



Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Médicas

“Morfofuncionalidad tímica y resultados del trasplante hepático en pacientes pediátricos sometidos a diferentes esquemas de inmunosupresión”

Tesis presentada para optar al título de “Doctor en Ciencias Biomédicas” por el médico Alejandro Costaguta

Director de tesis: Prof. Dr. Oscar Bottasso (IDICER¹-CONICET)

Co-Director: Prof. Fernando Álvarez (Universidad de Montreal, Canadá)

Lugar de trabajo: Sanatorio de Niños (Rosario), IDICER

¹ Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario

Agradecimientos

A mi familia y mis amigos, quienes, en las horas más difíciles de mi vida, allí estuvieron.

A Juan Carlos y Marta (papá y mamá), que vivieron por y para nosotros, y hace muy poco volvieron a encontrarse en el Cielo.

A mis mentores: Guillermo Ferrari del Sel, Hugo Tanno, Oscar Bottasso y Fernando Álvarez, de quienes decir algo siempre sería injustamente incompleto. Los admiro. Han sido el espejo donde he tratado de reflejarme.

A Carolina, mi amor y compañera de la primera mitad de mi vida.

A Griselda, mi amor y compañera de la segunda mitad de mi vida.

A mis hijos, Guillermo y Emilio porque han tomado la antorcha y la portan con orgullo y determinación. Son “mi equipo”, mi razón de ser.

A mi equipo de Trasplante Hepático del Sanatorio de Niños, compañeros incansables de día y de noche, dedicados a la tarea más noble que pueda existir: ayudar a quien está en serias dificultades.

Un agradecimiento especial a los integrantes del IDICER, sin cuyo apoyo no podríamos haber emprendido la tarea, especialmente a Ana Rosa Pérez, Brenda Di Natale y (muy especialmente) a Florencia Gonzalez, cuyo esfuerzo y compromiso emocionan.

A Lisandro Sicer, por su empeño en encontrar con su ecógrafo lo que era casi imposible. Finalmente, el Dr. Wilson Savino, del instituto Fio Cruz (Río de Janeiro) merece nuestro reconocimiento por haber compartido con nosotros el entusiasmo, el conocimiento y los materiales necesarios para desarrollar en nuestro Laboratorio las técnicas de detección de TREC.

“El camino es la meta.”

-Proverbio oriental.

Publicaciones y presentaciones en eventos científicos.

Partes del contenido de esta tesis han sido presentadas en reuniones científicas, han sido premiadas y/o publicadas en revistas de alto impacto, a saber:

- 55th Annual Meeting of the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN). Viena (Austria). Mayo 17-20 2023. Poster session “Lack of differences in safety and effectivity among three induction immunosuppression protocols during the first-year post-liver transplantation in pediatric patients. A multicenter study”.
- 27th Annual Meeting of the Society of Pediatric Liver Transplantation (SPLIT). Poster session Title: “Lack of differences in safety and effectivity among three induction immunosuppression protocols during the first-year post-liver transplantation in pediatric patients. A multicenter study” Montreal, octubre 16 a 17, 2023.
- 27th Annual Meeting of the Society of Pediatric Liver Transplantation (SPLIT). Poster session Title: “Reduced thymic functionality in pediatric patients after liver transplantation” Montreal, octubre 16 a 17, 2023.
- 29th International Congress of The Transplantation Society (TTS) CABA 10-14 septiembre 2022. Presentación oral: “Lack of differences in safety and effectivity among three induction immunosuppression protocols during the first-year post-liver transplantation in pediatric patients. A multicenter study”
- Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Hepatología y Nutrición Pediátrica (LASPGHAN): 1er. Premio en el Concurso de Proyectos de Investigación en Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica para investigadores jóvenes de Latinoamérica 2023. Título: “Morfofuncionalidad tímica y resultados del trasplante hepático en pacientes pediátricos sometidos a diferentes esquemas de inmunosupresión”.
- Publicación en “Liver Transplantation” febrero 2025. “Lack of differences in outcomes between 3 immunosuppression protocols in the first year after pediatric liver transplantation: A multicenter study.”

Abreviaturas

Ag	Antígeno
ATG	Globulina antilinfocitaria
AVB	Atresia de Vías Biliares
AZA	Azatioprina
BAS	Basiliximab
CK	Citocinas
CMV	Citomegalovirus
CPA	Célula presentadora de antígenos
DP	(Célula) doble positiva
DSA	Anticuerpos antidonante específicos
EBV	Virus Epstein-Barr
ETR	Emigrantes tímicos recientes
GC	Glucocorticoides
HLA	Antígeno leucocitario humano
HPA	Eje hipófiso-pituitario-suprarrenal
ICN	Inhibidores de calcineurina
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-2	Interleuquina - 2
ITA	Involución tímica aguda
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NFAT	Factor nuclear de activación
SI	Sistema Inmune
SP	(Célula) positiva simple
TAC	Tacrolimus
TCO	Tolerancia clínica operacional
TFG	Tasa de filtración glomerular
TH	Trasplante Hepático
TREC	Círculos de escisión del receptor T
Treg	Linfocitos T reguladores

Indice	Página
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Historia general de los trasplantes	11
1.2. Tipos de Injerto	12
1.2.1. El trasplante de hígado	13
1.2.1.1 Indicaciones del trasplante hepático	15
1.2.1.2 Aspectos pediátricos	15
1.2.1.3. Complicaciones	16
1.2.1.3.1. Técnicas	16
1.2.1.3.2. Inmunológicas	17
1.2.1.4. El fenómeno del “quimerismo” como promotor de tolerancia	21
1.2.1.5. El hígado como órgano “inmunológicamente privilegiado” y su relación con la inmunosupresión	22
1.2.1.6. Farmacoterapia postrasplante: impacto en el sistema inmune, particularmente el timo	25
1.2.1.7. Las interacciones inmuno-endócrinas	28
1.3. Hipótesis de trabajo	30
2. OBJETIVO GENERAL	32
2.1. Objetivos Específicos	33
3.MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Estudio retrospectivo	36
3.2. Estudio prospectivo	36
3.2.1. Características de la muestra conformada	37
3.2.2. Estudios de ultrasonido	37

3.2.3. Evaluación de la función tímica	38
3.2.4. Análisis estadístico	40
4. RESULTADOS	42
4.1 Estudio retrospectivo	43
4.2 Estudio Prospectivo	54
4.2.1 Estudios de ultrasonido	54
4.2.2 Estudio de la funcionalidad del timo	56
4.2.3. Variaciones en TREC y ETR en relación con las complicaciones	62
5.DISCUSIÓN	63
6. CONCLUSIONES	75
7. BIBLIOGRAFÍA	77

Resumen

Introducción: La inmunosupresión posterior al trasplante hepático (TH) es esencial para prevenir el rechazo, pero puede afectar negativamente la función tímica, comprometiendo la respuesta inmune y aumentando el riesgo de infecciones. La interacción entre injerto hepático y timo ha sido escasamente estudiada, especialmente en población pediátrica, donde la función tímica es crítica para la maduración inmunológica. Además, factores como la infección persistente por CMV o EBV podrían contribuir a la involución tímica.

Material y método: Se diseñó un estudio mixto. En la fase retrospectiva (2015-2019) se incluyeron 97 pacientes pediátricos trasplantados en cuatro centros para evaluar la relación entre distintos esquemas de inmunosupresión y la evolución clínica en el primer año post-TH.

En la fase prospectiva (2022-2023), 12 pacientes trasplantados en el Sanatorio de Niños de Rosario fueron seguidos durante un año, evaluando la morfología tímica (ecografía) y la función (cuantificación de TREC por PCR y emigrantes tímicos recientes —ETR— por citometría de flujo) en el pretrasplante y a 1, 3, 6 y 12 meses post-TH. Se correlacionaron estos hallazgos con episodios de rechazo e infecciones.

Resultados: En el análisis retrospectivo, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia del paciente o del injerto según el esquema de inducción (tacrolimus + esteroides ± basiliximab ± ATG), ni en la incidencia de rechazo o infecciones por CMV/EBV. La función renal se mantuvo estable globalmente. En la cohorte prospectiva, la ecografía mostró una reducción progresiva del volumen tímico tras el TH. Los niveles de TREC disminuyeron significativamente desde el primer mes y se mantuvieron bajos durante el seguimiento, mientras que la proporción de ETR mostró una tendencia descendente, más marcada a los 6 y 12 meses, aunque sin significancia estadística. Se observó asociación positiva entre TREC y ETR. No se hallaron diferencias significativas de TREC o ETR según la presencia de rechazo agudo o infecciones.

Conclusiones: La inmunosupresión en el contexto del TH pediátrico se asocia con una marcada disminución de la actividad tímica, evidente desde el primer mes postrasplante y mantenida al año, especialmente en las mediciones de TREC. Aunque no se demostraron diferencias significativas en ETR ni asociaciones sólidas con episodios de rechazo o infecciones, la tendencia sugiere un impacto clínicamente relevante que podría adquirir significancia en estudios con mayor tamaño muestral. Estos hallazgos destacan la necesidad de considerar estrategias terapéuticas que preserven la función tímica, optimizando el balance entre prevención del rechazo y mantenimiento de la competencia inmune. Los resultados podrían ser extrapolables a otros trasplantes de órganos sólidos en población pediátrica.

Abstract

Background: Post–liver transplantation (LT) immunosuppression is essential to prevent graft rejection but may impair thymic function, compromising immune competence and increasing susceptibility to infections. The liver–thymus interplay has been scarcely investigated, particularly in pediatric recipients, where thymic activity is crucial for immune maturation. Additionally, persistent cytomegalovirus (CMV) or Epstein–Barr virus (EBV) infection may contribute to thymic involution.

Material and Methods: A mixed-design study was conducted. In the retrospective phase (2015–2019), 97 pediatric LT recipients from four centers (Argentina and Canada) were analyzed to assess the relationship between different induction immunosuppressive regimens and clinical outcomes during the first post-transplant year. In the prospective phase (2022–2023), 12 pediatric LT recipients at the Sanatorio de Niños (Rosario, Argentina) were followed for 12 months. Thymic morphology (ultrasound) and function (T-cell receptor excision circles [TREC] by qPCR, and recent thymic emigrants [RTE] by flow cytometry) were evaluated pre-transplant and at 1, 3, 6, and 12 months post-LT. Associations between thymic parameters, rejection episodes, and infections were investigated.

Results: In the retrospective cohort, no significant differences were found in patient or graft survival according to induction regimen (tacrolimus + steroids \pm basiliximab \pm anti-thymocyte globulin), nor in the incidence of acute rejection or CMV/EBV infection. Renal function remained stable at the end of the follow-up, although individual variations were noticed.

In the prospective cohort, ultrasound revealed a decrease in thymic area after LT. TREC levels dropped significantly from the first month and remained low throughout follow-up, while RTE percentages showed a downward trend, more evident at 6 and 12 months, though not reaching statistical significance. A positive correlation between TREC and RTE was observed and paralleled in general the results from ultrasound studies. No significant differences in TREC or RTE were detected when stratifying by acute rejection or infection status.

Conclusions: In pediatric LT recipients, immunosuppressive therapy is associated with a marked reduction in thymic activity, as evidenced by early and sustained decreases in TREC levels. Although RTE changes and their association with rejection or infections did not reach statistical significance, trends suggest a clinically relevant impact that may become significant in larger cohorts followed for longer periods. These findings underscore the importance of considering immunosuppressive strategies that preserve thymic function to balance rejection prevention with maintenance of immune competence. The results may have broader implications for the management of pediatric solid organ transplantation.

1. Introducción

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Historia general de los trasplantes

La idea de reemplazar partes del cuerpo humano que han sufrido un daño funcional irreversible ha estado presente desde tiempos remotos. Referencias de este tipo pueden encontrarse en textos mitológicos y religiosos de las antiguas civilizaciones china e hindú, aunque también están presentes en textos occidentales como en la descripción del reemplazo de una pierna en favor de un diácono romano realizado por San Cosme y San Damián en el año 348 DC (1,2).

A lo largo de los años, el desarrollo de esta disciplina ha demostrado representar un desafío monumental en el que, para alcanzar el éxito, debieron converger progresos científicos y técnicos, como así también debatirse aspectos filosóficos, éticos e, incluso, jurídicos, como el desarrollo del concepto de “muerte cerebral”, aceptado hacia fines de la década de 1960 tras intensos debates (3).

Los primeros intentos de injerto probablemente hayan correspondido a trepanaciones craneanas que se cerraban después de un tiempo con el mismo hueso extraído previamente (autoinjerto).

De todas las referencias que se enumeran en diversos textos de variable credibilidad, se destaca desde los primeros tiempos la aplicación del injerto de piel. Durante varios siglos este fue considerado el único con posibilidades de éxito y su desarrollo adquirió un particular impulso a partir de las heridas sufridas por los combatientes de las dos guerras mundiales del siglo pasado. Por ese entonces el médico Peter Medawar procuraba entender la razón por la cual no era posible injertar exitosamente la piel entre individuos diferentes (aloinjerto), aunque no encontraban problemas en hacerlo cuando se

empleaba la piel propia (autoinjerto). Medawar razonó que debía tratarse de un “rechazo” al tejido, presumiblemente porque la piel injertada, obtenida de otra persona, presentaba características diferentes que eran detectadas como “no propias” por el receptor. Esta idea coincidía con los aportes de Burnet, quien demostró que la introducción de una sustancia extraña en un embrión inmunológicamente inmaduro provocaría su aceptación como propio y, en consecuencia, el individuo no produciría anticuerpos en exposiciones futuras logrando un estado de tolerancia inmunológica. Medawar proveyó evidencia experimental al respecto y ambos científicos recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1960. El descubrimiento del sistema HLA como patrón identitario de cada individuo, a fines de la década de 1950, y la aparición de la ciclosporina como columna fundamental de la inmunosupresión, a partir de los trabajos de Calne y col. terminaron por proveer el impulso definitivo para entrar en una nueva era de la trasplantología en seres humanos (4).

Los conocimientos adquiridos dispararon el interés por el reemplazo de órganos sólidos, generando una ola de sucesivos “primeros trasplantes” exitosos de riñón, hígado y corazón durante las décadas de 1950 y 1960, a lo que inmediatamente le siguieron páncreas, pulmones e intestino acompañando los progresos logrados en las técnicas quirúrgicas y, especialmente, la inmunosupresión (5,6).

1.2 Tipos de Injerto

En la actualidad, la disciplina de la trasplantología demuestra un dinamismo notable, continuamente expandiendo los límites y logrando progresos que se aplican a las otras áreas de la medicina, de cuyos avances también se nutre, generando una sinergia de mutuo beneficio.

Los injertos que forman parte actualmente del arsenal trasplantológico incluyen tejidos (piel, córneas, válvulas cardíacas, huesos, células madre hematopoyéticas, e incluso islotes pancreáticos y hepatocitos), como también órganos sólidos vascularizados (riñones, hígado, corazón, pulmones e intestino, y los llamados “multiviscerales” que incluyen estómago y duodeno, entre otros).

Los progresos alcanzados, con tasas actuales de supervivencia anual superiores al 90 % en órganos sólidos como hígado y riñón, extendieron las indicaciones de trasplantes al reemplazo de órganos no vitales pero con profundo impacto en la calidad de vida, abarcando actualmente injertos como faciales completos, lengua, manos, útero y pene (6).

El trasplante de órganos sólidos representa un desafío doble, quirúrgico e inmunológico, y entre todos destaca por su complejidad el trasplante de hígado, que analizaremos con más detalle en el siguiente apartado.

1.2.1 El trasplante de hígado

El hígado es un órgano funcionalmente complejo, que exhibe una particular anatomía (doble circulación, arterial y portal) (7), además de poseer una característica única: la capacidad de regeneración, sorprendentemente ya conocida por los antiguos griegos y descrita en el mito de Prometeo (8).

El primer intento de trasplante hepático en humanos, a cargo del Dr. Starzl en Colorado (EE. UU.) se llevó a cabo en una niña portadora de cirrosis colestática por atresia de vías biliares (AVB), en 1963. Lamentablemente la niña falleció en el quirófano debido a una hemorragia incontrolable, pero cuatro años más tarde, el mismo equipo logró completar exitosamente el primer trasplante hepático en humanos en un paciente portador de

hepatoblastoma, una variedad rara de cáncer de hígado de los niños pequeños. La historia de los trasplantes hepáticos quedó así íntimamente ligada a la pediatría (9).

