



FARMACOCINÉTICA
DE LOS INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA EN EL
TRASPLANTE PULMONAR
DE ADULTOS

TESIS DOCTORAL

*Tesis presentada por Alejandra Méndez Garrido
para optar al grado de Doctor en la Facultad de Medicina
y Cirugía de la Universidad Autònoma de Barcelona*

V.P. de los directores de tesis:

ANTONIO ROMAN BROTO

VÍCTOR MONFORTE TORRES

Barcelona, Septiembre 2015

“...el concepto es el concepto...” Airbag

“Nada es veneno, todo es veneno: la diferencia está en la dosis”. Theophrastus Bombart von Hoemheim, Paracelso

“Garantizar la vida de un ser humano gracias a la sustitución de uno de sus órganos destruidos por un órgano sano extraído de otro individuo, muerto o vivo, representa ciertamente la epopeya más apasionante de la ciencia médica de nuestro siglo, tanto en lo que supone de hazaña terapéutica como por su significación y sus repercusiones en el conocimiento de nuestro universo biológico”. René Küss 1992

Agradecimientos:

A Antonio Roman por hacer posible un proyecto que parecía difícil, por convertirlo en una tesis y por ser un gran apoyo en una época de cambio.

A Víctor Monforte por enseñarme a ser paciente y meticulosa en la elaboración de este proyecto, aportando energía y nuevas ideas.

A mis compañeros del Vall d'Hebron, un equipo motivado por su trabajo, con los que he compartido 5 años y que demuestran cada día que pivotando juntos llegan a sus metas.

A todos los pacientes que con una gran sonrisa han participado en los estudios y sin los que no sería posible este trabajo.

En especial, a mi familia y a Marc, que siempre han sabido apoyarme y aconsejarme en todas mis decisiones con gran entusiasmo.

Abreviaturas

- ALG: globulina antilinfocítica
- AMF: ácido micofenólico
- ATG: globulina antitimocítica
- AUC: área bajo la curva
- AZA: azatioprina
- BCC: *Burkholderia cepacia complex*
- BGN: bacterias *gram* negativas
- BOS: síndrome de bronquiolitis obliterante
- Cav: promedio de la concentración de Ciclosporina
- C₂: concentración a las 2 horas de la administración de la dosis
- C_{max}: concentración máxima
- C_{min}/C₀: concentración predosis o nivel valle
- CMV: citomegalovirus
- CsA : ciclosporina
- CV: coeficiente de variación
- DCI: disfunción crónica del injerto
- DM: diabetes mellitus
- DPI: disfunción primaria del injerto
- EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- FC: farmacocinética
- FCs: farmacocinéticas
- FEV1: volumen de espiración forzada durante el primer segundo
- FKBP12: proteína de unión del Tacrolimus
- FQ: fibrosis quística
- IC: inhibidores de la calcineurina
- IFN γ : interferón gamma
- IGRA: estudio de liberación de interferón gamma
- IL: interleucina
- ISHLT: sociedad internacional del trasplante cardíaco y pulmonar
- HAP: hipertensión arterial pulmonar
- HAPI: hipertensión arterial pulmonar idiopática

- HLA: antígenos leucocitarios humanos
- HTA: hipertensión arterial
- LBA: lavado broncoalveolar
- MAC: *Mycobacterium avium complex*
- MMF: micofenolato mofetil
- MNT: micobacterias no tuberculosas
- NFAT: factor nuclear de las células T activadas
- ON: óxido nítrico
- pmp: por millón de población
- RA: rechazo agudo
- RAC: rechazo agudo celular
- RAD: everolimus
- RMA: rechazo mediado por anticuerpos
- SIR: sirolimus
- TAC: tacrolimus
- TAC BID: Prograf® o Tacrolimus estándar
- TAC QD: Advagraf® o Tacrolimus de liberación prolongada
- TB: tuberculosis
- TBP: trasplante bipulmonar
- TBPs: trasplantes bipulmonares
- TC: trasplante cardíaco
- TCP: trasplante cardiopulmonar
- TCPs: trasplantes cardiopulmonares
- Tmax: tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima
- TMP-SMX: trimetoprim-sulfametoxazol
- TOS: trasplante de órgano sólido
- TP: trasplante pulmonar
- TPs: trasplantes pulmonares
- TUP: trasplante unipulmonar
- TUPs: trasplantes unipulmonares
- VEB: virus Epstein Barr

Índice

1. Introducción.....	13
1.1 Historia del trasplante pulmonar	13
1.2 Evolución, actividad y resultados del trasplante pulmonar	14
1.3 Principales complicaciones del trasplante pulmonar.....	17
1.4 Tratamiento inmunosupresor en el trasplante pulmonar	32
1.4.a Ciclosporina.....	35
1.4.b Tacrolimus	42
1.5 Estudios comparativos de los inhibidores de la calcineurina	46
2. Objetivos.	53
3. Resultados	57
3.1 Artículo 1.....	57
3.2 Artículo 2.....	58
4. Discusión	63
4.1 Artículo 1.....	63
4.2 Artículo 2.....	66
5. Conclusiones	73
5.1 Artículo 1.....	73
5.2 Artículo 2.....	73
6. Bibliografía	77
7. Artículos	95

INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

1.1 Historia del trasplante pulmonar.

Hasta la llegada de los fármacos anticalcineurínicos, se realizaron un número reducido de trasplantes pulmonares (TPs)¹ y cardiopulmonares (TCPs)² en todo el mundo y parecía una técnica imposible ya que la mortalidad era del 100% a corto plazo. El primer trasplante pulmonar (TP) en humanos fue realizado por el equipo de James D. Hardy en 1963. Posteriormente, desde 1963 hasta 1977, se realizaron 38 trasplantes en los que la inmunosupresión se realizó principalmente con corticoides y azatioprina (AZA), pero sólo 9 sobrevivieron más de 15 días^{3,4}. Dentro de los hechos más importantes de esta época pre-anticalcineurínicos destacaron los siguientes: en 1968 Cooley et al.² hacían el primer trasplante en bloque de corazón y ambos pulmones. Ese mismo año Derom et al.³ consiguieron que un paciente sobreviviera 10 meses tras recibir un pulmón. En 1970 el grupo de Haglin, Minnesota, realizó un trasplante bipulmonar (TBP) con fracaso a corto plazo. Después del éxito de Derom algunos equipos intentaron realizar trasplantes unipulmonares (TUPs) pero fueron un fracaso en Londres en 1971 y en Lyon en 1980. Estos malos resultados hicieron que la técnica prácticamente desapareciera durante los años setenta. De hecho, desde 1969 hasta 1983 sólo se realizaron 41 TPs y sobrevivieron 2 pacientes a medio plazo^{4,5}.

La introducción de los inhibidores de la calcineurina (IC) en la década de los 80 constituyó el punto de inflexión en la evolución de los trasplantes de órgano sólido. La utilización de la Ciclosporina (CsA) y posteriormente del Tacrolimus (TAC) supuso una gran disminución de la tasa de rechazo agudo (RA) y de infecciones, así como un gran aumento de la supervivencia^{6,7,8}. La utilización de la CsA en el TP mejoró la inmunosupresión, lo que permitió disminuir la dosis de corticoesteroides utilizadas y, secundariamente, disminuir la dehiscencia de suturas⁹. A finales de los 80, se describió la primera experiencia clínica con el TAC¹⁰. Posteriormente, en 1995, surgieron los primeros ensayos que demostraron que este fármaco era una opción competitiva frente a la CsA¹¹⁻¹³. En la actualidad, los IC siguen siendo la base del tratamiento inmunosupresor aunque la CsA ha sido desplazada por el TAC.

Los primeros TPs experimentales con fármacos inmunosupresores modernos se realizaron a finales de los setenta. Un trabajo histórico fue el de Shumway y Reitz en 1979. Estos

autores realizaron TPs en monos que trataron con CsA y AZA y la supervivencia osciló entre 140 días y 2 años. Estos resultados permitieron que en 1981, Reitz et al.¹⁴, realizaran cuatro TCPs humanos en bloque con buenas supervivencias, ya que 3 de los 4 pacientes sobrevivieron más de 2 años.

A partir de aquí se produjo un incremento progresivo de la actividad, especialmente en EEUU e Inglaterra, con un total de 785 TCPs desde 1983 a 1990.

En 1983 Cooper et al.¹⁵, del grupo de Toronto, realizaron el primer trasplante unipulmonar (TUP) de la época de los IC. Posteriormente, en 1987, Cooper presentó los 5 primeros casos de TUPs con una sola muerte y en 1989 Pearson describió 16 TUPs con sólo 4 muertes. A partir de 1989 se extendieron las indicaciones de los TUPs al enfisema, ya que al inicio se limitaban a la fibrosis pulmonar.

En 1986 el grupo de Toronto^{16, 17} describió el TBP en bloque en la era de los anticalcineurínicos y en 1989, como consecuencia de una mejora de las técnicas quirúrgicas, Bisson et al.¹⁸ realizaron el primer TBP secuencial. Realizaban una incisión anterotransversal única de esterno-bitoracotomía, que posteriormente el equipo de Sant Louis hizo de modo sistemático con CEC. Así, en 1990 Pasque et al.¹⁹ presentaron los tres primeros pacientes operados con trasplante secuencial bilateral y en 1991 el mismo grupo de Sant Louis²⁰ publicó 24 casos realizados. El liderazgo del TP en esta época estuvo en la escuela de Toronto y más tarde en la de St Louis^{21, 22}.

1.2 Evolución, actividad y resultados del Trasplante Pulmonar.

En 1990 nace la necesidad de realizar el Registro Internacional de Trasplantes en Saint Louis, Missouri, que informa de 290 TUPs y 130 trasplantes bipulmonares (TBPs). Las supervivencias registradas del TUP y TBP eran del 65% y el 63% al año y del 54% y 58% a los 2 años, respectivamente. En la última publicación del Registro de la Sociedad Internacional de trasplante cardíaco (TC) y TP (ISHLT)²³ hay registrados 47.647 TPs, incluyendo 1950 retrasplantes, así como 3772 TCPs en adultos. Durante estos años se ha observado que la actividad del TP evoluciona hacia un aumento progresivo del número de TBPs, un estancamiento del número de TUP y un descenso del trasplante cardiopulmonar (TCP). Las principales indicaciones del TP en adultos son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (39%), las enfermedades intersticiales (24%) que incluyen a la fibrosis pulmonar idiopática pero no otras fibrosis, la fibrosis quística (FQ) (16%), otras

fibrosis pulmonares (4%), la hipertensión arterial pulmonar idiopática (HAPI) (4%), las bronquiectasias no asociadas a FQ (3%) y los trasplantes (3%). Desde 1990 hasta 2013 la EPOC sin déficit de alfa-1 antitripsina, las enfermedades intersticiales y la FQ engloban las principales indicaciones de TP. Sin embargo, si analizamos el último periodo que abarca desde 1998 hasta 2013 se observa un descenso del 40 al 33% de TPs en EPOC y un aumento del 17 al 24% en pacientes con enfermedades intersticiales. En cuanto a las indicaciones del tipo de trasplante, en patologías como la FQ y la HAPI la indicación a lo largo de los años es el TBP pero se ve un cambio de TUP a TBP en otras patologías. Desde mediados de 1990 se aumentan las indicaciones de TBPs para las otras indicaciones de TP. Así, si observamos el porcentaje de TBPs realizados desde 1998 hasta 2012 vemos un aumento del 49 al 92% en pacientes EPOC con déficit de alfa-1 antitripsina, del 30 al 74% en pacientes EPOC sin déficit del alfa-1 antitripsina y del 19 al 60% en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

El TCP presenta un rápido ascenso en la década de los 80 alcanzando un máximo de 226 TCPs realizados en 1989. Posteriormente, se produce un declive progresivo desde los años 90 hasta que se mantiene estable durante la última década con un rango anual entre 62 y 94 TCPs. Desde 1982 hasta 2013 vemos que dos tercios de sus indicaciones son la cardiopatía congénita y la HAPI. El porcentaje de trasplantados por estas patologías permanece estable mientras que aumentan las indicaciones por enfermedades cardíacas adquiridas y disminuyen las de FQ.

La supervivencia del paciente con TP ha mejorado progresivamente. En el registro de la ISHLT de 2014²³, la supervivencia global media del TP es de 5,7 años siendo del 88% a los 3 meses, del 80% al año, del 65% a los 3 años, del 53% a los 5 años y del 32% a los 10 años. Los receptores que viven más de 1 año desde el TP tienen una supervivencia media de 7,9 años. En el registro internacional la supervivencia del TP se relaciona con varios factores: con el tipo de TP realizado, la serología frente a citomegalovirus (CMV) del donante y el receptor, la edad, el sexo del receptor y la indicación del TP. Cuando analizamos la supervivencia media de los pacientes con TP vemos que en el TBP es de 7 años frente a los 4,5 del TUP, en los trasplantados mayores de 60 años es de 4,4 años frente a los 7 años de pacientes entre 18 y 49 años, ligeramente superior en las mujeres, 5,8 vs 5,4 años, durante los primeros meses y cuando el donante es CMV negativo también se mejora la supervivencia. Al analizar la indicación del TP durante los tres primeros meses la EPOC sin déficit de alfa-1 antitripsina tiene la menor mortalidad pero al año la mayor

supervivencia es de 11 años para los pacientes con FQ, seguidos por los 10 años de la HAPI, los 9 años de la sarcoidosis y de la EPOC con déficit de alfa-1 antitripsina²³.

En España los datos también indican que es una actividad en crecimiento²⁴. Los datos de la Organización Nacional de Trasplantes revelan que en 2014 se realizaron 262 TPs frente a los 285 realizados en 2013 y los 238 efectuados en 2012. De los 262 TPs realizados: 161(62%) fueron TBPs incluyendo 3 TCPs y 101 (39%) TUPs que incluye 41 *twinnings*, un TUP en 2 pacientes diferentes. Esto supone un total de 3487 TPs realizados en España desde 1990. El TP y el TC compiten por el tercer puesto en importancia numérica tras el renal y el hepático con 262 vs 265 trasplantes, respectivamente. La tasa de TP es de 5.6 por millón de población (pmp), un poco más baja que el 6 pmp del 2013 y próxima al 6 pmp de EEUU. Las principales indicaciones del TP en España son: el enfisema secundario a EPOC (33%) con y sin déficit de alfa-1 antitripsina, las enfermedades intersticiales que incluyen la fibrosis pulmonar (39%), la FQ (13%) y la hipertensión arterial pulmonar (HAP) (5%).

En España, la indicación de TBP se incrementa de modo llamativo en la década de los 90, se estabiliza a partir del 2002, presenta un segundo repunte a partir del año 2006 y otro aumento especialmente llamativo en 2013 y en 2014. Destaca el repunte del TBP y el constante incremento de los TUP en los últimos años, destacando en 2013 con un 44,2% del total de los TP.

Los datos publicados en el Registro Español de TP en 2013²⁴ presentan una supervivencia no ajustada del 80% a los 3 meses, del 72% al año y del 60% a los 3 años que son comparables con los del registro de la ISHLT. Los pacientes que sobreviven al tercer mes postrasplante presentan una supervivencia del 90 % al año y del 75 % a los 3 años. En un análisis de supervivencia en función de la patología de base del paciente trasplantado se evidencia que la supervivencia precoz es mayor en EPOC y FQ. A largo plazo la FQ y la HAP^{23, 25} son las que tienen mejores resultados.

El programa de TP del Hospital Universitari Vall d'Hebron fue el primer programa de este tipo en España, realizando 822 TPs desde que inició su actividad en 1990²⁶ hasta abril de 2015. Este programa realizó el primer TBP secuencial en España²⁷. En los últimos años la actividad del TP ha ido creciendo. Actualmente, los TP realizados son 61 en 2011, 49 en 2012, 69 en 2013 y 67 en 2014 (66 adultos y 1 niño) entre las modalidades de TUP y TBP secuencial. Estas cifras sitúan a Cataluña en una tasa de 8,9 TPs pmp, en 2014, lo cual significa que está entre una de las mayores de su entorno.

Ante una demanda creciente las principales limitaciones del TP son dos: el número insuficiente de donantes que aumenta la lista de espera y la mortalidad del receptor^{23, 28-31}. Se considera la donación en asistolia la principal vía de expansión de los donantes fallecidos ya que en 2014 supone más del 21% de las donaciones de los trasplantes de órgano sólido en España. Por otro lado, sabemos que las principales causas de mortalidad²³ son la disfunción crónica del injerto (DCI) y las infecciones. Además, el receptor del TP tiene riesgo de desarrollar otras complicaciones que amenazan su supervivencia, éstas incluyen las complicaciones anastomóticas, el rechazo del injerto, la disfunción primaria del injerto (DPI), la lesión del nervio frénico, las complicaciones pleurales, la tromboembolia venosa, neoplasias postrasplante y la recurrencia de la enfermedad primaria.

1.3 Principales complicaciones del trasplante pulmonar:

Complicaciones de la sutura bronquial.

El acto quirúrgico del TP implica la realización de tres anastomosis; en las vías respiratorias, en las arterias pulmonares y en la aurícula izquierda con las venas pulmonares. La anastomosis de la vía aérea es el lugar más vulnerable de las complicaciones quirúrgicas del TP. Las complicaciones de las vías respiratorias anastomóticas después del TP³² incluyen las que normalmente se desarrollan dentro del primer mes (la infección de la anastomosis, la necrosis o la dehiscencia) y las que se desarrollan más tarde (el exceso de tejido de granulación, la broncomalacia, la estenosis de la vía aérea y las fístulas). Aunque las complicaciones de la vía aérea conducen a un aumento de los costes, una mayor morbilidad y disminución de la calidad de vida, por lo general, no se asocia con una disminución sustancial en la supervivencia³³.

La dehiscencia anastomótica ocurre entre la primera y la segunda semana después del trasplante. Para la mayoría de los pacientes con necrosis bronquial y dehiscencia, se sugiere tratamiento conservador con antibiótico. Sin embargo, la dehiscencia bronquial completa se trata a través de una reparación quirúrgica abierta. Es una complicación muy infrecuente que se asocia con una elevada morbimortalidad ya que provoca neumonía en el postoperatorio inmediato y DPI grave. Además, la zona de la anastomosis bronquial también es propensa a las infecciones y éstas parecen predisponer a otras complicaciones de las vías respiratorias tales como la estenosis bronquial, la dehiscencia, la broncomalacia

y la formación de fístulas. Esta predisposición está probablemente relacionada con la inmunosupresión, la mala irrigación vascular y la alteración del aclaramiento de las secreciones. La *Pseudomonas spp* y el *Staphylococcus aureus* son las infecciones bacterianas más comunes. El *Aspergillus spp* coloniza las vías respiratorias en el postoperatorio inmediato, en un 20% de los casos, y en el 3-6% de los casos es invasivo. En los pacientes que han sufrido una necrosis de la anastomosis, dehiscencia o infección se produce estenosis bronquial³², que es la complicación más frecuente de la vía aérea. Suele manifestarse después del primer mes del trasplante, pero a veces se evidencia años después. A los pocos meses del trasplante se puede formar tejido de granulación hiperplásico. Los pacientes sintomáticos pueden presentar disnea, tos o neumonía postobstructiva pero cuando el tejido de granulación estrecha las vías respiratorias en un 25% o más precisa desbridamiento. Otra complicación que provoca un estrechamiento de la vía aérea es la traqueomalacia. Se evidencia a través de la broncoscopia como un estrechamiento del calibre de la vía aérea, superior o igual al 50%, durante la espiración. Cuando el colapso de la vía aérea es asintomático no requiere tratamiento, en grados leves y sintomáticos se aconseja ventilación mecánica no invasiva con presión positiva nocturna y con colapsos superiores al 75% se coloca un stent temporal o se interviene quirúrgicamente. Por último, las fístulas broncopleurales, broncomediastínicas y las fístulas broncovasculares son complicaciones poco frecuentes del TP³² pero se asocian con alta mortalidad.

Complicaciones de la sutura vascular.

Las complicaciones de la anastomosis arterial y venosa se ven con menos frecuencia que las complicaciones de las anastomosis de las vías respiratorias, pero pueden tener efectos devastadores. Las complicaciones vasculares³⁴⁻³⁶ incluyen estenosis, acodamiento, torsión arterial y la formación de trombos venosos pulmonares que conllevan el riesgo de la embolización sistémica, el accidente cerebrovascular o la obstrucción venosa pulmonar.

Otras complicaciones quirúrgicas.

Otras complicaciones quirúrgicas no anastomóticas^{37, 38} incluyen la lesión del nervio frénico, la pleura o el sistema venoso. La lesión del nervio frénico es una complicación frecuente después de un TCP y se evidencia, aproximadamente, en un 40% de las ocasiones. La disfunción diafragmática se evidencia en un 5-10% de los pacientes con TP

y son un grupo de pacientes que suelen tener estancias hospitalarias prolongadas con una mayor duración de la ventilación mecánica. La incidencia de parálisis diafragmática en el TP es de un 3-9%. Las complicaciones pleurales^{39, 40} también se observan con frecuencia después de un TP e incluyen neumotórax, fístula broncopleural, derrame pleural, hemotórax y quilotórax. El tromboembolismo pulmonar en el receptor de TP tiene una incidencia del 5 al 10%, mientras que la trombosis venosa se encontró en un 20-30% cuando se incluyeron los trombos en extremidad superior e inferior

Disfunción primaria del injerto

La DPI es la principal causa de muerte temprana, durante el primer mes del TP, y ocurre entre el 10 y el 25%^{23, 41} de los TP. Es una lesión multifactorial que se desarrolla en las primeras 72 horas después del trasplante. Se caracteriza por hipoxemia grave, edema pulmonar y la aparición de opacidades radiográficas pulmonares difusas, sin otra causa identificable. El patrón patológico típico de DPI es el daño alveolar difuso. Tanto la preservación isquémica en frío como la lesión por isquemia-reperfusión parecen contribuir a la DPI. Otros factores que también pueden contribuir son el tromboembolismo del donante, la aspiración del receptor o la neumonía y la lesión pulmonar asociada a la ventilación. A pesar de los importantes avances en la preservación de órganos, la técnica quirúrgica y el cuidado perioperatorio, la DPI es responsable de la morbilidad y mortalidad después del TP⁴¹. En los pacientes con DPI moderada (grado ≤ 3) y con presión arterial pulmonar normal se recomienda el tratamiento de soporte convencional, usando la ventilación de protección pulmonar y un control óptimo de fluidos. En los pacientes más graves (grado >3), con dificultad persistente en la oxigenación y la presión arterial pulmonar elevada, se recomienda añadir óxido nítrico (ON) inhalado a una concentración de 10 a 20 ppm. Si los pacientes sobreviven, precisan ventilación mecánica durante más tiempo y suelen presentar un mayor deterioro de su función pulmonar. Además, en distintas series⁴²⁻⁴⁵ se ha evidenciado que tienen más riesgo de presentar una DCI.

Rechazo agudo.

El RA es responsable de aproximadamente el 4 % de las muertes en los primeros 30 días después del trasplante. A pesar de los avances en la inducción y el uso de inmunosupresión de mantenimiento agresiva, aproximadamente un tercio de los receptores de TP son tratados por RA en el primer año después del trasplante.

El rechazo agudo celular (RAC) es el tipo de RA más frecuente en el TP y está mediado por los linfocitos T que reconocen como extraños los antígenos leucocitarios humanos (HLA) u otros antígenos. Es una complicación que se diagnostica en el 29% de los TP durante el primer año²³ y es menos frecuente a medida que nos alejamos del momento del trasplante.

Los factores que pueden contribuir al desarrollo de RCA incluyen: la incompatibilidad del HLA donante-receptor, variaciones genéticas⁴⁶ en la interleucina-10 (IL-10), en la resistencia a fármacos, en citoquinas o en los receptores celulares; la inmunosupresión tanto de inducción como de mantenimiento²³, las edades comprendidas entre los 18 y los 34 años²³ y el déficit de vitamina D⁴⁷ previo al TP.

El diagnóstico seguro del RAC requiere un estudio histológico pulmonar y, por lo tanto, se habla de RAC demostrado por biopsia. La obtención de las muestras de pulmón suele ser a través de biopsia transbronquial y se ha recomendado un número de muestras entre 6 y 10 para poder hacer un diagnóstico adecuado⁴⁸. Las lesiones fundamentales que definen el RAC son los infiltrados linfocitarios que afectan a las arterias pulmonares. Estos infiltrados aparecen de forma parcheada en el injerto, lo cual justifica la necesidad de un número elevado de muestras para su diagnóstico. La afectación vascular puede ser desde focal en alguna zona de la pared del vaso hasta difusa y extendida al intersticio pulmonar. Estas lesiones se pueden acompañar o no de distintos grados de afectación de la vía aérea con una inflamación linfocitaria parcheada. Si la muestra obtenida por biopsia transbronquial no es diagnóstica, hay que valorar los riesgos y los potenciales beneficios de la obtención de tejido pulmonar por biopsia quirúrgica. Por esta razón llevamos muchos años intentando encontrar biomarcadores fiables de las complicaciones inmunológicas del paciente. Así, algunos grupos han intentado predecir el RAC mediante el hallazgo de células en el lavado broncoalveolar (LBA) o mediante la presencia de proteínas. El RAC se ha relacionado con elevación de las células T CD8, activación de células T CD4, células NK, elevación de la IL-17, de la IL-15 y del interferón gamma (IFN- γ) en el LBA. También se han realizado estudios de pH en el condensado de aire exhalado y ON exhalado que pueden ayudar en el diagnóstico. Sin embargo, todos estos estudios no han sido suficientes para poder aportar a la clínica un patrón de biomarcadores que pueda substituir a la histología pulmonar. Desde 1990 se han ido sucediendo los consensos para determinar los grados histológicos del RAC^{48, 49}, que actualmente están bien establecidos. Esta graduación de las lesiones del RAC ha permitido homogeneizar el lenguaje, poder comparar resultados de distintos

centros y definir cuándo se ha de realizar tratamiento. Clásicamente se consideró que el umbral para realizar tratamiento es la presencia de un grado A2 o superior ya que un número muy importante de lesiones de RAC mínimo desaparecen con el tiempo. Sin embargo, existen evidencias publicadas de que los pacientes que presentan grados bajos de RAC tienen un mayor riesgo de desarrollar DCI de forma más prematura^{50, 51}. Además, se calcula que en una de cada cuatro ocasiones las lesiones de RAC mínimo pueden progresar a grados superiores de RAC.

El diagnóstico diferencial del RAC incluye las infecciones, el rechazo mediado por anticuerpos (RMA), las complicaciones de las vías respiratorias como la estenosis de la anastomosis bronquial, la malacia de las vías respiratorias y el tejido de granulación; la DCI, el tromboembolismo o la recurrencia de su enfermedad de base. El RAC suele responder muy bien a corticoesteroides. Se utilizan dosis altas para los RAC de alto grado y para los RAC de bajo grado sintomáticos. Estas dosis se dan tres días consecutivos y luego se sigue con una pauta descendente de corticoesteroides de 2 a 3 semanas hasta llegar a la dosis adecuada de mantenimiento. También se realiza una revisión de la pauta inmunosupresora y una optimización de la misma.

Otra complicación inmunológica es el RMA, que es menos común que el RAC, está mediado por anticuerpos dirigidos contra HLA del donante u otros antígenos. Estos anticuerpos pueden haber estado presentes en el receptor en un nivel bajo antes del TP o pueden desarrollarse después. El RMA hiperagudo se produce por anticuerpos preformados, ocurre durante las primeras 24 horas después del TP y causa una respuesta inmunológica muy grave. Gracias a la utilización de técnicas de detección de anticuerpos donante-específicos pretrasplante, en suero, la incidencia del rechazo hiperagudo ha disminuido. Generalmente, se intenta determinar una compatibilidad cruzada virtual y si los anticuerpos HLA se identifican en el receptor potencial, los antígenos HLA correspondientes se evitan en el donante. A pesar de evitar los antígenos incompatibles, los pacientes que están presensibilizados presentan un mayor riesgo de complicaciones postrasplante.

