Lario S, Oppenheimer F, Diekmann F. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in kidney transplant patients reduces the urinary transforming growth factor-beta1 concentration. *Transplant Proc* 2007 Sep;39(7):2138-41.
- (98) Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Abizaid AS, Feres F, Pinto IM, et al. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001 Jan 16;103(2):192-5.
- (99) Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban HE, Perin M, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002 Jun 6;346(23):1773-80.
- (100) Luan FL, Hojo M, Maluccio M, Yamaji K, Suthanthiran M. Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation* 2002 May 27;73(10):1565-72.
- (101) Guba M, von BP, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002 Feb;8(2):128-35.
- (102) Stallone G, Schena A, Infante B, Di PS, Loverre A, Maggio G, et al. Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2005 Mar 31;352(13):1317-23.
- (103) Campistol JM, Eris J, Oberbauer R, Friend P, Hutchison B, Morales JM, et al. Sirolimus therapy after early cyclosporine withdrawal reduces the risk for cancer in adult renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006 Feb;17(2):581-9.
- (104) Granger DK, Cromwell JW, Chen SC, Goswitz JJ, Morrow DT, Beierle FA, et al. Prolongation of renal allograft survival in a large animal model by oral rapamycin monotherapy. *Transplantation* 1995 Jan 27;59(2):183-6.
- (105) Fryer J, Yatscoff RW, Pascoe EA, Thliveris J. The relationship of blood concentrations of rapamycin and cyclosporine to suppression of allograft rejection in a rabbit heterotopic heart transplant model. *Transplantation* 1993 Feb;55(2):340-5.
- (106) DiJoseph JF, Fluhler E, Armstrong J, Sharr M, Sehgal SN. Therapeutic blood levels of sirolimus (rapamycin) in the allografted rat. *Transplantation* 1996 Oct 27;62(8):1109-12.
- (107) Ryffel B, Weber E, Mihatsch MJ. Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *Exp Nephrol* 1994 Nov;2(6):324-33.
- (108) Golbaekdal K, Nielsen CB, Djurhuus JC, Pedersen EB. Effects of rapamycin on renal hemodynamics, water and sodium excretion, and plasma levels of angiotensin II, aldosterone, atrial natriuretic peptide, and vasopressin in pigs. *Transplantation* 1994 Dec 15;58(11):1153-7.
- (109) DiJoseph JF, Sharma RN, Chang JY. The effect of rapamycin on kidney function in the Sprague-Dawley rat. *Transplantation* 1992 Mar;53(3):507-13.
- (110) Murgia MG, Jordan S, Kahan BD. The side effect profile of sirolimus: a phase I study in quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant patients. *Kidney Int* 1996 Jan;49(1):209-16.
- (111) Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. Rapamune Study Group. *Transplantation* 1999 Nov 27;68(10):1526-32.
- (112) Groth CG, Backman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared



- with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation* 1999 Apr 15;67(7):1036-42.
- (113) Kreis H, Cisterne JM, Land W, Wramner L, Squifflet JP, Abramowicz D, et al. Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 2000 Apr 15;69(7):1252-60.
- (114) Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000 Jul 15;356(9225):194-202.
- (115) MacDonald AS. A worldwide, phase III, randomized, controlled, safety and efficacy study of a sirolimus/cyclosporine regimen for prevention of acute rejection in recipients of primary mismatched renal allografts. *Transplantation* 2001 Jan 27;71(2):271-80.
- (116) Johnson RW, Kreis H, Oberbauer R, Brattstrom C, Claesson K, Eris J. Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure. *Transplantation* 2001 Sep 15;72(5):777-86.
- (117) Oberbauer R, Kreis H, Johnson RW, Mota A, Claesson K, Ruiz JC, et al. Long-term improvement in renal function with sirolimus after early cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients: 2-year results of the Rapamune Maintenance Regimen Study. *Transplantation* 2003 Jul 27;76(2):364-70.
- (118) Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen RM, Oberbauer R, Brennan DC, et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation* 2009 Jan 27;87(2):233-42.
- (119) Chueh SC, Kahan BD. Dyslipidemia in renal transplant recipients treated with a sirolimus and cyclosporine-based immunosuppressive regimen: incidence, risk factors, progression, and prognosis. *Transplantation* 2003 Jul 27;76(2):375-82.
- (120) Castro C, Campistol JM, Sancho D, Sanchez-Madrid F, Casals E, Andres V. Rapamycin attenuates atherosclerosis induced by dietary cholesterol in apolipoprotein-deficient mice through a p27 Kip1 -independent pathway. *Atherosclerosis* 2004 Jan;172(1):31-8.
- (121) Ruiz JC, Campistol JM, Sanchez-Fructuoso A, Rivera C, Oliver J, Ramos D, et al. Increase of proteinuria after conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus-based treatment in kidney transplant patients with chronic allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2006 Nov;21(11):3252-7.
- (122) Ruiz JC, Campistol JM, Grinyo JM, Mota A, Prats D, Gutierrez JA, et al. Early cyclosporine withdrawal in kidney-transplant recipients receiving sirolimus prevents progression of chronic pathologic allograft lesions. *Transplantation* 2004 Nov 15;78(9):1312-8.
- (123) Oberbauer R, Segoloni G, Campistol JM, Kreis H, Mota A, Lawen J, et al. Early cyclosporine withdrawal from a sirolimus-based regimen results in better renal allograft survival and renal function at 48 months after transplantation. *Transpl Int* 2005 Jan;18(1):22-8.
- (124) Russ G, Segoloni G, Oberbauer R, Legendre C, Mota A, Eris J, et al. Superior outcomes in renal transplantation after early cyclosporine withdrawal and sirolimus maintenance therapy, regardless of baseline renal function. *Transplantation* 2005 Nov 15;80(9):1204-11.
- (125) Segundo DS, Fernandez-Fresnedo G, Ruiz JC, Rodrigo E, Benito MJ, Arias M, et al. Two-year follow-up of a prospective study of circulating regulatory T cells in renal transplant patients. *Clin Transplant* 2009 Sep 11.