A partir de ese momento, una vez demostrada la factibilidad, el trasplante fue consolidándose como una herramienta terapéutica efectiva en individuos con enfermedad hepática irreversible y progresiva. Con el paso del tiempo, sin embargo, al igual que en otros órganos se volvió víctima de su propio éxito, y rápidamente las listas de espera comenzaron a evidenciar una escasez relativa de donantes en relación con los pacientes inscriptos.

Esta situación estimuló la búsqueda de soluciones que, para el caso del hígado comprendieron:

- La “partición hepática”: un hígado para dos receptores (*“split liver”*)
- La utilización de “donantes marginales” (edad avanzada o preexistencias en el donante, tiempo de isquemia prolongada, etc.)
- La utilización de donantes en asistolia
- La utilización del “donante vivo” (un individuo sano dona su lóbulo izquierdo o, menos frecuentemente, su lóbulo derecho)
- La realización de trasplantes “en dominó” (en el caso de enfermedades que tardan muchos años en desarrollarse)
- Técnicas de “reducción hepática” (ajustar el tamaño del injerto de un donante adulto a un receptor pediátrico)

Todas estas variantes descritas contribuyen a ampliar la oferta de donantes, aunque probablemente al costo de un mayor número de complicaciones (10).

1.2.1.1 Indicaciones del trasplante hepático

El trasplante está indicado, de manera general, en los pacientes que cursan una enfermedad del hígado con pérdida irreversible y progresiva de su función. La presencia de tumores irresecables que cumplen con los criterios de aplicabilidad es otro grupo importante (10). Enfermedades originadas en el hígado, pero con impacto extrahepático constituyen un grupo de potenciales indicaciones (como es el caso de la hipercolesterolemia familiar o los trastornos del ciclo de la urea). Finalmente existe un grupo de pacientes que puede requerir trasplante debido a un daño agudo severo e irreparable del hígado, conocido como “falla hepática fulminante” o “insuficiencia hepática aguda”. Este último grupo suele ocupar el segundo lugar en frecuencia entre los pacientes pediátricos, con una etiología desconocida en el 50% de los casos.

1.2.1.2 Aspectos pediátricos.

El trasplante de órganos sólidos es una intervención que se realiza con frecuencia creciente en la población pediátrica. Datos recientes, por ejemplo, indican que 25% de los aproximadamente 500 trasplantes hepáticos que fueron realizados en Argentina durante el año 2023 se practicaron en menores de 18 años. Fuente: [<https://cresi.incucai.gov.ar/reporte/resumenestadistico>]

La historia del trasplante hepático puede decirse que es “la historia del trasplante hepático en pediatría”, como fue dicho anteriormente, remarcando la profunda asociación entre ambos.

Si el trasplante hepático es el más complejo, técnicamente, de los trasplantes de órganos sólidos, el trasplante hepático en niños lo es aún más. La necesidad de acomodar el volumen de hígado donante al receptor hepático (en algunos casos, incluso trasplantando monosegmentos), y el tamaño milimétrico de las anastomosis que deben

completarse en niños de no más de 3 kg de peso son una muestra de ello (11). Pese a todo, las tasas de éxito alcanzadas por los grupos más experimentados son comparables a las obtenidas en pacientes adultos, llegando hoy a superar el 90% de supervivencia a 1 año y 80% a 5 años (10).

El impacto de la AVB en la indicación del trasplante hace que el 50% de estos deba realizarse en niños menores de 3 años (una gran proporción, en menores de 12 meses de vida). Esto genera problemas adicionales como las dificultades nutricionales y la imposibilidad de completar los calendarios de vacunaciones antes de recibir la inmunosupresión.

Finalmente, la escala de tiempo con que medir el éxito en pediatría es sensiblemente diferente a la del paciente adulto, ya que el objetivo de supervivencia en niños se mide en “décadas” y no en “años”.

1.2.1.3. Complicaciones.

1.2.1.3.1. Técnicas

Las complicaciones técnicas son relativamente frecuentes y comprenden fundamentalmente la obstrucción o la pérdida del hermetismo de las estructuras tubulares que se anastomosan durante la cirugía. Así entonces, en el caso de las anastomosis vasculares, la trombosis de la arteria hepática, de la vena porta o de las venas “de salida” como las suprahepáticas o la vena cava inferior, se presentarán con grados variables de compromiso de la función hepática, y consecuencias clínicas que comprenden un espectro amplio, desde la elevación asintomática de los valores del laboratorio hasta cuadros de falla hepática fulminante, que requieren un retrasplante inmediato. Cuadros de colestasis asociados a patología de la vía biliar (cuya integridad depende del buen flujo en la arteria hepática) o el desarrollo de un síndrome ascítico-

edematoso son otras formas de presentación de las complicaciones vasculares en el posoperatorio inmediato y alejado.

La presencia de un sangrado activo intraabdominal es una complicación temida, que puede atribuirse tanto a problemas técnicos en las suturas, como a un estado *coagulopático* más o menos severo manifestado como sangrado difuso del lecho quirúrgico y que debe ser sostenido con la transfusión de hemoderivados hasta que se recupere la función del injerto.

Las complicaciones biliares difieren según el tipo de anastomosis que se ha realizado, pero en líneas generales podemos decir que son más frecuentes en los casos de trasplantes con variantes técnicas (*split*, donante vivo, o reducción hepática). Estas complicaciones pueden ser obstructivas o por fuga de bilis a cavidad peritoneal, y suelen requerir drenaje percutáneo, reintervención o (en los casos refractarios) retrasplante (12).

1.2.1.3.2. Inmunológicas

Como queda dicho, los avances en los tratamientos inmunosupresores, las técnicas quirúrgicas, la preservación de órganos, y el progreso en la asignación del órgano donado han prolongado significativamente la supervivencia del paciente receptor de un aloinjerto (13). Sin embargo, los individuos sometidos a trasplantes, especialmente a edades tempranas de la vida, se enfrentan a un mayor riesgo de infecciones oportunistas y tumores, a raíz de los efectos secundarios inmediatos y a largo plazo de la inevitable inmunosupresión a la que se ven expuestos (14). Interesantemente, la inmadurez del sistema inmune en pacientes jóvenes podría constituir una ventaja. Observaciones que datan ya de varios años, consignan que hasta 1/3 de los receptores de trasplantes de hígado en pediatría podrían suspender exitosamente el tratamiento inmunosupresor sin

pérdida del injerto (15), lo cual ha estimulado un gran interés en comprender los mecanismos íntimos que rigen este proceso de “tolerancia”, en especial en el paciente pediátrico. Este estado de tolerancia clínicamente operativa (TCO), que es excepcional en trasplantes de órganos sólidos en general, es bastante más frecuente para el caso del hígado, independientemente de los antecedentes inmunológicos del donante y del receptor e indicación del trasplante, y se verifica con más frecuencia en menores de 3 años al momento del procedimiento (por otra parte estos pacientes suelen presentar más frecuentemente fenómenos de alergia alimentaria y niveles elevados de IgA sérica) (16).

Los mecanismos subyacentes al fenómeno de TCO no están del todo aclarados. Si bien el hígado es un órgano considerado “inmunomodulador”, aún no se cuenta con un conocimiento pormenorizado de las células y los procesos tendientes a producir y mantener la TCO. Diversas teorías como la inducción de microquimerismo a partir de células madre transferidas con el injerto, o el efecto de masa atribuido a los leucocitos del donante han sido propuestas, pero ninguna de estas ha sido capaz de explicar de manera completa el fenómeno clínico (17).

El “reconocimiento inmunológico”: rechazo vs tolerancia.

Desde los trabajos de Medawar en la década de 1950, quedó establecido que el fenómeno del rechazo de injertos tiene una base inmunológica, por la cual es detectado como “no propio” y en consecuencia, atacado, del mismo modo que se ataca invasores naturales ciertamente más frecuentes como virus, bacterias y hongos, entre otros. Esta idea de rechazar lo “no propio” exige un mecanismo complejo que se pone en marcha para producir un resultado final del tipo “atacar” (rechazo) o “ignorar” (tolerancia). Comprender estos procesos es de importancia fundamental para intervenir exitosamente manipulando la respuesta en uno u otro sentido según se requiera (18).

HLA, el sistema de reconocimiento de “lo propio”: *en la superficie de cada una de las células que componen el cuerpo humano existen una serie de proteínas (antígenos) con una amplia variabilidad entre integrantes de la misma especie (son*

“polimórficas”). Esto hace que cada individuo presente una combinación prácticamente exclusiva, y por lo tanto sean capaces de brindar identidad. Esta identidad es la base de la discriminación entre “lo propio” y “lo no propio”, entre la aceptación y el ataque, que desarrollará el sistema inmune a través de sus diversos componentes (18). Tales proteínas identitarias corresponden a lo que en la década de 1930 se describió como HLA (por Human Leucocyte Antigen), dado que primero se observaron en la membrana de leucocitos aunque después se comprobó su ubicuidad. Estos HLA fueron clasificados en 2 grupos: HLA Clase I y Clase II. Los HLA Clase I se subdividen en A, B y C, están presente en todas las células eucariotas del cuerpo humano y presentan antígenos (Ag) citoplasmáticos (endógenos) a los linfocitos T CD8⁺, en tanto que los HLA Clase II se subclasifican en DR, DQ y DP y presentan Ag exógenos provenientes del procesamiento de vesículas fagocíticas, a los linfocitos T CD4⁺. Las proteínas que integran el HLA están codificadas en una región del cromosoma 6 conocida como “Complejo Mayor de Histocompatibilidad” (MHC, por sus sigla en inglés).

El reconocimiento de moléculas extrañas presentes en el injerto, despierta una respuesta inmune de rechazo por parte del receptor, dirigida hacia los antígenos desconocidos. Estos antígenos pueden ser detectados por los linfocitos T del receptor a través de células presentadoras de antígenos (CPA) del propio donante (que son transferidas junto al órgano), en lo que se conoce como “presentación directa”, o ser incorporados por endocitosis y procesados por CPA del receptor para presentarlos a los linfocitos T en el contexto de HLA Clase II, en lo que se conoce como “presentación indirecta”. En el primer caso, la respuesta inmune se presenta en las primeras semanas postrasplante y sería responsable de la mayoría de los episodios de rechazo agudo. La presentación indirecta, por su parte, está asociada probablemente a la aparición de fenómenos de rechazo en el más largo plazo (18).

Tipos de rechazo.

Desde el punto de vista del mecanismo efector existen 2 tipos de rechazo:

-Rechazo humoral: mediado por anticuerpos preformados contra el endotelio vascular del injerto. Es capaz de fijar complemento y provocar lesión de la íntima, con activación de la cascada de coagulación que termina produciendo una trombosis difusa que lleva a la pérdida del injerto. Se trata de un fenómeno imposible de revertir cuando se presenta durante los primeros días postrasplante, conocido también como “hiperagudo”, por la rapidez con que se instala. Si bien el rechazo humoral se podría prevenir a través de la detección preoperatoria de anticuerpos anti HLA (*Donor Specific Antibodies*, o DSA, por

sus siglas en inglés), se trata, no obstante, de un fenómeno raro en el caso del trasplante hepático por lo que su pesquisa prequirúrgica no es práctica rutinaria.

-Rechazo celular: este tipo de rechazo está a cargo de los Linfocitos T efectores que son activados por vía directa o indirecta, como se ha dicho, y están dirigidos a Ag presentes preferentemente en el endotelio vascular y en el epitelio de los conductos biliares, lo que provoca el patrón característico en la biopsia. Este tipo suele presentarse durante los primeros 6 meses y habitualmente se controla incrementando la medicación inmunosupresora en forma transitoria. Existe una variante tardía, caracterizada por un patrón de colestasis progresiva asociada a pérdida de conductos biliares (“ductopenia”), que se conoce como **“rechazo crónico”**. Esta forma de rechazo es más difícil de revertir y puede llevar en el mediano plazo a la pérdida del injerto. Ocasionalmente se observa la aparición de DSA que, si bien están dirigidos contra el endotelio vascular, no producen su destrucción, sino que estimulan la proliferación de la íntima arterial, eventualmente obliterando la luz, lo que lo vuelve muy difícil de revertir una vez instalado (19, 20).

Otras formas de injuria inmunomediada pueden verse en el mediano y largo plazo de los niños trasplantados. Algunos de ellos exhiben elevados niveles de IgG, autoanticuerpos, y un patrón histológico agresivo que remeda la hepatitis autoinmune, por lo que se la ha denominado “hepatitis autoinmune *de novo*” aludiendo a estas semejanzas, a pesar de tratarse de un aloinjerto (21). Para este tipo de reacción contra el injerto, se ha propuesto recientemente la denominación (probablemente más apropiada) de “rechazo rico en celular plasmáticas” (19). Otros pacientes muestran actividad inflamatoria de interfase sin otros componentes del cuadro de hepatitis autoinmune *de novo* y constituyen probablemente un grupo diferente, más asociado al diagnóstico de rechazo crónico con blanco en los hepatocitos periportales, y una tendencia a desarrollar fibrosis (22).

1.2.1.4. El fenómeno del “quimerismo” como promotor de tolerancia.

El fenómeno de “quimerismo” (la coexistencia de 2 tipos diferentes de ADN en un mismo individuo) fue observado cada vez con más frecuencia a partir de la década de 1960. Las primeras descripciones se referían a la presencia del corpúsculo de Barr en células periféricas de receptores masculinos con donantes femeninos. En el caso del hígado, particularmente, se demostró quimerismo en el órgano implantado, cuando se comprobó que los endotelios y células parenquimatosas retenían el fenotipo del donante, en tanto las células de estirpe linfoide y otras inmunocompetentes, como los macrófagos tisulares (células de Kupffer), exhibían el fenotipo del receptor. Estas observaciones se contradecían con el paradigma existente que suponía la destrucción de las células pasajeras que se trasplantaban junto al injerto y migraban una vez restablecido el flujo vascular. Este modelo de quimerismo “de una sola vía” (receptor/donante) fue reemplazado por un modelo “de dos vías” (donante/receptor y receptor/donante), por el cual, la supervivencia de células inmunocompetentes provenientes del donante, en los tejidos periféricos del receptor, promueve la aceptación del injerto como propio (20). Este quimerismo puede llegar a ser completo, comportándose como un verdadero “minitrasplante” de médula ósea. En efecto, en un interesante relato, Alexander y col. describieron una paciente de 9 años de edad sometida a un trasplante hepático tras lo cual se produjo el cambio de grupo sanguíneo, además de registrarse una tolerancia operacional hacia el hígado implantado que permitió suspender por completo la inmunosupresión ya que el sistema hematopoyético y el injerto pertenecían al mismo individuo (el donante) (23).

1.2.1.5. El hígado como órgano “inmunológicamente privilegiado” y su relación con la inmunosupresión

Como ha sido dicho, el hígado tiene características particulares que han derivado en el concepto de un tejido “inmunológicamente privilegiado”, dado que constituye un órgano hematopoyético y linfático, programado para favorecer la tolerancia a los antígenos que ingresan continuamente por vía de la vena porta. Para llevar a cabo este cometido “tolerogénico”, este órgano está dotado de una serie de características particulares, como la presencia de macrófagos tisulares fijos (células de Kupffer) sesgados hacia una respuesta “tolerante” cuando son estimulados, un endotelio sinusoidal fenestrado desprovisto de membrana basal (favorecedor del contacto directo de los leucocitos con la membrana de los hepatocitos), y expresión de un particular repertorio de moléculas de adhesión (“*homing*”) (24).

Pese a todo, por el momento el receptor de un aloinjerto debe ser sometido a un régimen terapéutico intenso que incluye el uso de glucocorticoides (GC) y otros tipos de inmunosupresores (detallado en el Box 1).

Box 1: Inmunosupresión en el postrasplante hepático y mecanismo de acción de los diferentes fármacos.