El RMA agudo suele producirse en el periodo postoperatorio inmediato después del TP, su aparición más tardía y la eventual existencia de formas crónicas es más controvertida. Cuando se sospecha un RMA agudo, deben revisarse los resultados del panel pretrasplante de anticuerpos reactivos y también debe realizarse una prueba cruzada directa, preferentemente utilizando citometría de flujo, ya que sabemos que el riesgo aumenta

cuando los valores de prueba son mayores del 10%. Se sabe que los pacientes que presentan anticuerpos donante-específicos de *novo* presentan un peor pronóstico del injerto y empeora la tasa de supervivencia⁵².

Sin embargo, aunque es importante tener en cuenta la sensibilización humoral tanto antes como después del TP, no podemos olvidarnos que el RMA puede ocurrir sin la presencia de anticuerpos donante-específicos. Se ha especulado con la presencia de anticuerpos no-HLA dirigidos contra componentes celulares del injerto pulmonar (células endoteliales, células epiteliales y colágeno) que podrían explicar los casos de DCI con hallazgos anatómo-patológicos característicos de RMA pero sin anticuerpos donante-específicos.

El diagnóstico del RMA requiere una aproximación multidisciplinar que consiste en un triple test que incluye la disfunción clínica del injerto asociada a la detección de anticuerpos donante-específicos circulantes y alteraciones histopatológicas compatibles con una inmunohistoquímica que evidencia depósitos de complemento a nivel alveolar (tinción CD4 +). Otros marcadores de activación del complemento como el C3d, del C5 al C9, marcadores endoteliales como el CD31 o CD34, marcadores de linfocitos B como el CD20, de linfocitos T como el CD3, de macrófagos como el CD68 o el CD163 parecen prometedores para el futuro⁵³. Además, la evidencia actual^{53, 54} sugiere que la inmunidad humoral juega un papel muy relevante en el RA y la DCI. El RMA no responde a corticoesteroides ya que existe un tratamiento específico que combina la plasmaféresis, las inmunoglobulinas y el rituximab, entre otras opciones.

Disfunción crónica del injerto

Otra complicación es la DCI que es la causa de muerte más importante después del primer año del trasplante, siendo alrededor del 40%⁵⁵, y presenta una prevalencia aproximada del 50% a los 5 años y del 76% a los 10 años postrasplante²³.

Hasta hace pocos años la DCI era sinónimo de síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS). Sin embargo, recientemente⁵⁶ se ha identificado que la DCI se puede presentar en forma de otros fenotipos menos frecuentes y con características diferentes. Recientemente se han descrito el síndrome restrictivo del injerto y la disfunción crónica reversible neutrofílica del injerto. Se desconoce el motivo por el cual un paciente desarrolla un tipo u otro de DCI pero es frecuente que un paciente pueda presentar características de uno u otro fenotipo, a la vez o a lo largo de su vida.

La mejor estrategia para hacer frente a la DCI es la prevención, ya que no hay un tratamiento fiable una vez que los pacientes desarrollan esta enfermedad. Entre las opciones para la prevención de la DCI se incluye la inmunosupresión inicial intensa para eliminar los episodios de RCA, la profilaxis contra el CMV con valganciclovir oral en los receptores que se encuentran en riesgo de infección por CMV, la vacunación contra la gripe⁵⁷ y el neumococo, la reducción del tiempo de isquemia fría y otros métodos para reducir la DPI, el tratamiento del reflujo gastroesofágico para reducir la aspiración ácida y la azitromicina a largo plazo.

Para tratar la DCI hay distintas opciones terapéuticas que no han demostrado eficacia en ningún estudio controlado y sobre las que no existe ningún protocolo bien establecido. Los tratamientos potenciales incluyen el cambio del tratamiento inmunosupresor de mantenimiento, la fotoféresis extracorpórea, la irradiación linfoide total, la plasmaféresis, otras terapias de anticuerpos contra el injerto (inmunoglobulinas, rituximab, inhibidores del proteosoma) y la ciclosporina inhalada⁵⁸⁻⁶¹. La decisión entre estas opciones suele depender de la preferencia del centro. En cuanto al tratamiento inmunosupresor, se revisa el régimen inmunosupresor de mantenimiento para adecuar y garantizar que los niveles séricos de los diversos agentes inmunosupresores son apropiados. Algunos pacientes con DCI precoz responden a los cambios en su régimen de inmunosupresión de mantenimiento en favor de TAC y MMF/AMF, tal y como se describe en el apartado 1.3.

Infecciones

Aunque el principal obstáculo para el éxito a largo plazo del TP es la DCI, que afecta a dos terceras partes de los pacientes, las complicaciones infecciosas siguen siendo una importante causa de morbimortalidad y son responsables de la muerte del 25% de estos pacientes. Durante el primer año postrasplante las infecciones son la principal causa de mortalidad. En el periodo inmediato del postrasplante predominan las infecciones nosocomiales, en el periodo precoz los gérmenes oportunistas, como el CMV y los hongos, y en el periodo tardío las bacterias adquiridas en la comunidad y los virus. El riesgo de infección en un receptor de TP viene determinado por la interrelación de diferentes grupos de factores, como son los vinculados con el receptor (infección latente, activa o colonización), el propio injerto pulmonar, el acto quirúrgico, los microorganismos presentes en el explante o implante y aquellos derivados del estado de inmunosupresión.

Del total de infecciones, el 35-66% son bacterianas y el 50-85% de los pacientes sometidos a TP presentan como mínimo un episodio de infección bacteriana durante su seguimiento. A pesar de la profilaxis bacteriana la incidencia de neumonía bacteriana es de aproximadamente un 10-20% en los primeros 30 días después del trasplante⁶². Sabemos que la neumonía bacteriana es la complicación infecciosa más frecuente en el receptor de un TP⁶³. Especialmente las bacterias *gram* negativas (BGN) causan las tres cuartas partes de las neumonías y el resto son causadas por bacterias *gram* positivas como el *Staphylococcus spp*, el *Enterococcus spp* y el *Haemophilus spp*. La *Pseudomonas aeruginosa* es la especie más aislada aunque también otras BGN como el *Acinetobacter spp*, la *Enterobacteriaceae spp*, la *Stenotrophomona spp* y la *Burkholderia spp* son frecuentes.

La colonización de las vías aéreas antes del TP, especialmente en pacientes con FQ, es un factor importante para determinar tanto la indicación del TP, como el tratamiento postoperatorio ya que la colonización postrasplante es un factor de riesgo importante para el desarrollo de infecciones precoces y de DCI⁶⁴⁻⁶⁷. La colonización con BGN multirresistentes antes del TP no parece afectar a la supervivencia de los pacientes, con la notable excepción de ciertas especies de *Burkholderia*. Es importante conocer las resistencias pretrasplante para la elección de la profilaxis antibiótica peritrasplante. Históricamente los pacientes con FQ colonizados por *Burkholderia cepacia* eran excluidos como candidatos a TP debido a los malos resultados. Sin embargo estudios recientes han revelado que 9 especies genéticamente distintas (*genomovars*) componen el *Burkholderia cepacia complex* (BCC), siendo la *Burkholderia cenocepacia* (*genomovar III*) y la *Burkholderia multivorans* (*genomovar II*) las más frecuentes en pacientes con FQ. También sabemos que las cepas no epidémicas de *Burkholderia cenocepacia* comportan mayor riesgo de muerte que las formas transmisibles o epidémicas. Varios estudios^{68, 69} demuestran que la infección por la *Burkholderia cenocepacia* implica mal pronóstico tras el TP si lo comparamos con los pacientes con *Burkholderia no-cenocepacia* que presentan un riesgo comparable a los controles no infectados. Algunos trabajos sugieren que la infección por *Burkholderia gladioli* antes del TP se asocia a un incremento del riesgo de muerte. Ante estos datos es necesario validar unos criterios de selección más rigurosos basados en el *genomovar* específico de la BCC, en la presencia de *Burkholderia cenocepacia no epidémica vs epidémica* o en la presencia de *Burkholderia gladioli*. Esta

estrategia permitirá disminuir el riesgo de complicaciones en el TP de los pacientes con FQ y BCC.

Los *Staphylococcus aureus* son una causa frecuente de neumonías nosocomiales, bacteriemias y de infecciones de heridas⁷⁰. Destaca el aumento de aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en las unidades de FQ, su presencia pretrasplante empeora el pronóstico⁷¹ y aumenta la mortalidad durante los 3 primeros meses postrasplante⁷². El *Streptococcus pneumoniae* es la causa más frecuente de las neumonías adquiridas en la comunidad a partir de los 6 meses. A pesar de la vacunación antineumocócica y del empleo profiláctico del trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) para el *Pneumocystis jirovecii*, los pacientes con TP tienen una mayor probabilidad de desarrollar una infección neumocócica invasiva y bacteriemia. La *Chlamydia pneumoniae*, además de causar infecciones del tracto respiratorio superior e inferior ha sido implicada como una posible causa de BOS⁷³

Las infecciones causadas por *Nocardia spp* son raras. Aproximadamente del 1,9 al 3,5% de los pacientes con TP desarrollan nocardiosis, con un promedio de 14,3 meses después del trasplante⁷⁴. En los pacientes trasplantados que reciben profilaxis con TMP-SMX se han diagnosticado casos de nocardiosis, lo que sugiere resistencias al tratamiento. Debemos pensar en la nocardiosis en neumonías de pacientes con TP, particularmente cuando no responden a la terapia empírica, ya que a pesar de la baja prevalencia presentan un alto riesgo de mortalidad⁶³. Finalmente, la infección por *Clostridium difficile* es un problema emergente. Presenta una incidencia del 7 al 31%, con mayor frecuencia durante los primeros meses después del trasplante y en los pacientes que requieren una hospitalización prolongada. La intensa inmunosupresión y la exposición a los agentes antimicrobianos tras el trasplante probablemente contribuyen al aumento del riesgo de infección por *Clostridium difficile*⁷⁵, asociado con la emergencia de una cepa muy virulenta. Es la causa más frecuente de diarrea nosocomial y de infección nosocomial en EEUU⁶³. Estudios previos⁷⁶ han demostrado la relación entre la infección por *Clostridium difficile* y el BOS, sobre todo, si ocurre durante los 3 primeros meses postrasplante. Los pacientes con TP tienen una elevada mortalidad⁷⁵ tras las complicaciones infecciosas del *Clostridium difficile*.

Tras la infección bacteriana, la infección por CMV es la segunda causa más frecuente de infección en el TP⁶³. A pesar de utilizar diferentes estrategias de prevención, la incidencia de infección por CMV sigue siendo elevada.

El factor de riesgo más importante para la infección y la enfermedad por CMV en los receptores del TP es el estado serológico del CMV, sobre todo, en los receptores seronegativos de órganos seropositivos (CMV D +/R-), que se asocia a la intensa inmunosupresión a la que son sometidos estos pacientes. En particular, los anticuerpos antilinfocíticos, utilizados como terapia de inducción o para el tratamiento de rechazo resistente a esteroides, y las altas dosis de glucocorticoides también se han identificado como un factor de riesgo para la enfermedad por CMV. Otros factores de riesgo son la presencia de RAC y la existencia de otras coinfecciones, sobre todo víricas.

Sabemos que la utilización de profilaxis anti-CMV en el TP reduce el riesgo de infección, de enfermedad y de otras causas de morbimortalidad asociadas al CMV. Un correcto estudio del estado serológico de los donantes y los receptores mediante la detección de IgG anti-CMV debe realizarse siempre para un adecuada estratificación del riesgo y para implementar las estrategias de profilaxis adecuadas. Generalmente se utilizan dos tipos de estrategias para la profilaxis del CMV en el trasplante de órgano sólido (TOS)⁷⁷: la profilaxis universal que administra fármacos antivirales a todos los individuos de riesgo y la profilaxis anticipativa que administra antivirales sólo a los individuos con replicación viral demostrada. Aunque la profilaxis anticipativa puede reducir costes y disminuir la toxicidad por fármacos en el TP, la mayoría de los centros utilizan la profilaxis universal. Inicialmente las estrategias de profilaxis universal utilizan exclusivamente ganciclovir intravenoso o valganciclovir oral tras una corta tanda inicial de ganciclovir intravenoso. Algunos centros añaden gammaglobulina anti-CMV intravenosa pero faltan estudios randomizados que apoyen su utilidad. Existe cierta discusión en relación a la duración de la profilaxis pero estudios recientes demuestran la necesidad de profilaxis prolongadas entre 6 y 12 meses^{77, 78}. Esta profilaxis se debe reiniciar durante el tratamiento del RA, con la utilización de altas dosis de corticoesteroides y durante el tratamiento con anticuerpos antilinfocíticos. En una revisión de la Cochrane⁷⁹ sobre la profilaxis frente al CMV se evidencia que también disminuye el riesgo de infecciones por virus *herpes simplex*, virus *varicella zoster* e infecciones bacterianas. El tratamiento de la enfermedad por el CMV precisa una reducción de la inmunosupresión de mantenimiento asociado al tratamiento antiviral. La inmunosupresión inducida por el CMV puede conducir a la infección de otros organismos oportunistas como el *Pneumocystis spp*, las micobacterias o el *Aspergillus spp*. Además, la infección y la enfermedad por CMV se asocian con RA⁷⁷ y BOS^{80, 81}.

Todos los candidatos a TP deben ser evaluados sobre la presencia de anticuerpos frente al CMV, el virus Epstein Barr (VEB), el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C para realizar tratamiento, definir la profilaxis, vacunación o seguimiento tras el trasplante. Con respecto al VEB, la serología positiva previa al TP valorará el riesgo de linfomas asociados al VEB y se implementarán las medidas de vigilancia adecuadas.

Las infecciones por hongos son una complicación frecuente en los receptores de TP. La candidemia ocurre generalmente durante el primer mes tras el TP como consecuencia de la cirugía reciente y de la exposición a la unidad de cuidados intensivos. La aspergilosis se presenta en un 72% de los casos durante los primeros seis meses tras el TP. El *Aspergillus spp* y la *Candida spp* causan la mayoría de las infecciones fúngicas. El TP es el único tipo de TOS en el cual la etiología más frecuente de infección fúngica invasiva es el *Aspergillus spp*, a diferencia del resto, en que típicamente se deben a *Candida spp*. Las manifestaciones más comunes de la aspergilosis en el TP son la traqueobronquitis, la aspergilosis pulmonar invasiva y la enfermedad diseminada. La traqueobronquitis aspergilar se presenta de modo más frecuente dentro de los tres primeros meses del trasplante y la aspergilosis pulmonar generalmente se produce durante los seis meses después del trasplante. Aproximadamente el 6% de los receptores de TP desarrollan aspergilosis. La mayoría de los aislamientos de *Aspergillus spp* en el esputo o en el LBA son colonizaciones (25-30%) y menos del 10% desarrollan una enfermedad invasiva⁶³. En los pacientes con FQ la colonización por *Aspergillus spp* no se considera un factor de riesgo añadido para desarrollar enfermedad invasiva, aunque sí para desarrollar traqueobronquitis aspergilar postrasplante. El hongo que causa de modo más frecuente la aspergilosis invasiva es el *Aspergillus fumigatus*. Se consideran factores de riesgo para desarrollar aspergilosis invasiva: el aumento de inmunosupresión necesario para prevenir el rechazo, los efectos adversos del trasplante sobre las defensas locales pulmonares y el contacto constante con el medio ambiente que permite el acceso directo de los hongos al injerto. Otros factores de riesgo específicos para la aspergilosis invasiva en receptores de TP incluyen: la colonización de la vía aérea por *Aspergillus spp*, la isquemia de las vías respiratorias y el BOS.

El diagnóstico de la aspergilosis traqueobronquial se hace por visualización de eritema, pseudomembranas o ulceraciones en la broncoscopia y la confirmación por histopatología y/o cultivo de hongos. El diagnóstico definitivo de la aspergilosis pulmonar invasiva

requiere una biopsia que demuestra la invasión de tejidos, aunque esto no siempre es necesario o práctico. Lo más habitual es que el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar se realice con la TC de tórax y con la broncoscopia a través de la tinción y el cultivo de hongos. En los casos en los que el diagnóstico no se establece mediante la muestra del LBA, la obtención de una biopsia puede ser útil.

La profilaxis de las infecciones fúngicas invasivas es una práctica común, aunque el fármaco utilizado y la duración varía según los grupos de trasplante. Una estrategia es utilizar anfotericina B nebulizada para la profilaxis del *Aspergillus spp*^{82, 83} y otras infecciones fúngicas invasivas, en pacientes sin colonización del tracto respiratorio. Para los pacientes que tienen colonizado el tracto respiratorio, especialmente por *Aspergillus spp*, la profilaxis antifúngica puede realizarse con un azol oral. El uso de formulaciones de anfotericina B nebulizada se ha asociado con una baja tasa de infecciones fúngicas pulmonares en el período postoperatorio temprano.

El tratamiento inicial en pacientes con traqueobronquitis aspergilar o aspergilosis invasiva se realiza con voriconazol y si no lo tolera, anfotericina B lipídica endovenosa o alguna equinocandina. Cuando se utilizan los azoles debemos tener en cuenta sus interacciones con TAC, CsA y sirolimus (SIR) para reducir la dosis del agente inmunosupresor. Además, la terapia sistémica con azoles se combina con anfotericina B nebulizada en todos los pacientes con aspergilosis traqueobronquial. El desbridamiento broncoscópico es un componente importante del tratamiento, particularmente cuando hay riesgo de obstrucción de las vías respiratorias por desechos necróticos en la anastomosis bronquial. El tratamiento de la aspergilosis invasiva⁸⁴ precisa una reducción de la inmunosupresión además de voriconazol y considerar la utilización de anfotericina parenteral, equinocandinas, posaconazol o itraconazol. La resección quirúrgica se recomienda con hemoptisis amenazantes, infecciones sinusales o intracraneales y en lesiones próximas a grandes vasos o al pericardio. La mortalidad en pacientes con traqueobronquitis es del 25% y en pacientes con infecciones pulmonares invasivas es del 50%.

Otras causas importantes de infecciones fúngicas son los *Cryptococcus spp*, los hongos de la mucormicosis, el *Histoplasma*, los *Coccidioides* y los *Blastomyces*; causas más raras son el *Scedosporium spp*, el *Fusarium spp* y los hongos dematiáceos. La mayor parte de las infecciones por *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides* y *Blastomyces* son reactivaciones de una enfermedad latente por lo que es importante una adecuada evaluación pretrasplante.

El *Pneumocystis jirovecii* desarrolla infecciones en el 5-15% de los pacientes con TOS que no reciben profilaxis. Las tasas más altas se presentan en los TPs y los TCPs. El periodo de mayor riesgo de infección por *Pneumocystis jirovecii* es de uno a seis meses después del trasplante⁶³. La incidencia de *Pneumocystis jirovecii* disminuye drásticamente debido a la profilaxis casi universal. El TMP-SMX presenta un amplio espectro contra una variedad de organismos como son el *Pneumocystis jirovecii*, el *Toxoplasma gondii*, la *Listeria spp*, la *Nocardia spp* y el *Streptococcus pneumoniae*, entre otros. Además, el TMP-SMX presenta mejor tolerancia y menos efectos secundarios que otros tratamientos profilácticos⁸⁵.

Las infecciones por micobacterias después del TP son raras. Previamente, la mayoría de estas infecciones eran secundarias al *Mycobacterium tuberculosis* pero recientemente se ha incrementado la incidencia de las micobacterias no tuberculosas (MNT). Particularmente, el *Mycobacterium abscessus* que tiene una incidencia del 3 al 9%.

La incidencia del *Mycobacterium tuberculosis* en los receptores de TOS no está bien establecida y varía según la ubicación geográfica, pero ha demostrado ser significativamente mayor entre los receptores de trasplante en comparación con la población general⁸⁶. La prevalencia de la tuberculosis (TB) activa entre los receptores de trasplante en los países desarrollados ha oscilado desde 1,2 hasta el 6,4%^{87, 88}. La TB puede ser el resultado de la reactivación de la infección latente en el receptor, de la infección no identificada en el injerto o de la infección tras el trasplante.

Los receptores de TP son más propensos a desarrollar manifestaciones pulmonares de TB aunque también presentan enfermedad diseminada. De un tercio a la mitad de los casos de TB se diseminan o son extrapulmonares tras el trasplante. La TB debe considerarse en todos los receptores de trasplante con evidencia de lesiones pulmonares o cutáneas.

La detección de TB latente se realiza en todos los pacientes candidatos a TOS. Hay dos pruebas disponibles que pueden ser utilizadas para detectar la TB latente, la prueba cutánea de la tuberculina y el estudio de la liberación de IFN- γ (IGRA) en sangre. El diagnóstico de TB activa en receptores de trasplante requiere un alto índice de sospecha y, a menudo, requiere un procedimiento invasivo como la broncoscopia con LBA o biopsia pulmonar. En los receptores de trasplante con lesiones cutáneas atípicas o infecciones de tejidos blandos se realizan biopsia de la piel y/o líquido del absceso que se deben enviar para la tinción de bacilo ácido-alcohol resistente, cultivos e histopatología.

Se considera que los pacientes deben ser tratados de TB latente si tienen una prueba de tuberculina ≥ 5 mm o IGRA +, antecedentes de TB latente no tratada o reciben un órgano de un paciente con tuberculosis latente no tratada. También se recomienda el tratamiento de los TP que presentan un alto riesgo de contraer TB primaria y deben ser tratados como TB latente incluso si las pruebas de detección son negativas.

El tratamiento de la TB activa en los receptores de TP^{87, 89, 90} utiliza los mismos regímenes que se utilizan en los huéspedes inmunocompetentes. La salvedad son las interacciones farmacocinéticas (FCs) entre los inmunosupresores y los medicamentos antituberculosos. Las rifamicinas, especialmente la rifampicina, reducen las concentraciones séricas de TAC, CsA, SIR y everolimus (RAD) a través de la inducción del isoenzima CYP3A4 del citocromo P450. Por ello, la combinación de la rifampicina con los IC se puede asociar con el desarrollo de rechazo^{87, 88}. Sin embargo, dos estudios multicéntricos recientes^{91, 92} no mostraron diferencias en la tasa de mortalidad y rechazo por TB en los trasplantes de órgano sólido. Otros inconvenientes del tratamiento incluyen la toxicidad de los medicamentos y las respuestas inmunes inadecuadas a *Mycobacterium tuberculosis* debido a la inmunosupresión exógena.

Los receptores de un TOS tienen mayor riesgo de infección por MNT debido a la depresión de la inmunidad celular. La infección por MNT se presenta frecuentemente a partir del año del trasplante. Durante los últimos años se describe un aumento de su incidencia hasta el 3-9%. La tasa de infección en el TP es del 0,2 al 2,8%⁹³ pero tiene una morbimortalidad significativa. Las MNT que causan enfermedad⁹³ en pacientes con TOS, de forma más frecuente, son el *Mycobacterium avium complex* (MAC), el *Mycobacterium kansasii*, el *Mycobacterium haemophilum* y el *Mycobacterium marinum*, especies de crecimiento lento, junto con el *Mycobacterium fortuitum*, el *Mycobacterium chelonae* y el *Mycobacterium abscessus*, que son especies de crecimiento rápido. La manifestación más común de la infección por MNT entre los receptores de TOS es la enfermedad pleuropulmonar. El MAC, el *Mycobacterium kansasii*, el *Mycobacterium abscessus* y el *Mycobacterium xenopi* son las causas más frecuentes de enfermedad pulmonar. El *Mycobacterium kansasii* puede causar una enfermedad agresiva en los receptores del TP que puede imitar la reactivación de la TB pulmonar. El *Mycobacterium abscessus* tiende a ser particularmente virulento y puede causar afectación pulmonar, cutánea y/o enfermedad diseminada. La colonización por *Mycobacterium abscessus* en pacientes con FQ aumenta el riesgo de infección invasiva. Se han publicado varios casos fatales de infecciones

postrasplante por *Mycobacterium abscessus* que afectan a los pulmones y/o la pleura de pacientes con TP⁹⁴⁻⁹⁶. A pesar de tratamientos antimicrobianos largos puede ser especialmente agresivo provocando recaídas o incluso la muerte. El MAC es menos frecuente y su impacto en la morbimortalidad es menos severo que el del *Mycobacterium abscessus*.

Otras complicaciones.

Como consecuencia del tratamiento inmunosupresor la hipertensión arterial (HTA), la dislipemia, la diabetes mellitus (DM) y la insuficiencia renal son muy frecuentes después del TP con una prevalencia a los 5 años del 82%, 59%, 40% y 55%, respectivamente, según los últimos datos el registro de la ISHLT²³.

La incidencia de neoplasias también está muy incrementada en estos pacientes y predomina en épocas tardías del trasplante. La más frecuente es el cáncer de piel aunque los síndromes linfoproliferativos confieren una mayor morbilidad. Según el registro de la ISHLT el 22% de los pacientes con TP presentan al menos una neoplasia durante los 5 primeros años y un 42% a los 10 años. La mortalidad por neoplasia es de un 5% al año y un 13% a los 5 años.

En definitiva, el éxito del TP dependerá del número de complicaciones que pueda presentar y sus secuelas. La disminución del número de complicaciones dependerá, por una parte, de la correcta selección de los receptores, del buen manejo del donante, de la correcta preservación del órgano, de la cirugía, del manejo postquirúrgico y de una mejor comprensión de las causas de la DCI para poder prevenirla. Y por otra parte, de una inmunosupresión adecuada que nos permita evitar los procesos de RA y la DCI a la vez que minimizamos los efectos adversos y las infecciones.

En consecuencia, con un mejor manejo de la medicación inmunosupresora y la definición de unas pautas más eficaces que las actuales, podríamos atenuar las principales complicaciones del TP. De hecho, al analizar las diferencias en los resultados clínicos del trasplante antes de la introducción de la CsA y los alcanzados después vemos que la introducción de los IC fue y es fundamental en este progreso.

1.4 Tratamiento inmunosupresor en el trasplante de pulmón

La inmunosupresión moderna llegó hace 30 años con la introducción de la CsA. La combinación de la CsA con AZA y corticoesteroides, con o sin tratamiento de inducción, se estableció como la pauta estándar de tratamiento inmunosupresor para el trasplante de órganos en general y para el pulmonar en particular⁹⁷. Desde los 80 hasta mediados de los 90 esta pauta fue la utilizada por la mayor parte de los grupos de trasplante. En los últimos años las posibilidades terapéuticas del tratamiento inmunosupresor se han multiplicado. Actualmente, la mayoría de los esquemas de inmunosupresión después de un TP están basados en una triple terapia donde los IC son una pieza clave. Esta triple terapia está integrada por la CsA o TAC, además de los agentes antimetabólicos que incluyen la AZA, el micofenolato mofetil (MMF) y el ácido micofenólico (AMF); y los corticoesteroides. Aunque de uso menos frecuente, también están disponibles los inhibidores de la mTOR que incluyen el SIR y el RAD, los cuales presentan un mecanismo de acción y unos efectos secundarios diferentes de los IC. Otros fármacos usados con menor frecuencia en el TP son los inductores o agentes inmunomoduladores como las gammaglobulinas antitimocíticas (ATG)/ antilinfocíticas (ALG), los anticuerpos monoclonales anti CD-25 (Basiliximab) y anti CD-52 (Alemtuzumab), entre otros.