- (126) Knight RJ, Villa M, Laskey R, Benavides C, Schoenberg L, Welsh M, et al. Risk factors for impaired wound healing in sirolimus-treated renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2007 Jul;21(4):460-5.
- (127) Langer RM, Kahan BD. Incidence, therapy, and consequences of lymphocele after sirolimus-cyclosporine-prednisone immunosuppression in renal transplant recipients. *Transplantation* 2002 Sep 27;74(6):804-8.
- (128) Valente JF, Hricik D, Weigel K, Seaman D, Knauss T, Siegel CT, et al. Comparison of sirolimus vs. mycophenolate mofetil on surgical complications and wound healing in adult kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003 Sep;3(9):1128-34.
- (129) Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, Rennke H, Abernathy VE, Koh JS, et al. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001 Oct;281(4):F693-F706.
- (130) Lieberthal W, Fuhro R, Andry C, Patel V, Levine JS. Rapamycin delays but does not prevent recovery from acute renal failure: role of acquired tubular resistance. *Transplantation* 2006 Jul 15;82(1):17-22.
- (131) Campistol JM, Cockwell P, Diekmann F, Donati D, Guirado L, Herlenius G, et al. Practical recommendations for the early use of m-TOR inhibitors (sirolimus) in renal transplantation. *Transpl Int* 2009 Apr 6.
- (132) Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gurkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007 Dec 20;357(25):2562-75.
- (133) Diekmann F, Campistol JM, Saval N, Gutierrez-Dalmau A, Arellano EM, Crespo M, et al. Sequential quadruple immunosuppression including sirolimus in extended criteria and nonheartbeating donor kidney transplantation. *Transplantation* 2007 Aug 15;84(3):429-32.
- (134) Mula AV, Cockfield S, Stryker R, Fergusson D, Knoll GA. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus for chronic renal allograft dysfunction: a systematic review of the evidence. *Transplantation* 2006 Nov 15;82(9):1153-62.
- (135) Bumbea V, Kamar N, Ribes D, Esposito L, Modesto A, Guitard J, et al. Long-term results in renal transplant patients with allograft dysfunction after switching from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Nephrol Dial Transplant* 2005 Nov;20(11):2517-23.
- (136) Basu A, Falcone JL, Tan HP, Hassan D, Dvorchik I, Bahri K, et al. Chronic allograft nephropathy score before sirolimus rescue predicts allograft function in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2007 Jan;39(1):94-8.
- (137) Ruiz JC, Sanchez A, Rengel M, Beneyto I, Plaza JJ, Zarraga S, et al. Use of the new proliferation signal inhibitor everolimus in renal transplant patients in Spain: preliminary results of the EVERODATA registry. *Transplant Proc* 2007 Sep;39(7):2157-9.
- (138) Diekmann F, Budde K, Oppenheimer F, Fritsche L, Neumayer HH, Campistol JM. Predictors of success in conversion from calcineurin inhibitor to sirolimus in chronic allograft dysfunction. *Am J Transplant* 2004 Nov;4(11):1869-75.
- (139) Ruiz JC, Campistol JM, Sanchez-Fructuoso A, Mota A, Grinyo JM, Paul J, et al. Early sirolimus use with cyclosporine elimination does not induce progressive proteinuria. *Transplant Proc* 2007 Sep;39(7):2151-2.
- (140) Radermacher J, Mengel M, Ellis S, Stucht S, Hiss M, Schwarz A, et al. The renal arterial resistance index and renal allograft survival. *N Engl J Med* 2003 Jul 10;349(2):115-24.

- (141) Schwenger V, Korosoglou G, Hinkel UP, Morath C, Hansen A, Sommerer C, et al. Real-time contrast-enhanced sonography of renal transplant recipients predicts chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant* 2006 Mar;6(3):609-15.
- (142) Lebranchu Y, Etienne I, Touchard G, et al. Comparison of efficacy and safety of cyclosporine (CsA) discontinuation with introduction of sirolimus (SRL) at week 12 to standard strategy in renal transplant recipients receiving mycophenolate mofetil (MMF). *Am J Transplant.* 7, 160. 2008.
- (143) Pearson TC, Mulgaonkar S, Patel A, et al. Efficacy and safety of mycophenolate mofetil/sirolimus maintenance therapy after calcineurin inhibitor withdrawal in renal transplant recipients. Final results of the spare-the nephron (STN Trial). *Am J Transplant.* 8, 213. 2008.