La inmunosupresión que se administra postrasplante puede considerarse en 3 contextos diferentes, a saber: Inducción, mantenimiento y tratamiento de rechazo. La “Inducción” se refiere al período inicial postrasplante, en que se produce el reconocimiento inmunológico del injerto, preparando la respuesta que habitualmente es de rechazo. En general este período se caracteriza por una mayor intensidad de inmunosupresión, que puede apelar, según diversos protocolos, a la utilización de anticuerpos “depletantes”, como la globulina antilinfocitaria (ATG), que reduce la población de linfocitos T en la periferia o “no depletantes” como el basiliximab (BAS), un anticuerpo contra CD25, que bloquea el receptor soluble de la IL-2, impidiendo la proliferación y expansión clonal del linfocito T estimulado. La inmunosupresión de mantenimiento comúnmente comprende una combinación sinérgica de un inhibidor de la calcineurina (ICN) (habitualmente, tacrolimus [TAC]) y GC durante los primeros meses, eventualmente asociado a micofenolato de mofetilo (MMF) o azatioprina (AZA).

La principal acción farmacológica de los ICN es bloquear la activación (desfosforilación) del Factor Nuclear de Activación T (NFAT), a cargo de la calcineurina. El NFAT fosforilado no puede translocarse al núcleo y, en consecuencia, no se activa la síntesis de IL-2 imprescindible para promover la mencionada expansión clonal de los linfocitos T activados (tercera señal). La acción farmacológica de los ICN implica el riesgo de desarrollar efectos secundarios casi inevitables que derivan de su propia naturaleza como ICN, principalmente expresados a través del desarrollo de neurotoxicidad y nefrotoxicidad. Esto ha estimulado la búsqueda de nuevas drogas que puedan reemplazar o asociarse con los ICN, para disminuir la toxicidad sin reducir su eficacia inmunosupresora.

El MMF inhibe la síntesis de las purinas disminuyendo de este modo la proliferación de células T y B. Este fármaco fue desarrollado luego de observar que los individuos que padecía un déficit de ADA presentaban un cuadro severo de inmunosupresión congénita. La ADA es una enzima necesaria para la síntesis de purinas “*de novo*”, una vía imprescindible para la supervivencia y proliferación de los linfocitos. Los individuos que reciben MMF se ven impedidos de montar una respuesta inmune normal, ya que sus linfocitos no pueden proliferar en respuesta a las señales de activación recibidas.

Los GC ejercen una regulación compleja a través de mecanismos genómicos y no genómicos, actuando principalmente mediante la regulación negativa de citocinas (CK) proinflamatorias y la señalización celular (25).

Son moléculas endógenas (cortisol, cortisona, corticosterona) que también pueden sintetizarse en el laboratorio y utilizarse ampliamente como tratamientos para varias enfermedades. La secreción de GC está mediada por el eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA) y está regulada por el ritmo circadiano y el estrés, pero también por estímulos inflamatorios. En efecto, tras la activación por CK como la interleucina (IL)-1, factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-6, el HPA induce la producción y secreción de GC, que actúan menguando el proceso inflamatorio y bloqueando la activación, migración y proliferación de células inmunes tanto innatas como adaptativas. La acción de los GC está mediada principalmente por el llamado “receptor de glucocorticoides” (RG), presente predominantemente en el citoplasma celular, unido a un complejo de proteínas de choque térmico, inmunofilinas, quinasas y fosfolipasas. Después de la interacción GC/RG y los consiguientes cambios conformacionales, el RG se disocia y transloca al núcleo. La acción genómica del RG activado se provoca mediante la unión a una secuencia de ADN con dos motivos de zinc. Esta secuencia apunta a elementos específicos que responden a glucocorticoides (GRE) controlando la expresión de muchos genes, que codifican para la síntesis de mediadores proinflamatorios y factores de transcripción [p. ej., la proteína activadora-1, factor nuclear kappa B (NF-kB)]. Por el contrario, GC/RG regulan al alza la expresión de lipocortina-1, antagonistas del receptor de IL-1 e Ik-B. Estos efectos transcripcionales contribuyen al efecto antiinflamatorio y las acciones inmunorreguladoras de los GC.

Sin embargo, la presencia de GRE no es el único mecanismo por el cual que el RG regula su actividad transcripcional. Las actividades de los GC dependen de varios factores adicionales, incluida la accesibilidad a la cromatina de los genes diana, que modula la disponibilidad de secuencias de ADN. Las acciones no genómicas también contribuyen a la complejidad del CG/RG. Esto a menudo implica la generación de segundos mensajeros intracelulares y varias cascadas de transducción de señales, como activación de

fosfolipasa, modulación de la adenosina cíclica monofosfato, vías de proteína quinasa y movilización de Ca²⁺ (26,27).

Los avances en el terreno de la inmunosupresión apuntan, como uno de los objetivos más importantes, a reducir al mínimo posible el uso de GC, especialmente en los niños (28). En algunos casos, esto se asocia a menor frecuencia de enfermedades virales, y mayor supervivencia del injerto libre de rechazo después de 3 años (29,30). Varios estudios prospectivos y retrospectivos con esteroides durante un corto plazo o terapias completamente libres de los mismos han demostrado una tasa de rechazo similar o disminuida con respecto al esquema clásico de mantenimiento con esteroides a largo plazo; aunque los tiempos de seguimiento no fueron prolongados y la muestra de pacientes bastante limitada (31). Los regímenes sin esteroides más habituales se basan en un período de inducción con BAS, seguido de TAC o ciclosporina (CyA) como las principales terapias para el mantenimiento [revisado en (32)]. Otros protocolos de inducción incluyen ATG o alemtuzumab. Estas diferentes prácticas de inmunosupresión, han decantado a lo largo del tiempo en 3 esquemas básicos: 1- TAC asociado a GC, 2- inducción con anticuerpos “depletantes” (ATG) 3- inducción con anticuerpos “no depletantes” (BAS). En los dos últimos casos, acompañados de TAC y GC durante los primeros meses post-trasplante (33).

Frente a esta variedad de opciones, resulta de mucho interés conocer los resultados obtenidos en diferentes centros alrededor del mundo. Sin embargo, la escasez de datos comparativos es la regla, especialmente cuando se trata de población pediátrica, y particularmente en pacientes de nuestra región (Latinoamérica).

La población pediátrica es particularmente atractiva en ese sentido, dado que, a diferencia de lo que ocurre en los adultos, la recurrencia de la enfermedad subyacente

es poco común. Datos recientes muestran una supervivencia del 94% a un año, que posteriormente desciende al 91% y 88% a los 5 y 10 años, respectivamente en receptores menores de 18 años (34). Es de destacar que, en este grupo, hasta dos tercios de las muertes tardías tras el trasplante pueden ser atribuibles a complicaciones por la inmunosupresión, particularmente infecciones y neoplasias (35). Aun así, el TH en niños ha pasado a ser un recurso terapéutico exitoso, cada vez más extendido.

Aproximadamente el 50% de los TH efectuados en la población pediátrica se realiza durante los primeros 2 años de vida. Esta edad coincide con una etapa donde la función de la glándula tímica es muy intensa y por lo tanto podría tener un impacto sustantivo sobre dicha función, sea en lo que hace al desarrollo de tolerancia dado que las células T reguladoras son muy dependientes de la presencia de IL-2 (bloqueada por la inmunosupresión) para su supervivencia y expansión clonal (36), como así también sobre la competencia inmunológica en términos de la exportación tímica y reposición del repertorio en periferia (37). Por tratarse de un órgano clave en el mantenimiento de una respuesta inmune adaptativa eficiente, un trastorno en la función del timo, particularmente a esa edad, probablemente afectará la capacidad del individuo para combatir infecciones y contrarrestar fenómenos de autoinmunidad en el postrasplante inmediato y alejado, además de interferir con el desarrollo de la TCO.

1.2.1.6. Terapia para el trasplante y sistema inmune, particularmente el timo

Es sabido que el mantenimiento del equilibrio inmunológico requiere una producción estable de linfocitos y una expansión controlada. Los microambientes del estroma tímico y de los ganglios linfáticos representan elementos clave en el desarrollo del sistema inmune adaptativo. En consecuencia, el deterioro de este microambiente podría

conducir a respuestas inmunitarias insuficientes o al declive de la selección tímica. Los linfocitos T citotóxicos y auxiliares tolerantes a lo propio, y las células reguladoras de las respuestas inmunes adaptativas (Tregs), se desarrollan en la red epitelial especializada del timo. Este órgano, sin embargo, pierde gradualmente su capacidad para soportar la linfopoyesis en un proceso de involución que da como resultado una disminución de la producción de células T *de novo*.

En los seres humanos, la atrofia tímica relacionada con la edad comienza alrededor de la pubertad tardía, y a los 50 años el 80% del estroma de la glándula se convierte en tejido adiposo (38) en un proceso conocido como “involución adiposa” (39). Atento a que el timo ya no puede soportar la misma producción de células T vírgenes, la composición de linfocitos en la periferia exhibe el predominio de linfocitos T de memoria (40,41).

Los círculos de escisión del receptor de células T (TREC, por sus siglas en inglés), constituidos por una cadena de ADN episomal, son un subproducto de los reordenamientos de la cadena alfa del receptor de células T que ocurre durante su maduración en el interior del timo. Por esta razón se utilizan para evaluar la frecuencia de los emigrantes recientes de la glándula y constituyen un marcador subrogante confiable de la función tímica actual. Aunque varios estudios han demostrado que estos TREC disminuyen exponencialmente con la edad, aún se puede detectar cierto nivel de TREC incluso en personas ancianas (42-43).

Más allá de esta involución tímica relacionada con la edad (41), bajo ciertas situaciones fisiológicas y patológicas, el timo puede sufrir una regresión transitoria abrupta, conocida como involución tímica aguda (ITA) (41). La diferencia más notable entre la ITA y la atrofia asociada a la edad es que la primera ocurre debido a un aumento en la muerte de timocitos con capacidad de recuperación tras eliminar el estímulo disparador (44). La ITA

es una característica frecuente en varias infecciones por hongos, virus o bacterias (45), como así también en desnutrición y embarazo (46, 47) y la administración de corticoides a dosis suprafisiológicas. Generalmente está mediada por el sistema neuroendocrino, y se caracteriza, como queda dicho, por un aumento de la muerte de timocitos, preservando la capacidad de recuperarse después de la eliminación del insulto (40). Diversas vías moleculares y de señalización están involucradas en la ITA dependiendo del tipo y la variedad de agentes infecciosos (virales, parasitarios, fúngicos, bacterianos) implicados.

Box 2: Desarrollo de la tolerancia central y periférica.

En condiciones normales, los progenitores de células T de la médula ósea migran al timo para someterse a un amplio proceso de diferenciación y selección. Los timocitos que representan diferentes etapas de desarrollo de las células T, ocupan distintas regiones de la glándula. La selección de timocitos positivos está mediada por células epiteliales tímicas (TEC), que no sólo muestran actividad presentadora de antígeno, sino que también secretan compuestos o expresan moléculas de superficie celular esenciales para el desarrollo de los timocitos. En la médula, las TEC medulares permiten el reconocimiento de autoantígenos por parte de las células T facilitando la expresión de antígenos relacionados con los tejidos y presentándolos a los timocitos en desarrollo. La tolerancia de las células T centrales también tiene lugar en la médula tímica, para lo cual se logra la eliminación de los clones de células T autorreactivas y nocivas. Los progenitores de los timocitos denominados células doble negativas (CD3-CD4-CD8-) se localizan en la unión córtico-medular, donde se someten a una proliferación rápida, principalmente impulsada por IL-7, tras lo cual migran hacia la médula. Las células incapaces de reordenar sus genes para el receptor del antígeno sobrellevan apoptosis, mientras que las que experimentaron reordenamientos génicos “exitosos” de los genes para el receptor de las células T (TCR) y la adquisición de los correceptores CD4 y CD8 (células CD4 + CD8 + doble positivas -DP-) sobrellevan una selección positiva (TCR funcional) y negativa (TCR no autorreactivo) en la corteza y la médula. La mayoría de las células DP tienen receptores de antígenos no funcionales que los incapacita para recibir señales de supervivencia por las que van a la apoptosis (muerte por negligencia). Las células sobrevivientes que pierden moléculas CD4 o CD8 y se convierten en células positivas únicas (SP), experimentan una selección negativa. Esta es una muerte celular inducida por activación de células con receptor de antígeno de alta afinidad para autoantígenos. Finalmente, las células que completaron exitosamente este proceso

abandonan el timo como células T CD4-CD8 + (citotóxicas) o CD4 + CD8- (auxiliar), SP maduras y *naïve*.

Las células T reguladoras (Treg) como los LT CD4+Foxp3+ representan una población que juega un papel esencial en el mantenimiento de la autotolerancia y en la atenuación de la inflamación. Según su origen, se han descrito dos grandes clases de Treg: las derivadas del timo (tTreg) y las Treg periféricas (pTreg). La población tTreg se diferencia en el timo y puebla la periferia temprano, alrededor del día 3 de vida; en tanto que en periferia, los antígenos ambientales u otras señales pueden regular positivamente el factor de transcripción FoxP3 en células T CD4+ convencionales para llegar a convertirse en pTreg. Las Treg también se caracterizan por la expresión de ciertos marcadores de superficie, principalmente la cadena α del receptor de IL-2 o CD25, expresado constitutivamente en esta población (son células CD4+CD25+FoxP3+). IL-2, junto con otras CK de la misma familia como IL-15, favorece la expansión, maduración y supervivencia de las Treg (48, 49).

1.2.1.7. Las interacciones inmuno-endócrinas

El campo interdisciplinario de la neuro-inmuno-endocrinología ha crecido explosivamente durante los últimos 20 años, confirmando que el sistema inmune no es enteramente autónomo y que la mayoría de sus funciones están sujetas, en algún grado, al control por parte del sistema nervioso central (SNC) a través de vías nerviosas, cascadas hormonales e interacciones celulares, que le permiten al SNC regular al sistema inmune (SI): localmente, en los sitios de inflamación, regionalmente, en los órganos inmunes y sistémicamente, a través de rutas hormonales (50, 51).

Se puede afirmar que el sistema neuroendócrino y el inmune hablan un lenguaje bioquímico común y se comunican por medio de un circuito bidireccional. El descubrimiento de neuropéptidos o de receptores para neurotransmisores en leucocitos y de receptores para CK en células nerviosas y células neuroendócrinas, permitieron comenzar a explicar observaciones realizadas en el campo de la psiconeuroinmunología. Dentro de las vías de comunicación entre el SNC y el SI podemos mencionar las vías noradrenérgica, dopaminérgica, peptidérgica, colinérgica y el eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal; siendo esta última una de las más estudiadas. El hipotálamo recibe y

monitorea la información del medio ambiente por medio de los distintos sentidos y coordina las respuestas a través de nervios y hormonas. Además, la porción emocional del cerebro también libera información hacia el hipotálamo y desde este centro integrador, el cerebro controla la secreción de hormonas por distintas glándulas.

Los componentes principales del eje HPA son el núcleo paraventricular (PVN) en el hipotálamo; la glándula pituitaria anterior localizada en la base del cerebro; y las glándulas adrenales. La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) es secretada desde el PVN a la sangre portal hipofisiaria y estimula la expresión de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) en la glándula pituitaria anterior. La ACTH circula en el torrente sanguíneo hasta las glándulas adrenales donde induce la síntesis y liberación de hormonas esteroideas como GC y dehidroepiandrosterona (DHEA), entre otras, que desempeñan múltiples funciones en el organismo. Los mediadores del SI no sólo ejercen su efecto a nivel central, sino que también pueden modular la síntesis local de hormonas, como se ha demostrado con los esteroides adrenales.

Está bien establecido que el sistema neuroendócrino ejerce una notable influencia sobre la fisiología del timo (52), por lo que es concebible que situaciones patológicas como la malnutrición y los procesos inflamatorios crónicos puedan afectar el perfil hormonal y por ende la repercusión sobre esta glándula. En este sentido se sabe que los niveles aumentados de GC, no sólo ejercen efectos inhibitorios sobre la respuesta inmune (51) sino que también pueden producir depleción timocitaria (52). Datos experimentales indican asimismo que otro esteroide también producido a nivel de la corteza adrenal, la DHEA tendría efectos más bien beneficiosos sobre la integridad del timo, que compensarían la acción deletérea de los GC (53).