La inmunosupresión debe adaptarse a la fase del trasplante. Se considera que existen dos fases bien diferenciadas en la respuesta inmune frente a un TOS, la de inducción o fase temprana del postoperatorio y la de mantenimiento. La primera se caracteriza por ser considerada la de mayor riesgo inmunológico como lo demuestra la alta incidencia de RAC en este periodo. La segunda presenta un riesgo inmunológico menor. Por esta razón, desde el punto de vista teórico se considera que un tratamiento inmunosupresor más intenso en la fase de inducción podría estar justificado. Sin embargo, en la fase de mantenimiento se disminuye la inmunoreactividad y eso permite disminuir la inmunosupresión. En el TP el tratamiento de inducción se realiza con las ATG o Timoglobulina, ALG, el OKT3 o muromonab-CD3, Basiliximab, Daclizumab y el Alemtuzumab. A pesar de esta amplia oferta de fármacos, no existen estudios controlados y bien diseñados que permitan aclarar si la inducción en el TP es o no es vital. En una revisión de la Cochrane del 2013⁹⁸, no se identifican efectos beneficiosos ni perjudiciales claros asociados con el uso de inducción de anticuerpos contra los linfocitos T en comparación con ninguna inducción, ni al comparar diferentes tipos de anticuerpos contra los linfocitos T. Actualmente, según los datos del registro internacional²³ aproximadamente

el 55% de los pacientes no reciben tratamiento de inducción, lo cual demuestra la división de la comunidad científica por la falta de evidencia.

En la fase de mantenimiento o de menor riesgo inmunológico el tratamiento inmunosupresor más utilizado en la práctica clínica actual, tanto en el primero como al quinto año del TP, es la combinación de TAC/MMF (Figura 1).

Figura 1: Tratamiento inmunosupresor de mantenimiento en adultos con TP tratados con prednisona. Seguimiento desde enero de 2002 hasta junio de 2012²³.

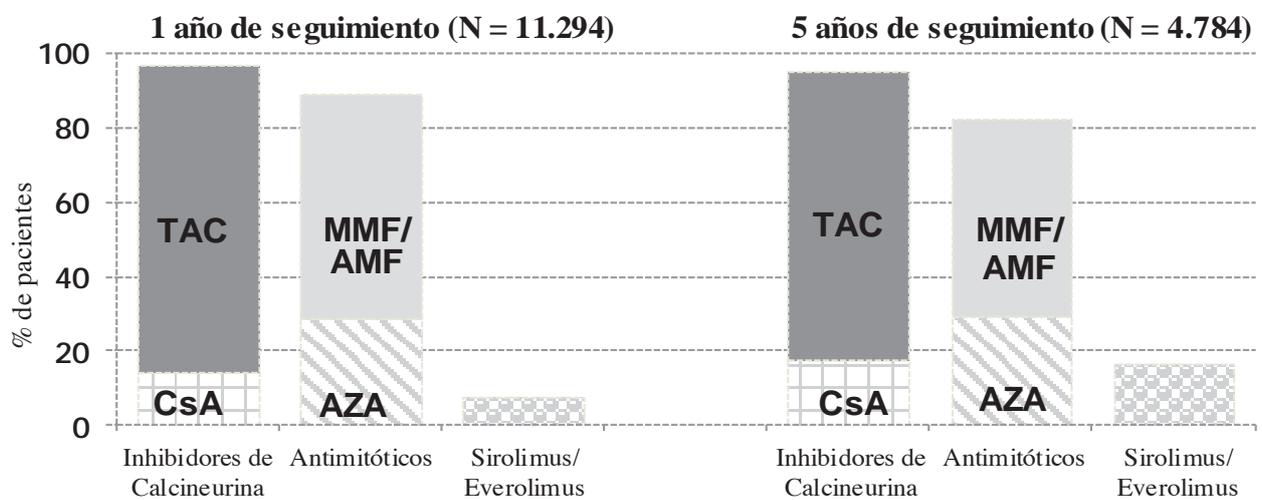


Figura traducida y modificada de Yusen et al.²³

Otras combinaciones utilizadas son TAC/AZA, CsA/MMF, CsA/AZA²³. Dentro de los IC, más del 80% de los pacientes portadores de TP al año y un 77% a los 5 años tienen TAC dentro del esquema inmunosupresor²³. En los datos del registro español también observamos que durante los últimos años el TAC junto con el MMF o AMF son los inmunosupresores más utilizados²⁴. Pero al recordar cuales eran los inmunosupresores utilizados al inicio de los años 80 en el TP la combinación de CsA, AZA y corticoides era el estándar. Cómo y por qué la mayoría de los grupos de TP han ido evolucionando hacia nuevas pautas de inmunosupresión es un tema que se desarrolla en los próximos capítulos. De la variedad de combinaciones que se utilizan podemos sacar dos apreciaciones. Una es que dentro del esquema de la triple terapia todavía queda un porcentaje no despreciable de

pacientes que reciben el tratamiento con el que se inició el TP hace más de 30 años. Y la otra es que si se emplean tantas combinaciones es probable que este hecho refleje que, hasta la fecha, ninguna combinación de fármacos se ha mostrado claramente superior a las demás para prevenir el RA y la DCI en los receptores del TP.

Un hecho fundamental y sobre el que existe un gran convencimiento, es considerar al TP como un TOS con mayor riesgo inmunológico y de infecciones. Esta afirmación está apoyada por una relativa mayor incidencia de RAC que en otros trasplantes de órgano sólido. Así el 28,9% de los TPs²³ presentan al menos un episodio de RA durante el primer año postrasplante frente al 10% en trasplante renal⁹⁹, al 15% en trasplante hepático¹⁰⁰ y al 25% en trasplante cardíaco¹⁰¹. En este sentido, el hecho de que los pacientes con TP presenten más episodios de RA que otros pacientes con TOS puede deberse a la menor compatibilidad del HLA, porque en el TP se obvia el emparejamiento previo donante-receptor, a una elevada actividad inmunológica a nivel pulmonar y, además, un contacto permanente con el medio externo¹⁰². Estos hechos apoyan la idea teórica de que el TP necesita un alto nivel de inmunosupresión, especialmente en el postoperatorio inmediato, para intentar disminuir la frecuencia del RAC. Además, la incidencia de RAC se considera un factor de riesgo de DCI^{103, 104}. Por ello, es fundamental prevenir el RAC ya que afecta indirectamente a la supervivencia.

Dentro de la estrategia de inducción debe de ser un objetivo la disminución del RAC que se ha de balancear con el riesgo aumentado de infecciones y de tumores, sobre todo, linfomas relacionados con el VEB¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Sin embargo, los estudios existentes no demuestran un efecto del tratamiento de inducción sobre la frecuencia de RA, que es el objetivo principal de los escasos ensayos clínicos realizados. Entre los estudios que analizan el tratamiento de inducción ninguno de ellos demuestra efecto sobre la tasa de RAC. Así, el estudio hispano-canadiense LUNAS¹⁰⁸, no muestra diferencias del efecto del basiliximab frente al tratamiento con placebo. Una revisión de la Cochrane⁹⁸, en 2013, analiza 6 ensayos clínicos en los que se utilizan anticuerpos contra los linfocitos, policlonales y monoclonales, como tratamiento de inducción tras el TP. Son ensayos clínicos controlados y aleatorizados en los que todos los pacientes reciben el mismo tratamiento inmunosupresor de mantenimiento. Analizan 278 pacientes y comparan el tratamiento policlonal o monoclonal *vs* no inducción, policlonal *vs* no inducción, antagonistas de los receptores de la IL-2 *vs* no inducción, policlonal *vs* muromonab-CD3 y policlonal *vs* antagonistas de los receptores de la IL-2 sin evidenciar ningún beneficio del

tratamiento de inducción. Posteriormente, se publican 2 estudios que analizan ATG¹⁰⁹ y Alemtuzumab¹¹⁰ con resultados similares. Sin embargo, recientemente se publica un estudio retrospectivo¹¹¹ que evidencia una menor incidencia de RA a los 6 meses de la inducción con alemtuzumab, confirmada por biopsia, al compararlo con basiliximab. Otras evidencias de menor calidad, como son los registros, tampoco aclaran el tema. Así, en el último registro de la ISHL observan que al analizar los pacientes sin DCI no hay diferencias entre los pacientes tratados con y sin inducción. Sin embargo, en el mismo registro se observa que aproximadamente el 45% de los TP reciben tratamiento de inducción siendo el basiliximab el más usado, seguido de la ATG/ALG y alemtuzumab²³. En la fase de mantenimiento el tratamiento inmunosupresor incluye un IC, un antimetabolito y corticoesteroides en la inmensa mayoría de los TP del mundo. En definitiva, en el esquema actual de la inmunosupresión los fármacos considerados fundamentales son los IC. Actualmente existen comercializados dos de ellos, CsA y TAC. En los siguientes apartados describiré ambos compuestos y su papel en el TP.

1.4.a Ciclosporina

La introducción de la CsA representa un avance fundamental para el TP a principios de la década de los 80. Es el primer IC que demuestra experimentalmente una capacidad de controlar el RA del injerto.

En 1970, el departamento de microbiología de Sandoz cultiva los microorganismos de muestras del suelo de Hardanger, en Noruega. Obtienen la cepa del *Tolypocladium inflatum* que produce un polipéptido que posteriormente denominaron CsA. Su efecto inmunosupresor se descubre en 1976 por JF Borel y en 1978 se ve que es efectivo inhibiendo el rechazo de pacientes trasplantados de riñón de donantes cadáveres⁶.

La CsA es un polipéptido compuesto por 11 aminoácidos dispuestos cíclicamente y todos los nitrógenos amínicos se encuentran metilados. Es una molécula muy hidrófoba que contiene un residuo aminoacídico *dextro* en la posición 8 y una configuración *cis* en la posición 9 y 10 de los residuos metilados. La CsA es altamente lipofílica, su solubilidad a 25° es de 0,04 mg/g en agua, 1,6 mg/g en n-hexano y mayor de 500 en metanol, etanol y acetonitrilo. Su administración puede ser intravenosa, oral o inhalada. Esta última vía de desarrollo clínico presenta resultados preliminares muy favorables que no se han llegado a confirmar^{58, 112, 113}. En la presentación oral tras la administración de la cápsula de gelatina

hay una fase de absorción, lenta y errática, durante la cual se alcanza un pico de concentración máxima (C_{max}), que corresponde con el tiempo de máxima inhibición de la calcineurina a nivel sistémico^{114, 115}. La absorción de la CsA está afectada por la necesidad de solubilizar la CsA en la bilis, también como por la presencia o ausencia de la comida, el momento de la administración durante el día, la raza, el sexo, el índice de masa corporal, la edad, la enfermedad de base, la concentración de lipoproteínas, la concentración de albúmina, el hematocrito, la función renal, el tránsito gastrointestinal, la neuropatía autonómica gastrointestinal y la medicación concomitante, con lo que estos factores pueden afectar a la exposición total del fármaco hasta en un 60%. La formulación oral inicial de la CsA (Sandimmun®), comercializada por Sandoz, tiene una base oleosa y una amplia biovariabilidad interindividual e intraindividual con un rango entre el 1 y el 89%^{115, 116} de la exposición real del fármaco, siendo su valor medio del 30%. Esta variabilidad de la farmacocinética (FC) se mejora a mediados de 1990 con la formulación Neoral de la CsA (Sandimmun Neoral®). Se trata de una microemulsión de CsA que mejora la absorción y reduce la biovariabilidad oral¹¹⁷. La CsA Neoral®, comercializada por Novartis, asegura la liberación rápida de la CsA dentro del tracto gastrointestinal y una presentación más uniforme a la superficie absorptiva del intestino delgado. Esto produce una dispersión del fármaco en el tubo digestivo ya que la microemulsión forma unas micromicelas que facilitan su absorción, con menor dependencia de la bilis¹¹⁸, e interacciona menos con las comidas. La absorción más rápida de la CsA Neoral se pone de manifiesto en el estudio de Mueller et al.¹¹⁹, en voluntarios sanos, en los que el tiempo necesario para alcanzar la C_{max} , (T_{max}), es de 1,5 a 2,1 horas frente a 2,1-2,4 horas con la formulación clásica. Además, la C_{max} y el área bajo la curva (AUC) aumentan del 70 al 135% en pacientes sanos que se tratan con CsA Neoral. En otro estudio¹²⁰ realizado en voluntarios sanos los parámetros farmacocinéticos de la CsA Neoral manifiestan su menor variabilidad intraindividual e interindividual frente a la CsA clásica (3-22% frente al 20-34%, respectivamente). Estos datos también se evidencian en pacientes trasplantados. Así, en pacientes con trasplante renal los parámetros farmacocinéticos de la CsA en microemulsión presentan una menor variabilidad (3-22% frente al 19-45%) y una mejor correlación de la concentración predosis o nivel valle (C_{min} , C_0) y el AUC^{121, 122}, que la formulación clásica. En trasplante hepático también se evidencia que la absorción de la CsA Neoral presenta una biodisponibilidad media un 156% mayor que la convencional^{118, 123, 124}. En un estudio de 50 pacientes con TP *de novo*¹²⁵, con y sin FQ, las concentraciones

del AUC de la CsA Neoral a las 2 y a las 6 horas son significativamente superiores ($p < 0,001$) y se reduce la variabilidad intraindividual e interindividual.

Tras la administración intravenosa, el volumen de distribución es de 3 a 5 L/kg en pacientes receptores de TOS. La distribución de la CsA es extensa en los fluidos corporales y los tejidos, la mayoría del fármaco se distribuye fuera del torrente sanguíneo. El compuesto original se deposita en el tejido adiposo y los metabolitos en timo, bazo, hígado, páncreas, riñones, glándulas suprarrenales, pulmón, piel, médula y ganglios linfáticos. En el torrente sanguíneo, la CsA se distribuye en el plasma en un 33-47%, un 4-9% en los linfocitos, un 5-12% en los granulocitos y el 41-58% en los eritrocitos. La distribución entre la sangre y el plasma es dependiente de la temperatura, la concentración del fármaco, el hematocrito y las lipoproteínas plasmáticas. La CsA es un profármaco que necesita interactuar con las ciclofilinas que son unas proteínas citoplasmáticas a las que se une en un 90% y sólo existe un 2% de fracción libre. El complejo heterodímero formado por la CsA y la ciclofilina inhibe la actividad de la calcineurina que es una enzima clave de la activación de los linfocitos T y un importante regulador del factor nuclear de las células T activadas (NFAT). Este mecanismo de acción de la CsA permite el bloqueo de la activación de los linfocitos T, en fase de reposo (G0) y en fase de activación (G1), mediante la inhibición de la síntesis de la IL-2. Esta acción la realiza al inhibir la desfosforilación del NFAT que impide su translocación al nucléolo donde transcribe el ARN mensajero necesario para sintetizar citoquinas como la IL-2 y el IFN- γ , mediadas fundamentalmente para ampliar la respuesta de rechazo del injerto (figura 2).

La mayor parte del metabolismo se realiza a través del sistema del citocromo P450 3A a nivel hepático, por oxidación, pero también se metabolizada a nivel intestinal por el citocromo P450 3A4¹²⁶ y por la glicoproteína P en la mucosa intestinal¹¹⁵. Esto contribuye a la variabilidad y a la posibilidad de inducción por otros fármacos. Posteriormente se generan unos 30 metabolitos que presentan de un 10 a un 20% de la actividad inmunosupresora del fármaco. Los metabolitos de la CsA se encuentran en la bilis, en las heces, en la sangre y en la orina. La mayor parte de la excreción de la CsA, el 90%, es biliar y sólo un 6% se elimina a través de la orina, con un 0,1% de fármaco no metabolizado. Los datos sobre la vida media de eliminación de la CsA muestran una gran variabilidad según el ensayo utilizado y la población examinada. En adultos con una buena función renal y hepática, la vida media de eliminación inicial es de 1,2 horas y la vida

media de eliminación final de 8,4 a 27 horas¹¹⁵. El aclaramiento sanguíneo es del 0,3 al 0,4 L/h/kg en trasplante renal y hepático, pero es levemente inferior tras el trasplante cardíaco. Ni la hemodiálisis ni la insuficiencia renal afectan al aclaramiento de la CsA.

Figura 2: Mecanismo de acción de los IC.

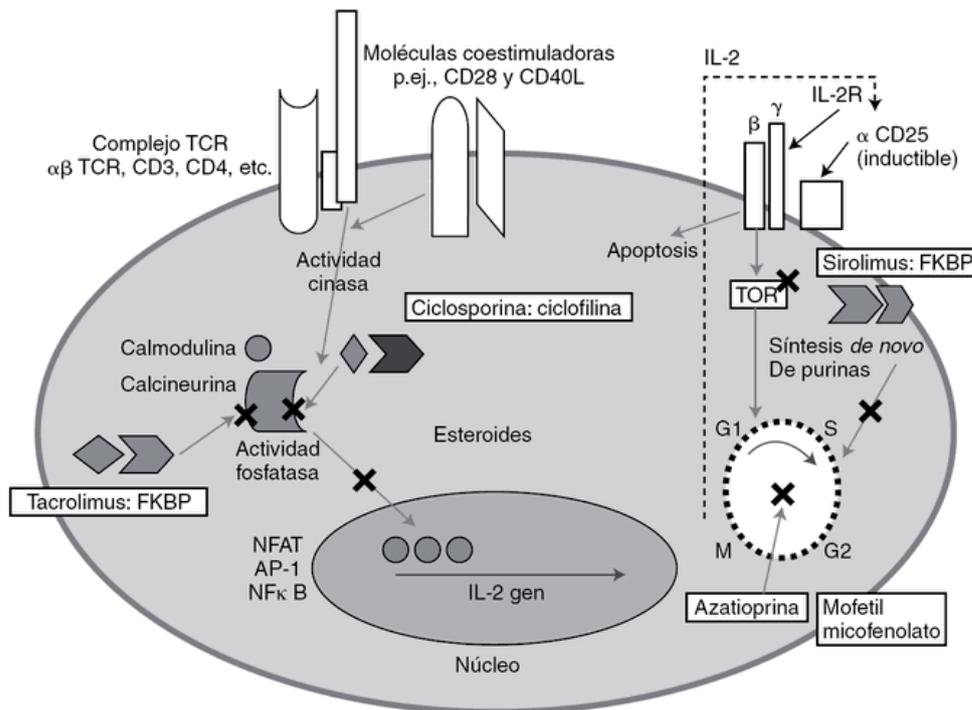


Figura adaptada de Martín-Dávila P et al.¹²⁷

El periodo de exposición completo del fármaco desde la administración de una dosis hasta la próxima es el AUC¹¹⁵. La determinación del AUC se realiza a través de determinaciones seriadas de muestras de sangre que conforman una curva FC. Desde el inicio de la FC se han desarrollado otras técnicas de individualización posológica como son los nomogramas¹²⁸ y los algoritmos bayesianos¹²⁹. No obstante, la aproximación más robusta de las propuestas es la basada en la estimación del AUC¹³⁰ ya que es el parámetro farmacocinético que mejor se correlaciona con el efecto que produce el fármaco. Sin embargo, el número de muestras de sangre necesarias para llevar a cabo esta estrategia de individualización posológica dificulta su aplicación en la práctica clínica ya que es poco práctico y costoso. A partir de aquí, una estrategia de muestreo limitado parece una buena opción para obtener información. Por ello, durante años se desarrollan estrategias de muestreo limitado como valores subordinados del valor del AUC. El objetivo del muestreo

es definir el mejor punto o la combinación de puntos que representan la mejor correlación posible con el AUC. La utilidad de determinar las concentraciones o niveles sanguíneos de los IC se basa en el hecho de que el efecto farmacológico está muy relacionado con las concentraciones del fármaco en su lugar de acción y éstas dependen más de las concentraciones en sangre que de las dosis administradas. Además, la elevada variabilidad interindividual e intraindividual de los pacientes tratados con CsA también podría justificar la necesidad de monitorizar el AUC en algunos pacientes.

Durante dos décadas, el punto considerado con mayor correlación con el AUC fue C_0 y ésta fue la estrategia elegida por la mayoría de los centros. En la reunión internacional sobre la monitorización de la CsA en trasplante renal, celebrada en 1995, se llegó al acuerdo de monitorizar a través de C_0 . Se realizaba una extracción dentro de la hora anterior a la dosis matinal para evitar el ritmo circadiano de metabolización que, en general, era menor durante la noche. La monitorización de la CsA se efectuaba una vez cada 24 o 48 horas en el postrasplante inmediato y se espaciaba progresivamente en función del tiempo postrasplante y de la evolución del paciente. Posteriormente, Dumont et al¹³¹ revisaron el método usado para la monitorización clínica de la CsA e indicaron la C_0 como el método utilizado de modo estándar en la mayoría de los centros a pesar de que no indicaba la exposición completa del fármaco. En varios estudios se observó que los niveles de la CsA predosis se correlacionaban peor de lo inicialmente visto con la exposición sistémica del fármaco y con los resultados clínicos^{132, 133}. Se buscaba un método más eficaz para optimizar la inmunosupresión ya que la C_0 no optimizaba el beneficio clínico de la CsA Neoral. Varios estudios^{134, 135} evidenciaron que en la fase de absorción de la CsA Neoral se centraba la fase de mayor variabilidad FC. Por otro lado, Sindhi et al¹³⁶ evidenciaron que la inhibición de la calcineurina y la supresión de la IL-2 eran máximas y más consistentes a las 2 horas de administrar la dosis. Además, eso se correlacionaba con la concentración de CsA *in vivo*.

Así, se empleó un método de monitorización que medía la concentración de la CsA Neoral durante la fase de absorción de 0 a 4h para optimizar la inmunosupresión conseguida por el fármaco. Este método aumentaba en gran medida la monitorización conseguida con los niveles C_0 , permitía establecer los valores recomendados como objetivo y tenía una aplicación clínica y práctica. La validación de esta monitorización, basada en el perfil de absorción de la CsA Neoral, se realizó a través de un estudio retrospectivo y otro prospectivo. El estudio retrospectivo¹³⁷ realizado en 156 pacientes con trasplante renal y

triple inmunosupresión ajustada con C_0 , evidenció que la C_0 era un mal predictor del RA. El valor medio obtenido con C_0 para pacientes con RA era igual que los que no lo presentaban. Además, el AUC entre 4400 y 5500 ng.h/ml se asociaba a una menor incidencia de RA y cuando se alcanzaba este objetivo antes de los primeros 5 días postrasplante los niveles de la creatinina sérica, a los 6 meses, eran más bajos. El mismo autor realizó un estudio prospectivo¹³⁸ en 98 pacientes con trasplante renal *de novo* y triple inmunosupresión basada en CsA Neoral y los monitorizó con $AUC_{0-4\text{ h}}$. Utilizaban el rango del AUC de 4.400-5.500 ng.h/L como rango objetivo y evidenciaron que existía una alta correlación entre el RA y el rango del AUC durante los primeros días. También objetivaron que ese rango se relacionaba con unos niveles de creatinina más bajos a los 6 meses del trasplante. Aunque ambos estudios concluyeron que el $AUC_{0-4\text{ h}}$ era más eficaz en la monitorización que la C_0 , como factor predictor de una monitorización óptima, se intentaba simplificar la metodología. El hecho de que aparecieran episodios de RA en el postoperatorio inmediato, cuando era uno de los objetivos primordiales de los protocolos de inmunosupresión, y la dificultad de realizar el AUC hizo que se buscara la posibilidad de otra medida simplificada que se relacionara mejor con la clínica. Se creía que la mala correlación clínica con C_0 ¹³⁷ podía deberse al complejo perfil de absorción de la CsA. La máxima absorción de CsA normalmente ocurría dentro de las dos horas siguientes a la administración oral, lo que causaba un rápido pico de concentración de CsA en sangre y un descenso paulatino. Además, existía una gran variabilidad de un paciente a otro dependiendo del grado de absorción gastrointestinal individual que en el postoperatorio podía estar muy alterado por la existencia de edema intestinal, íleo paralítico o por la cantidad de flujo biliar. En la evolución posterior, durante la etapa de mantenimiento, la exposición inadecuada del fármaco podría contribuir al desarrollo de DCI, contribuyendo a la morbimortalidad del paciente trasplantado y limitando la supervivencia.

Los estudios farmacocinéticos efectuados fundamentalmente por grupos canadienses a finales de los años noventa, tratando de optimizar el uso de la CsA, pusieron de manifiesto que los niveles C_0 no guardaban correlación con el $AUC_{0-12\text{ h}}$, ni con su expresión simplificada $AUC_{0-4\text{ h}}$, ni predecían el riesgo de RA^{137, 139}. Otros estudios¹⁴⁰⁻¹⁴² y revisiones¹⁴³ en TOS han propuesto los niveles de CsA a las 2 horas de la administración de la dosis (C_2) como la herramienta más fiable para monitorizar el tratamiento con CsA ya que presenta una mejor correlación con el $ABC_{0-4\text{ h}}$ ¹⁴⁰⁻¹⁴². Los estudios realizados en

pacientes con TP también indicaron que la C_2 se correlacionaba mejor que C_0 con el ABC_{0-4h} ¹⁴⁴ y que podía reducir la nefrotoxicidad asociada con la CsA sin comprometer la función pulmonar¹⁴⁵. Knoop et al.¹⁴⁶ analizaron un grupo de 10 pacientes con TP por FQ y 10 pacientes con TP sin FQ a través de curvas FCs. Evidenciaron que los pacientes trasplantados sin FQ presentaban menos biovariabilidad de CsA y que los pacientes trasplantados por FQ presentaban gran variabilidad de la C_{max} , la C_2 y el AUC. Los datos obtenidos en los estudios^{146, 147} sobre la utilidad de la C_2 en el postrasplante pulmonar en fase estable, que han analizado la variabilidad intraindividual e interindividual del AUC, eran similares a los de otros trasplantes de órgano sólido. Estos estudios apoyaban una estrategia de muestreo limitado, a través de la C_2 , que permitía obtener la información más ajustada a la biodisponibilidad real del paciente en la práctica clínica diaria.

Lindholm et al.¹³⁴ demostraron que la biodisponibilidad de la CsA era uno de los factores farmacocinéticos determinantes tanto de la incidencia del RA como de la supervivencia del injerto tras el trasplante renal. La incidencia de pacientes libres de rechazo y la supervivencia del injerto a un año aumentaba significativamente cuando la biodisponibilidad era superior al 25%. Otros estudios corroboraron estos datos e identificaron los valores bajos del AUC y del promedio de la concentración de CsA (C_{av}) como los predictores más sensibles de la aparición de RA y pérdida del injerto a un año.

Sin embargo, este refinamiento en la monitorización ha llegado en una fase tardía del uso de la CsA. Es por ello, que muchos estudios y ensayos clínicos se realizaron en la época en la que la monitorización de la CsA se realizaba con C_0 . Este hecho pone en cuestión los resultados de los estudios *a posteriori* y, fundamentalmente, las comparaciones realizadas entre CsA y TAC. La monitorización del fármaco con los niveles sanguíneos es uno de los principales problemas para conseguir la inmunosupresión eficaz y los efectos secundarios son unos de los factores de morbimortalidad a largo plazo.

La eficacia de la inmunosupresión depende de múltiples factores farmacocinéticos y todos estos factores evidencian que una misma dosis de fármaco puede tener efectos variables en distintos pacientes. En los IC es más frecuente que la variabilidad interindividual e intraindividual ocurra en la fase de absorción que en la fase de eliminación. Ambos IC tienen una ventana terapéutica estrecha, lo que significa que precisan monitorización del fármaco. Las dosis bajas del fármaco en sangre se asocian con un aumento del riesgo de rechazo mientras que la sobredosis del fármaco se asocia a toxicidad y a un mayor riesgo de infecciones^{148,149}. La relación que se establece entre los niveles de un fármaco y sus

efectos terapéuticos o tóxicos se puede explicar con una curva sigmoidea. A partir de un nivel comienzan a observarse los efectos y aumentando los niveles aumentamos los efectos hasta alcanzar un límite por encima del cual no se consigue mayor eficacia. El intervalo terapéutico es el intervalo de niveles de un fármaco en el que la mayor parte de los pacientes tiene una buena respuesta sin toxicidad.

Los efectos adversos más frecuentes de la CsA incluyen la nefrotoxicidad, la HTA, la neurotoxicidad y la dislipemia. Otros efectos adversos incluyen hirsutismo, hiperglucemia, alteraciones gastrointestinales e hiperplasia gingival, que se resumen en la Tabla 1.

La principal limitación del tratamiento con CsA es la nefrotoxicidad que se produce de tres maneras. Una es la forma aguda que es reversible, otra es la forma crónica progresiva y la tercera es la microangiopatía trombótica que es infrecuente^{150, 151}. La disfunción renal aguda es dosis dependiente y normalmente responde a la reducción o suspensión de dosis. La disfunción está causada por vasoconstricción a nivel de la arteriola aferente que provoca la disminución del filtrado glomerular. La nefropatía crónica normalmente aparece durante los primeros 6 meses después del trasplante y suele ser irreversible.

1.4.b Tacrolimus

El TAC es un producto de la fermentación de un actinomiceto, el *Streptomyces tsukubaensis*, y tiene una estructura de macrólido. Su nombre hace referencia al nombre de la localidad de Tsukuba, a 100 km de Tokio, donde fue descubierto en 1984. Se introdujo en la clínica en la década de 1990 y ahora es ampliamente aceptado como una alternativa a la CsA²³ en TOS. El TAC contiene una molécula de agua cristalizada y es prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol y muy soluble en metanol. Los mecanismos de acción y la toxicidad del TAC y la CsA son bastante similares.

La administración del TAC puede ser intravenosa, oral o sublingual. La administración intravenosa se considera de elevada toxicidad renal y no se utiliza frecuentemente. La administración sublingual de las cápsulas de TAC es una opción en los pacientes que no toleran el tratamiento por vía oral y en los que se evita la vía endovenosa por su toxicidad¹⁵².

Durante años se utilizó el fármaco estándar, Prograf® (TAC BID), que se administra dos veces al día y que debe tomarse 1 hora antes o al menos 2 o 3 horas después de la comida. Recientemente, se ha comercializado el TAC de liberación prolongada, Advagraf® (TAC

QD), con una pauta de administración de una vez al día. El TAC QD facilita el cumplimiento del tratamiento y es más cómodo para los pacientes. La presentación oral del TAC QD tiene un perfil de absorción prolongado. El TAC BID se absorbe de modo rápido e incompleto en el tracto gastrointestinal y la concentración máxima se alcanza en las 3 primeras horas tras la dosis. La absorción se realiza en el tracto gastrointestinal, en particular en el yeyuno y en el duodeno. También se evidencia una marcada variabilidad intrapaciente e interpaciente en la absorción. La absorción no depende de la bilis pero depende del tránsito gastrointestinal y está afectada por la presencia o ausencia de comida y también por el contenido lipídico de la misma¹⁵³. Además de la edad, el sexo, la raza, el índice de masa corporal, la albúmina sérica, el hematocrito y la presencia de hepatitis B o C u otras enfermedades hepáticas también influyen en la dosis diaria requerida^{154, 155}. Cuando se analiza la variación de la absorción en relación con el ritmo circadiano se evidencia una absorción significativamente mayor por la mañana^{156, 157}.

El TAC se une fuertemente a los eritrocitos con una relación de 20:1 en las concentraciones de TAC en sangre completa vs plasma. Posteriormente se divide y se distribuye en el pulmón, bazo, corazón, riñones y páncreas. La biodisponibilidad del TAC es pobre con una media de 25% (r: 4-93%) y esta baja biodisponibilidad se explica por la incompleta absorción y/o el metabolismo del fármaco¹⁵⁸. También es un profármaco que precisa unirse a su inmunofilina, la proteína de unión del TAC (FKBP12), para activarse y presenta 50 veces más potencia que la CsA *in vitro*. Esto lo podría explicar la fuerte afinidad que presenta el TAC por su FKBP12. La mayor parte del metabolismo se realiza en el hígado, a través del citocromo P-450, y en la pared intestinal también se metaboliza un porcentaje considerable del fármaco, a través de la glicoproteína-P. Se obtienen al menos 15 metabolitos y sólo uno de ellos ha demostrado cierta actividad inmunosupresora *in vitro* similar al TAC. Por lo tanto, los metabolitos no contribuyen a la actividad farmacológica del TAC. Dado que es el mismo fármaco activo el que se libera del TAC BID y del TAC QD, se esperaría que la mayoría de las covariables que afectan a la FC de una formulación también influyan en la otra. Entre el 80 y el 95% del TAC se elimina a través de la bilis con menos de un 1% de fármaco no metabolizado en heces y orina. La vida media de eliminación del TAC es de 12 a 19 horas en pacientes con trasplante renal y hepático y de 35 horas en voluntarios sanos. El aclaramiento sanguíneo del TAC es lento. En voluntarios sanos fue 2,25 L/h y el promedio de la vida media de 43 horas. En

trasplante renal, hepático y cardíaco adulto se observan tasas de aclaramiento 6,7 L/h, 4,1 L/h y 3,9 L/h, respectivamente.

En la mayoría de los ensayos clínicos¹⁵⁹⁻¹⁶¹, se observa una buena correlación entre los resultados clínicos y la C_0 del TAC. Por ello, la C_0 es la estrategia de monitorización habitual del TAC en la clínica. Sin embargo, se sabe que la biodisponibilidad puede variar de forma importante entre los pacientes. De hecho varios estudios observan que la correlación entre C_0 y el AUC es muy variable¹⁶² y, además, hay algunos estudios que proponen niveles de concentraciones distintas de C_0 ^{163, 164}, la combinación de dos concentraciones entre las 0 y las 4 horas¹⁶⁵ o la combinación de C_2 y C_4 ¹⁶⁶ como buenos parámetros en la correlación con el AUC. Por ello son necesarios estudios que determinen los niveles que mejorarían los resultados en pacientes tratados con TAC.

Debido a la complejidad de las pautas terapéuticas, los pacientes trasplantados son particularmente propensos a la falta de adherencia. En los pacientes con TOS se ha descrito una tasa de no adherencia al tratamiento que oscila entre el 5% y el 68%¹⁶⁷, aumentando así unas siete veces el riesgo del rechazo al injerto. Se han estudiado los factores que pueden ocasionar la falta de adherencia, siendo los principales la frecuencia de administración y el número de fármacos. Por ello, el diseño de fármacos que se administran en una única dosis al día puede mejorar la adherencia al tratamiento y evitar el fracaso terapéutico del inmunosupresor. La comercialización de TAC QD está preparada para solucionar este problema.

Se han realizado estudios de bioequivalencia entre TAC QD y TAC BID mediante el $AUC_{0-24\text{ h}}$ y las C_0 . En un ensayo de fase I con voluntarios sanos se ha demostrado que TAC QD se asocia a un perfil de seguridad comparable a TAC BID, ya que tienen $AUC_{0-24\text{ h}}$ similares definidas por una bioequivalencia entre el 80% y el 125% (recomendación de la *Food and Drug Administration*), y presentan una buena relación entre $AUC_{0-24\text{ h}}$ y C_0 en ambas formulaciones¹⁶⁸. Sin embargo, los pacientes con trasplante renal, hepático y cardíaco estable realizan conversiones de TAC BID a TAC QD con equivalencias variables, tal y como describiré en el apartado 4.2 de la discusión.

Tabla 1: Características y efectos secundarios de los IC.

Características	CsA Neoral	TAC BID
Estructura	Péptido cíclico lipofílico	Macrólido
Proteínas de unión	Ciclofilina	FKBP12
Enzima diana	Calcineurina	Calcineurina
Unión en plasma	Lipoproteínas	Proteínas
C _{máx} (ng/ml)	721a, 493b, no se registra en c	24.2a ^x , 68.5b ^x , 17c ^x , 29.7d
AUC _{0-12h} (ng. h/ml)	3525 a, 2851 b, 4231 c	288a ^x , 519b ^x , 232 c ^x , 243d,
Absorción	Intestino delgado, Depende poco de la bilis	Intestino delgado, Independiente de la bilis
Metabolismo	Hepático, Intestinal	Hepático, Intestinal
Metabolitos	30	15
Excreción	>90% biliar	>80% biliar
T 1/2 eliminación (h)	19	12
Efectos adversos		
Nefrotoxicidad	++++	++++
Hiperglucemia	+++	++++
HTA	++++	+++
Dislipemia	++++	+++
Temblor, cefalea	++++	++++
Hiperuricemia	+++	+++
Gastrointestinales: diarrea, nauseas	+++	++++
Hirsutismo	++	+
Hiperplasia gingival	++	+
Prurito	+	++
Alopecia	-	+
Insomnio	-	++

a¹⁶⁹ 35 receptores trasplante renal , a^{x8} 26 receptores trasplantes renales, b¹⁷⁰ 39 receptores de trasplantes hepáticos, b^{x8} 17 receptores de trasplantes hepáticos, c¹¹⁵ receptores de TCP o TP, c^{x171} receptor de TC, d⁸ 16 receptores voluntarios sanos,

++++: muy frecuente, +++: frecuente, ++ poco frecuente, + raro, - no lo presenta

Los efectos secundarios del TAC incluyen nefrotoxicidad, diabetes, neurotoxicidad, alteraciones gastrointestinales e HTA. Muchos de estos efectos secundarios se producen por la inhibición de la calcineurina por lo que también se asocian a la CsA. Aunque si los comparamos vemos que el TAC produce más diarrea y alteraciones de la glucemia. Sin embargo, presenta menos efectos aterogénicos y menos HTA. Por otro lado, produce de forma muy rara hirsutismo e hipertrofia gingival pero causa más prurito, tal y como se registra en la tabla 1.

El TAC ha demostrado ser al menos tan eficaz como la CsA en el TOS, incluyendo el TP^{11, 172-175}. Se utiliza para la prevención del rechazo del aloinjerto en trasplante de riñón, hígado, corazón, intestino, páncreas y pulmón⁸. Además es un agente de rescate eficaz en el RA recurrente o refractario¹⁷⁶. Los protocolos actuales pueden prevenir o revertir la mayoría de los episodios de RA. Sin embargo, aunque se pueda limitar el RA, el injerto puede verse sometido a un rechazo más lento que se manifiesta desde meses hasta años después. La aparición de episodios de RA aumenta la probabilidad de que se desarrolle una futura DCI¹⁷⁷.

En conclusión, los IC se caracterizan por una alta variabilidad FC intraindividual, biodisponibilidad dependiente de la formulación, estrecho margen terapéutico, necesidad de control de la dosificación y graves consecuencias clínicas dependientes del exceso o déficit. Estas características los convierten en fármacos de difícil manejo y, pese a ello, han contribuido de forma fundamental para lograr los resultados actuales en los trasplantes de órganos sólidos.

1.5 Estudios comparativos de los inhibidores de la calcineurina en el TP.

Una pregunta relevante es cuál es el mejor IC para los pacientes portadores de TP. En este sentido se han realizado algunos estudios, pocos de ellos son multicéntricos.

El estudio unicéntrico más antiguo que comparó los IC lo publicó Griffith en 1994 con los resultados iniciales de 74 TPs y su seguimiento a 1 y 2 años lo presentó Keenan et al.¹¹. En este ensayo clínico realizado en un único centro, 133 TPs fueron aleatorizados a CsA y TAC con AZA y corticoesteroides. No se observaron diferencias en la incidencia de RA por paciente. Además, el 33 % se convirtieron de CsA a TAC por RA o BOS y sólo 9 se convirtieron de TAC a CsA ($p < 0,05$). También se observó que a los 2 años la incidencia de

BOS fue del 21,7% en los pacientes con TAC *vs* el 38% de los pacientes con CsA, ($p < 0,05$), con un tiempo desde el TP al diagnóstico de BOS mayor en el grupo tratado con TAC. La supervivencia al año y a los 2 años fue similar y a los 7 años mayor en el grupo tratado con TAC (50% *vs* 39%). Poco después se publicaron los primeros resultados de estudios que evidenciaban la disminución de BOS tras la conversión de CsA a TAC. En este sentido, Kesten et al¹⁷⁸ sustituyeron CsA por TAC en 12 TP con BOS y observaron que la velocidad de descenso del volumen de espiración forzada durante el primer segundo (FEV1) disminuyó del 5,3% mensual al 1,1% ($p < 0,001$). Un estudio retrospectivo^{179, 180} realizado también en un único centro comparó en 78 pacientes tres pautas: CsA con AZA (34 pacientes), TAC con AZA (30 pacientes) y TAC con MMF (12 pacientes), todos los pacientes estaban tratados con corticoesteroides. La incidencia de RA fue menor en el grupo TAC-AZA y en el de TAC-MMF que en el de CsA-AZA y la ausencia de RA fue menor en el grupo tratado con TAC-MMF (TAC-MMF *vs* CsA-AZA, $p = 0,0007$; TAC-MMF *vs* TAC-AZA $p = 0,0037$). La supervivencia a uno y 3 años fue del 70% y 51% en el grupo de la CsA-AZA *vs* del 93% y 71% en el grupo de TAC-AZA, respectivamente ($p = 0,044$). Posteriormente fue publicado otro estudio multicéntrico¹⁸¹ que realizaba conversión de CsA a TAC en 328 pacientes por RA refractario, pre-BOS, BOS o efectos adversos de CsA. Evidenciaron que en los pacientes tratados con TAC disminuyeron los RA refractarios, también el RA en pacientes con BOS grado 1-3 y disminuyó o se detuvo el descenso del FEV1 durante los primeros 6 meses tras el tratamiento. En 2002 un estudio retrospectivo¹⁸² mostró que el rescate con TAC y MMF en 12 pacientes con TP y BOS conseguía la estabilidad o la mejoría del FEV1 en 9 pacientes. En ese mismo año, otro estudio retrospectivo¹⁸³ de 328 pacientes presentó una reducción histológica ($p < 0,01$) y clínica ($p < 0,05$) de episodios de rechazo en pacientes convertidos de CsA a TAC por RA recurrente o rechazo crónico. En Europa se realizó un ensayo clínico¹⁷⁴ en dos centros que compararon CsA-MMF en 24 pacientes *vs* TAC-MMF en 26 pacientes, ambos con corticoesteroides y tratamiento citolítico de inducción. El estudio observó que tenían una supervivencia similar a los 6 meses y al año pero el número de episodios de RA tratados fue significativamente menor en el grupo tratado con TAC (0,225 *vs* 0,426, $p < 0,05$). La incidencia de RA y de infecciones era similar en los dos grupos. Se amplió el estudio a 74 pacientes¹⁷² y los resultados obtenidos fueron similares. Los resultados no evidenciaban diferencias significativas en los pacientes tratados por RA en ambos grupos pero sí una mayor incidencia de HTA en el grupo de CsA y nuevos casos de DM en el grupo de TAC.

En el ensayo clínico de Zuckermann et al.¹⁸⁴ observaron que los pacientes tratados con CsA presentaron una incidencia de BOS del 41% y los tratados con TAC del 10% ($p < 0,01$). Otro ensayo clínico unicéntrico¹⁷³ aleatorizó a 44 pacientes con TAC y 46 con CsA. El objetivo principal del estudio era valorar el RA severo, la bronquitis linfocitaria y el diagnóstico de BOS. El estudio sugirió que el TAC disminuía los episodios de RA severo, disminuía la bronquitis linfocitaria y el diagnóstico de BOS. Otro estudio español¹⁸⁵ de 79 pacientes con TP y BOS evidenciaba que la conversión de CsA a TAC mejoraba la pérdida de FEV1 ($p = 0,005$). En 2009 se publicó un metanálisis¹⁷⁵ que incluía tres ensayos clínicos^{11, 172, 173} con 297 pacientes. Se concluyó que los pacientes tratados con TAC presentaron menos episodios de RA ($p < 0,05$) y se observó una clara tendencia a la disminución del riesgo de BOS en pacientes tratados con TAC. Entre los efectos secundarios se observó una mayor incidencia de DM en los pacientes tratados con TAC y una incidencia similar de HTA y disfunción renal en ambos grupos. En los pacientes tratados con TAC también se observó una tendencia a una menor incidencia de tumores y en la necesidad de suspender el tratamiento, aunque la mortalidad fue similar en ambos grupos.

El estudio más importante realizado sobre este tema fue publicado por Treede et al.¹⁸⁶ en 2012. En este estudio internacional, multicéntrico, randomizado y abierto se comparó la inmunosupresión *de novo* con TAC-MMF-corticoesteroides frente a CsA-MMF-corticoesteroides, sin tratamiento de inducción, en 249 pacientes. El objetivo principal del estudio fue valorar la incidencia de BOS a los 3 años del trasplante. Los objetivos secundarios eran la supervivencia, la incidencia de RA, las infecciones y otros efectos adversos. En el grupo del TAC se evidenciaba BOS (11,6% vs 21,3%) y una supervivencia similar (78,7% con TAC vs 82,8% con CsA). La incidencia de RA también fue similar (67,4% en el grupo de TAC vs 74,9% en el grupo de CsA). Así mismo, la incidencia de infecciones también fue parecida. Se observó más DM y más disfunción renal en el grupo de TAC.

Finalmente, en 2013 se publicó una revisión de la Cochrane¹⁸⁷ que analizó 413 TP, incluyó 3 de los ensayos clínicos^{172, 173, 186} comentados, y concluyó que el TAC podía ser superior a la CsA en la BOS, en la bronquiolitis linfocítica, en la necesidad de retirar tratamiento a largo plazo y la HTA, pero presentó una mayor incidencia de DM postrasplante. No hubo diferencias entre los fármacos cuando se analizó el RA y la mortalidad.

En definitiva, en la inmunosupresión del TP el TAC presenta una cierta superioridad sobre la CsA y esto se evidencia por el mayor empleo de este IC en la actualidad. Sin embargo, lo importante es individualizar la pauta inmunosupresora en función de los efectos adversos que presente el paciente. La mejora de la eficacia y la seguridad de estos inmunosupresores radican en gran medida en una correcta dosificación. Y la dosificación está relacionada con las estrategias de muestreo limitado que mejor se correlacionan con el AUC. Por último, la adhesión al tratamiento es también clave. Así, la aparición de formulaciones de TAC, que pueden administrarse una vez al día, presentan evidentes ventajas pero precisan confirmar su bioequivalencia con la formulación de dos veces al día en el TP.

OBJETIVOS

2. Objetivos.

El objetivo de esta tesis fue estudiar dos aspectos poco conocidos de la FC de los dos IC utilizados en el TP. Por un lado en el primer artículo, "High intra-individual variability of Cyclosporine pharmacokinetics in lung transplant recipients without cystic fibrosis", el objetivo fue determinar la variabilidad intraindividual de la FC de la CsA en pacientes con TP e investigar su implicación en la monitorización de la CsA.

Por otro lado en el segundo artículo, "Pharmacokinetic Study of Conversion from Tacrolimus Twice-Daily to Tacrolimus Once-Daily in Stable Lung Transplantation", el objetivo fue evaluar y comparar la FC del TAC BID y TAC QD en pacientes con TP estable y ver su eficacia y seguridad a los 6 meses.

RESULTADOS

3. Resultados.

3.1 Artículo 1.

En el artículo “High intra-individual variability of Cyclosporine pharmacokinetics in lung transplant recipients without cystic fibrosis” se estudiaron diez pacientes consecutivos que habían sido sometidos a TP durante el periodo de Julio de 2004 a 2006. Incluimos a pacientes con TP, sin fibrosis quística, tratados con una dosis estable de CsA y con un seguimiento postrasplante superior a 180 días. Se realizaron 3 curvas FCs en todos los pacientes salvo en uno en el que se realizaron 2 curvas FCs. Se calcularon las correlaciones entre las concentraciones de CsA con el AUC_{0-4h} , el AUC_{0-12h} y el coeficiente de variación (CV) intraindividual. En función del $CV < 20\%$ o $\geq 20\%$ se dividían a los pacientes en 2 grupos y se analizaba la supervivencia a los 5 años en ambos grupos. Un grupo de 6 pacientes presentaban un CV bajo, $< 20\%$, y los otros 4 tenían un CV alto. La media del CV era de 7,7% (rango: 3,1-14,3%) en pacientes con CV bajo y de 24,8% (rango: 20,8-28,6%) en los que presentaban un CV alto. Los valores del ABC_{0-12h} y la C_{max} eran mayores en pacientes con alto CV que en el grupo con CV bajo (5535 vs. 3575, $p = 0.002$, y 1490 vs. 946, $p = 0.100$, respectivamente).

Las mejores correlaciones con el AUC_{0-4h} eran con C_1 ($r = 0.836$, $p = 0.000$) y C_2 ($r = 0.810$, $p = 0.000$) cuando analizamos a todos los pacientes globalmente y por separado (tabla 2 del artículo). Cuando analizamos el AUC_{0-12h} en los pacientes con CV bajo la mejor correlación seguía siendo con C_2 ($r = 0.674$, $p = 0.002$), sin embargo esto no ocurría en pacientes con CV alto. En estos pacientes con CV alto, la mejor correlación era con C_5 ($r = 0.800$, $p = 0.003$) mientras que la correlación con C_2 era baja ($r = 0.327$, $p = 0.32$). Además también observamos que en estos pacientes con CV alta la correlación con C_0 era buena ($r = 0.709$, $p < 0.05$) (Tabla 3 del artículo).

La supervivencia a los 5 años de seguimiento era 2 de 4 (50.0%) en el grupo con CV alto y 6 de 6 en el grupo con CV bajo ($p = 0.06$). En el grupo de pacientes con un CV bajo sólo un paciente presentó neumonitis por CMV, en todos los pacientes se evidencia insuficiencia renal y 2 de ellos presentaron RA con posterior DCI, pero no fallecieron durante los 5 años de seguimiento. En el grupo con CV alto 2 pacientes presentaron infección por CMV y neumonitis por CMV. Tres de 4 pacientes presentaron RA con DCI posterior y fallecieron 2 de los 4 pacientes. Un paciente falleció por DCI y otro por disfunción renal.

Los datos clínicos y los resultados a los 5 años de seguimiento se resumen en las tablas 4 y 5 del artículo.

3.2 Artículo 2.

En el segundo artículo “Pharmacokinetic Study of Conversion from Tacrolimus Twice-Daily to Tacrolimus Once-Daily in Stable Lung Transplantation” se analizaron 19 pacientes con TPs estables, sin FQ, en los que se realizaron 2 curvas FCs pre y postconversión de TAC BID a TAC QD. La media (desviación estándar) del AUC_{0-24h} fue 279.8 (57.7) ng mL/hr en TAC BID y 278.7 (52.5) ng mL/hr en TAC QD ($p=0.92$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el TAC BID y TAC QD cuando se analizó la $C_{max_{0-24 h}}$ y $C_{min_{0-24 h}}$. El $T_{max_{0-12 h}}$ fue 1.5 (0.9) h para TAC BID y 3 (1.9) h para TAC QD. Los parámetros farmacocinéticos de TAC BID y TAC QD se muestran en la tabla 1 del artículo.

Las correlaciones entre $AUC_{0-24 h}$ y las determinaciones puntuales de las concentraciones del fármaco eran fuertes ($r>0.7$) en la mayoría de los puntos tanto para el TAC BID como para el TAC QD (Tabla 2 del artículo). También se evidenció una fuerte correlación entre el $AUC_{0-24 h}$ y la $C_{24 h}$ para ambas formulaciones.

La dosis del TAC fue modificada durante el seguimiento: la dosis diaria media de TAC BID antes del cambio (día 14) era 4.8 ± 2.2 mg. En 3 (15.8%) pacientes, la dosis de TAC se modificó entre el cambio a TAC QD y la segunda curva FC, por ello cuando se calculó la segunda $AUC_{0-24 h}$ la variación de dosis fue corregida. Tras realizar la conversión a TAC QD, la dosis media diaria se incrementó 5.2 ± 2.6 , 5.4 ± 3.0 y 5.6 ± 3.1 mg durante los días +60, +90 y +180, respectivamente. Ocho pacientes tenían la misma dosis tras 6 meses; en 4 pacientes, la dosis se disminuyó ligeramente en 1 mg/día; en 4 pacientes se aumentó 1 mg/día y sólo en tres pacientes el aumento fue superior a 1 mg/día tras los 6 meses de seguimiento.

Todos los pacientes sobrevivieron durante el periodo del estudio. Los efectos adversos registrados fueron 0,16 eventos por pacientes y mes de seguimiento durante el tratamiento con TAC BID y 0,26 eventos por pacientes y mes durante el tratamiento con TAC QD (Tabla 3 del artículo). Se registraron 3 efectos adversos severos postconversión que requirieron hospitalización aunque no se consideraron relacionados con la conversión del fármaco. Una sepsis urinaria a los 2 meses y una colelitiasis a los 5 meses que precisó

colecistectomía, un accidente isquémico cerebral a los 2 meses y una pielonefritis aguda litíásica a los 5 meses.

Entre las complicaciones inmunológicas no se registraron RAC pero un paciente presentó una DCI, por BOS, a los 4 meses de la conversión.

DISCUSSION

4. Discusión.

4.1 Artículo 1.

En el artículo “High intra-individual variability of Cyclosporine pharmacokinetics in lung transplant recipients without cystic fibrosis” observamos que hay un elevado porcentaje de pacientes sin FQ con elevada variabilidad intraindividual de la CsA. Estos pacientes presentan curvas FCs variables con AUC que no se correlacionan bien con los niveles que se utilizan habitualmente para el ajuste de dosis (C_2). Todo ello con potenciales implicaciones clínicas.

La variabilidad intraindividual de la FC de la CsA ha sido investigada en trasplantes de órganos sólidos distintos del TP^{135, 188, 189}. Sin embargo, hay pocos estudios que analicen la variabilidad de la CsA en el TP. En nuestro estudio un 40% de los pacientes con TP presentan una elevada variabilidad intraindividual en la FC de la CsA. En el estudio de Kahan et al.¹⁹⁰ presentan datos similares en pacientes con trasplante renal ya que el CV intraindividual medio de la CsA es del 30%. Estos autores correlacionan las variaciones de los parámetros farmacocinéticos con el rechazo crónico. Tras identificar el impacto de los factores demográficos, los parámetros analíticos y clínicos en el rechazo crónico, analizan la correlación de las dosis absolutas y corregidas de CsA, el porcentaje del CV y el Cav. Los datos sugieren que al disminuir el CV se podría reducir la incidencia de rechazo crónico y mejorar la supervivencia del trasplante renal.

Dado que no es posible la realización de curvas FCs rutinarias para el ajuste de la dosis adecuada, el problema es determinar en qué tiempo la concentración del fármaco correlaciona mejor con el AUC. Muchos estudios realizados en pacientes con otro TOS evidencian que el AUC_{0-4h} se correlaciona bien con los niveles de C_2 ^{132, 140, 191, 192}. Además numerosos estudios muestran que los mejores resultados se obtienen ajustando la dosis con niveles de C_2 . En el trasplante renal y hepático la monitorización de C_2 es un valor predictivo de rechazo y nefrotoxicidad¹⁴² y en TP la monitorización de C_2 reduce el riesgo de toxicidad de CsA y la dosificación incorrecta¹⁴⁵. El consenso¹⁴² apoya que el mejor parámetro para monitorizar la dosis de CsA es la C_2 . En nuestro estudio globalmente la C_2 también tiene una buena correlación con el AUC_{0-4h} .