De acuerdo con todo lo descrito, las hormonas neuroendocrinas liberadas en respuesta a la inflamación crónica (infecciosa o no) o tratamientos que implican un alto grado de supresión inmunológica, especialmente los GC, podrían derivar en inmunosenescencia prematura (54), particularmente cuando se considera la semejanza de los cambios inmunes observados durante el envejecimiento o la exposición crónica a GC, aunque, como se ha dicho, esta última situación puede ser reversible. El patrón de inmunosenescencia observado en el envejecimiento cronológico es comparable al observado en sujetos bajo estrés crónico o crónicamente expuestos a GC, es decir: involución tímica, disminución de la exportación tímica de linfocitos T vírgenes (con la consiguiente reducción de la densidad de TREC detectables en sangre periférica), un cambio de CK Th1→Th2, aumento de los niveles circulantes de marcadores proinflamatorios y longitudes más cortas de telómeros, compatibles con un envejecimiento acelerado (55).

1.3. Hipótesis de trabajo

En función de todas las consideraciones más arriba explicitadas es probable que exista un impacto potencial de los tratamientos inmunosupresores administrados después de un trasplante sobre la función tímica y el resultado final del órgano trasplantado (aceptación/rechazo) es un tópico que ha recibido poca atención en la literatura. De momento no parecen existir datos respecto a lo que puede darse en el contexto del trasplante hepático, lo cual brinda un campo fértil para la indagación y eventual manipulación, de la interacción timo-injerto hepático, particularmente en el contexto de la edad pediátrica.

En el mismo sentido también resulta interesante analizar si los diferentes esquemas de terapia inmunosupresora aplicados en los receptores del TH modifican la evolución en términos de desenlaces clínico-patológicos a corto, mediano y largo plazo.

Atento a que la estimulación antigénica crónica, especialmente por la infección persistente por citomegalovirus (CMV) y/o por virus de Epstein-Barr (EBV) pueden contribuir a la involución tímica es interesante ponderar asimismo la presencia de este cofactor (56).

Más allá de su valor intrínseco, los conocimientos que pudieran generarse con este tipo de investigaciones podrían aportar una información valiosa en términos de promover una mejor aceptación del injerto, como así también mejorar la respuesta antiinfecciosa en el escenario del trasplante hepático durante la infancia.

Desde una mirada más integral tales conocimientos también podrían hacerse extensibles al manejo de trasplantes de otros órganos.

2. Objetivo general

2. OBJETIVO GENERAL

Investigar la evolución del TH en pacientes pediátricos sometidos a diferentes esquemas inmunosupresores, el impacto de estas terapias sobre el estado y función del timo, y la relación de estos dos últimos componentes con los resultados del trasplante.

2.1. Objetivos Específicos

Atento a lo enunciado en el ítem anterior, el presente proyecto de tesis involucra tres cuestiones a ser investigadas. Por un lado, el éxito del trasplante en relación con los diferentes regímenes terapéuticos inmunosupresores instituidos. Por otro lado, la repercusión de estos tratamientos sobre la glándula tímica, y finalmente, la relación de los cambios tímicos con los resultados del trasplante. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

2.1.1. Evaluar si existen diferencias en la supervivencia del paciente y del hígado trasplantado según las terapias instituidas tras la intervención quirúrgica, además de investigar el desarrollo de complicaciones, particularmente episodios infecciosos específicos e inespecíficos, y deterioro de la función renal, todo durante el primer año del seguimiento.

2.1.2. Analizar la influencia de la terapia inmunosupresora sobre la morfología y funcionalidad del timo (evaluaciones en el pre-trasplante inmediato y a los 1, 3, 6 y 12 meses postrasplante) en los pacientes trasplantados a través de la medición en sangre periférica de los TREC y de las evaluaciones de la morfología de la glándula tímica por ultrasonido.

2.1.3. Determinar si existe una relación entre los cambios tímicos y la aceptación del injerto (ausencia de rechazo a 12 meses de seguimiento postrasplante), y eventos infecciosos sufridos por el paciente

3. Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estudio retrospectivo

Para el primero de los objetivos (2.1.1) se aplicó un abordaje *quasi* experimental² a partir de una cohorte de casos trasplantados en cuatro centros que trabajan en trasplante hepático pediátrico: Sanatorio de Niños (Rosario), Fundación Favaloro (CABA), Hospital Italiano (CABA), y Hospital *Sainte-Justine* (Montreal, Canadá). El número con que se contó fue de 97 pacientes pediátricos trasplantados entre el 01/01/2015 y el 31/12/2019. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes, con especial interés en los datos demográficos, enfermedad de base, esquema inmunosupresor aplicado, medidas de seguimiento y control clínico y bioquímico (se contó con la historia clínica digitalizada para cada paciente). Para el caso que nos ocupa la variable de impacto a considerar fue “hígado sin evidencia clínico-laboratorial de rechazo”, dentro del primer año postrasplante.

Se consideraron eventos infecciosos solamente aquellos en los que las alteraciones clínicas y/o bioquímicas registradas en el seguimiento del paciente estaban acompañados de la identificación del agente patógeno (cultivo o prueba de biología molecular). Para la detección y cuantificación de EBV y CMV se empleó un equipo Abbot real time PCR (Alinity-m-EBV assay y Alinity-m-CMV assay. Abbot Park, Illinois USA). Para la detección de patógenos respiratorios y digestivos se utilizó el BioFire FilmArray respiratory panel 2.1 (bioMérieux, Marcy-L’Etoile, France) y el BioFire FilmArray GI panel (bioMérieux, Marcy-L’Etoile, France), respectivamente. Para los hemocultivos se empleó el BACT/ALERT system (bioMérieux, Marcy-L’Etoile, France).

² Los cuasi experimentos constituyen una suerte de experimentos que tienen tratamientos, medidas de resultado y unidades experimentales, pero no usan asignación aleatoria para conformar los grupos de comparaciones de, tratamiento

3.2. Estudio prospectivo

La segunda parte del presente trabajo de tesis (objetivos 2.1.2 y 2.1.3) se llevó a cabo en base a un seguimiento de pacientes pediátricos trasplantados en el Sanatorio de Niños (Rosario), en quienes se valoró la potencial influencia de la terapia inmunosupresora sobre la morfofuncionalidad tímica.³

3.2.1. Características de la muestra conformada

Criterios de inclusión: pacientes que recibieron un primer trasplante hepático en edades comprendidas entre 0 y 18 años.

Criterios de exclusión: pacientes que hubiesen recibido trasplantes de otros órganos previo o simultáneamente; pacientes con diagnóstico de inmunodeficiencias congénitas o adquiridas; pacientes con tratamientos inmunosupresores por otras causas.

La inmunosupresión consistió en el uso de metilprednisolona + TAC + inducción con BAS de acuerdo con el protocolo descrito en el anexo 1. Los pacientes fueron seguidos en base a las prácticas habituales del centro, recolectando prospectivamente los datos, hasta completar 1 año. La frecuencia de controles se ajustó de acuerdo con las características evolutivas de cada paciente, comprendiendo un mínimo de controles semanales durante el primer mes, quincenales en el segundo y tercer mes, y mensuales a partir del tercero. En cada caso se efectuaron controles clínicos, de laboratorio y de imágenes (de acuerdo con necesidad). El diagnóstico de rechazo se estableció en base a los criterios de Banff (57).

³ La aprobación ética para este estudio fue obtenida por el Comité de Ética del Sanatorio de Niños de Rosario, Rosario, Argentina. Toda la investigación se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki y Estambul. Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los sujetos. También se contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas como requisito contemplado en la normativa para la aprobación de proyectos de tesis del doctorado en Ciencias Biomédicas.

Se tomaron los recaudos necesarios para preservar la identidad de todos los participantes, cumpliendo con la ley de protección de datos personales (Ley 25.326) y las normas que la complementan. Los datos de las historias clínicas de los pacientes se utilizaron atento a los propósitos de esta investigación.

3.2.2. Estudios de ultrasonido. Se realizaron al momento de la internación del paciente inmediatamente previo al trasplante a cargo de un operador con experiencia en pacientes pediátricos, de acuerdo con la técnica descrita (58). Se repitieron controles a los meses 1, 3, 6, y 12 postrasplante. Todas las determinaciones se realizaron con un equipo GE Versana Balance (GE HealthCare, USA).

3.2.3. Evaluación de la función tímica. La timopoyesis como proceso dirigido a mantener el repertorio de linfocitos T *naïve* se estudió en base a la cuantificación de la frecuencia de los círculos de escisión del receptor de células T (TREC, por RTqPCR). Las muestras se obtuvieron en el momento de la internación inmediatamente previo al trasplante, y a los 1, 3, 6 y 12 meses postrasplante.

Como fuera anticipado la frecuencia en sangre entera de TREC en particular, un tipo de TREC denominado sjTREC, se considera proporcional al grado de exportación tímica de los emigrantes tímicos recientes (ETR). Durante el proceso de maduración en el timo, los timocitos reordenan los genes de la cadena α del TCR para generar un TCR funcional mediante la eliminación del locus δ que se dispone entre los segmentos V y J. Estos segmentos se unen para generar un solo exón que codificará la región variable del receptor. Como consecuencia de estos re-arreglos, se generan diferentes piezas de ADN circular, llamados sjTREC. Los sjTREC son estables y no se replican por lo que se diluyen tras cada división celular, no se degradan fácilmente y su presencia indica de forma inequívoca que la célula es de origen tímico. Los sjTREC son ampliamente utilizados para evaluar el grado de actividad y exportación tímica dado que es un marcador indiscutible de ETRs, es decir que cuanto mayor sea la cantidad de células que emigren del timo, mayor será la cantidad de sjTREC que van a detectarse en circulación (59). En nuestros pacientes la cuantificación de sjTREC se realizó a partir de muestras de sangre seca.

Brevemente, 50µl de sangre entera fresca se depositaron en forma de gotas sobre un papel de filtro homologado para tal fin y se dejó secar por 1hr a T ambiente para posteriormente ser almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Una vez acumulado un número significativo de muestras se procedió a la extracción del ADN de las mismas mediante la utilización de un kit de extracción de ADN comercial siguiendo el protocolo detallado en el mismo para este tipo de muestras (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Alemania). El rendimiento de la extracción de ADN a partir de 6 círculos de sangre seca de 3mm de diámetro fue de aproximadamente 5 ng/ml. El principio del ensayo para cuantificar TREC consistió en una técnica de PCR cuantitativa en tiempo real ("*real time*" PCR), mediante la utilización de la tecnología de sondas TaqMan, que permite una mayor especificidad y sensibilidad que la PCR convencional. Para aumentar la sensibilidad de la técnica 50 ng de ADN fueron pre-amplificados mediante PCR convencional utilizando *primers* específicos para los sjTREC y a modo de gen normalizador endógeno se amplificó simultáneamente el gen de la albúmina. La adaptación a una técnica cuantitativa requirió de una curva estándar, para lo cual se utilizaron plásmidos de concentración conocida (donados por el Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, FIOCRUZ, Río de Janeiro), que poseían la secuencia de los sjTREC y de la albúmina. Estos plásmidos se utilizaron para realizar una curva estándar en cada determinación. Los valores de sjTREC se obtuvieron por extrapolación en la curva estándar y relativización respecto del gen endógeno normalizador. Los TREC se informan como TREC/150.000 células que es la medida convencional utilizada en distintas publicaciones (60, 61).

Secuencias de *primers* y sondas utilizados:

Primers: sjTREC Forward CACATCCCTTTCAACCATGCT

Reverse GCCAGCTGCAGGGTTTAGG

Albúmina Forward GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT

Reverse ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC

Sondas: sjTREC FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCACT-TAMRA

Albúmina FAM-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-TAMRA

Asimismo, como medida complementaria a la determinación de sjTREC, también se analizó la presencia de ETR en circulación por citometría de flujo. Se ha descrito que las células en circulación con el fenotipo CD3+CD4+CD45RA+CD31+ poseen la mayor concentración de sjTREC, indicando que han emigrado del timo recientemente (62). Por dicho motivo, evaluamos el porcentaje de esta población en la sangre de los pacientes a los 0, 1, 3, 6 y 12 meses de instaurado el tratamiento inmunosupresor. Para ello, una alícuota de 100µl de sangre fresca se incubó con anticuerpos anti-CD3/APC-Cy7, anti-CD4/APC, anti-CD45RA/FITC y anti-CD31/PE-Cy7 (Invitrogen,USA) durante 30 min. A continuación, los eritrocitos se lisaron mediante la adición de una solución de lisis (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₂ 10 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH:7,3) y tras un lavado, los glóbulos blancos se resuspendieron en una solución de fijación (formol 4%) por 1 hr. Posteriormente la muestra se lavó y resuspendió en buffer fosfato salino (PBS) 1X. Luego, las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSAria II (Beckton-Dickinson, USA). En los análisis, las células muertas se eliminaron en función de la dispersión de la luz en diferentes ángulos (dispersión frontal -FCS- y dispersión lateral -SSC-) y se seleccionó la población de linfocitos de acuerdo con tamaño y complejidad. Se adquirió un mínimo de 1x10⁵ eventos para cada muestra. Los análisis de frecuencia se realizaron utilizando el software FlowJo (Beckton Dickinson, USA).

Un grupo de 10 niños que concurren a realizarse un procedimiento endoscópico que resultó “normal”, a los que se les extrajo sangre como parte de la rutina preanestésica, operó como “controles sanos”.

3.2.4. Análisis estadístico.

En primer término, se emplearon técnicas de análisis descriptivo para las variables bajo estudio (distintos parámetros bioquímicos, estudios complementarios, y datos clínicos). Se utilizaron pruebas no paramétricas para grupos no relacionados, y posteriormente se aplicaron técnicas *post-hoc* en función de la existencia de diferencias basales (por ejemplo, análisis de la variancia de Kruskal-Wallis). Para las variables cualitativas se aplicaron las técnicas de chi cuadrado y probabilidad exacta de Fisher. Los análisis de correlación se efectuaron en base a la prueba de Spearman.

En función del curso del trasplante se intentó determinar si dentro de la cohorte de trasplantados había diferencias entre aquellos con una evolución favorable o no. A partir de ello se efectuaron comparaciones entre esos dos subgrupos (pruebas no paramétricas para muestras no relacionadas, por ejemplo, Mann-Whitney U test, chi cuadrado o prueba de la probabilidad exacta de Fisher). Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad InStat 4.0 (GraphPad, California, USA). Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Estudio retrospectivo

Como fuera anticipado se aplicó un diseño cuasiexperimental basado en una cohorte de pacientes pediátricos consecutivos que recibieron un TH (edad < 18 años) de 2015 a 2019 en alguno de los cuatro centros mencionados bajo la coordinación del sitio base, (el Sanatorio de Niños, Rosario, Argentina). Junto con la muestra total se analizó por separado a los pacientes con AVB, ya que constituyen casi el 50% de las indicaciones para el trasplante hepático y ofrecen una población más homogénea (63). Los datos relevados a partir de los registros de los pacientes comprendieron variables clínicas (edad, sexo, antropometría, etc.) y de laboratorio (hemograma, medio interno, función hepática y renal, etc.). La tasa de filtración glomerular (TFG), estimada con la fórmula de Schwartz, se utilizó para medir la función renal (64). Además, se evaluó la TFG utilizando tecnecio-99m y se ajustó, cuando fue necesario, utilizando los métodos de Peter o Brochner-Mortensen (esto último solamente para los pacientes del Hospital Sainte-Justine). Las comparaciones entre los grupos se realizaron por separado para ambas técnicas. Los criterios de valoración principales fueron las tasas de supervivencia del paciente y del injerto a 1 año. Los eventos infecciosos se registraron como criterios de valoración secundarios (probados por cultivo o técnicas de biología molecular). Se consideraron episodios de colangitis cuando los pacientes desarrollaron fiebre con niveles crecientes de bilirrubina, GGT y/o ALT, que regresaron a valores previos después del tratamiento con antibióticos. No se requirieron cultivos positivos en este escenario. Los episodios de rechazo agudo se trataron con tres bolos intravenosos a una dosis de 10 mg/kg de metilprednisolona en días consecutivos. El programa de reducción gradual y la adición de micofenolato de mofetilo (MMF) variaron según los criterios del equipo médico. Se

realizaron ajustes en función de los factores individuales del paciente y la respuesta al tratamiento (ver Box 3).

También se comparó el número total de días que cada paciente recibió una dosis suprafisiológica de esteroides (>15 mg/m² de hidrocortisona o su equivalente).