Aunque hay consenso en que el mejor parámetro puntual para la monitorización de la CsA es la C_2 el problema radica en que los estudios utilizan el AUC_{0-4h} porque se considera que

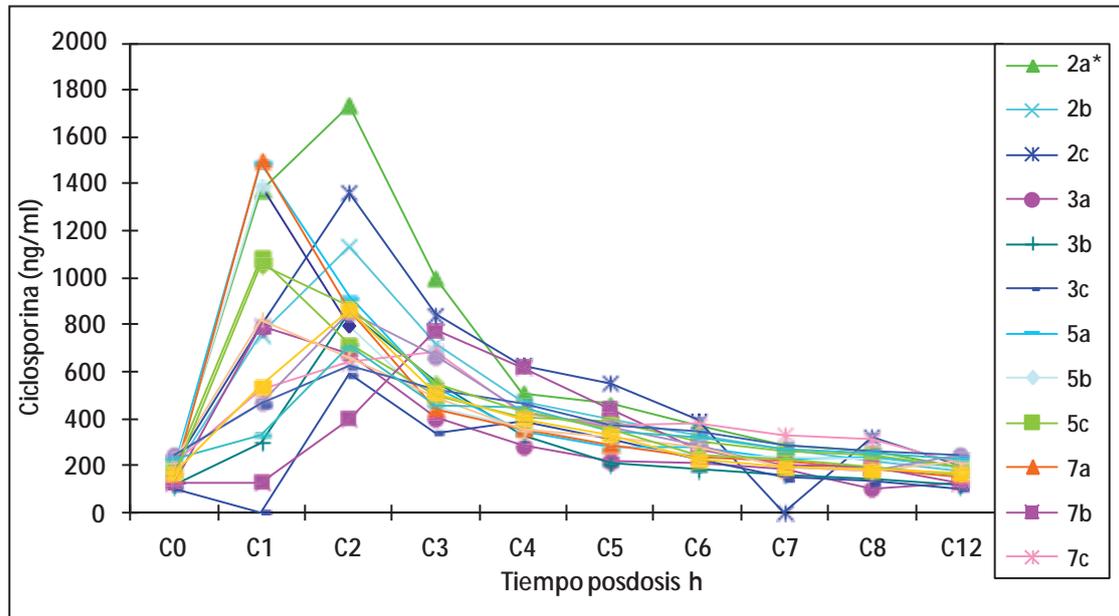
es cuando ocurre la mayor exposición del fármaco. Sin embargo, esto puede no ser cierto en todos los pacientes. El grupo de Levy et al.¹⁴² consideran que existen dos grupos de pacientes, unos que tienen una absorción baja y otros que son absorbedores lentos. La C_2 no permite diferenciar estos grupos de pacientes por lo que consideran que determinando C_6 y C_2 podemos diferenciarlos. En el grupo de absorbedores lentos la C_6 es superior a C_2 mientras que en los pacientes con una baja absorción las 2 determinaciones serían bajas. Los autores consideran importante identificar a los absorbedores lentos ya que ajustes inapropiados de la dosis pueden causar consecuencias negativas a largo plazo, como empeoramiento de la función renal. En nuestro estudio los pacientes con elevado CV muestran una considerable exposición al fármaco en las últimas horas, tal y como se observa en los perfiles farmacocinéticos (figuras 1a y 1b del artículo). En estos pacientes la correlación de C_2 con el AUC no es buena. Nosotros hipotetizamos que hay pacientes con elevada variabilidad intraindividual que más que ser absorbedores lentos tienen un patrón de absorción variable. En estos casos, la monitorización clásica con C_0 correlaciona mejor con AUC_{0-12h} . Por tanto, en este tipo de pacientes con CV alto la monitorización probablemente debería realizarse con C_0 o utilizar un IC con menos variabilidad, como el TAC. El problema radica en cómo podemos identificar a estos pacientes sin hacer curvas FCs a todos los pacientes. Tal vez, observar C_2 muy variables en la monitorización rutinaria nos podría hacer sospechar que estamos ante un paciente con CV intraindividual alta. Tal sospecha la podríamos confirmar realizando curvas FCs.

Algunos estudios han relacionado la variabilidad intraindividual con la eficacia del tratamiento. Kahan et al.¹⁹³ refieren que la exposición y el grado de variabilidad día a día en la exposición determinan la incidencia del RA y crónico en los pacientes con trasplante renal. Por tanto, los pacientes con elevada variabilidad intraindividual pueden tener peor pronóstico.

En nuestro estudio, la supervivencia es menor en pacientes con variabilidad intraindividual alta. Sin embargo, estos datos deben ser interpretados con cautela ya que la supervivencia no se consideró un objetivo primario del estudio. Consideramos que es una limitación del estudio ya que por ello no pudimos realizar un análisis multivariable de los factores que pueden afectar a la supervivencia. Otra limitación de nuestro estudio es el pequeño tamaño muestral.

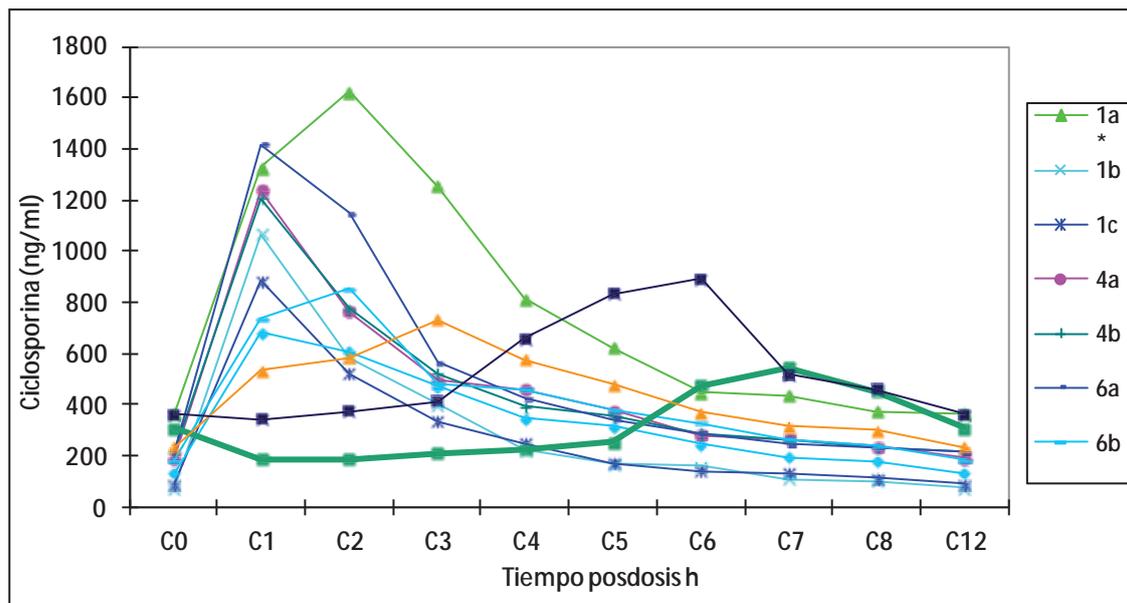
Figuras 1 del artículo 1:

Figura 1a. Representación de 18 perfiles farmacocinéticos de CsA en 6 receptores de TP con bajo CV (<20%)



2a*: corresponde al paciente número 2 con su primera curva y así sucesivamente

Figura 1b. Representación de 11 perfiles farmacocinéticos de CsA in 4 receptores de TP con alto CV ($\geq 20\%$)



1a*: corresponde al paciente número 1 con su primera curva y así sucesivamente

En resumen, un elevado porcentaje de pacientes con TP presentan una elevada variabilidad intraindividual en la FC de la CsA. En ellos la monitorización con C_2 no parece adecuada y el uso de C_0 o la determinación de una curva FC podrían ser una mejor opción.

4.2 Artículo 2.

En el segundo artículo “Pharmacokinetic Study of Conversion from Tacrolimus Twice-Daily to Tacrolimus Once-Daily in Stable Lung Transplantation”.

El estudio evidencia que la exposición del TAC es similar cuando la formulación BID se convierte a QD (1 mg: 1 mg) de la dosis total en TP adulto estable. Hasta nuestro conocimiento el presente estudio es el primero que evalúa esto en pacientes con TP estable, adultos y sin FQ. Los resultados son concordantes con los de varios estudios realizados en otros trasplantes de órgano sólido. El grupo de Alloway et al.¹⁹⁴ realiza un estudio farmacocinético multicéntrico y prospectivo de pacientes con trasplante renal estable. Comparan los parámetros farmacocinéticos del TAC BID y TAC QD, realizando curvas FCs pre y postconversión, y valoran la tolerancia y la seguridad a corto y a largo plazo¹⁹⁵ tras la conversión (1 mg: 1mg). Demuestran una exposición equivalente entre ambas formulaciones ($AUC_{TAC\ QD/BID}$ del 94,9% con un IC del 90% de 90,7-99,4) y una alta correlación entre el AUC y la C_{min} ($r > 80\%$ en ambas formulaciones). No precisan ajustar la dosis en casi un 70 % de los pacientes, durante los primeros 35 días postconversión, y precisan un ajuste de la dosis que varía desde el 9 al 39% durante un seguimiento de 2 años. Presenta una incidencia de RA confirmado por biopsia del 6% y no se incrementan los efectos adversos o las alteraciones analíticas durante el seguimiento. Por lo tanto, concluyen que las 2 formulaciones son equivalentes y que la conversión mg a mg es segura. Sin embargo, hay mucha controversia en si hay que mantener la misma dosis o no en la conversión, de hecho algunos estudios recomiendan reducir la dosis y otros aumentarla. Así, en otro estudio de trasplante renal estable, Hardinger et al.¹⁹⁶ concluyen que la dosis debería reducirse al 85% del tratamiento tras la conversión. Se trata de un estudio secuencial en el que hacen 2 curvas FCs, pre y postconversión. Al realizar la conversión dividen a los pacientes en tres grupos en los que administran un 65%, 85% y 100% de la dosis del TAC BID. Posteriormente calculan la correlación entre el $AUC_{TAC\ BID/QD}$. Concluyen que con el 65% de la dosis la exposición es baja y con el 100% es excesiva, por lo que el 85% es la dosis de conversión que consideran más equivalente y

segura. Los autores justifican su conclusión con la hipótesis de que la mayor absorción del fármaco ocurre por la mañana y esto permite que se disminuya la dosis al tratarlos con TAC QD.

Otros estudios realizados en trasplantes renales estables apoyan la idea de que la dosis del fármaco debe aumentarse tras la conversión y el incremento varía del 20%¹⁹⁷ al 30%¹⁹⁸. Ambos son estudios retrospectivos que no realizan curvas FCs y utilizan dosis diarias y niveles sanguíneos de C_0 para realizar el análisis. En relación al trasplante hepático y cardíaco la opinión generalizada apoya los datos de nuestro estudio. En un estudio multicéntrico en pacientes con trasplante hepático estable, de Florman et al.¹⁹⁹, demuestran que puede ser segura la conversión 1:1 por la mañana. Analizan la conversión de cuatro periodos cruzados realizando una curva FC al final de cada periodo. Así, objetivan que aproximadamente el 80% de los pacientes convertidos a TAC QD no precisan ajuste de la dosis, las AUC de ambas formulaciones son comparables y la correlación entre el AUC_{0-24h} y la C_{min} es buena (con un $r > 0,86$ en ambas formulaciones). En 56 de los 62 pacientes que completan el estudio se realiza un seguimiento a largo plazo durante 2 años²⁰⁰. Durante el seguimiento se registró un rango de modificación de la dosis entre el 18% y el 36 %, la incidencia de RA es de un 6 % y la supervivencia del 99 %.

En trasplante cardíaco un estudio retrospectivo²⁰¹ apoya un aumento del 25 % de la dosis manteniendo la seguridad y la eficacia. El estudio más relevante es el realizado por Alloway et al.¹⁷¹ en trasplante cardíaco estable. Es un estudio multicéntrico y prospectivo que aporta una fuerte evidencia sobre la seguridad de la conversión 1:1 de TAC BID a TAC QD. De 85 pacientes seleccionados se realizan 5 curvas FCs a 45 pacientes: dos preconversión y tres postconversión durante un periodo de seguimiento de 35 días. Concluyen que las AUC para TAC BID y TAC QD son comparables y presentan una elevada correlación entre el $AUC_{0-24 h}$ y la C_{min} para ambas formulaciones ($r > 0,91\%$). La variabilidad interpaciente e intrapaciente es similar en ambas formulaciones y un tercio de los pacientes precisan ajuste de la dosis.

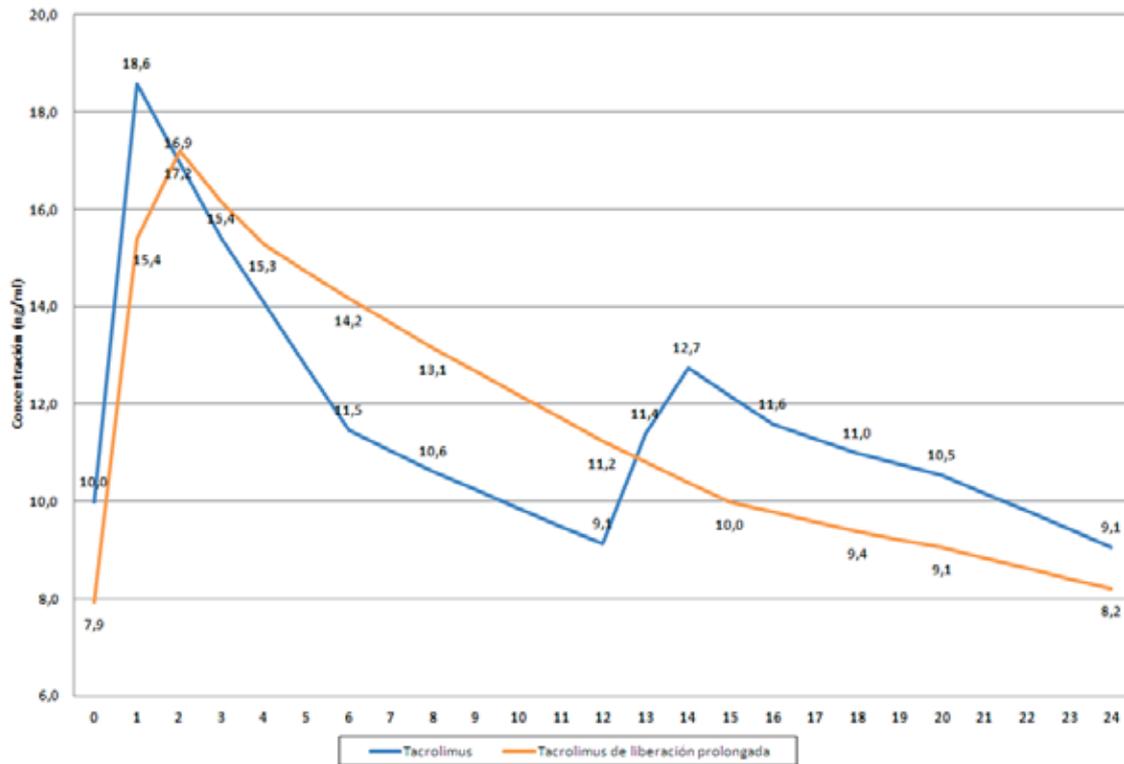
Aunque nuestros datos apoyan el concepto de que las 2 formulaciones de TAC proporcionan prácticamente la misma exposición al fármaco, durante el estudio las decisiones médicas estaban influidas por el nivel de C_0 y este nivel fue ligeramente inferior con TAC QD. Esto podría ser la razón de algunos aumentos de dosis innecesarias realizados tras la conversión ya que, al completar el estudio, la dosis media total de la cohorte se incrementó. Al realizar un análisis más detallado muestra que sólo un tercio de

los pacientes tienen un aumento de la dosis real, mientras que, en los dos tercios restantes, la dosis administrada es la misma o menor que la dosis original. Las modificaciones de las dosis realizadas durante el estudio se basaron en razones clínicas y no en datos farmacocinéticos. Wu et al.²⁰² intentan determinar el CV en pacientes con trasplante renal estable cuando se realiza la conversión de TAC BID a TAC QD. Además, analizan si el CV de C₀ antes de la conversión se correlaciona con las variaciones de la C₀ tras la conversión. Evidencian una reducción de más del 25% de la C₀ a los 7 días de la conversión en casi el 32% de los pacientes. Estos autores concluyen que el CV de C₀ mayor del 22,5%, antes de la conversión, se asocia con un mayor riesgo de reducir C₀ tras la conversión ($p < 0,05$). En el presente estudio realizado en pacientes con TP apoyamos la idea de que la biovariabilidad del TAC es similar cuando la misma dosis diaria se administra con TAC BID o TAC QD.

Nuestro estudio documentó una buena correlación entre las AUC y una relación similar entre el AUC_{0-24 h} y C_{24 h}. Esto indica que la monitorización de las concentraciones a través de muestras sanguíneas, como niveles de referencia, proporcionan una buena estimación de la exposición sistémica a TAC y esto podría ser un valor de referencia para ambas formulaciones. En nuestro estudio, consideramos a C_{min} como la determinación C_{24 h}, porque es la concentración antes de la siguiente dosis que podemos asegurar que se determina exactamente 12 horas después de la última dosis en el caso de TAC BID. Sin embargo, nosotros encontramos una baja correlación entre C_{min} y AUC_{0-24 h} para TAC BID, que creemos que se debe principalmente a la falta de coordinación de las 12 horas entre la ingesta nocturna de la dosis en su domicilio (hora exacta influenciado por las preferencias del paciente) y la dosis del hospital la mañana siguiente. Esto también puede ocurrir en la práctica clínica diaria. Sin embargo, obtenemos una buena correlación entre C_{min} y AUC_{0-24 h} del TAC QD a pesar de la variabilidad en el horario de administración domiciliario. Este hallazgo apoya el beneficio potencial de una sola dosis de tratamiento con TAC que conduce a una mejor monitorización de los niveles del fármaco. Con el TAC QD la C_{max} no llega a los límites de equivalencias y el T_{max} para QD es más largo que para TAC BID (figura 1 del artículo 2). Estos resultados reflejan las características de liberación prolongada de la formulación QD y además son similares a los reportados en estudios previos de las dos formulaciones^{171, 203, 204}. Las diferencias entre el AUC_{0-12 h} y AUC_{12-24 h}, en el caso del TAC BID, observadas en el presente estudio están de acuerdo con estudios publicados previamente¹⁹⁶. La hipótesis actual que podría explicar el AUC inferior

de la noche es la disminución de la biodisponibilidad oral de TAC cuando se toma con alimentos o el cambio nocturno del ritmo intestinal.

Figura 1 del artículo 2: AUC del TAC BID y TAC QD en 19 pacientes con trasplante pulmonar.



Los valores de la gráfica representan medias

En nuestro estudio, los efectos adversos que ocurren con las dos formulaciones son similares cuando se corrigen por el tiempo de exposición al fármaco. Además, los niveles de creatinina sérica se mantienen estables después de la conversión a TAC QD y no hay nuevos casos de DM postrasplante, ni aumento de los efectos adversos asociados con el uso de TAC después de la conversión. Esto subraya la seguridad de cambiar a TAC QD en pacientes con TP estable. En el estudio de Alloway et al.¹⁷¹ los efectos secundarios son superiores con TAC QD (27% vs 12%) lo que se atribuye a un seguimiento de 4 semanas en comparación con un seguimiento de 1 semana con TAC BID. Sin embargo, hacen una prolongación del estudio durante 1 año, en el que participan 69 de los 85 pacientes seleccionados, y registran pocos efectos adversos. Lo que se confirma en el estudio de Van Hooff et al²⁰⁵. Este estudio multicéntrico y prospectivo realizado durante 4 años incluye a los pacientes con trasplante cardíaco estable, del estudio de Alloway et al¹⁷¹, además de

pacientes con trasplante renal estable y pacientes con trasplante renal y hepático *de novo*, tratados con TAC QD, y evidencia la disminución de efectos adversos a largo plazo.

Una limitación en el diseño del estudio es el corto período de seguimiento (6 meses), que es insuficiente para mostrar diferencias entre la eficacia del TAC BID y TAC QD, aunque nuestros resultados farmacocinéticos apoyan la ausencia de diferencias en la eficacia. Otra posible limitación es la exclusión de los pacientes con FQ debido a la absorción intestinal irregular que presentan. De acuerdo con los hallazgos de otros autores^{206, 207}, creemos que los pacientes con FQ deben ser analizados como una población separada²⁰⁸. Por último, todos los pacientes tratados con TAC también se tratan con fármacos concomitantes, azitromicina y TMP-SMX, que potencialmente interactúan con los inmunosupresores. Sin embargo, todos los pacientes se tratan con estos fármacos antes y después de la conversión a las mismas dosis. Por ello, consideramos que no debe de influir de modo significativo en el estudio.

En conclusión, el resultado fundamental de este trabajo es que en el TP estable sin FQ se puede realizar la conversión de TAC BID a TAC QD con una relación 1mg :1 mg que parece eficaz y segura.

CONCLUSIÖNES

5. Conclusiones.

5.1 Artículo 1.

En el artículo “High intra-individual variability of Cyclosporine pharmacokinetics in lung transplant recipients without cystic fibrosis” concluimos que:

- 1- Un importante porcentaje de los pacientes (40%) sometidos a TP muestran una alta variabilidad intraindividual en la FC de la CsA.
- 2- La monitorización estándar del fármaco, de acuerdo con los niveles de C_2 , puede no ser apropiada en estos pacientes
- 3- El uso de los niveles de C_0 puede seguir siendo la mejor opción.
- 4- Las dificultades en la monitorización para determinar la dosis correcta de CsA pueden ser un factor que influye en la supervivencia de estos pacientes.

5.2 Artículo 2.

En “Pharmacokinetic Study of Conversion from Tacrolimus Twice-Daily to Tacrolimus Once-Daily in Stable Lung Transplantation”, los resultados de este estudio muestran que:

- 1- Las AUC del TAC BID y del TAC QD son equivalentes en los pacientes con TP estable, no FQ, tras la conversión 1 mg: 1 mg.
- 2- Existe una alta correlación entre la C_{24h} y el AUC_{0-24h} .
- 3- La monitorización terapéutica simplificada con C_0 es adecuada para TAC BID y TAC QD en TP estable.
- 4- La conversión 1 mg: 1 mg parece eficaz y segura.
- 5- Es probable que el tratamiento con TAC QD mejore el cumplimiento del paciente.

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía.

1. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto Lung Transplant Group. *N Engl J Med* 1986;314(18):1140-1145.
2. Cooley DA, Bloodwell RD, Hallman GL, Nora JJ, Harrison GM, Leachman RD. Organ transplantation for advanced cardiopulmonary disease. *Ann Thorac Surg* 1969;8(1):30-46.
3. Derom F, Barbier F, Ringoir S et al. Ten-month survival after lung homotransplantation in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1971;61(6):835-846.
4. Nelems JM, Rebuck AS, Cooper JD, Goldberg M, Halloran PF, Vellend H. Human lung transplantation. *Chest* 1980;78(4):569-573.
5. Pillard D, Dureau G, Bui-Xuan B, Tabib A, Motin J, Marion P. [Human lung transplantation. A case report (author's transl)]. *Ann Chir* 1982;36(2):148-156.
6. Calne RY, White DJ, Evans DB et al. Cyclosporin A in cadaveric organ transplantation. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981;282(6268):934-936.
7. Powles RL, Barrett AJ, Clink H, Kay HE, Sloane J, McElwain TJ. Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man. *Lancet* 1978;2(8104-5):1327-1331.
8. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2003;63(12):1247-1297.
9. Goldberg M, Lima O, Morgan E et al. A comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;85(6):821-826.
10. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* 1989;2(8670):1000-1004.
11. Keenan RJ, Konishi H, Kawai A et al. Clinical trial of tacrolimus versus cyclosporine in lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1995;60(3):580-584.
12. Horning NR, Lynch JP, Sundaresan SR, Patterson GA, Trulock EP. Tacrolimus therapy for persistent or recurrent acute rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1998;17(8):761-767.
13. Onsager DR, Canver CC, Jahania MS et al. Efficacy of tacrolimus in the treatment of refractory rejection in heart and lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1999;18(5):448-455.
14. Reitz BA, Pennock JL, Shumway NE. Simplified operative method for heart and lung transplantation. *J Surg Res* 1981;31(1):1-5.

15. Cooper JD, Ginsberg RJ, Goldberg M, et al. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1986;314:1140.
16. Dark JH, Patterson GA, Al-Jilaihawi AN, Hsu H, Egan T, Cooper JD. Experimental en bloc double-lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1986;42(4):394-398.
17. Patterson GA, Cooper JD, Goldman B et al. Technique of successful clinical double-lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1988;45(6):626-633.
18. Bisson A, Bonnette P. [A new technic of bipulmonary transplantation: double unilateral lung transplantation]. *Presse Med* 1990;19(16):762.
19. Pasque MK, Cooper JD, Kaiser LR, Haydock DA, Triantafillou A, Trulock EP. Improved technique for bilateral lung transplantation: rationale and initial clinical experience. *Ann Thorac Surg* 1990;49(5):785-791.
20. Kaiser LR, Pasque MK, Trulock EP, Low DE, Dresler CM, Cooper JD. Bilateral sequential lung transplantation: the procedure of choice for double-lung replacement. *Ann Thorac Surg* 1991;52(3):438-445.
21. Cooper JD. Lung transplantation: a new era. *Ann Thorac Surg* 1987;44(5):447-448.
22. Pearson FG. Lung transplantation: the Toronto experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 1989;3(1):6-11.
23. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first adult lung and heart-lung transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014;33(10):1009-1024.
24. Coll E, Santos F, Ussetti P et al. The Spanish Lung Transplant Registry: first report of results (2006-2010). *Arch Bronconeumol* 2013;49(2):70-78.
25. Laporta HR, Lazaro Carrasco MT, Varela de UA, Ussetti GP. Long-term follow-up of the lung transplant patient. *Arch Bronconeumol* 2014;50(2):67-72.
26. Roman A, Bravo C, Tenorio L, Astudillo J, Margarit C, Morell F. Single lung transplant for idiopathic pulmonary fibrosis: normocapnea after prolonged hypercapnea. Vall d'Hebron Transplant Group. *Transplant Proc* 1992;24(1):21.
27. Astudillo PJ, Bravo MC, Margarit CC, Guillermo Rodriguez ML, Tenorio LL. [Sequential double-lung transplantation. Technique and results in the first 3 cases. Pulmonary Transplant Group]. *Arch Bronconeumol* 1994;30(7):348-353.
28. Lau CL, Patterson GA. Current status of lung transplantation. *Eur Respir J Suppl* 2003;47:57s-64s.
29. Limbos MM, Chan CK, Kesten S. Quality of life in female lung transplant candidates and recipients. *Chest* 1997;112(5):1165-1174.

30. TenVergert EM, Vermeulen KM, Geertsma A et al. Quality of life before and after lung transplantation in patients with emphysema versus other indications. *Psychol Rep* 2001;89(3):707-717.
31. Espinosa M, Rodil R, Goikoetxea MJ, Zulueta J, Seijo LM. [Lung transplant]. *An Sist Sanit Navar* 2006;29 Suppl 2:105-112.
32. Santacruz JF, Mehta AC. Airway complications and management after lung transplantation: ischemia, dehiscence, and stenosis. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6(1):79-93.
33. Meyers BF, de la Morena M, Sweet SC et al. Primary graft dysfunction and other selected complications of lung transplantation: A single-center experience of 983 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129(6):1421-1429.
34. Banerjee SK, Santhanakrishnan K, Shapiro L, Dunning J, Tsui S, Parmar J. Successful stenting of anastomotic stenosis of the left pulmonary artery after single lung transplantation. *Eur Respir Rev* 2011;20(119):59-62.
35. Chen F, Tazaki J, Shibata T et al. Stent angioplasty for a kink in the pulmonary artery anastomosis soon after living-donor lobar lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2011;92(5):e105-e106.
36. Uhlmann EJ, Dunitz JM, Fiol ME. Pulmonary vein thrombosis after lung transplantation presenting as stroke. *J Heart Lung Transplant* 2009;28(2):209-210.
37. Sano Y, Oto T, Toyooka S, Yamane M, Okazaki M, Date H. [Phrenic nerve paralysis following lung transplantation]. *Kyobu Geka* 2007;60(11):993-997.
38. Kahan ES, Petersen G, Gaughan JP, Criner GJ. High incidence of venous thromboembolic events in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(4):339-344.
39. Wahidi MM, Willner DA, Snyder LD, Hardison JL, Chia JY, Palmer SM. Diagnosis and outcome of early pleural space infection following lung transplantation. *Chest* 2009;135(2):484-491.
40. Ferrer J, Roldan J, Roman A et al. Acute and chronic pleural complications in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003;22(11):1217-1225.
41. Christie JD, Sager JS, Kimmel SE et al. Impact of primary graft failure on outcomes following lung transplantation. *Chest* 2005;127(1):161-165.
42. Fiser SM, Tribble CG, Long SM et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002;73(4):1041-1047.
43. Whitson BA, Prekker ME, Herrington CS et al. Primary graft dysfunction and long-term pulmonary function after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(10):1004-1011.

44. Daud SA, Yusen RD, Meyers BF et al. Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(5):507-513.
45. Bharat A, Kuo E, Steward N et al. Immunological link between primary graft dysfunction and chronic lung allograft rejection. *Ann Thorac Surg* 2008;86(1):189-195.
46. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K et al. The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol* 2005;14(1):37-42.
47. Lowery EM, Bemiss B, Cascino T et al. Low vitamin D levels are associated with increased rejection and infections after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(7):700-707.
48. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI et al. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(12):1229-1242.
49. Yousem SA, Berry GJ, Cagle PT et al. Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *J Heart Lung Transplant* 1996;15(1 Pt 1):1-15.
50. Hopkins PM, Aboyoun CL, Chhajed PN et al. Association of minimal rejection in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(9):1022-1026.
51. Hachem RR, Khalifah AP, Chakinala MM et al. The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. *Transplantation* 2005;80(10):1406-1413.
52. Snyder LD, Wang Z, Chen DF et al. Implications for human leukocyte antigen antibodies after lung transplantation: a 10-year experience in 441 patients. *Chest* 2013;144(1):226-233.
53. Berry G, Burke M, Andersen C et al. Pathology of pulmonary antibody-mediated rejection: 2012 update from the Pathology Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant* 2013;32(1):14-21.
54. Lyu DM, Grazia TJ, Benson AB, Cagle LR, Freed BM, Zamora MR. Pre-transplant presence of antibodies to MICA and HLA class I or II are associated with an earlier onset of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. *Clin Transpl* 2012;237-246.
55. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(10):1073-1086.
56. Vos R, Verleden SE, Verleden GM. Chronic lung allograft dysfunction: evolving practice. *Curr Opin Organ Transplant* 2015.

57. Ng BJ, Glanville AR, Snell G et al. The impact of pandemic influenza A H1N1 2009 on Australian lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2011;11(3):568-574.
58. Iacono AT, Keenan RJ, Duncan SR et al. Aerosolized cyclosporine in lung recipients with refractory chronic rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(4 Pt 1):1451-1455.
59. Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2010;29(4):424-431.
60. Verleden GM, Lievens Y, Dupont LJ et al. Efficacy of total lymphoid irradiation in azithromycin nonresponsive chronic allograft rejection after lung transplantation. *Transplant Proc* 2009;41(5):1816-1820.
61. Fisher AJ, Rutherford RM, Bozzino J, Parry G, Dark JH, Corris PA. The safety and efficacy of total lymphoid irradiation in progressive bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am J Transplant* 2005;5(3):537-543.
62. Ruiz I, Gavalda J, Monforte V et al. Donor-to-host transmission of bacterial and fungal infections in lung transplantation. *Am J Transplant* 2006;6(1):178-182.
63. Burguete SR, Maselli DJ, Fernandez JF, Levine SM. Lung transplant infection. *Respirology* 2013;18(1):22-38.
64. Gottlieb J, Mattner F, Weissbrodt H et al. Impact of graft colonization with gram-negative bacteria after lung transplantation on the development of bronchiolitis obliterans syndrome in recipients with cystic fibrosis. *Respir Med* 2009;103(5):743-749.
65. Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE et al. A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *Eur Respir J* 2011;37(1):164-172.
66. Vos R, Vanaudenaerde BM, Ottevaere A et al. Long-term azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: divide and conquer? *J Heart Lung Transplant* 2010;29(12):1358-1368.
67. Gregson AL, Wang X, Weigt SS et al. Interaction between *Pseudomonas* and CXC chemokines increases risk of bronchiolitis obliterans syndrome and death in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(5):518-526.
68. Alexander BD, Petzold EW, Reller LB et al. Survival after lung transplantation of cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex. *Am J Transplant* 2008;8(5):1025-1030.
69. Boussaud V, Guillemain R, Grenet D et al. Clinical outcome following lung transplantation in patients with cystic fibrosis colonised with *Burkholderia cepacia* complex: results from two French centres. *Thorax* 2008;63(8):732-737.

70. Garzoni C, Vergidis P. Methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13 Suppl 4:50-58.
71. Dasenbrook EC, Checkley W, Merlo CA, Konstan MW, Lechtzin N, Boyle MP. Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. *JAMA* 2010;303(23):2386-2392.
72. Manuel O, Lien D, Weinkauff J, Humar A, Cobos I, Kumar D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after lung transplantation: 5-year review of clinical and molecular epidemiology. *J Heart Lung Transplant* 2009;28(11):1231-1236.
73. Kotsimbos TC, Snell GI, Levvey B et al. *Chlamydia pneumoniae* serology in donors and recipients and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* 2005;79(3):269-275.
74. Poonyagariyagorn HK, Gershman A, Avery R et al. Challenges in the diagnosis and management of *Nocardia* infections in lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2008;10(6):403-408.
75. Lee JT, Kelly RF, Hertz MI, Dunitz JM, Shumway SJ. *Clostridium difficile* infection increases mortality risk in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2013;32(10):1020-1026.
76. Gunderson CC, Gupta MR, Lopez F et al. *Clostridium difficile* colitis in lung transplantation. *Transpl Infect Dis* 2008;10(4):245-251.
77. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013;96(4):333-360.
78. Razonable RR. Management strategies for cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am* 2013;27(2):317-342.
79. Hodson EM, Ladhani M, Webster AC, Strippoli GF, Craig JC. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;2:CD003774.
80. Paraskeva M, Bailey M, Levvey BJ et al. Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2011;11(10):2190-2196.
81. Snyder LD, Finlen-Copeland CA, Turbyfill WJ, Howell D, Willner DA, Palmer SM. Cytomegalovirus pneumonitis is a risk for bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(12):1391-1396.
82. Monforte V, Ussetti P, Lopez R et al. Nebulized liposomal amphotericin B prophylaxis for *Aspergillus* infection in lung transplantation: pharmacokinetics and safety. *J Heart Lung Transplant* 2009;28(2):170-175.

83. Monforte V, Ussetti P, Gavalda J et al. Feasibility, tolerability, and outcomes of nebulized liposomal amphotericin B for *Aspergillus* infection prevention in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2010;29(5):523-530.
84. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46(3):327-360.
85. Subramanian AK. Antimicrobial prophylaxis regimens following transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 2011;24(4):344-349.
86. Lopez de CD, Schluger NW. Tuberculosis following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 2010;12(2):106-112.
87. Subramanian AK, Morris MI. Mycobacterium tuberculosis infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13 Suppl 4:68-76.
88. Aguado JM, Torre-Cisneros J, Fortun J et al. Tuberculosis in solid-organ transplant recipients: consensus statement of the group for the study of infection in transplant recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Clin Infect Dis* 2009;48(9):1276-1284.
89. Meije Y, Piersimoni C, Torre-Cisneros J, Dilektasli AG, Aguado JM. Mycobacterial infections in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2014;20 Suppl 7:89-101.
90. Bumbacea D, Arend SM, Eyuboglu F et al. The risk of tuberculosis in transplant candidates and recipients: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2012;40(4):990-1013.
91. Sun HY, Munoz P, Torre-Cisneros J et al. Tuberculosis in solid-organ transplant recipients: disease characteristics and outcomes in the current era. *Prog Transplant* 2014;24(1):37-43.
92. Canet E, Dantal J, Blanco G, Hourmant M, Coupel S. Tuberculosis following kidney transplantation: clinical features and outcome. A French multicentre experience in the last 20 years. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(11):3773-3778.
93. Keating MR, Daly JS. Nontuberculous mycobacterial infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13 Suppl 4:77-82.
94. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P et al. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* in a lung transplant and cystic fibrosis center. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(2):231-232.
95. Zaidi S, Elidemir O, Heinle JS et al. *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis lung transplant recipients: report of 2 cases and risk for recurrence. *Transpl Infect Dis* 2009;11(3):243-248.

96. Garrison AP, Morris MI, Doblecki LS et al. Mycobacterium abscessus infection in solid organ transplant recipients: report of three cases and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 2009;11(6):541-548.
97. Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med* 1982;306(10):557-564.
98. Penninga L, Moller CH, Penninga EI, Iversen M, Glud C, Steinbruchel DA. Antibody induction therapy for lung transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;11:CD008927.
99. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant* 2014;14 Suppl 1:11-44.
100. Kim WR, Lake JR, Smith JM et al. OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: liver. *Am J Transplant* 2015;15 Suppl 2:1-28.
101. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report--2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant* 2013;32(10):951-964.
102. Chakinala MM, Trulock EP. Acute allograft rejection after lung transplantation: diagnosis and therapy. *Chest Surg Clin N Am* 2003;13(3):525-542.
103. Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J Heart Lung Transplant* 2002;21(2):271-281.
104. Davis WA, Finlen Copeland CA, Todd JL, Snyder LD, Martissa JA, Palmer SM. Spirometrically significant acute rejection increases the risk for BOS and death after lung transplantation. *Am J Transplant* 2012;12(3):745-752.
105. Snell GI, Westall GP. Immunosuppression for lung transplantation: evidence to date. *Drugs* 2007;67(11):1531-1539.
106. Meyer NJ, Borhade SM. Evolving immunosuppressive regimens for lung transplant recipients. *Semin Respir Crit Care Med* 2006;27(5):470-479.
107. Hopkins PM, McNeil K. Evidence for immunosuppression in lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13(5):477-483.
108. Waddell T.K., Borro J.M., Roman A., et al. A double-blind randomized trial comparing basiliximab to placebo in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006;S114:202.
109. Snell GI, Westall GP, Levvey BJ et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study of rabbit ATG in the prophylaxis of acute rejection in lung transplantation. *Am J Transplant* 2014;14(5):1191-1198.

110. Wehman B, Griffith BP, Balwan A et al. Long-term outcomes following alemtuzumab induction in lung transplantation. *Heart Surg Forum* 2013;16(5):E252-E256.
111. Whited LK, Latran MJ, Hashmi ZA et al. Evaluation of Alemtuzumab Versus Basiliximab Induction: A Retrospective Cohort Study in Lung Transplant Recipients. *Transplantation* 2015.
112. Iacono AT, Smaldone GC, Keenan RJ et al. Dose-related reversal of acute lung rejection by aerosolized cyclosporine. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(5):1690-1698.
113. Iacono AT, Johnson BA, Grgurich WF et al. A randomized trial of inhaled cyclosporine in lung-transplant recipients. *N Engl J Med* 2006;354(2):141-150.
114. Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation* 1999;68(9):1356-1361.
115. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)¹ in organ transplantation. *Drugs* 2001;61(13):1957-2016.
116. Kahan BD. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation* 1985;40(5):457-476.
117. Kahan BD, Dunn J, Fitts C et al. Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics in renal transplant recipients treated with a microemulsion formulation in conjunction with fasting, low-fat meals, or high-fat meals. *Transplantation* 1995;59(4):505-511.
118. Levy GA, Grant D. Neoral in liver transplantation. *Transplant Proc* 1996;28(2):1019-1021.
119. Mueller EA, Kovarik JM, van Bree JB, Tetzloff W, Grevel J, Kutz K. Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Pharm Res* 1994;11(2):301-304.
120. Kovarik JM, Mueller EA, van Bree JB, Tetzloff W, Kutz K. Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *J Pharm Sci* 1994;83(3):444-446.
121. Kovarik JM, Mueller EA, van Bree JB, Arns W, Renner E, Kutz K. Within-day consistency in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation in renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 1994;16(3):232-237.
122. Mueller EA, Kovarik JM, van Bree JB, Lison AE, Kutz K. Pharmacokinetics and tolerability of a microemulsion formulation of cyclosporine in renal allograft recipients--a concentration-controlled comparison with the commercial formulation. *Transplantation* 1994;57(8):1178-1182.

123. Mueller EA, Kallay Z, Kovarik JM et al. Bile-independent absorption of cyclosporine from a microemulsion formulation in liver transplant patients. *Transplantation* 1995;60(5):515-517.
124. Winkler M, Haller GW, Oldhafer K et al. Cyclosporin new oral formulation for early oral immunosuppressive therapy in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):544-546.
125. Trull A, Steel L, Sharples L et al. Randomized, trough blood cyclosporine concentration-controlled trial to compare the pharmacodynamics of Sandimmune and Neoral in de novo lung transplant recipients. *Ther Drug Monit* 1999;21(1):17-26.
126. Christians U, Sewing KF. Alternative cyclosporine metabolic pathways and toxicity. *Clin Biochem* 1995;28(6):547-559.
127. Martin-Davila P, Blanes M, Fortun J. [Immunosuppression and infection in transplant recipients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(2):143-154.
128. Shibata N, Hoshino N, Yamaji A et al. Erythrocyte-to-plasma distribution ratio of cyclosporine: a useful indicator to predict cyclosporine pharmacokinetics and physiological changes during cyclosporine monitoring. *Transplant Proc* 1996;28(3):1313-1315.
129. Anderson JE, Munday AS, Kelman AW et al. Evaluation of a Bayesian approach to the pharmacokinetic interpretation of cyclosporin concentrations in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit* 1994;16(2):160-165.
130. Grevel J, Post BK, Kahan BD. Michaelis-Menten kinetics determine cyclosporine steady-state concentrations: a population analysis in kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 1993;53(6):651-660.
131. Dumont RJ, Ensom MH. Methods for clinical monitoring of cyclosporin in transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2000;38(5):427-447.
132. Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J et al. Peak cyclosporine levels (C_{max}) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomized comparison of neoral and sandimmune for liver transplantation (NOF-8). *Transplantation* 1999;67(8):1133-1137.
133. Min DI, Perry PJ, Chen HY, Hunsicker LG. Cyclosporine trough concentrations in predicting allograft rejection and renal toxicity up to 12 months after renal transplantation. *Pharmacotherapy* 1998;18(2):282-287.
134. Lindholm A, Kahan BD. Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54(2):205-218.
135. Johnston A, David OJ, Cooney GF. Pharmacokinetic validation of neoral absorption profiling. *Transplant Proc* 2000;32(3A Suppl):53S-56S.

136. Sindhi R, LaVia MF, Paulling E et al. Stimulated response of peripheral lymphocytes may distinguish cyclosporine effect in renal transplant recipients receiving a cyclosporine+rapamycin regimen. *Transplantation* 2000;69(3):432-436.
137. Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation* 1999;68(1):55-62.
138. Mahalati K, Belitsky P, West K et al. Approaching the therapeutic window for cyclosporine in kidney transplantation: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(4):828-833.
139. Levy GA. C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the Neoral formulation. *BioDrugs* 2001;15(5):279-290.
140. Cantarovich M, Besner JG, Barkun JS, Elstein E, Loertscher R. Two-hour cyclosporine level determination is the appropriate tool to monitor Neoral therapy. *Clin Transplant* 1998;12(3):243-249.
141. Cantarovich M, Barkun JS, Tchervenkov JI, Besner JG, Aspeslet L, Metrakos P. Comparison of neoral dose monitoring with cyclosporine through levels versus 2-hr postdose levels in stable liver transplant patients. *Transplantation* 1998;66(12):1621-1627.
142. Levy G, Therivet E, Lake J, Uchida K. Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement. *Transplantation* 2002;73(9 Suppl):S12-S18.
143. Knight SR, Morris PJ. The clinical benefits of cyclosporine C2-level monitoring: a systematic review. *Transplantation* 2007;83(12):1525-1535.
144. Jaksch P, Kocher A, Neuhauser P et al. Monitoring C2 level predicts exposure in maintenance lung transplant patients receiving the microemulsion formulation of cyclosporine (Neoral). *J Heart Lung Transplant* 2005;24(8):1076-1080.
145. Morton JM, Aboyoun CL, Malouf MA, Plit ML, Glanville AR. Enhanced clinical utility of de novo cyclosporine C2 monitoring after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004;23(9):1035-1039.
146. Knoop C, Vervier I, Thiry P et al. Cyclosporine pharmacokinetics and dose monitoring after lung transplantation: comparison between cystic fibrosis and other conditions. *Transplantation* 2003;76(4):683-688.
147. Glanville AR, Aboyoun CL, Morton JM, Plit M, Malouf MA. Cyclosporine C2 target levels and acute cellular rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006;25(8):928-934.
148. Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2(2):374-384.

149. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000;343(7):481-492.
150. Reig Mezquida JP, Jover AS, Ansotegui BE, Escriva PJ, Pastor Colom MD, Pastor GJ. Thrombotic microangiopathy associated with tacrolimus in lung transplantation. *Arch Bronconeumol* 2015;51(5):e23-e24.
151. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med* 1984;311(11):699-705.
152. Watkins KD, Boettger RF, Hanger KM et al. Use of sublingual tacrolimus in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(2):127-132.
153. Christiaans M, van DE, Beysens T, Undre N, Schafer A, van HJ. Effect of breakfast on the oral bioavailability of tacrolimus and changes in pharmacokinetics at different times posttransplant in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998;30(4):1271-1273.
154. Fitzsimmons WE, Bekersky I, Dressler D, Raye K, Hodosh E, Mekki Q. Demographic considerations in tacrolimus pharmacokinetics. *Transplant Proc* 1998;30(4):1359-1364.
155. Hu RH, Lee PH, Tsai MK. Clinical influencing factors for daily dose, trough level, and relative clearance of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2000;32(7):1689-1692.
156. Min DI, Chen HY, Fabrega A et al. Circadian variation of tacrolimus disposition in liver allograft recipients. *Transplantation* 1996;62(8):1190-1192.
157. Park SI, Felipe CR, Pinheiro-Machado PG, Garcia R, Tedesco-Silva H, Jr., Medina-Pestana JO. Circadian and time-dependent variability in tacrolimus pharmacokinetics. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21(2):191-197.
158. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(11):813-851.
159. Undre NA, van HJ, Christiaans M et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):296-298.
160. Jain AB, Todo S, Fung JJ et al. Correlation of rejection episodes with FK 506 dosage, FK 506 level, and steroids following primary orthotopic liver transplant. *Transplant Proc* 1991;23(6):3023-3025.
161. Backman L, Nicar M, Levy M et al. FK506 trough levels in whole blood and plasma in liver transplant recipients. Correlation with clinical events and side effects. *Transplantation* 1994;57(4):519-525.
162. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* 2002;24(3):330-350.

163. Hangler HB, Ruttman E, Geltner C et al. Single time point measurement by C2 or C3 is highly predictive in cyclosporine area under the curve estimation immediately after lung transplantation. *Clin Transplant* 2008;22(1):35-40.
164. Mardigyan V, Giannetti N, Cecere R, Besner JG, Cantarovich M. Best single time points to predict the area-under-the-curve in long-term heart transplant patients taking mycophenolate mofetil in combination with cyclosporine or tacrolimus. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(10):1614-1618.
165. Ragette R, Kamler M, Weinreich G, Teschler H, Jakob H. Tacrolimus pharmacokinetics in lung transplantation: new strategies for monitoring. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(9):1315-1319.
166. Wong KM, Shek CC, Chau KF, Li CS. Abbreviated tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2000;35(4):660-666.
167. Chisholm MA, Middleton MD. Modified-release tacrolimus. *Ann Pharmacother* 2006;40(2):270-275.
168. Cross SA, Perry CM. Tacrolimus once-daily formulation: in the prophylaxis of transplant rejection in renal or liver allograft recipients. *Drugs* 2007;67(13):1931-1943.
169. Keown P, Landsberg D, Halloran P et al. A randomized, prospective multicenter pharmacoepidemiologic study of cyclosporine microemulsion in stable renal graft recipients. Report of the Canadian Neoral Renal Transplantation Study Group. *Transplantation* 1996;62(12):1744-1752.
170. Freeman D, Grant D, Levy G et al. Pharmacokinetics of a new oral formulation of cyclosporine in liver transplant recipients. *Ther Drug Monit* 1995;17(3):213-216.
171. Alloway R, Vanhaecke J, Yonan N et al. Pharmacokinetics in stable heart transplant recipients after conversion from twice-daily to once-daily tacrolimus formulations. *J Heart Lung Transplant* 2011;30(9):1003-1010.
172. Zuckermann A, Reichenspurner H, Birsan T et al. Cyclosporine A versus tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil and steroids as primary immunosuppression after lung transplantation: one-year results of a 2-center prospective randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125(4):891-900.
173. Hachem RR, Yusen RD, Chakinala MM et al. A randomized controlled trial of tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(10):1012-1018.
174. Treede H, Klepetko W, Reichenspurner H et al. Tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation: a prospective, open, randomized two-center trial comparing two different immunosuppressive protocols. *J Heart Lung Transplant* 2001;20(5):511-517.

175. Fan Y, Xiao YB, Weng YG. Tacrolimus versus cyclosporine for adult lung transplant recipients: a meta-analysis. *Transplant Proc* 2009;41(5):1821-1824.
176. Sarahrudi K, Estenne M, Corris P et al. International experience with conversion from cyclosporine to tacrolimus for acute and chronic lung allograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127(4):1126-1132.
177. Wohlschlager J, Sommerwerck U, Jonigk D, Rische J, Baba HA, Muller KM. [Lung transplantation and rejection. Basic principles, clinical aspects and histomorphology]. *Pathologie* 2011;32(2):104-112.
178. Kesten S, Chaparro C, Scavuzzo M, Gutierrez C. Tacrolimus as rescue therapy for bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 1997;16(9):905-912.
179. Reichenspurner H, Kur F, Treede H et al. Tacrolimus-based immunosuppressive protocols in lung transplantation. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):171-172.
180. Reichenspurner H, Kur F, Treede H et al. Optimization of the immunosuppressive protocol after lung transplantation. *Transplantation* 1999;68(1):67-71.
181. Klepetko W, Estenne M, Glanville A et al. A multicenter study to assess outcome following a switch in the primary immunosuppressant from cyclosporin (CYA) to tacrolimus (TAC) in lung recipients. *J Heart Lung Transplant* 2001;20(2):208.
182. Roman A, Bravo C, Monforte V, Reyes L, Canela M, Morell F. Preliminary results of rescue therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil in lung transplanted patients with bronchiolitis obliterans. *Transplant Proc* 2002;34(1):146-147.
183. Klepetko W, Sarahrudi K, Corris P, et al. Efficacy of conversion from cyclosporin A to tacrolimus in lung transplantation (abstract n°86). *Am J Transplant* 2002;2 Suppl.(3):159.
184. Zuckermann A, Reichenspurner H, Jacks P, et al. Long term follow up of a prospective randomized trial comparing tacrolimus versus cyclosporine in combination with MMF after lung transplantation (abstract n°9). *J Heart Lung Transplant* 2003;22 Suppl:S76-7.
185. Borro JM, Bravo C, Sole A et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus stabilizes the course of lung function in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplant Proc* 2007;39(7):2416-2419.
186. Treede H, Glanville AR, Klepetko W et al. Tacrolimus and cyclosporine have differential effects on the risk of development of bronchiolitis obliterans syndrome: results of a prospective, randomized international trial in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(8):797-804.
187. Penninga L, Penninga EI, Moller CH, Iversen M, Steinbruchel DA, Gluud C. Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for lung transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;5:CD008817.

188. Ohlman S, Lindholm A, Hagglund H, Sawe J, Kahan BD. On the intraindividual variability and chronobiology of cyclosporine pharmacokinetics in renal transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 1993;44(3):265-269.
189. Kahan BD, Welsh M, Urbauer DL et al. Low intraindividual variability of cyclosporin A exposure reduces chronic rejection incidence and health care costs. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(6):1122-1131.
190. Kahan BD, Welsh M, Schoenberg L et al. Variable oral absorption of cyclosporine. A biopharmaceutical risk factor for chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1996;62(5):599-606.
191. Kelles A, Herman J, Tjandra-Maga TB, Van Damme-Lombaerts R. Sandimmune to Neoral conversion and value of abbreviated AUC monitoring in stable pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant* 1999;3(4):282-287.
192. Dunn S, Falkenstein K, Cooney G. Neoral C(2) monitoring in pediatric liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2001;33(7-8):3094-3095.
193. Kahan BD. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine: 20 years of progress. *Transplant Proc* 2004;36(2 Suppl):378S-391S.
194. Alloway R, Steinberg S, Khalil K et al. Conversion of stable kidney transplant recipients from a twice daily Prograf-based regimen to a once daily modified release tacrolimus-based regimen. *Transplant Proc* 2005;37(2):867-870.
195. Alloway R, Steinberg S, Khalil K et al. Two years postconversion from a prograf-based regimen to a once-daily tacrolimus extended-release formulation in stable kidney transplant recipients. *Transplantation* 2007;83(12):1648-1651.
196. Hardinger KL, Park JM, Schnitzler MA, Koch MJ, Miller BW, Brennan DC. Pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients: twice daily versus once daily dosing. *Am J Transplant* 2004;4(4):621-625.
197. de JH, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Reduced C₀ concentrations and increased dose requirements in renal allograft recipients converted to the novel once-daily tacrolimus formulation. *Transplantation* 2010;90(5):523-529.
198. Hougardy JM, Broeders N, Kianda M et al. Conversion from Prograf to Advagraf among kidney transplant recipients results in sustained decrease in tacrolimus exposure. *Transplantation* 2011;91(5):566-569.
199. Florman S, Alloway R, Kalayoglu M et al. Conversion of stable liver transplant recipients from a twice-daily Prograf-based regimen to a once-daily modified release tacrolimus-based regimen. *Transplant Proc* 2005;37(2):1211-1213.
200. Florman S, Alloway R, Kalayoglu M et al. Once-daily tacrolimus extended release formulation: experience at 2 years postconversion from a Prograf-based regimen in stable liver transplant recipients. *Transplantation* 2007;83(12):1639-1642.