Los protocolos variaron entre centros, pero en general todos realizaron una inducción con metilprednisolona (10 a 20 mg/Kg/dosis, bolo intraoperatorio IV), disminuyendo gradualmente durante los meses siguientes hasta

una dosis de mantenimiento de 0,2-0,3 mg/Kg/día, retirándola alrededor del 4º al 6º mes.

El TAC se inició durante la primera semana (alrededor del 3º y 5º día), buscando niveles valle de 10-12 ng/ml durante el primer mes. La primera dosis de BAS, cuando se administró, fue de 10 o 20 mg IV según el peso del paciente, con la primera dosis en el quirófano luego de la reperfusión arterial y la segunda dosis en el cuarto día postoperatorio. En uno de los centros administró globulina antitimocítica (ATG) a 1 mg/kg/dosis IV durante los primeros cuatro días (dosis total de 4 mg) como parte de su protocolo (Box 4). Los detalles del protocolo se pueden encontrar en el contenido complementario 2. Los pacientes se clasificaron de acuerdo con su protocolo de inmunosupresión de inducción en el Grupo A (TAC + esteroides + BAS), Grupo B (TAC +

Box 3: Protocolos de tratamiento del rechazo agudo según cada centro participante.

GRUPO A: Metilprednisolona: 3 bolos IV de 10 mg/kg/dosis, seguidos de 2 bolos de 5 mg/kg/dosis. Prednisona VO a 2 mg/kg/dosis (máximo 60 mg) durante 10 a 15 días según respuesta bioquímica, con descenso progresivo a un ritmo del 15% cada semana hasta retirada. Tras el segundo rechazo o en caso de respuesta parcial, se añade MMF a 600 mg/m²

GRUPO B: Metilprednisolona: 3 bolos IV de 10 mg/kg/dosis en días alternos, seguidos de 2 mg/kg/dosis (máximo 60 mg) de prednisona VO durante 14 días. Descenso progresivo del 20% cada semana, hasta conseguir dosis de 5 a 10 mg. No se debe suspender el tratamiento. Se añade MMF tras cualquier episodio de rechazo agudo celular, a dosis de 600 mg/m²

GRUPO C: Metilprednisolona: 1 a 3 bolos IV a 10 mg/kg/dosis según respuesta bioquímica, seguido de prednisona VO a 0,3 g/kg/dosis durante 15 días y reducción gradual a un ritmo de 0,1 mg/kg/dosis cada 10 días hasta la suspensión. Se considera MMF tras el primer o segundo episodio de rechazo agudo, a dosis de 600 mg/m² según respuesta clínica y bioquímica.

esteroides + BAS + ATG) o Grupo C (TAC+ esteroides). El protocolo se eligió de acuerdo con la práctica habitual de cada centro, (contenido complementario 1). Se añadió MMF durante la fase de inducción o de mantenimiento en los siguientes escenarios: TH por hepatitis autoinmune, en caso de lesión renal aguda, después de un primer (grupo B) o segundo episodio (grupo A y C) de rechazo celular agudo, o en casos de sospecha de toxicidad por TAC en los que era necesario mantener los niveles valle por debajo de lo habitual.

Noventa y siete pacientes de cuatro centros participantes cumplieron los criterios de inclusión y fueron analizados. Los datos demográficos y los perfiles bioquímicos de los pacientes antes del trasplante se muestran en la Tabla 1. Solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de ALT para el Grupo C. Aunque los niveles de urea y creatinina en sangre fueron diferentes entre los grupos, estuvieron dentro de los límites normales en casi todos los casos.

Tabla 1. Perfil clínico y bioquímico de los pacientes previo al trasplante (n=97)

Variable	Grupo A (n=52)		Grupo B (n=25)		Grupo C (n=20)		Valor de p	
	Todos	AB	Todos	AB	Todos	AB	Todos	AB
Edad (meses)	16 (10-80)	13.5 (8-22.7)	20 (14-27)	17.5 (11.5-25)	11.5 (6.8-25)	14.5 (6.5-68)	0.6	0.05
Peso (Kgrs)	11.1 (7.4-20.8)	9 (6.8-11.9)	10.2 (8-12.8)	9.7 (7.9-12.1)	20 (8-120)	9.3 (54-26.7)	0.15	0.31
ALT (UI/L)	91 (48-168)	93.5 (53-160)	91 (50-123)	86 (49-110)	202 (82-405)	268 (155-364)	0.03 ^a	0.03 ^a
AST (UI/L)	158 (91-277)	192 (121-278)	155 (77-258)	141 (86-197)	179 (70-298)	103 (18-245)	0.85	0.08
GGT (UI/L)	75 (27-196)	137 (52-319)	118 (62-253)	126 (117-355)	174 (56-422)	327 (209-692)	0.19	0.07
Bilirrubina (mg/dl)	8 (1.7-23)	21 (10.9-28.9)	10 (2.8-17)	9.3 (3.9-17)	11 (5.8-18)	10 (6.7-13.6)	0.86	0.01 ^b
Albúmina (gr/dl)	2.8 (2.5-3.3)	2.7 (2.5-3.0)	3.1 (2.9-3.3)	3 (2.7-3.3)	2.9 (2.4-3.4)	2.5 (2.2-3.1)	0.06	0.26
INR	1.6 (1.2-2.5)	1.6 (1.2-2.5)	1.4 (1.1-1.8)	1.2 (1.1-2.4)	1.5 (1.2-1.3)	1.3 (1.1-1.5)	0.5	0.08
Urea (mg/dl)	29 (24-39)	17 (14-22)	22 (17-27)	22 (17-26)	19 (12-36)	16 (12-42)	<0.001 ^b	0.37
Creatinina (mg/dl)	0.3 (0.1-0.5)	0.3 (0.2-0.4)	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.3)	0.4 (0.3-0.6)	0.4 (0.3-0.5)	<0.001 ^c	<0.001 ^d

Los valores representan la mediana (25-75 percentiles)

*Prueba de Kruskal-Wallis test seguida de las comparaciones *post-hoc* cuando correspondía.

a: C diferente de A y B

b: A diferente de B y C

c: C diferente de A and B

d: B diferente de C

En los datos del subgrupo de pacientes con AVB, observamos diferencias estadísticas en la edad (más alta en el Grupo B), niveles más altos de ALT en el Grupo C y bilirrubina en el Grupo A. Los niveles séricos de creatinina también mostraron diferencias, pero los valores estuvieron en su mayoría dentro de los límites normales (Tabla 1).

La distribución por etiología fue la esperada: casi el 50% de los pacientes tenían AVB, siendo la insuficiencia hepática aguda la segunda causa más común registrada (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de las enfermedades hepáticas (n = 97) *

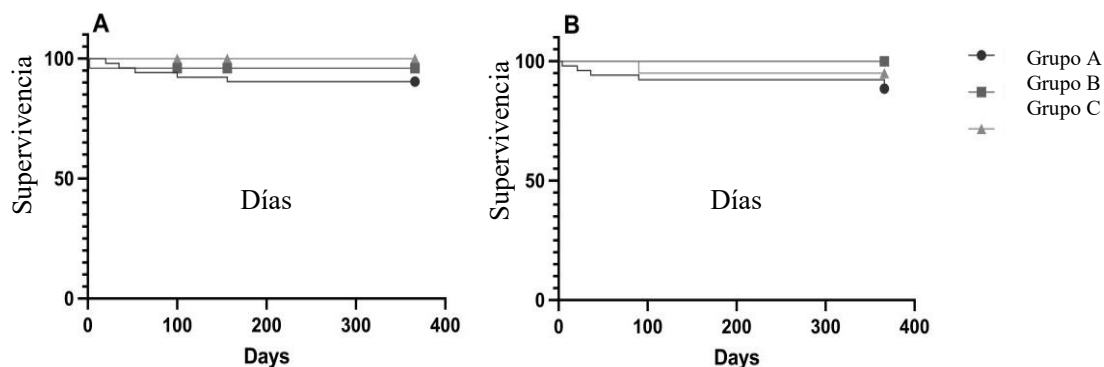
Diagnóstico	Protocolo de inmunosupresión		
	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Atresia de vías biliares	26 (50 %)	16 (64 %)	6 (30 %)
Hepatitis autoinmune	1	1	2
Falla hepática aguda	8	3	5
Colestasis genética	2	4	3
Neoplasias	6	-	-
Errores congénitos del metabolismo	3	-	1
Otros	6	1	3
Total (n = 97)	52	25	20

*48 casos correspondieron a AVB

En cuanto a los resultados del primer año post trasplante, no encontramos diferencias en la supervivencia del paciente o del injerto en todo el grupo o en la población de AVB (Figura 1).

Figura 1. Datos de supervivencia del paciente según tipo de tratamiento:

A) Supervivencia del total de pacientes (n=97). B) Supervivencia de pacientes con AVB (n=48)



La frecuencia de rechazo fue comparable entre los grupos; el rechazo resistente a esteroides fue un evento infrecuente, con dos pacientes en el grupo A, un paciente en el grupo B y ningún paciente en el grupo C ($p = 0.65$). El uso de esteroides durante el primer año después del trasplante fue comparable entre los grupos, aunque existen diferencias menores que son inherentes a cada protocolo (ver Boxes 3 y 4).

En el grupo A, se observó una media de 122,3 días (DE 18,8), 130,3 días (DE 29,4) en el grupo B y 128,3 días (DE 11,4) en el grupo C ($p = 0.27$). El MMF se utilizó en muy pocos casos: tres pacientes del grupo A, dos tras el segundo episodio de rechazo agudo y uno por necesidad de niveles valle de TAC más bajos ante la replicación activa del EBV a los 3 meses del TH. En el grupo B, seis pacientes recibieron MMF como parte de su protocolo habitual post-rechazo y en uno trasplantado por hepatitis autoinmune, al igual que tres pacientes del grupo C (p

Box 4: Protocolos inmunosupresores según grupo.

GRUPO A: Metilprednisolona: 10 mg/Kg/bolo IV en reperusión en el quirófano, continuar con 2 mg/Kg/día hasta normalización de aminotransferasas y GGT, luego cambiar a prednisona VO y disminuir 10-15% cada 3 a 7 días hasta dosis de mantenimiento de 3,75 mg/m² VO. Cambiar a hidrocortisona y disminuir lentamente hasta recuperación de función suprarrenal, luego suspender (aproximadamente entre el tercer y cuarto mes postoperatorio)

- Basiliximab: 2 dosis IV separadas los días 0 y 4. En <35 Kg: 10 mg/dosis, en >35 Kg: 20 mg/dosis

- Tacrolimus: desde el día 5 postoperatorio con objetivo de niveles sanguíneos de 10 a 12 ng/mL durante el primer mes. Reducir gradualmente a 4-5 ng/mL a los seis meses

GRUPO B: • Metilprednisolona: 20 mg/Kg/bolo IV post-reperusión en el quirófano, seguido de 10, 5, 3, 1,5 y 1 mg/Kg/bolo IV los días 1, 2, 3, 4 y 5 postoperatorios respectivamente. Continuar con prednisona oral disminuyendo gradualmente y suspendiendo entre el cuarto y sexto mes

- Basiliximab: 10 mg IV (< 10 Kg) o 20 mg IV si paciente > 10 kg

- Globulina antitimocítica: 1 mg/Kg/día IV los días 1 a 4

- Tacrolimus: desde el día 3, niveles objetivo de 10-12 ng/ml los primeros 3 meses, luego 8-10 ng/mL durante los siguientes 9 meses

GRUPO C:

- Metilprednisolona: 20 mg/Kg IV en bolo post-reperusión en el quirófano, luego 10, 8, 6, 4 mg/Kg/día IV los días 1 a 5. Desde el día 6 al 20: 0,3 mg/Kg/d IV, luego continuar con 0,6 mg/Kg/d PO. Disminución gradual a partir del tercer mes después de la operación, hasta detenerse a los cuatro meses

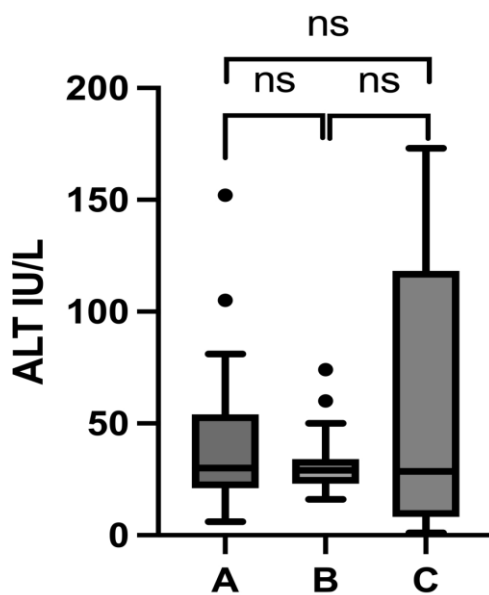
- Tacrolimus: niveles objetivo de 10-12 ng/mL los primeros 2 meses, luego 7-10 ng/mL hasta los 6 meses y disminución gradual a 5-7 ng/mL durante los siguientes

= 0.45). Al final del primer año, los niveles de ALT fueron similares (en su mayoría normales) en los tres grupos (Figura 2).

La frecuencia de replicación del EBV/CMV fue similar entre los grupos, tanto en la población total como en los pacientes con AVB.

La incidencia de otras infecciones también fue comparable entre los tres grupos (Tablas 3 y 4).

Figura 2. Valores de ALT entre los tres grupos al año del trasplante



ANOVA con corrección de Tukey. Se muestran las medianas y el RIQ

Grupo A (n=47) mediana 30, IC 95% 31.8 – 49.1

Grupo B (n=24) mediana 29, IC 95% 25.3 – 39.7

Grupo C (n=20) mediana 28.5, IC 95% 31.1 – 87.8

Tabla 3. Resultados del primer año en todos los pacientes trasplantados (n = 97)

Puntos finales primarios	Protocolos de inmunosupresión			Valor de p
	A (n=52)	B (n=25)	C (n=20)	
Supervivencia (paciente)*				
Sí	47 (90%)	24 (96%)	20 (100%)	0.29
No	5 (10%)	1 (4%)	0	
Supervivencia injerto (censurado/muerte)*				
Sí	49 (94%)	25 (100%)	19 (95%)	0.17
No	3 (6%)	0	1 (5%)	
Rechazo *				
Sí	14 (27%)	11 (44%)	5 (25%)	0.25
No	38 (73%)	14 (56%)	15 (75%)	
Infecciones *				
Sí	22 (42%)	11 (44%)	8 (40%)	0.30
No	30 (58%)	14 (56%)	12 (60%)	
Citomegalovirus *				
Sí	19 (37%)	9 (36%)	9 (45%)	0.06
No	33 (63%)	16 (64%)	11 (55%)	
Epstein-Barr Virus *				
Sí	22 (42%)	10 (40%)	10 (50%)	0.20
No	30 (58%)	15 (60%)	10 (50%)	
Urea (media) ** (mg/dl)	27 (21-35)	29 (22-34)	25 (20-30)	0.46
Creatinina (media) ** (mg/dl)	0.4 (0.3-0.5)	0.2 (0.1-0.3)	0.5 (0.4-0.6)	

* chi cuadrado

**Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una comparación post hoc de los niveles de creatinina. RIQ, entre paréntesis

a: B significativamente diferente de A y C

Tabla 4. Resultados del primer año en los pacientes trasplantados por AVB (n = 48)

Puntos finales primarios	Protocolos de inmunosupresión			Valor de p
	A (n=26)	B (n=16)	C (n=6)	
Supervivencia (paciente)*				
Sí	24 (88%)	15 (94%)	6 (100%)	0.32
No	2 (12%)	1 (6%)	0	
Supervivencia injerto (censurado/muerte)*				
Sí	25 (96%)	16 (100%)	6 (100%)	0.65
No	1 (4%)	0	0	
Rechazo *				
Sí	8 (31%)	7 (44%)	3 (50%)	0.44
No	18 (69%)	89 (56%)	3 (50%)	
Infecciones *				
Sí	14 (54%)	9 (56%)	2 (34%)	0.54
No	12 (46%)	7 (44%)	4 (66%)	
Citomegalovirus *				
Sí	9 (35%)	6 (37%)	5 (84%)	0.09
No	17 (65%)	10 (63%)	1 (16%)	
Epstein-Barr Virus *				
Sí	14 (54%)	7 (44%)	3 (50%)	0.87
No	12 (46%)	9 (56%)	3 (50%)	
Urea (media) ** (mg/dl)	17 (14-22)	22 (17-26)	19 (15-24)	0.34
Creatinine (media) ** (mg/dl)	0.3 (0.2-0.4)	0.2 (0.1-0.2)	0.4 (0.4-0.6)	<0.001 ^a

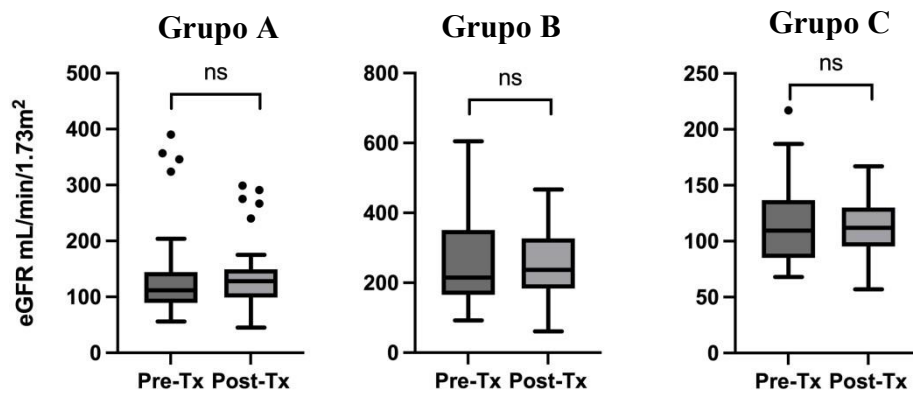
*chi cuadrado

**Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una comparación post hoc de los niveles de creatinina. RIQ, entre paréntesis

a: B significativamente diferente de A y C

Los cambios en el filtrado glomerular mostraron una tendencia general a permanecer estables, incluso en pacientes con hiperfiltración pretrasplante. Algunos pacientes aislados mostraron un empeoramiento de la función renal, pero esto no cambió la tendencia general (Figura 3).

Figura 3. TFGe al año del trasplante en todos los pacientes (n = 91)



Grupo B (n=24) mediana Pre-Tx 215 vs Post-Tx 237, p 0.72

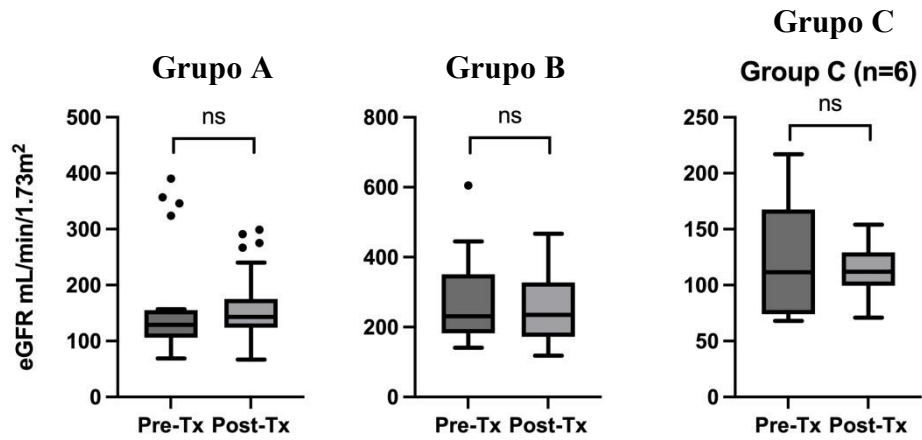
Grupo C (n=20) mediana Pre-Tx 109.5 vs Post-Tx 112, p 0.59

TFGe: tasa de filtración glomerular estimada; Pre-Tx: pre-trasplante; Post-Tx: post-trasplante

Datos faltantes: 5 pacientes en el Grupo A (9%), 2 en el Grupo B (8%) y 0 en el Grupo C. Se asumió que los datos faltantes faltaban completamente al azar

Esto también se vio cuando se analizaron solo los pacientes con AVB (Figura 4)

Figura 4. TFGe al año del trasplante en pacientes con AVB (n = 45)



Comparación de medianas mediante la prueba t, se muestra el RIQ

Grupo A (n = 24) mediana Pre-Tx 129 vs Post-Tx 143, p 0,72

Grupo B (n = 15) mediana Pre-Tx 231 vs Post-Tx 235, p 0,55

Grupo C (n = 6) mediana Pre-Tx 111.5 vs Post-Tx 112, p 0,64

TFGe: tasa de filtración glomerular estimada; Pre-Tx: pre-trasplante; Post-Tx: post-trasplante

Datos faltantes: 2 pacientes en el Grupo A (9%), 1 en el Grupo B (8%) y 0 en el Grupo C. Se asumió que los mismo tenían un comportamiento aleatorio

4.2 Estudio Prospectivo

Durante el período comprendido entre 01/01/2022 y 31/12/2023 se efectuaron 12 trasplantes hepáticos en el Sanatorio de Niños de Rosario. Las características de la muestra se describen en la Tabla 5. Como puede observarse la mayoría de los casos correspondieron a falla hepática aguda y atresia biliar.

Tabla 5. Características clínico-laboratoriales de los pacientes trasplantados durante el año de seguimiento

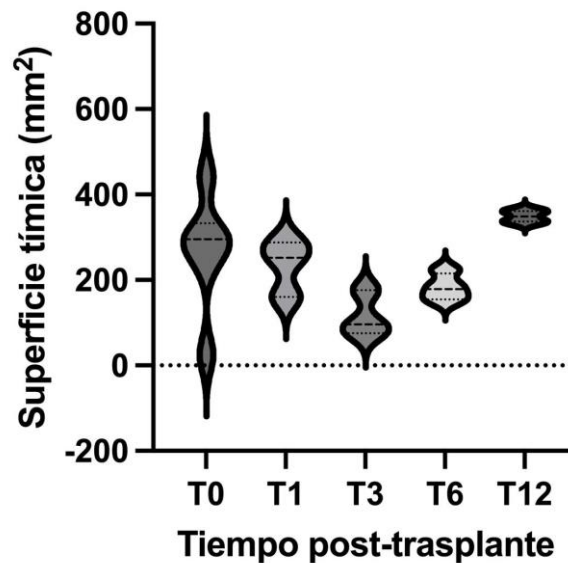
Variables	Momento de la evaluación			
	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses
Supervivencia paciente	12/12	12/12	12/12	12/12
Supervivencia injerto	10/12	10/12	10/12	10/12
Infecciones bacterianas	1/12	5/12	6/12	6/12
Infección por CMV	6/12	7/12	7/12	8/12
Infección por EBV	0/12	2/12	3/12	4/12
Infección por otros virus	1/12	1/12	1/12	1/12
Rechazo agudo	2/12	4/12	6/12	6/12
Motivo del trasplante	Número de casos			
Falla hepática aguda indeterminada	4			
Atresia de vía biliar	3			
Hepatitis autoinmune	2			
Fibrosis hepática congénita	1			
Enfermedad de Wilson	1			
Hepatitis fetal aloinmune	1			
TOTAL	12			

4.2.1 Estudios de ultrasonido

Todos los pacientes fueron sometidos a la realización de ecografías de la glándula tímica. El valor registrado inmediatamente antes de la realización de la cirugía se tomó como la medición basal. En los tiempos sucesivos y en base a las mediciones efectuadas se calculó

la reducción relativa del timo. Los datos se resumen en la Fig.5 Los valores al T0 indican la cuantificación en mm (largo, ancho y el producto). Resulta claro que existe una caída en el volumen de la glándula fundamentalmente en los T1, T3 y T6.

Fig. 5. Cambios en el área tímica durante el primer año postraplante, expresados en mm².



Los datos representan la mediana (percentiles 25-75) valores máximos y mínimos

4.2.2 Estudio de la funcionalidad del timo

En simultáneo se obtuvieron las muestras de sangre para la evaluación de la funcionalidad de la glándula, esto es, los TREC en gotas de sangre seca y la subpoblación de ETR por citometría de flujo en sangre fresca.

Los resultados de la primera serie de mediciones se hallan representados en la Figura 6 (de la página siguiente). Como puede advertirse se constató una caída muy notoria de los TREC en los pacientes trasplantados en los distintos tiempos analizados (meses 1, 3, 6 y 12) posteriores a la realización del TH, lo cual se tradujo en una diferencia estadísticamente significativa para T1, T3 y T12 respecto de los valores basales (T0, panel

a). Para una mejor apreciación de los resultados el panel b brinda los datos particulares de cada tiempo de estudio.

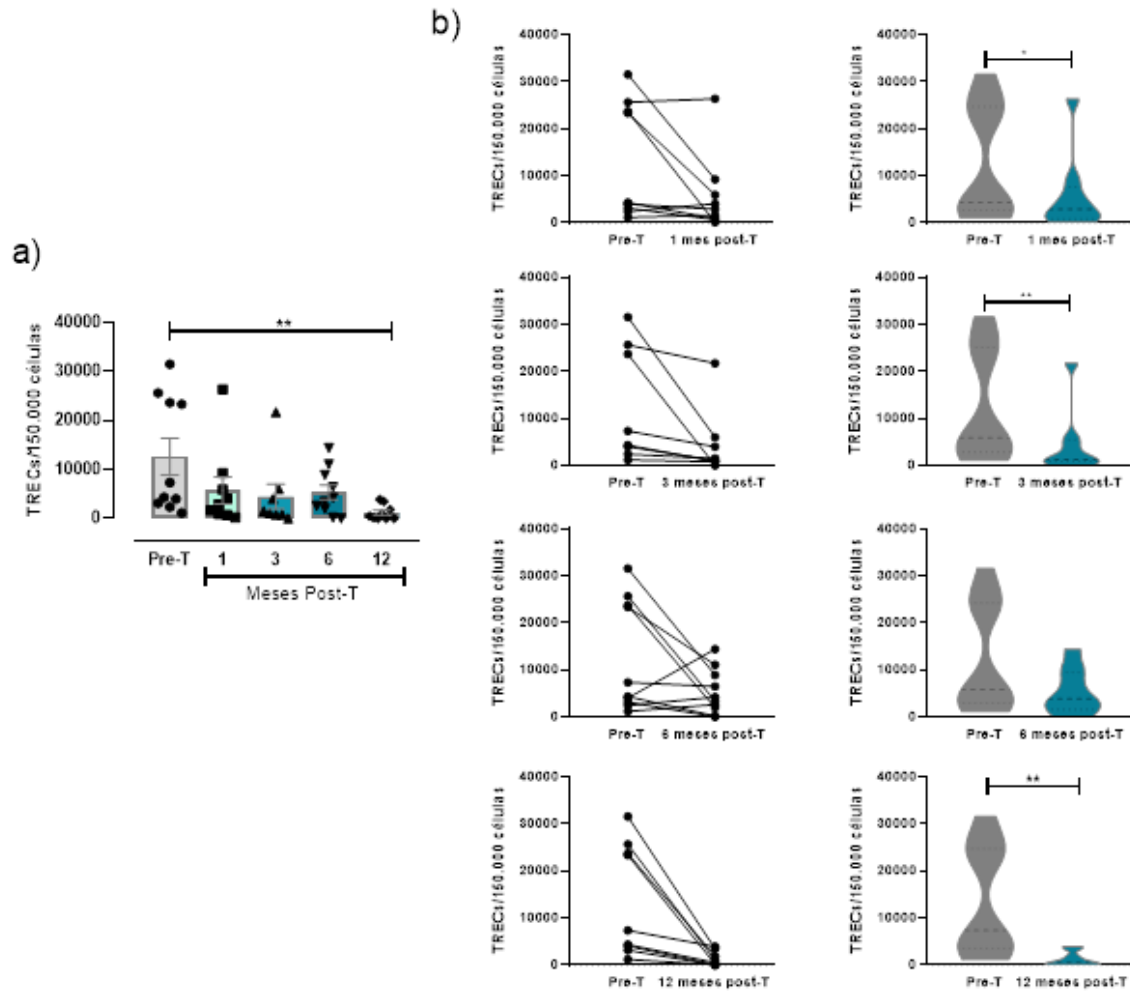


Figura 6: Cuantificación de círculos de escisión del receptor de células T (TRECs) en sangre de pacientes trasplantados durante los diferentes meses de seguimiento.

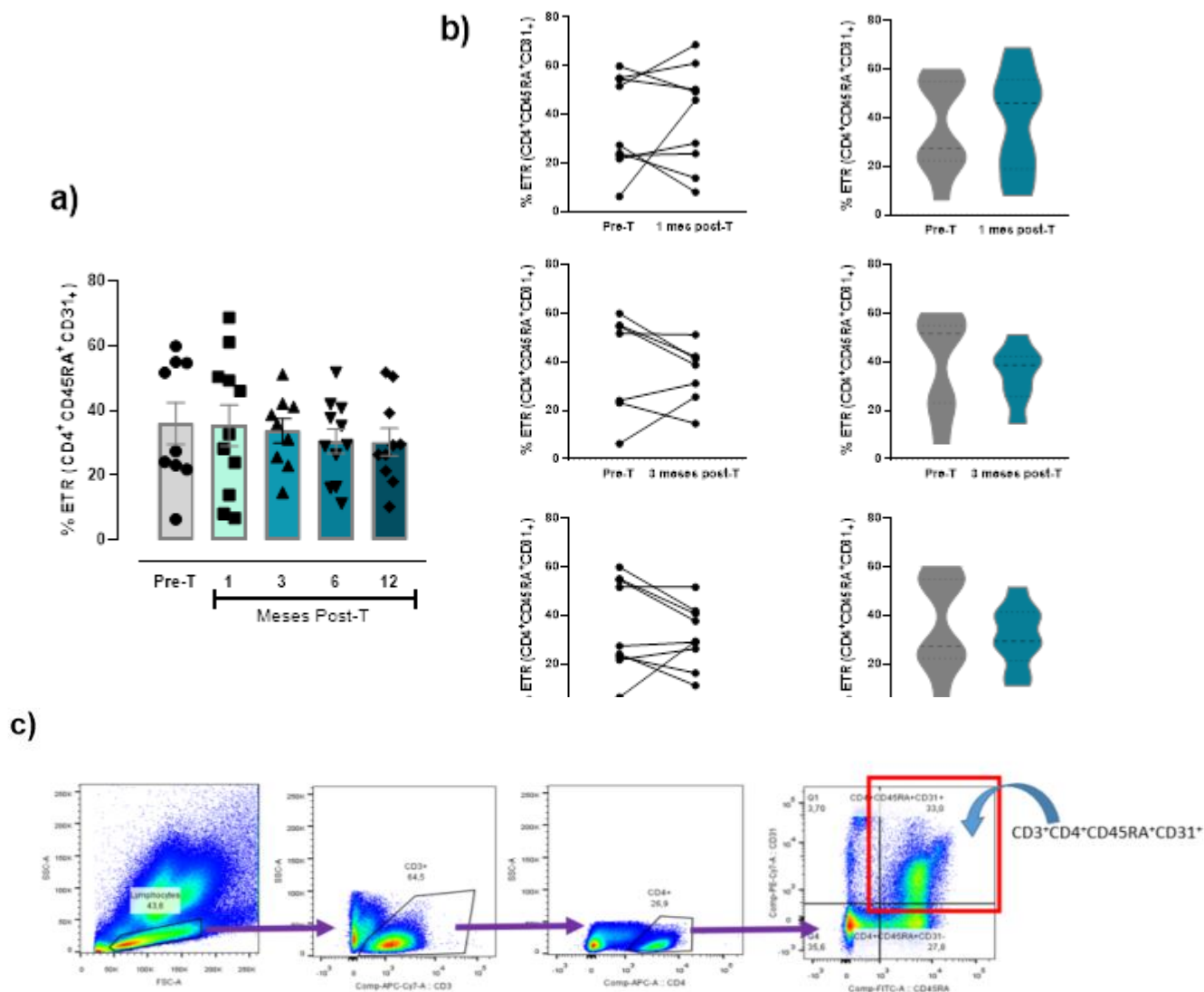
a) Niveles de TRECs en circulación durante todos los meses del seguimiento. Los datos representan la media \pm error estándar de la media. Las comparaciones se efectuaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Friedman.

b) Niveles de TRECs en circulación mes a mes del seguimiento. Gráficas izquierdas cada punto representa los niveles de TRECs/pacientes pre y post trasplante. En las gráficas a la derecha se indica la mediana y los cuartiles correspondiente a todos los pacientes. Las comparaciones se efectuaron mediante prueba de rangos de Wilcoxon para pares apareados. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Pre-T: Pre-trasplante, muestras previas al Tx y tratamiento inmunosupresor.