201. Marzoa-Rivas R, Paniagua-Martin MJ, Barge-Caballero E et al. Conversion of heart transplant patients from standard to sustained-release tacrolimus requires a dosage increase. *Transplant Proc* 2010;42(8):2994-2996.
202. Wu MJ, Cheng CY, Chen CH et al. Lower variability of tacrolimus trough concentration after conversion from prograf to advagraf in stable kidney transplant recipients. *Transplantation* 2011;92(6):648-652.
203. Wlodarczyk Z, Squifflet JP, Ostrowski M et al. Pharmacokinetics for once- versus twice-daily tacrolimus formulations in de novo kidney transplantation: a randomized, open-label trial. *Am J Transplant* 2009;9(11):2505-2513.
204. Fischer L, Trunecka P, Gridelli B et al. Pharmacokinetics for once-daily versus twice-daily tacrolimus formulations in de novo liver transplantation: a randomized, open-label trial. *Liver Transpl* 2011;17(2):167-177.
205. van Hooff JP, Alloway RR, Trunecka P, Mourad M. Four-year experience with tacrolimus once-daily prolonged release in patients from phase II conversion and de novo kidney, liver, and heart studies. *Clin Transplant* 2011;25(1):E1-12.
206. Deierhoi MH, Haug M, III. Review of select transplant subpopulations at high risk of failure from standard immunosuppressive therapy. *Clin Transplant* 2000;14(5):439-448.
207. Del TM. Prospects for personalized immunosuppression: pharmacologic tools--a review. *Transplant Proc* 2004;36(3):687-689.
208. Soto GA, Ruiz-Antoran B, Laporta R et al. Dose increase needed in most cystic fibrosis lung transplantation patients when changing from twice- to once-daily tacrolimus oral administration. *Eur J Clin Pharmacol* 2015;71(6):715-722.

ARTÍCULOS

High intra-individual variability of cyclosporine pharmacokinetics in lung transplant recipients without cystic fibrosis

Méndez A, Monforte V, Berastegui C, López-Meseguer M, Bravo C, Pou L, Roman A. High intra-individual variability of cyclosporine pharmacokinetics in lung transplant recipients without cystic fibrosis.

Abstract: Background: There has been little study on the variability of CsA pharmacokinetics in stable lung transplant (LT) recipients without cystic fibrosis. This study was conducted to determine the prevalence of high intra-individual variability of CsA in LT recipients and its implications in CsA monitoring.

Methods: Twenty-nine pharmacokinetic curves were performed in 10 consecutive stable patients from a single center. The intra-individual coefficient of variation (CV) of the $AUC_{0-12\text{ h}}$ was calculated in each case. Patients were grouped according to whether their CV was high ($\geq 20\%$) or low ($< 20\%$). Correlations between cyclosporine CsA concentration at each time point, $AUC_{0-4\text{ h}}$, and $AUC_{0-12\text{ h}}$ were also calculated.

Results: Six (60%) patients presented low CVs and four (40%) high CVs. In patients with low CVs, the best correlation of $AUC_{0-12\text{ h}}$ was with CsA concentration at two h post-dose (C_2) ($r = 0.674$, $p = 0.002$), whereas in those with high CV, the best correlation was with C_5 ($r = 0.800$, $p = 0.003$). In the latter group, the correlation with C_2 was low ($r = 0.327$, $p = 0.32$), whereas the correlation with C_0 was high ($r = 0.709$, $p < 0.05$).

Conclusions: Intra-individual variability of CsA pharmacokinetics may be high in many LT recipients. In patients with high CV, the use of C_0 levels may be more appropriate for CsA monitoring than C_2 levels.

Alejandra Méndez^{a,b}, Víctor Monforte^{a,b}, Cristina Berastegui^{a,b}, Manuel López-Meseguer^{a,b}, Carlos Bravo^{a,b}, Leonor Pou^c and Antonio Roman^{a,b}

^aLung Transplantation Program, Servei de Pneumologia, Departament de Medicina, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, ^bCIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid and ^cServeis Centrals de Laboratori, Secció de Farmacologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Key words: cyclosporine – immunosuppression – intra-individual variability – lung transplantation – pharmacokinetics

Corresponding author: Alejandra Méndez, Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2746157; fax: +34 93 3746083; e-mail: alejandramendez2005@hotmail.com

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interests.

Accepted for publication 2 April 2014

Most immunosuppression regimens for lung transplant (LT) recipients are based on calcineurin inhibitors such as cyclosporine and tacrolimus. The introduction of cyclosporine was responsible for the initial success of LT in the early 1980s because it enabled use of a smaller corticosteroid dose and hence afforded superior wound healing (1).

Cyclosporine A (CsA) is not easy to use because it has a narrow therapeutic window, significant systemic side effects, and variable absorption within and between patients. For these reasons, CsA requires individualized monitoring of blood concentrations. Area under the plasma drug concentration–time curve (AUC) monitoring is the

reference standard for therapeutic drug monitoring, but it is expensive and not always practical. For this reason, most pharmacokinetic studies have been conducted with simplified AUCs, mainly the 0–4-h AUC ($AUC_{0-4\text{ h}}$) (2–7).

CsA absorption during the first four h post-dose represents the period of greatest variability among patients. Adequate CsA absorption during this period is important for effective rejection prophylaxis in the post-transplant phase. Although $AUC_{0-4\text{ h}}$ is a sensitive marker for CsA absorption, numerous analyses have evaluated CsA concentration at various time points to identify the single sample that provides the most accurate surrogate marker for $AUC_{0-4\text{ h}}$ (5, 6, 8, 9). These

Méndez et al.

analyses have consistently shown that the two h post-dose sampling point (C_2) correlates most closely with $AUC_{0-4\text{ h}}$ in both the early and later post-transplant periods. For this reason, use of the C_2 level is currently considered the best option for single-point CsA monitoring (2–7).

In addition to its narrow therapeutic window, CsA pharmacokinetics shows considerable interindividual and intra-individual variability, which obscures the relationship between therapeutic outcomes and the dose administered, and impedes the development of safe algorithms for CsA therapy (2). This variability may have repercussions on the evolution of the transplant, and it has been associated with acute and chronic rejection in renal transplantation (2, 7, 10). CsA is a highly lipophilic molecule with wide interpatient and inpatient variation in absorption. A multitude of factors can be responsible for the variability in CsA pharmacokinetics, including non-genetic biological and lifestyle-related factors (11–15), such as age, sex, body size, food intake (11), serum albumin concentration, hematocrit, coadministration of interacting drugs, and low- and high-density lipoprotein concentrations in blood (16, 17). Lipoproteins are the major complexing constituents for CsA in plasma; hence, changes in lipoprotein levels may influence the pharmacokinetic properties of CsA. For example, prednisolone induces an increase in plasma lipoprotein levels, and this has repercussions on the pharmacokinetic properties of CsA. In one study (18), a prednisolone dose >20 mg/d was found to explain 20% of the intra-individual variability in CsA pharmacokinetics. Yet, even when these factors are taken into account, a considerable part of the variability remains unexplained, and this may be attributable to genetic differences in CsA metabolism.

More than 90% of CsA is metabolized in the liver (19), mainly through CYP3A (20), whose major subfamilies are CYP3A4 and CYP3A5. Several studies have shown a relationship between some of these isoenzyme polymorphisms and the variability of CsA pharmacokinetics (18, 21–23).

There has been little study in the variability of CsA pharmacokinetics in stable LT recipients without cystic fibrosis, and its consequences are unknown. The aim of this study was to determine the intra-individual variability of CsA pharmacokinetics in LT patients and investigate the implications of this factor on CsA monitoring.

Patients and methods

A pharmacokinetic study was performed during the period of July 2004–2006. Ten consecutive LT

recipients without cystic fibrosis (two women and eight men) with a mean age of 58 yr (range, 54–64) were enrolled from a single center. The mean time since lung transplantation of the cohort was 856 d (range, 228–3007). The inclusion criteria were adult LT patients, more than 180 d of post-LT follow-up, and stable CsA dose. Patients with ongoing acute cellular rejection or acute cellular rejection in the previous three months and those with progressive chronic rejection were excluded. Furthermore, patients were excluded if they had clinical evidence of malignancies within the previous five yr (except for successfully treated non-metastatic basal or squamous cell carcinoma of the skin), systemic infection requiring treatment, severe diarrhea, vomiting, active peptic ulcer, or a gastrointestinal disorder that might affect CsA absorption. Additional exclusion criteria were uncontrolled hypercholesterolemia (≥ 350 mg/dL, 9.1 mmol/L) or hypertriglyceridemia (≥ 750 mg/dL, 8.5 mmol/L), white blood cell count of $<2500/\text{mm}^3$ or platelet count $<50\,000/\text{mm}^3$, and serum creatinine levels >2 mg/dL. None of the patients were using drugs with potential pharmacokinetic interactions with CsA.

Two patients had received a single LT and eight had received sequential double LTs. The patients' underlying diseases were emphysema in six cases, idiopathic pulmonary fibrosis in two, lymphangiomyomatosis in one, and bronchiolitis obliterans after bone marrow transplantation in one case.

All patients in the cohort were under the same treatment protocol, based on triple therapy with cyclosporine, azathioprine, and corticosteroids at a mean dose of 5 mg (range, 2–15). Cyclosporine microemulsion (Sandimmun Neoral) was started on day 1 following transplantation at a dose adjusted to trough blood levels at two h post-dose (C_2), that is, 600–900 ng/mL from 180 to 365 d and 600–800 ng/mL after the first year. Azathioprine was started within two wk after transplantation at a dose of 1–3 mg/kg/d, depending on white cell count and avoiding total leukocyte counts of less than $4.0 \times 10^9/\text{L}$. Methylprednisolone was started in the operating room at a dose of 10 mg/kg before graft reperfusion, followed by 375 mg/d the first day, and gradually tapering over the first year to reach a maintenance dose of 0.1–0.2 mg/kg/d for life.

Since transplantation, follow-up was carried out every 15–30 d during the first six months and every month thereafter up to the first year. During the first year, follow-up was carried out every two months up to the second year. At each visit, spirometry and analytical monitoring of CsA levels were performed.

Cyclosporine in lung transplantation

Three CsA pharmacokinetic profiles were determined in all except one patient, in whom only two profiles were performed. Whole blood samples for determination of pharmacokinetic profiles were obtained before CsA administration (C_0) and at one, two, three, four, five, six, seven, eight, and 12 h (C_{12}) after administration in all patients. Whole blood CsA concentrations were estimated using the EMIT 2000 Cyclosporine Specific Assay (Behring Diagnostics, Cupertino, CA, USA) on the COBAS MIRA PLUS analyzer. The highest measured whole blood CsA concentration (C_{max}) and the corresponding sampling time (T_{max}) were recorded. The linear trapezoidal rule was used to calculate the AUC between 0 and 4 h ($AUC_{0-4\ h}$), which represents the interval of time with greatest exposure to the drug, and between 0 and 12 h ($AUC_{0-12\ h}$), which represents the total exposure to the drug. The correlations between cyclosporine CsA concentration at each time point, $AUC_{0-4\ h}$, and $AUC_{0-12\ h}$ were also calculated. The intra-individual coefficient of variation (CV) for CsA obtained in all patients was determined using the formula: $CV = (SD/mean) \times 100$, in which SD is the standard deviation and mean is the mean value for $AUC_{0-12\ h}$. Patients were divided into two groups according to whether they presented a high CV ($\geq 20\%$) or low CV ($< 20\%$). The five yr post-transplantation survival rates were determined in the two groups.

The study protocol was approved by the Ethics Committee for Clinical Research of Hospital Universitari Vall d'Hebron (registered as PR (HG) 107/2003). Informed written consent was obtained from all patients taking part in this study.

Statistical analysis

Each single CsA value was correlated with the corresponding AUC using the Spearman correlation coefficient (r) (24, 25) to evaluate the best single time point measure for AUC estimation. The Mann-Whitney U -test was used to compare T_{max} , C_{max} , $AUC_{0-4\ h}$, and $AUC_{0-12\ h}$ in patients with low and high intra-individual CVs. Significance was set at a p-Value of < 0.05 .

Results

CsA pharmacokinetic profiles are shown in Fig. 1 and the parameters obtained in Table 1. Six of the 10 (60%) patients presented a low intra-individual CV and four patients (40%) a high CV. The median CV was 7.7% (range, 3.2–14.3%) in patients with a low CV and 24.8% (range, 20.8–28.6%) in those with a high CV ($p = 0.008$). The $AUC_{0-12\ h}$

and C_{max} values were higher in patients with a high CV than in the low CV group (5535 vs. 3575, $p = 0.002$, and 1490 vs. 946, $p = 0.100$, respectively) (Table 1).

The best correlations with the $AUC_{0-4\ h}$ were C_1 ($r = 0.836$, $p = 0.000$) and C_2 ($r = 0.810$, $p = 0.000$), both overall and in patients with high and low CVs (Table 2). In the case of the $AUC_{0-12\ h}$, however, the best overall correlation was with C_7 ($r = 0.649$, $p = 0.000$) (Table 3). Analysis according to CV values showed that in patients with a low CV, the best correlation was with C_2 ($r = 0.674$, $p = 0.002$), whereas in patients with a high CV, the best correlation was with C_5 ($r = 0.800$, $p = 0.003$). In this latter group, the correlation with C_2 was low ($r = 0.327$, $p = 0.32$), whereas the correlation with C_0 was high ($r = 0.709$, $p < 0.05$) (Table 3).

Five yr post-transplantation survival was two of four patients (50.0%) in the high CV group and six of six patients (100%) with a low CV ($p = 0.06$). Individual clinical data and outcomes at five yr of follow-up are summarized in Tables 4 and 5.

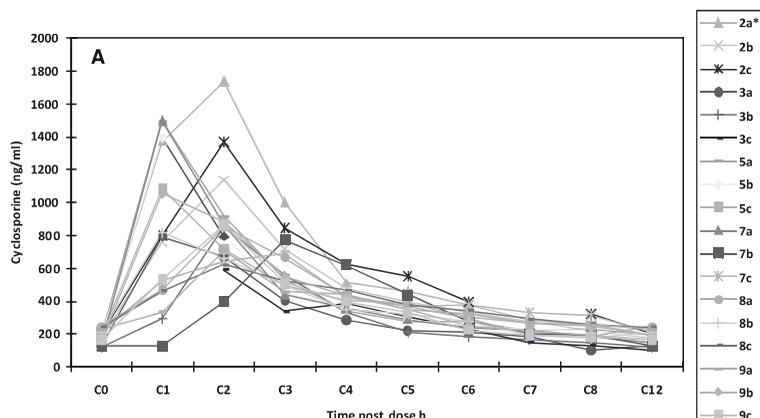
Discussion

The intra-individual variability of CsA pharmacokinetics has been investigated in solid organ transplant patients other than lung recipients (10, 26, 27). There are, however, few studies analyzing CsA variability and its implications for drug monitoring in stable LT patients without cystic fibrosis. In our study, 40% of LT patients showed high intra-individual variation in CsA pharmacokinetics. Kahan et al. reported similar data in kidney transplant recipients, who showed a mean intra-individual CV for CsA of 30% (2).

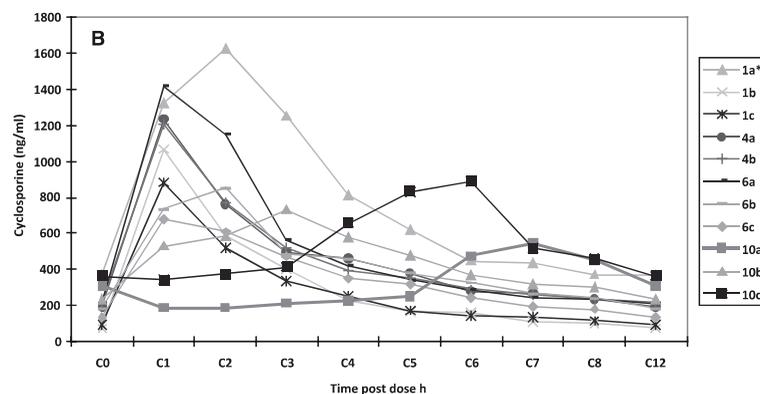
Several studies performed in transplant patients receiving different types of organs have shown that the $AUC_{0-4\ h}$ correlates best with the levels measured at two h following dosing (C_2) (5, 6, 9, 28, 29). Furthermore, various studies have shown that better results seem to be obtained by adjusting dosage to C_2 values. In kidney and liver transplantation, CsA monitoring at C_2 was predictive of acute rejection and nephrotoxicity (30), and in LT recipients, C_2 monitoring reduced the risk of CsA toxicity and incorrect dosing (31). There is now consensus regarding the fact that monitoring at C_2 is the best policy for adjusting CsA dosage (30).

Studies reporting that C_2 is the best parameter to adjust drug dosage use the $AUC_{0-4\ h}$ because it is considered that highest CsA exposure occurs in the first four h. However, $AUC_{0-12\ h}$ shows the complete exposure to the drug, and in this case, we found that the correlation with C_2 was weaker.

Méndez et al.



2a*: Corresponds to the first curve of patient 2, with successive numbering of patients and curves



1a*: Corresponds to the first curve of patient 1, with successive numbering of patients and curves

Fig. 1. (A) Pharmacokinetic profiles (AUC) of CsA (n = 18) in six lung transplant (LT) recipients with low coefficient of variation (CVs) (<20%). (B) Pharmacokinetic profiles (AUC) of CsA (n = 11) in four LT recipients with high CVs (≥20%).

Table 1. Overall results for pharmacokinetic parameters and comparison between patients with high and low CVs

Parameters	All patients median (range)	Low variability group (CV < 20%) median (range)	High variability group (CV ≥ 20%) median (range)	p
C_{max} , ng/mL	1021 (543–1736)	946 (621–1736)	1490 (543–1625)	0.10
T_{max} , hours	2 (1–7)	1.6 (1–3)	1.5 (1–7)	0.715
$AUC_{0-4 h}$, ng*h/mL	2488 (850–4460)	2853 (1672–4460)	2273 (505–4795)	0.564
$AUC_{0-12 h}$, ng*h/mL	4494 (2927–6249)	3575 (2927–6249)	5535 (2934–6079)	0.002

CV, coefficient of variation; C_{max} , maximum concentration; T_{max} , time to maximum concentration; $AUC_{0-4 h}$, area under the curve from 0 to 4 h; $AUC_{0-12 h}$, area under the curve from 0 to 12 h.

These differences between the $AUC_{0-4 h}$ and $AUC_{0-12 h}$ may be due to the fact that patients with high CVs also show considerable exposure to the drug in the last hours following dosing, as can be seen in their pharmacokinetic profiles (Fig. 1). Therefore, monitoring according to C_2 values may not be optimal in patients with high intra-individual variability. Instead, the classic monitoring according to C_0 may be more appropriate in these specific cases. It would be beneficial to identify

them by performing 12-h pharmacokinetic curves. Once they have been identified, their management could include monitoring by C_0 levels or the use of calcineurin inhibitors subject to less variability, such as tacrolimus.

In the present study, survival was lower in patients with high CVs, although several factors can contribute to the problems of CsA drug monitoring in these patients. The aim of this study was not to analyze survival in the patients included,

Cyclosporine in lung transplantation

Table 2. Correlation between the AUC_{0-4 h} and CsA concentration at different time points

Time	All patients	Low variability group (CV < 20)	High variability group (CV ≥ 20)
C ₀	-0.004	0.086	-0.009
C ₁	0.836**	0.821**	0.936**
C ₂	0.810**	0.797**	0.891**
C ₃	0.336	0.017	0.745**
C ₄	0.155	0.071	0.273

CV, coefficient of variation.

**Significant correlation at 0.01.

Table 3. Correlation between the AUC_{0-12 h} and CsA concentration at different time points

Time	All patients	Low variability group (CV < 20)	High variability group (CV ≥ 20)
C ₀	0.549**	0.387	0.709*
C ₁	0.465*	0.662**	0.282
C ₂	0.529**	0.674**	0.327
C ₃	0.440*	0.292	0.600
C ₄	0.577**	0.333	0.764**
C ₅	0.604**	0.373	0.800**
C ₆	0.621**	0.585*	0.618*
C ₇	0.649**	0.664**	0.564
C ₈	0.648**	0.658**	0.620*
C ₁₂	0.610**	0.486*	0.709*

CV, coefficient of variation.

*Significant correlation at 0.05.

**Significant correlation at 0.01.

and multivariate analysis of potential factors affecting survival was not performed. Nonetheless, it was surprising that survival in patients with high CsA CVs was much worse than in those with low CVs. Some studies have related intra-individual variability with treatment efficacy. Kahan et al.

Table 4. Individual clinical data and outcome over five yr of follow-up

Patients	CV, %	CMV	Kidney dysfunction ^a	Acute rejection ^b	Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) ^c	Death (cause)
1	≥20	Infection	No	No	Yes	Yes (CLAD)
2	<20	No	Yes	No	No	No
3	≥20	Infection	Yes	Yes	Yes	No
4	<20	No	Yes	No	No	No
5	<20	Pneumonitis	Yes	No	Yes	No
6	≥20	No	No	Yes	Yes	No
7	<20	No	Yes	Yes	No	No
8	<20	No	Yes	No	Yes	No
9	<20	No	Yes	Yes	No	No
10	≥20	Pneumonitis	Yes	Yes	No	Yes (renal failure)

CMV, cytomegalovirus.

^aGlomerular filtration rate <60 mL/min.^bBiopsy proven.^cIncluding bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome.

Table 5. Overall results for clinical parameters between patients with high and low CVs over five yr of follow-up

	CV ≥ 20%	CV < 20%	Yates' correction (p)
CMV (%)	3/4 (75)	1/6 (17)	0.236
Kidney dysfunction (%)	2/4 (50)	6/6 (100)	0.259
Acute rejection (%)	3/4 (75)	2/6 (33)	0.519
Chronic lung allograft dysfunction (%)	3/4 (75)	2/6 (33)	0.519
Death (%)	2/4 (50)	0/6 (0)	0.259

CMV, cytomegalovirus; CV, coefficient of variation.

(32) reported that exposure and the degree of day-to-day variability in exposure are predictive of the incidence of acute and chronic rejection in renal transplant recipients. Thus, patients with high intra-individual variability may have a poorer prognosis.

In summary, a large percentage of LT recipients show high intra-individual variability in CsA pharmacokinetics. Standard drug monitoring according to C₂ levels may not be appropriate in these patients, and the use of C₀ levels may remain the best choice. Difficulties in monitoring to determine correct CsA dosage may be a factor influencing survival in these patients. Larger studies are needed to confirm these findings.

Acknowledgments

This study was supported by an unrestricted grant from Novartis Pharma.

Authors' contributions

A. Méndez: Performed the study, collected data, analyzed data, and wrote the paper; V. Monforte:

Méndez et al.

Designed the study, analyzed data, and wrote the paper; C. Berastegui, M. López-Meseguer, and C. Bravo: Collected data; L. Pou: Analyzed data; A. Roman: Contributed to the study design.

References

1. TORONTO LUNG TRANSPLANT GROUP. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1986; 314: 1140.
2. KAHAN BD, WELSH M, SCHOENBERG L et al. Variable oral absorption of cyclosporine. A biopharmaceutical risk factor for chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1996; 62: 599.
3. KAHAN BD, DUNN J, FITTS C et al. Reduced inter- and in-trasubject variability in cyclosporine pharmacokinetics in renal transplant recipients treated with a microemulsion formulation in conjunction with fasting, low-fat meals, or high-fat meals. *Transplantation* 1995; 59: 505.
4. NASHAN B, COLE E, LEVY G, THERVET E. Clinical validation studies of neoral C(2) monitoring: a review. *Transplantation* 2002; 73: S3.
5. CANTAROVICH M, BESNER JG, BARKUN JS, ELSTEIN E, LOERTSCHER R. Two-hour cyclosporine level determination is the appropriate tool to monitor neoral therapy. *Clin Transplant* 1998; 12: 243.
6. GRANT D, KNETEMAN N, TCHERVENKOV J et al. Peak cyclosporine levels (C_{max}) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomized comparison of neoral and sandimmune for liver transplantation (NOF-8). *Transplantation* 1999; 67: 1133.
7. LINDHOLM A, KAHAN BD. Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and auc monitoring on outcome after kidney transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 54: 205.
8. MAHALATI K, BELITSKY P, SKETRIS I, WEST K, PANEK R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation* 1999; 68: 55.
9. KELLES A, HERMAN J, TJANDRA-MAGA TB, VAN DAMME-LOMBAERTS R. Sandimmune to neoral conversion and value of abbreviated AUC monitoring in stable pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant* 1999; 3: 282.
10. KAHAN BD, WELSH M, URBAUER DL et al. Low intraindividual variability of cyclosporin a exposure reduces chronic rejection incidence and health care costs. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1122.
11. MCMILLAN MA. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Pharmacol Ther* 1989; 42: 135.
12. ROSENBAUM SE, BAHETI G, TRULL AK, AKHLAGHI F. Population pharmacokinetics of cyclosporine in cardiopulmonary transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 116.
13. UBHI CS, WOODHOUSE L, GILES GR. Interaction of intravenous methylprednisolone with oral cyclosporin. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5: 376.
14. DUCHARME MP, WARBASSE LH, EDWARDS DJ. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57: 485.
15. HEBERT MF, ROBERTS JP, PRUEKSARITANONT T, BENET LZ. Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 52: 453.
16. AKHLAGHI F, TRULL AK. Distribution of cyclosporin in organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 615.
17. WASAN KM, PRITCHARD PH, RAMASWAMY M, WONG W, DONNACHIE EM, BRUNNER LJ. Differences in lipoprotein lipid concentration and composition modify the plasma distribution of cyclosporine. *Pharm Res* 1997; 14: 1613.
18. PRESS RR, PLOEGER BA, DEN HJ et al. Explaining variability in cyclosporin exposure in adult kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66: 579.
19. VENKATARAMANAN R, STARZL TE, YANG S et al. Biliary excretion of cyclosporine in liver transplant patients. *Transplant Proc* 1985; 17: 286.
20. AOYAMA T, YAMANO S, WAXMAN DJ et al. Cytochrome P-450 HPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. CDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of CDNA-expressed HPCN1 and HPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *J Biol Chem* 1989; 264: 10388.
21. CHOWBAY B, CUMARASWAMY S, CHEUNG YB, ZHOU Q, LEE EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 89.
22. BARNARD JB, RICHARDSON S, SHELDON S et al. The MDR1/ABCB1 gene, a high-impact risk factor for cardiac transplant rejection. *Transplantation* 2006; 82: 1677.
23. BALRAM C, SHARMA A, SIVATHASAN C, LEE EJ. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 78.
24. LEUNG CB, SZETO CC, HO CS, LAW WK, LAM CW, LI PK. Pharmacokinetic advantages of two-hour post-dose cyclosporin a level for the therapeutic drug monitoring in stable chinese kidney transplant recipients. *Nephron Clin Pract* 2005; 99: C68.
25. HARDINGER KL, PARK JM, SCHNITZLER MA, KOCH MJ, MILLER BW, BRENNAN DC. Pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients: twice daily versus once daily dosing. *Am J Transplant* 2004; 4: 621.
26. OHLMAN S, LINDHOLM A, HAGGLUND H, SAWE J, KAHAN BD. On the intraindividual variability and chronobiology of cyclosporine pharmacokinetics in renal transplantation. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; 44: 265.
27. JOHNSTON A, DAVID OJ, COONEY GF. Pharmacokinetic validation of neoral absorption profiling. *Transplant Proc* 2000; 32: 53s.
28. DUNN S, FALKENSTEIN K, COONEY G. Neoral C(2) monitoring in pediatric liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2001; 33: 3094.
29. JAKSCH P, KOCHER A, NEUHAUSER P et al. Monitoring C2 level predicts exposure in maintenance lung transplant patients receiving the microemulsion formulation of cyclosporine (neoral). *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1076.
30. LEVY G, THERVET E, LAKE J, UCHIDA K. Patient management by neoral C(2) monitoring: an international consensus statement. *Transplantation* 2002; 73: S12.
31. MORTON JM, ABOYOUN CL, MALOUF MA, PLIT ML, GLANVILLE AR. Enhanced clinical utility of de novo cyclosporine C2 monitoring after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 1035.
32. KAHAN BD. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine: 20 years of progress. *Transplant Proc* 2004; 36: 378s.