Post-T: Post-Trasplante muestras tomadas a diferentes tiempos luego de realizado el trasplante bajo tratamiento inmunosupresor.

Figura 7: Cuantificación de la subpoblación de emigrantes tímicos recientes (ETR) en sangre de pacientes trasplantados durante los diferentes meses de seguimiento (las leyendas están en las páginas 57 y 58).



a) Proporción de ETRs en circulación durante todos los meses del seguimiento. Los datos representan la media \pm error estándar de la media. Las comparaciones se efectuaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Friedman (las cuales no resultaron significativas).

b) Proporción de ETR en circulación mes a mes del seguimiento. Paneles izquierdos cada punto representa los porcentajes de ETRs por pacientes pre y post trasplante. En lo concerniente a las figuras a la derecha del panel b) lo mostrado está referido a la mediana y los cuartiles correspondiente a todos los pacientes agrupados. Las comparaciones se efectuaron mediante prueba de rangos de Wilcoxon para pares apareados (diferencias no significativas).

c) Los porcentajes de ETR se obtuvieron por citometría de flujo mediante la selección de la subpoblación de linfocitos positiva para los marcadores CD3+CD4+CD45RA+CD31+ como puede observarse en la estrategia de gates utilizada`

Pre-T: Pre-trasplante, corresponde a muestras tomadas previo al trasplante e instauración de tratamiento inmunosupresor.

Post-T: Post-Trasplante corresponde a muestras tomadas a diferentes tiempos luego de realizado el trasplante e instaurado tratamiento inmunosupresor.

En cuanto a las evaluaciones de los ETR, las mediciones efectuadas mostraron un descenso de los mismos particularmente un tanto más manifiesto en los tramos posteriores del seguimiento (T6 y T12, Figura 7 paneles a y b), aunque la tendencia no llegó a ser significativa probablemente por cuestiones de un bajo tamaño muestral que redujo el poder del análisis.

En un paso posterior se procedió al cálculo de las correlaciones entre la edad de los pacientes (en meses) y los valores de TREC y ETR registrados en todos ellos. Como se halla consignado en la Tabla 6, la variable edad mostró una asociación negativa tanto en los pacientes trasplantados como en un grupo de controles sanos, en relación con los TREC. Algo similar se verificó cuando se efectuaron los cálculos parámetro edad vs. ETR (misma tabla).

Tabla 6. Correlaciones entre la edad de los pacientes y los parámetros de funcionalidad tímica

Sub-rogados tímicos	Edad en meses (de 1 a 205)		
	r	R ²	Valor de p
Log TRECs			
Controles sanos	-0.85	0.72	0.0019
Pre y Post-Trasplante	-0.48	0.23	0.0002
Pre-Trasplante	-0.44	0.19	0.0879
Post-Trasplante	-0.48	0.23	0.0008
ETR			
Pre y Post Trasplante	-0.57	0.33	0.0001
Pre-Trasplante	-0.37	0.14	0.1620
Post-Trasplante	-0.64	0.40	0.0001

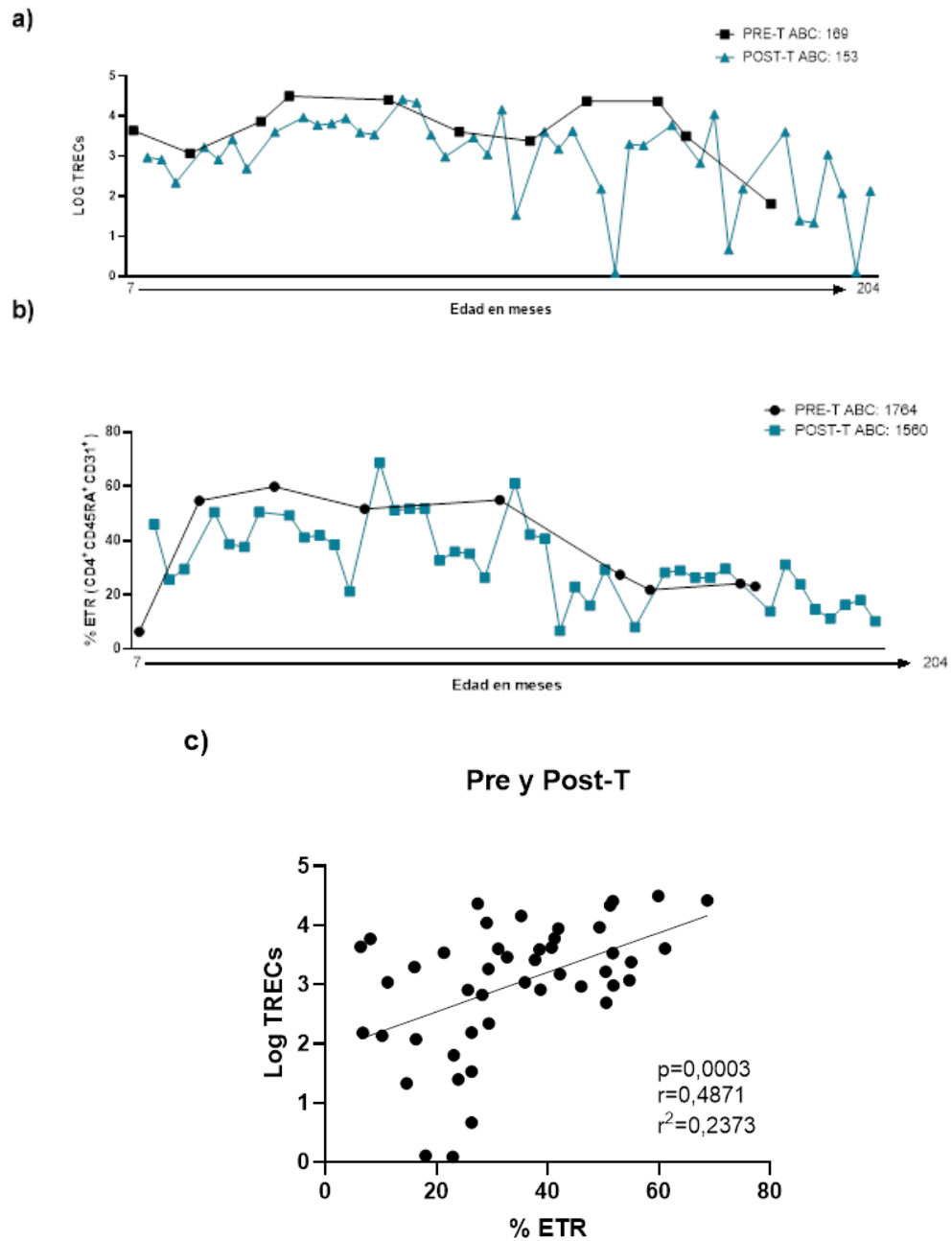
Se aplicó el coeficiente de correlación paramétrico de Pearson. R² representa la proporción de la variancia de una variable dependiente explicada por una variable independiente (en este caso edad). Pre-Trasplante corresponde a muestras tomadas previo al trasplante e instauración de tratamiento inmunosupresor. Post-Trasplante corresponde a muestras tomadas a diferentes tiempos luego de realizado el trasplante e instaurado tratamiento inmunosupresor. Los controles sanos fueron niños emparejados en sexo y edad sin patología evidente.

El número de pacientes estudiados no permite efectuar un análisis en el que se pueda introducir la covariable edad en el binomio analito de funcionalidad tímica y tiempo post-trasplante. Como un intento de poder obtener alguna información al respecto en la Figura 8 se brindan datos sobre los niveles de TRECs y ETR en función de la edad (en meses), en los cuales se visualiza una tendencia en el sentido de la interrelación negativa. El panel c de la misma figura indica por otro lado que ambos parámetros de funcionalidad glandular se encuentran positivamente asociados.

Figura 8: Variación del log TREC (a) y ETR (b) en circulación en función de la edad en meses.

ABC: Área bajo la curva. La utilización de una línea que une los puntos es sólo a los efectos de brindar representatividad en términos de área bajo la curva, ya que los diferentes puntos no corresponden al mismo paciente.

c) Correlación entre el log TREC y ETR. R2 representa la proporción de la variancia de una variable dependiente explicada por una variable independiente (en este caso edad).



4.2.3. Variaciones en TRECS y ETR en relación con las complicaciones (en función del objetivo 2.1.3)

Si bien se analizó la presencia de rechazo e infecciones (bacterianas, CMV y EBV) a lo largo del primer año postrasplante, dado que los mismos pacientes sumaron eventos los datos se analizaron agrupadamente en base a la existencia, o no, de complicaciones (tabla 8). Aunque en nuestra población no se observan diferencias significativas entre los diferentes grupos, no se puede descartar la influencia del pequeño tamaño muestral en el resultado (n=12).

Tabla 8. Valores de TRECs y ETR para los diferentes “time-points” en función de la existencia de complicaciones.

Parámetro	Complicación Mes 3		Complicación Mes 6		Complicación Mes 12	
	Si (n=7)	No (n=4)	Si (n=6)	No (n=5)	Si (n=3)	No (n=8)
TRECs	4551±2938	1116 ±344	2218±988	7437±3261	1362±1277	496 ±263
Valor de <i>p</i>	<0.58		<0.10		<0.35	
ETR	30.2 ± 5.1	40.4 ± 1.8	24.9 ± 7.3	33 ± 2.5	18.2 ± 8.0	34.9 ± 4.8
Valor de <i>p</i>	<0.32		<0.32		0.14	

Los valores representan la media ± es y las comparaciones se efectuaron por medio de la prueba de la U de Mann-

Whitney

5. Discusión

5.DISCUSIÓN

En 1963, Starzl et al. (65) intentaron realizar un TH por primera vez en humanos en una niña de 3 años con AVB que murió durante la cirugía debido a una hemorragia incontrolable. La siguiente serie de pacientes sobrevivió a la cirugía sólo para sucumbir poco después debido a complicaciones relacionadas principalmente con la inmunosupresión. En ese momento, los protocolos se basaban en la administración de esteroides en dosis altas y azatioprina. A fines de los años sesenta, con la introducción de ATG, la supervivencia de los pacientes en el primer año alcanzó el 30% (9); sin embargo, este régimen amplio y no selectivo se asoció con tasas de complicaciones inaceptables, particularmente rechazo e infecciones (66). Un gran avance se produjo en 1979 cuando Calne et al. (67) demostraron la eficacia inmunosupresora de la CyA, un inhibidor de la calcineurina, que fue inmediatamente adoptado en todo el mundo, marcando el comienzo de una nueva era del trasplante de órganos sólidos. Desde entonces, se han probado y aprobado una gran variedad de agentes y sus combinaciones para la inmunosupresión postrasplante (68-71).

Los protocolos actuales tienen como objetivo evitar el rechazo y prolongar la supervivencia del injerto, además de prevenir las complicaciones asociadas a la inmunosupresión, como infecciones, enfermedad renal y desarrollo de cáncer (71).

Actualmente se encuentran disponibles protocolos basados en diferentes combinaciones de inmunosupresores (detallados en el Box 1), por lo que es práctica común adoptar regímenes basados principalmente en preferencias personales en lugar de evidencia publicada, que, en su mayor parte, está lejos de ser sólida (72). Creemos que nuestro estudio representa con suficiente precisión el panorama actual de las prácticas de inmunosupresión (73). La distribución por etiología de la enfermedad primaria fue

concordante con la experiencia publicada, donde la AVB representó aproximadamente el 50% de los casos y la insuficiencia hepática aguda, la segunda causa más común (74-76). Los grupos fueron comparables, y aunque se observaron diferencias bioquímicas menores, éstas fueron marginales. Las tasas de supervivencia del paciente y del injerto a 1 año fueron >90% en todos los grupos y comparables a los estándares actuales, sin diferencias intergrupales (77). La incidencia de rechazo agudo en nuestros pacientes fue entre 25% y 44%, similar al 40-60% reportado por otros autores durante el primer año (78), sin significación estadística entre los grupos. El rechazo resistente a esteroides, definido como una falta de respuesta bioquímica después del tratamiento apropiado con dosis intravenosas altas de los mismos (79, 80), se observó en solo tres de nuestros pacientes (14% de los rechazos en el Grupo A y 9% en el Grupo B).

La inducción con anticuerpos ya sea BAS o ATG, se utiliza con la intención de reducir la incidencia de rechazo y disminuir las complicaciones renales asociadas con la introducción temprana de ICN. Se ha sugerido que BAS más TAC es mejor que los esteroides solos en términos de supervivencia libre de rechazo a 3 años,(81) aunque otros estudios, principalmente en el ámbito de adultos, no pudieron reproducir tales hallazgos (82). En nuestro estudio, no solo no pudimos encontrar diferencias en las tasas de rechazo entre los grupos, sino que el número total de días que los pacientes recibieron dosis suprafisiológicas de GC durante el período de seguimiento también fue similar. Además, en la presente serie, sólo unos pocos pacientes requirieron un protocolo de inmunosupresión de mantenimiento modificado (es decir, MMF), sin diferencias entre los grupos. Este hallazgo podría atribuirse al período de seguimiento relativamente corto del estudio (un año). Sin embargo esto es poco probable, dado que la mayoría de los episodios de rechazo tienden a ocurrir durante los primeros 6 meses después del TH, y

es un hecho que la mayoría de los pacientes disminuye considerablemente la carga de inmunosupresión a medida que se aleja del momento del trasplante.

La inmunosupresión posterior al trasplante hace que los individuos sean vulnerables a infecciones oportunistas o reactivación de infecciones latentes. Estos están estrechamente relacionados con el grado de inmunosupresión en un momento dado, y en el TH pediátrico los mejores ejemplos son el CMV y EBV. Aunque difícil de evaluar de forma fiable, la intensidad de la inmunosupresión fue probablemente mayor en el grupo B, a pesar de lo cual no encontramos diferencias en la incidencia de infecciones bacterianas, fúngicas o virales. Además, no se registraron casos de enfermedad linfoproliferativa postrasplante (que se asocia con la replicación de EBV). La función renal es otro tema de preocupación en estos pacientes, y debe ser monitoreada estrechamente. Es ampliamente aceptado que una disminución en la TFG es casi inevitable, y en una proporción variable de casos, puede conducir a una enfermedad renal terminal (83, 84). Sin embargo, datos recientes han demostrado que esto no tiene por qué ser necesariamente así (85, 86). Aunque históricamente se ha atribuido a la nefrotoxicidad inherente de algunos de los muchos fármacos utilizados después del trasplante renal, todavía quedan por dilucidar otros mecanismos implicados en la lesión renal postrasplante (87-89). Estas discrepancias pueden deberse a la naturaleza multifactorial de las lesiones entre los pacientes. De hecho, nuestro grupo sugirió recientemente que el deterioro de la función renal puede ser secundario al desarrollo de complejos de IgA circulantes, posiblemente favorecidos por el uso de TAC a una edad temprana (16). Dado el impacto negativo de la enfermedad renal avanzada en la calidad de vida de los pacientes, se deben realizar todos los esfuerzos posibles para prevenirla (90). En ese sentido los protocolos de inmunosupresión que retrasan la introducción de

ICN o los combinan con un segundo agente (MMF o inducción con anticuerpos), permiten niveles valle de ICN más bajos durante el posoperatorio inmediato, período durante el cual los riñones son más vulnerables (91). En nuestro estudio, evaluamos la función renal de los pacientes, con los Grupos A y B introduciendo ICN desde el día 4 después del trasplante y el Grupo C comenzando ICN en las primeras 24 horas. A pesar de las diferencias esperadas, no encontramos ningún cambio clínicamente significativo en la TFG antes y después del TH (Figura 3). Curiosamente, algunos pacientes (principalmente en el Grupo B) mostraron una TFG elevada tanto antes como después del trasplante. Este estado de hiperfiltración ha sido descrito previamente, probablemente secundario a enfermedad hepática y se reconoce como un marcador temprano de lesión renal (92, 93). Yoshida et al.(94) demostraron que los pacientes sometidos a inducción con anticuerpos tuvieron una función renal significativamente mejor inmediatamente después del trasplante; sin embargo, este efecto desapareció después del primer año. De manera similar, Tchervenkov et al. (95) encontraron que los pacientes tratados con anticuerpos tenían niveles de creatinina sérica más bajos a los seis meses, pero no se hallaron diferencias en la TFG. En nuestros pacientes no pudimos detectar ninguna diferencia en la función renal un año después del trasplante. Esto fue así para las comparaciones entre grupos, aunque los pacientes individuales mostraron resultados discordantes.