CLINICAL AND TRANSLATIONAL RESEARCH

Pharmacokinetic Study of Conversion from Tacrolimus Twice-Daily to Tacrolimus Once-Daily in Stable Lung Transplantation

Alejandra Méndez,^{1,2,4} Cristina Berastegui,^{1,2} Manuel López-Meseguer,^{1,2} Víctor Monforte,^{1,2}
Carlos Bravo,^{1,2} Albert Blanco,³ Silvia Camós,³ Leonor Pou,³ and Antonio Roman^{1,2}

Background. Tacrolimus twice-daily (TAC BID) is widely used in lung transplantation (LT), but there are little data on the use of tacrolimus once-daily (TAC QD) in this population. The objective of this study was to compare the pharmacokinetics (PK) of TAC BID and TAC QD in stable, adult LT patients.

Methods. Phase II, open-label, single-center, single-arm, prospective pilot PK study. Nineteen LT recipients with more than 6 months of postoperative follow-up and on TAC BID-based therapy were converted to TAC QD on a 1:1 (mg/mg) basis. Patients had been stable during the previous 3 months, and cystic fibrosis patients were excluded. One 24-hr PK profile was obtained on day -14 while patients were under TAC BID. A second PK profile was obtained 14 to 28 days after switching (day 0) to the same dose of TAC QD. Pre- and post-switch 24-hr PK profiles were compared.

Results. Mean $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ was 279.8 ng mL/hr for TAC BID and 278.7 ng mL/hr for TAC QD ($P=0.92$). $AUC_{0-12 \text{ hr}}$ of TAC BID was higher than the $AUC_{12-24 \text{ hr}}$. There was a good correlation between $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ and C_{24} for both QD ($r=0.96$) and BID ($r=0.94$) formulations. There were no differences in the adverse events occurring with the two formulations.

Conclusions. Tacrolimus bioavailability in steady state is similar in BID and QD formulations after conversion in stable LT recipients, excluding those with cystic fibrosis. Thus, our results indicate TAC BID can be safely switched to the more convenient QD formulation in this population.

Keywords: Lung transplantation, Pharmacokinetics, Tacrolimus once-daily.

(*Transplantation* 2014;97: 358–362)

Tacrolimus is a potent immunosuppressive agent that is used worldwide in liver, heart, kidney, and lung transplantation (LT). Tacrolimus was first marketed in a twice-daily formulation (TAC BID) and it has been extensively used for nearly three decades in this form. More recently, a

once-daily form of tacrolimus (TAC QD) has come onto the market. Tacrolimus has a narrow therapeutic window and its bioavailability is subject to variability between patients (1, 2). In contrast to TAC BID (Prograf), TAC QD (Advagraf) has a modified galenic formulation, allowing once-daily drug intake. TAC QD was designed to provide an area under the concentration–time curve from 0 to 24 hr ($AUC_{0-24 \text{ hr}}$) similar to that of TAC BID with equivalent efficacy and safety (3, 4). Pharmacokinetic (PK) data on TAC QD in healthy volunteers show a time to maximum plasma concentration (T_{max}) of about 120 to 180 min and a half-life of 36.1 to 40.9 hr (3, 5, 6). Comparison of the $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ between formulations in healthy individuals has shown lower exposure (median 10%) with TAC QD (6). Published data in recipients of certain solid organ transplants have shown some differences in $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ between the two formulations (2, 7–10). There are no reported data on the PK of these formulations in the stable LT population.

The rationale for the simplified approach is the fact that patients are generally more compliant with once-daily treatment regimens than with twice-daily dosing. An improvement in adherence may possibly increase graft survival (11). Furthermore, slower release of tacrolimus may provide a better safety profile by avoiding toxic peak concentrations (12).

Two studies have shown that the relationship between $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ and trough (C_{24}) levels are similar for TAC QD

This study was partially funded by Astellas Pharma.

The authors declare no conflicts of interest.

¹ Lung Transplantation Program, Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

² CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

³ Serveis Centrals de Laboratori, Secció de Farmacologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

⁴ Address correspondence to: Alejandra Méndez, M.D., Lung Transplantation Program, Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

E-mail: alejandramendez2005@hotmail.com

A.M. and A.R. participated in the research design, performance of the research, and writing of the article. C.B., M.L.-M., V.M., and C.B. participated in the performance of the research. A.B. and S.C. participated in the data analysis.

L.P. participated in the research design and data analysis.

Received 4 July 2013. Revision requested 31 July 2013.

Accepted 28 August 2013.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/14/9703-358

DOI: 10.1097/01.tp.0000435699.69266.66

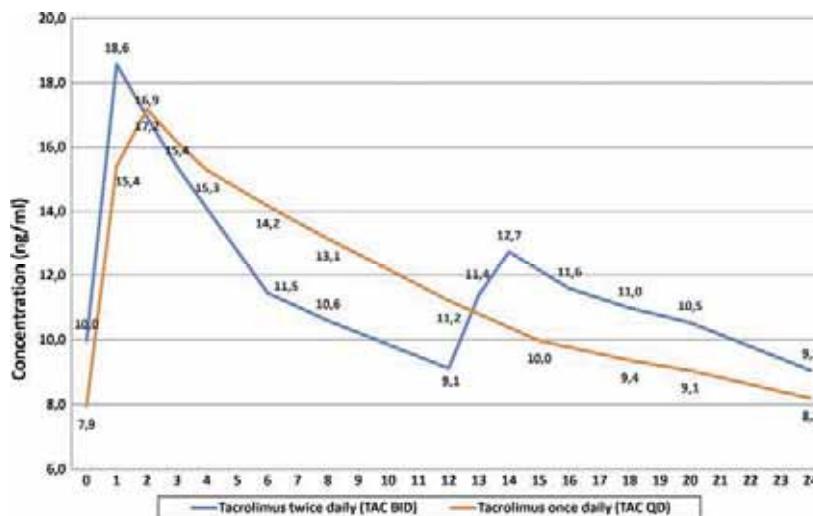


FIGURE 1. AUC of TAC BID and TAC QD in 19 LT patients.

and TAC BID (3, 4). This fact supports the use of the same therapeutic monitoring arrangements for both tacrolimus formulations. Previous studies have confirmed that correlations between the $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ and C_{24} are comparable in TAC BID and TAC QD in stable kidney, heart, and liver transplant recipients (1, 2, 7). The objective of this study was to evaluate and compare the PK of TAC BID and TAC QD in stable LT patients.

RESULTS

All 19 patients recruited completed the study. The mean (SD) $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ value was 279.8 (57.7) ng mL/hr in TAC BID and 278.7 (52.5) ng mL/hr in TAC QD ($P=0.92$) (Fig. 1). There were no statistically significant differences between TAC BID and TAC QD when analyzing the $C_{\text{max}0-24 \text{ hr}}$ and $C_{\text{min}0-24 \text{ hr}}$

values. $T_{\text{max}0-12 \text{ hr}}$ was 1.5 (0.9) hr for TAC BID and 3 (1.9) hr for TAC QD. TAC BID and TAC QD PK parameters are shown in Table 1.

Correlations between $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ and drug concentrations were strong ($r>0.7$) at most time points for both TAC BID and TAC QD (Table 2). An excellent correlation was found between $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ and C_{min} for both drug formulations.

Tacrolimus dosage was modified as follows: mean daily dose of TAC BID before switching (day -14) was 4.8 ± 2.2 mg. After conversion to QD, mean daily dose was increased to 5.2 ± 2.6 , 5.4 ± 3.0 , and 5.6 ± 3.1 mg on days +60, +90 and +180, respectively. In 3 (15.8%) patients, the tacrolimus dose was modified between the switch to TAC QD and the second PK study. This dose modification performed between the first and second PK studies was found to be unnecessary in all cases

TABLE 1. Comparison between PK parameters of TAC BID and TAC QD in 19 LT recipients

	TAC BID			TAC QD			P^a
	Mean (SD)	Range	90% CI	Mean (SD)	Range	90% CI	
$C_{\text{max}0-12}$	19.8 (4.4)	9.3–26.1	17.6–21.9				
$C_{\text{max}12-24}$	14.1 (4.0)	8.9–24	12.1–16.1				
$C_{\text{max}0-24}$	20.1 (4.0)	13–26.1	18.1–22.1	19.1 (3.2)	15.6–27.1	17.5–20.6	0.7482
$C_{\text{min}0-12}$	8.6 (2.0)	4.5–11.5	7.6–9.6				
$C_{\text{min}12-24}$	8.5 (2.1)	4.8–11.5	7.5–9.6				
$C_{\text{min}0-24}$	8.3 (2.0)	4.5–11.5	7.3–9.2	7.7 (2.0)	5.2–11.5	6.7–8.6	0.7131
$T_{\text{max}0-12}$	1.5 (0.9)	0–3	1.1–2.0				
$T_{\text{max}12-24}$	15.7 (2.6)	12–20	14.5–17.0				
$T_{\text{max}0-24}$	3.0 (4.2)	1–16	1.0–5.0	3.0 (1.9)	1–8	2.1–3.9	0.0952
	AUC			AUC			P^b
AUC_{0-12}	184.6 (44.0)	—	—	—	—	—	—
AUC_{12-24}	149.9 (29.3)	—	—	—	—	—	—
AUC_{0-24}	279.8 (57.7)	—	—	278.7 (52.5)	—	—	0.9217

^a Schuirmann unilateral double t test.

^b Wilcoxon test.

TABLE 2. Correlation between AUC_{0–24} and concentration at different time points for TAC BID and TAC QD

	Coefficient (r)	P
TAC QD		
C ₀	0.8576	<0.0001
C ₁	0.2440	0.3141
C ₂	0.4637	0.0455
C ₄	0.7170	0.0006
C ₆	0.9139	<0.0001
C ₈	0.8859	<0.0001
C ₁₂	0.9207	<0.0001
C ₁₅	0.9580	<0.0001
C ₁₈	0.8780	<0.0001
C ₂₀	0.9716	<0.0001
C ₂₄	0.9653	<0.0001
TAC BID		
C ₀	0.4951	0.0312
C ₁	0.5205	0.0223
C ₂	0.7301	0.0004
C ₃	0.8881	<0.0001
C ₆	0.9008	<0.0001
C ₈	0.9358	<0.0001
C ₁₂	0.8707	<0.0001
C ₁₃	0.8422	<0.0001
C ₁₄	0.6176	0.0048
C ₁₆	0.8915	<0.0001
C ₁₈	0.8701	<0.0001
C ₂₀	0.9249	<0.0001
C ₂₄	0.9388	<0.0001

because exposure to tacrolimus was similar when the two AUC values were compared. When the AUC_{0–24 hr} was calculated, the dose variations were corrected. In summary, eight patients were under the same dose after 6 months; in four patients, the dose was slightly decreased (1 mg/day); in four patients, it was slightly increased (1 mg/day); and in only three patients, it was increased by more than 1 mg per day after 6 months of follow-up. Concomitant medication that potentially interacts with tacrolimus included azitromicine 250 mg three times a week and cotrimoxazole 480 mg per day for life that all patients received. Patients do not receive other drugs that could interact with tacrolimus.

All patients survived during the study period. Switching was safe and well tolerated by all individuals. Regarding adverse events, 0.16 events per patient per month of follow-up were recorded during TAC BID treatment and 0.26 events per patient per month during TAC QD (Table 3). Three adverse events were considered severe. In one patient, urinary sepsis occurred 2 months after conversion and acute cholecystitis at 5 months, which required cholecystectomy. Another patient had an ischemic brain attack 2 months after switching, and the third had acute lithiasic pyelonephritis 5 months after switching. None of these cases of severe adverse events, which all required hospitalization, were considered related to the tacrolimus formulation change. Regarding immunologic

complications, one patient had chronic allograft dysfunction due to bronchiolitis obliterans syndrome 4 months after conversion. There were no episodes of acute cellular rejection (ACR).

The present study provides direct evidence that tacrolimus exposure is similar when the BID formulation is converted to QD on a 1:1 (mg/mg) total daily dose basis in stable adult LT recipients. This is the first study on tacrolimus PK performed in the stable LT population, and the findings are in accordance with various studies conducted in stable recipients of other solid organs. In renal transplantation, a multicenter prospective PK study reported that approximately 70% of patients converted to TAC QD did not require dose adjustment because the two formulations were equivalent (1). In contrast, in another study in renal transplant recipients, Hardinger et al. (10) concluded that the dose should be decreased to 85% of the initial BID treatment after conversion. The authors justified this conclusion by hypothesizing that there is greater absorption of the drug during the morning with TAC QD. Another study in kidney transplantation supported the idea that dose should be increased after switching to TAC QD and that the increase, which could be as high as 30%, depends on time since transplantation (10). This study was retrospective, however, and did not investigate PK profiles to analyze the true differences in tacrolimus exposure with the two formulations. Another study in kidney transplantation also supported the idea of increasing the dose, in this case, by more than 20% (13). With regard to liver and heart transplantation, the most widespread opinions support our study findings. In one multicenter study including stable liver transplant recipients, the authors demonstrated that tacrolimus can be safely switched from BID dosing to the

TABLE 3. Adverse events occurring during the study

Adverse event	n	Severe
Nausea	1	No
Diarrhea	4	No
Abdominal pain	1	No
Weight gain	1	No
Erythema	1	No
Pruritus	1	No
Cataracts and ocular discomfort	3	No
Tremor	3	No
Movement disorder	1	No
Sciatica	1	No
Transient ischemic attack	1	Yes
Hypertension	1	No
Peripheral edema	3	No
Insomnia	1	No
Decreased libido	1	No
Pyelonephritis	1	Yes
Acute cholecystitis and urinary sepsis	1	Yes
Cough, pharyngitis, and bronchitis	5	No
Cutaneous papilloma virus infection	1	No
Cutaneous fungal infection	1	No

same 1:1 daily QD dose in the morning. Approximately 80% of patients who converted to TAC QD did not require dose adjustment after switching (14). In heart transplantation, an initial retrospective study supported the idea that switching to a 25% higher dose of TAC QD than BID maintained both safety and efficacy (7). The most relevant prospective multicenter study performed in heart transplantation provided strong evidence for successful conversion from TAC BID to TAC QD on a 1:1 (mg/mg) total daily dose basis, although one third of patients may require dose adjustment after conversion (2). The present study performed in LT recipients supports the idea that tacrolimus bioavailability is similar when the same daily dose is given BID or QD. At completion of the study, the mean dose in the total cohort was found to be somewhat increased, but further analysis showed that only one third of patients had an actual dose increase, whereas, in the remaining two thirds, the dose given was the same or lower than the original BID dose. These dose modifications were decided solely based on clinical reasons because there were no PK reasons for the change. Although our results clearly support the concept that the two tacrolimus formulations provide virtually the same drug exposure, clinicians are influenced by the pre-dose level (C_0) when making decisions, and this level was slightly lower with TAC QD; hence, in practice, this might be the reason for some unnecessary dose increases.

Our study documented a good correlation and similar relationship between the $AUC_{0-24\text{ hr}}$ and C_{\min} . This indicates that monitoring whole-blood measurement of trough concentration as the reference level provides a good estimation of systemic exposure to tacrolimus and that this could be the target value for both formulations. In our study, we considered C_{\min} to be the C_{24} determination, because it was the pre-dose concentration that we could assure was determined exactly 12 hr after the last dose in the case of TAC BID. We found a low correlation between C_0 and $AUC_{0-24\text{ hr}}$ for TAC BID, which we believe is mainly due to the lack of coordination of the 12 hr between nocturnal home dose intake (exact time influenced by patient preferences) and the next-morning hospital dose. Nonetheless, this could also be the case in daily clinical practice. However, a good correlation was obtained for C_0 and $AUC_{0-24\text{ hr}}$ for TAC QD despite this possible issue. This finding supports the potential benefit of one-dose tacrolimus treatment leading to better monitoring of drug levels. TAC QD C_{\max} did not reach the bounds for equivalences, and T_{\max} for QD was longer than for TAC BID. These results reflect the prolonged-release characteristics of the QD formulation and are similar to those reported in previous studies of the two formulations (2, 8, 9). Differences between $AUC_{0-12\text{ hr}}$ and $AUC_{12-24\text{ hr}}$ in the case of TAC BID observed in the present study are in accordance with previous published studies (10). The current hypothesis that could explain the lower evening AUC is the decreased oral bioavailability of tacrolimus when taken with food.

The adverse events occurring with the two formulations were similar when corrected by time of exposure to the drug. In addition, serum creatinine levels remained stable after conversion to TAC QD, and there were no new cases of posttransplantation diabetes or any increase in adverse events associated with tacrolimus use after switching. This underscores the safety of switching to QD in LT patients.

A potential limitation of the study design is the short follow-up period (6 months), which is insufficient to show differences in efficacy between TAC BID and TAC QD, although our PK results support an absence of efficacy differences. Also of note was the exclusion of patients with cystic fibrosis (CF) due to the known irregular intestinal absorption in those patients. In keeping with findings from previous authors (15–17), we believe that CF patients should be considered as a separate population.

In summary, the results of this study show that the steady-state tacrolimus exposure and target trough level range of QD tacrolimus are equivalent to BID tacrolimus after conversion to QD dosing in stable LT recipients. In addition, the high correlation between tacrolimus residual blood levels and AUC_{0-24} for both the BID and QD formulations indicates that the simplified therapeutic monitoring system currently used for TAC BID may also be feasible for patients receiving TAC QD. It is likely that a once-daily dose regimen of tacrolimus will improve patient compliance with treatment while effective immunosuppression is maintained. Future studies in the CF population and in the early postoperative period will provide more information about the efficacy and safety of this strategy.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Setting

This is a phase II, open-label, single-center, single-arm, prospective, pilot PK study (registered as TX PULMON 09/2009-015863-15). The study was performed in stable adult LT recipients receiving TAC BID at the time of screening and switched to TAC QD. Patients were enrolled in a single LT center at Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). The study was approved by the local ethics committee and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Each patient gave written informed consent before enrolment in the study.

Objectives and Endpoints

The purpose of this study was to establish and compare the PK profile of tacrolimus in stable adult LT patients before and after conversion (1:1) from BID to QD dosing. The primary endpoint was the comparison of tacrolimus $AUC_{-24\text{ hr}}$ under steady-state conditions administered BID or QD. Secondary endpoints were the incidence of biopsy-proven ACR at 6 months after conversion and the safety assessment, which included all adverse events from baseline to the end of the study evaluated by patient interview and laboratory findings.

Study Population

The study included 19 stable adult LT patients with a mean (range) age of 49 (40–62) years, 9 (47.4%) of whom were women. The inclusion criteria were adult LT patients, more than 180 days of post-LT follow-up, and stable tacrolimus dose with C_0 between 5 and 15 ng/mL. CF patients, patients with ongoing ACR or ACR in the previous 3 months, and those with progressive chronic rejection were excluded. Furthermore, patients were excluded if they had clinical evidence of malignancies within the previous 5 years (except nonmetastatic basal or squamous cell carcinoma of the skin that had been treated successfully), systemic infection requiring treatment, severe diarrhea, vomiting, active peptic ulcer, or a gastrointestinal disorder that might affect tacrolimus absorption. Additional exclusion criteria were elevated serum glutamic-pyruvic transaminase/alanine aminotransferase or serum glutamic-oxalacetic transaminase/aspartate aminotransferase, total bilirubin levels at least three times over the upper limit of the normal laboratory range, and serum creatinine levels more than 2 mg/dL.

Two (10.5%) patients had received a single LT and 17 (89.5%) received a sequential double LT. Underlying diseases were emphysema in 9 (47.4%), lymphangioliomyomatosis in 4 (21.1%), idiopathic pulmonary fibrosis in

3 (15.8%), and bronchiolitis obliterans, pulmonary arterial hypertension, and pulmonary alveolar proteinosis in 1 patient each.

The average (range) time from LT to enrolment in the study was 31.1 (8.2–128.7) months. The patients' immunosuppressive protocol included tacrolimus, one antimetabolite drug (mycophenolate mofetil [MMF], mycophenolic acid, or azathioprine), and corticosteroids. Induction therapy was not used. Oral or sublingual tacrolimus was started on day 1 and dose was adjusted to a pre-dose level ranging from 5 to 15 ng/mL (MEIA, Imx auto-analyzer; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Between 1 and 2 g per day of oral MMF was started during the first postoperative week. In the case of side effects, particularly gastrointestinal problems, MMF was switched to mycophenolic acid or azathioprine. Corticosteroids were started in the operating room and before initiating lung perfusion. The initial dose was 10 mg/kg followed by 6 mg/kg the first postoperative day. This drug was decreased to 0.5 mg/kg during the first week, and dose ranged from 0.5 to 0.1 mg/kg per day thereafter. At the time of recruitment, concomitant immunosuppression included prednisolone (n=19), MMF (n=10), mycophenolic acid (n=7), and azathioprine (n=2).

At the time of enrolment and during the baseline assessment, patients were under TAC BID, which continued for 30 days. On day 31, the study medication was converted on a 1:1 (mg/mg) total daily dose basis to TAC QD administered in the mornings. TAC BID and TAC QD were swallowed with fluid, preferably water, on an empty stomach or at least 1 hr before or 2 to 3 hr after a meal. Total daily doses were adjusted when deemed necessary for clinical reasons to maintain pre-dose whole-blood tacrolimus at levels within 5 to 15 ng/mL. For the purposes of study, patient follow-up was recorded during the next 6 months after switching.

Spirometry was performed per protocol before switching at -28, -14, and -1 days and after switching at 14, 28, 60, 90, and 180 days and every 3 months thereafter. The possibility of ACR was investigated based on clinical suspicion and/or spirometric deterioration. Only biopsy-proven episodes of ACR were reported.

PK Profiles and Sampling

The PK study consisted of two 24-hr PK blood curves, one under TAC BID obtained 14 days before switching and the second 2 to 4 weeks after switching to TAC QD. The PK parameters compared were $AUC_{0-24 \text{ hr}}$, C_{\min} , and T_{\max} . We obtained whole-blood tacrolimus levels before switching (baseline, C_0) as well as at -28, -14, and -1 days and at 7, 14, 28, 60, 90, and 180 days thereafter. Tacrolimus levels were analyzed by immunoassay with nonspecific monoclonal antibody (MEIA, Imx autoanalyzer; Abbott Laboratories).

For the purposes of the study, recruited patients were hospitalized twice, and at each admission, a 24-hr PK profile was performed, one during TAC BID treatment phase and another during TAC QD. For TAC BID, whole-blood samples were collected before BID dosing (hr 0) and at 1, 2, 3, 6, 8, 12, 13, 14, 16, 18, 20, and 24 hr. The 12-hr sample was taken before the second BID dose in the evening. For TAC QD, samples were collected before QD dosing (hr 0) and at 1, 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18, 20, and 24 hr. Thus, samples were obtained at 13 time points in 24 hr for TAC BID and at 11 time points in 24 hr for TAC QD (Fig. 1). The following PK parameters were calculated: $AUC_{0-24 \text{ hr}}$, C_{\max} , C_{\min} , and T_{\max} .

Statistical Analysis

$AUC_{0-24 \text{ hr}}$ was estimated using the linear trapezoidal method. Standard PK parameters were calculated for each patient using a noncompartmental approach. C_{\max} , T_{\max} , and C_{\min} were obtained directly from the 24-hr concentration-time profiles. Each single tacrolimus value was correlated with the corresponding AUC using the Spearman correlation coefficient. Comparison of $AUC_{0-24 \text{ hr}}$, C_{\max} , T_{\max} , and C_{\min} values between TAC BID and TAC QD was carried out using the Schuirmann unilateral double t test. In addition, repeated-measures analysis of variance (ANOVA) with logarithmic transformation was performed to compare C_{\max} and C_{\min} values. The ANOVA residual error was used to calculate the 90% confidence intervals (CI)

and the Schuirmann unilateral double t test. T_{\max} comparisons were carried out using the Wilcoxon's nonparametric test after logarithmic transformation.

Parametric (Student's t or ANOVA) or nonparametric (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis) tests were used for comparing quantitative variables depending on the characteristics of each variable. Finally, chi-square tests were conducted for qualitative variables.

Results are reported as the mean and SD or percentage, when appropriate. All calculations were performed using SAS for Windows (version 9.2). Bilateral tests were used, with a statistical significance level of 0.05.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Josep Roman, BSC, for his critical review of the article.

REFERENCES

1. Alloway R, Steinberg S, Khalil K, et al. Conversion of stable kidney transplant recipients from a twice daily Prograf-based regimen to a once daily modified release tacrolimus-based regimen. *Transplant Proc* 2005; 37: 867.
2. Alloway R, Vanhaecke J, Yonan N, et al. Pharmacokinetics in stable heart transplant recipients after conversion from twice-daily to once-daily tacrolimus formulations. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 1003.
3. First MR. First clinical experience with the new once-daily formulation of tacrolimus. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 159.
4. Chisholm MA, Middleton MD. Modified-release tacrolimus. *Ann Pharmacother* 2006; 40: 270.
5. First MR, Fitzsimmons WE. Modified release tacrolimus. *Yonsei Med J* 2004; 45: 1127.
6. Barraclough KA, Isbel NM, Johnson DW, et al. Once- versus twice-daily tacrolimus: are the formulations truly equivalent? 2011; 71: 1561.
7. Florman S, Alloway R, Kalayoglu M, et al. Conversion of stable liver transplant recipients from a twice-daily Prograf-based regimen to a once-daily modified release tacrolimus-based regimen. *Transplant Proc* 2005; 37: 1211.
8. Włodarczyk Z, Squifflet JP, Ostrowski M, et al. Pharmacokinetics for once- versus twice-daily tacrolimus formulations in de novo kidney transplantation: a randomized, open-label trial. *Am J Transplant* 2009; 9: 2505.
9. Fischer L, Truncka P, Gridelli B, et al. Pharmacokinetics for once-daily versus twice-daily tacrolimus formulations in de novo liver transplantation: a randomized, open-label trial. *Liver Transpl* 2011; 17: 167.
10. Hardinger KL, Park JM, Schnitzler MA, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients: twice daily versus once daily dosing. *Am J Transplant* 2004; 4: 621.
11. Weng FL, Joffe MM, Feldman HI, et al. Rates of completion of the medical evaluation for renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 734.
12. Undre NA, van HJ, Christiaans M, et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc* 1999; 31: 296.
13. Hougardy JM, Broeders N, Kianda M, et al. Conversion from Prograf to Advagraf among kidney transplant recipients results in sustained decrease in tacrolimus exposure. *Transplantation* 2011; 91: 566.
14. de JH, Kuypers DR, Verbeke K, et al. Reduced C0 concentrations and increased dose requirements in renal allograft recipients converted to the novel once-daily tacrolimus formulation. *Transplantation* 2010; 90: 523.
15. Del TM. Prospects for personalized immunosuppression: pharmacologic tools—a review. *Transplant Proc* 2004; 36: 687.
16. Reams BD, Palmer SM. Sublingual tacrolimus for immunosuppression in lung transplantation: a potentially important therapeutic option in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* 2002; 1: 91.
17. Deierhoi MH, Haug M III. Review of select transplant subpopulations at high risk of failure from standard immunosuppressive therapy. *Clin Transplant* 2000; 14: 439.