Los protocolos de ahorro de esteroides, en los que los ICN se introducen poco después del TH para acortar o evitar el uso de esteroides en dosis altas, han sido propuestos desde finales de los noventa por el grupo de Bruselas con excelentes resultados (29).

Entre los tres grupos de nuestro estudio (con y sin inducción de anticuerpos), la incidencia de complicaciones fue similar. Otros efectos secundarios bien conocidos de los GC como

diabetes, osteopenia, hipertensión arterial y manifestaciones oculares, no se incluyeron en el análisis porque eran transitorios o tardaban mucho tiempo en desarrollarse (96).

En conclusión, en la primera parte de este trabajo de tesis, no pudimos encontrar diferencias en los resultados entre los tres protocolos de inmunosupresión utilizados, ya sea como grupo completo (n = 97) o centrándonos solo en los pacientes con AVB (n = 48).

La supervivencia del paciente y del injerto, las tasas de rechazo, la desviación de los protocolos establecidos, la incidencia de infecciones y la función renal fueron clínica y estadísticamente similares después de un año de seguimiento. En nuestro estudio, el uso de BAS y/o ATG no pareció modificar los resultados (97). Es tentador especular que si esto es cierto, podría ser entonces que los diferentes protocolos fuesen intercambiables, permitiendo flexibilidad en los regímenes inmunosupresores. En este caso, el equipo médico podría adoptar la mejor pauta de inmunosupresión para un escenario determinado (es decir, pacientes con lesión renal aguda, sarcopenia, aquellos que reciben trasplantes dobles, diabéticos, etc.) sin comprometer los resultados.

Nuestro estudio tiene limitaciones inherentes, como su naturaleza retrospectiva y observacional, número limitado de participantes, distribución desigual entre centros, y relativamente corto período de seguimiento. La posible interacción entre los diferentes fármacos otorga una cuota adicional de prudencia en cuanto a la inferencia los hallazgos, ya que no se puede descartar la presencia de factores de confusión. Sin embargo, creemos que refleja adecuadamente la “experiencia de la vida real” en la atención diaria de estos pacientes complejos.

Aunque un ensayo controlado aleatorio sigue siendo el estándar de oro para comparar tratamientos, llevarlo a cabo constituye una tarea formidable en este escenario, por su difícil implementación. Hasta entonces, los estudios cuasi experimentales como el

presente podrían proporcionar información útil para ayudar en la toma de decisiones. Sin dudas se requieren estudios más amplios con mayores períodos de seguimiento para llegar a conclusiones más definitivas. Mientras tanto, las decisiones terapéuticas seguirán guiándose por el buen criterio y la experiencia del equipo médico con la ayuda de la mejor evidencia disponible a cuyo fin el presente estudio intenta ser un aporte (98, 99).

Los resultados obtenidos a partir del estudio prospectivo en torno a afectación de la morfología y funcionalidad del timo apuntan a un impacto negativo (en ambos casos, con las limitaciones de una muestra relativamente pequeña), cuyos pormenores se discuten a continuación.

El área tímica mensurada en el momento pre y postrasplante evidencia una reducción cuya cuantificación exacta es difícil de establecer con el método utilizado en nuestro trabajo, dado las escasas mediciones válidas que se obtuvieron en relación con el pequeño tamaño residual de la glándula, al menos durante el primer año postrasplante (100). Es probable que la glándula haya involucionado como consecuencia del estrés y el uso de GC a altas dosis. Sin embargo, no podemos descartar que esto pueda deberse a dificultades técnicas de la práctica (paciente no cooperativo, pequeño tamaño de la glándula), o al escaso número de pacientes estudiados (12 en total). En cualquier caso, si bien no podemos establecer conclusiones definitivas, podríamos afirmar que nuestras observaciones son consistentes con el desarrollo de un impacto negativo intenso en la morfología de la glándula tímica que puede ser observada al menos durante el primer año. Un fenómeno claramente manifiesto que se acompañaría igualmente de una afectación funcional.

Como fuera señalado más arriba, el timo desempeña un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la inmunidad adaptativa, instruyendo a los linfocitos

inmaduros a tolerar los antígenos propios y a atacar a los extraños. Esta función esencial se logra mediante complejas interacciones intercelulares entre los timocitos inmaduros, originados en la médula ósea, y las células del estroma del timo. Como resultado, los linfocitos T maduros emergen del timo y entran al torrente sanguíneo, listos para interactuar con sus antígenos afines.

La función tímica alcanza su máximo nivel durante la infancia y disminuye gradualmente a partir de entonces en un proceso conocido como senescencia. Esta involución relacionada con la edad se caracteriza por una lenta atrofia glandular secundaria al aumento de la apoptosis tanto de los timocitos inmaduros, en particular de las células doblemente positivas CD4/CD8, como de las células epiteliales tímicas, con reemplazo por tejido adiposo. Estos cambios reducen significativamente la producción tímica, lo que se refleja en una disminución del repertorio de TCR y una mayor proporción de linfocitos T de memoria en la periferia. En humanos sanos, este declive se produce alrededor de los 30-40 años, con una marcada desaceleración posterior (101).

En condiciones fisiológicas, esta senescencia se produce de forma lenta e irreversible a lo largo de muchos años. Sin embargo, se ha demostrado que, en ciertas condiciones patológicas, el timo puede experimentar una involución aguda caracterizada por un aumento de la muerte de timocitos y células epiteliales tímicas. Esta, a diferencia de la senescencia tímica normal, podría revertirse si se elimina el agente agresor.

La mayoría de estas situaciones tiene que ver con infecciones severas, cáncer, radiación o influencias hormonales como los GCs (102). Otros estímulos como la inmunosupresión pueden igualmente acelerar la apoptosis doble positiva (103). Evidencia en un modelo de infección experimental por *Trypanosoma cruzi* indica que los GCs están directamente involucrados en la involución tímica (104).

La distinción entre la senescencia fisiológica normal y la ATI cobra especial relevancia en el contexto del trasplante hepático pediátrico, donde los protocolos de inmunosupresión implican la administración de GC a dosis altas en combinación con ICN, como el TAC. En muchos casos, también se utiliza la terapia de inducción con BAS. Este régimen produce una profunda inhibición de la señalización de IL-2, crucial para la supervivencia de los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y los linfocitos Tregs (105).

Dado que la mayoría de los trasplantes de hígado pediátricos se realizan antes de los seis años de edad, durante el período de máxima actividad tímica, la repercusión de la inmunosupresión temprana e intensa sobre la función tímica y el desarrollo inmunológico es una preocupación urgente (106).

Sin embargo, este tema ha recibido una atención limitada en la literatura, aunque algunos autores han estudiado el impacto de la función del timo durante el período previo al trasplante y su relación con resultados adversos después del trasplante de riñón, ya que la enfermedad renal terminal se asocia con la involución tímica aguda (107).

En el presente estudio, buscamos evaluar el estado morfológico y funcional del timo en una cohorte de niños sometidos a su primer TH. Esto se logró mediante ecografía del timo y la cuantificación de TREC y ETR en sangre periférica. Es de destacar que ambos estudios evidenciaron un comportamiento similar en cuanto a la afectación de la función y el tamaño de la glándula tímica, lo cual otorga mayor verosimilitud a los hallazgos obtenidos.

Al igual que en otros estudios sobre ATI en función de la edad o influencias de inmunomediadores como los interferones (108, 109), se observó que los pacientes pediátricos que recibían inmunosupresión para trasplante de hígado experimentaron una involución tímica, en el presente estudio reflejada en la marcada reducción de sjTREC.

Nuestros hallazgos no permiten establecer si lo observado es una clara ATI o una senescencia temprana. En parte porque no resulta claro si 12 meses después de la agresión inicial (el protocolo de inducción) es un tiempo suficiente para que el timo recupere su función normal, y los efectos reportados se deberían solo al protocolo de inducción, o al uso continuo de TAC, si bien en dosis menores, aún capaz de inducir cierto grado de involución tímica. Por un lado, las tendencias observadas en las mediciones de sjTREC parecen apuntar a un efecto sostenido, ya que los sjTREC en T12 son significativamente menos frecuentes que en T0, pero como se mencionó anteriormente, nuestro estudio no es lo suficientemente robusto, en términos muestrales y temporales, como para diferenciar entre una senescencia temprana o una ATI. Por otro lado, los ETR parecen verse afectados poco después del trasplante (T1), pero puede observarse cierta estabilidad e incluso cierta tendencia al alza en etapas posteriores (T12), lo que podría sugerir que nuestros hallazgos son más compatibles con una inhibición transitoria, similar a la de una ATI. A pesar de no poder establecerse con certeza cuál de estos dos escenarios es el real, creemos que el segundo sería más probable. Esto puede verse parcialmente respaldado por los hallazgos limitados, pero notorios, de reducción del tamaño del timo. Como se desprende de la Fig. 5, la superficie de la glándula disminuye en forma apreciable inmediatamente después del trasplante, siendo más evidente entre T1 y T3, lo cual también ha sido descrito por otros autores (110).

Sin embargo, en estadios posteriores (T6 y T12) se observa una tendencia al aumento de tamaño. Estos resultados sugieren que, tras la agresión inicial, caracterizada por las altas dosis de inmunosupresión utilizadas durante los primeros 1 a 3 meses tras el trasplante, la función tímica parece recuperarse lentamente, aunque aún no alcanza niveles normales a un año postrasplante. Además, este aumento de tamaño observado tras una

involución tímica episódica es compatible con lo que otros autores han descrito y denominado «hiperplasia de rebote tímico», constatada principalmente tras una ATI secundaria a quimioterapia y radioterapia (111, 112).

Se debe tener en cuenta que el timo debe disminuir lentamente de tamaño con el tiempo y, por lo tanto, es esperable una glándula ligeramente más pequeña en T12, independientemente del posible efecto de la inmunosupresión (113).

Por lo tanto, el hecho de que el tamaño medio de T12 sea mayor que el de T0 podría indicar que la glándula estaría recuperando su función, lo que también sería consistente con la ATI en lugar de la senescencia temprana.

Esta distinción va más lejos que un simple problema semántico. Debe recordarse que, según ha sido señalado, es probable que la involución tímica guarde cierta relación con una mayor ocurrencia de enfermedades neoplásicas (106). También se ha propuesto que el envejecimiento del timo está estrechamente vinculado a una disminución de la capacidad inmune y la reparación de los tejidos, lo que también podría desempeñar un papel eventual en la fibrosis del injerto y la recuperación del órgano después del rechazo (114). Claramente se necesitan más estudios para dilucidar el papel del timo en los resultados del trasplante.

Esta segunda parte del trabajo de tesis también presenta algunas limitaciones, principalmente en la medición del tamaño tímico. A pesar de que algunos autores han demostrado que la ecografía es segura y eficaz para la evaluación del tamaño y la morfología tímica, incluso en recién nacidos (115), durante nuestro estudio encontramos numerosas dificultades con esta técnica. En la mayoría de los pacientes la glándula se visualizó escasamente, incluso en el período pretrasplante, lo que impidió utilizar a cada paciente como su propio control. Por lo tanto debimos aplicar un análisis de medias, una

prueba menos potente. Incluso en algunos pacientes con una glándula evaluada adecuadamente en T0, no fue factible realizar mediciones adicionales en los puntos temporales posteriores, en parte porque esto podría haberse debido a una atrofia extrema del timo, (demasiado pequeño para su detección), o a un problema con la técnica o el operador. De todos modos, la morfología y el tamaño del timo en el presente estudio se utilizaron como datos adicionales respaldatorios de los hallazgos principales (sjTREC y ETR). Estos hallazgos mostraron un comportamiento simétrico a lo largo del seguimiento, lo que le otorga mayor robustez a los resultados.

Nuestra serie de pacientes es pequeña, pero cabe destacar que hasta la fecha no se ha realizado ningún otro estudio similar, lo que los hace interesantes en cuanto a demostrar el impacto que tiene el tratamiento inmunosupresor sobre la glándula tímica. Restará por elucidar si existe una asociación entre los cambios de TREC y ETR en función de la existencia o no de complicaciones, lo que requerirá un mayor número de pacientes en seguimiento. Los datos del mes 12 en nuestra población estarían apuntando en esa dirección.

Si bien los efectos a largo plazo (más de un año postrasplante) no han sido estudiados, el comportamiento de los datos aquí recopilados permite suponer que los cambios descritos se mantienen más allá del período inmediato, y que la morfofuncionalidad tímica probablemente continúe afectada en el mediano plazo.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

En el presente estudio no observamos diferencias de resultados en términos de seguridad y eficacia entre los diferentes métodos de inmunosupresión utilizados (estudio retrospectivo).

Los estudios morfofuncionales de la glándula tímica en niños trasplantados hepáticos bajo inmunosupresión muestran un impacto negativo que continúa expresándose al menos hasta un año después del trasplante (estudio prospectivo).

Estos hallazgos tienen una alta cuota de novedad, que, además de su valor intrínseco proveen las bases para seguir investigando no sólo en seguimientos más prolongados de pacientes trasplantados, sino también en otros escenarios clínicos que impliquen la administración de terapia inmunosupresora.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Marino IR, Cirillo C. An abridged photographic history of organ transplantation. *Exp Clin Transplant*. 2014;12 Suppl 1:11-6.
2. Nordham KD, Ninokawa S. The history of organ transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2022;35(1):124-8.
3. Pace RA. El concepto de muerte cerebral y su relación con los trasplantes de órganos. *Rev Argent Cardiol*. 2001;69:27-33.
4. Starzl TE. History of clinical transplantation. *World J Surg*. 2000;24(7):759-82.
5. Shayan H. Organ transplantation: from myth to reality. *Exp Clin Transplant*. 2012;10(1):1-4.
6. Petit F. Allogreffes de langue, de trachée, de paroi abdominale, d'utérus, de pénis. Précisions sur d'autres aplicaciones de l'allotransplantation de tissus composites vascularisés chez l'homme. *Ann Chir Plast Esthet*. 2007;52(5):498-501.
7. Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*. 2010;90(4):643-53.
8. Tiniakos DG, Kandilis A, Geller SA. Tityus: a forgotten myth of liver regeneration. *J Hepatol*. 2010;53(2):357-61.
9. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Moon JB, Fulginiti VA, Cotton EK, et al. Extended survival in three cases of orthotopic homotransplantation of the human liver. *Surgery*. 1968;63(4):549-63.
10. Pham YH, Miloh T. Liver transplantation in children. *Clin Liver Dis*. 2018;22(4):807-21.
11. Sundaram SS, Alonso EM, Whittington PF. Liver transplantation in neonates. *Liver Transpl*. 2003;9(8):783-8.

12. Spada M, Riva S, Maggiore G, Cintonino D, Gridelli B. Pediatric liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2009;15(6):648-74. doi:10.3748/wjg.15.648.
13. Otte, JB. History of pediatric liver transplantation. Where are we coming from? Where do we stand? *Pediatr Transplant.* 2002 Oct;6(5):378-87. doi: 10.1034/j.1399-3046.2002.01082.x.
14. Noble J, Terrec F, Malvezzi P, Rostaing L. Adverse effects of immunosuppression after liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2021;54-55:101762.
15. Esquivel CO, Benden C. Clinical models of tolerance induction in pediatric transplantation. *Pediatr Transplant.* 2009;13(4):397-9.
16. Costaguta G, Dion S, Chartier ME, Paganelli M, Álvarez F. Increase of circulating IgA levels after pediatric liver transplantation: a retrospective cohort study. *J Liver Transpl.* 2024;13:100194. doi:10.1016/j.liver.2023.100194.
17. Orlando G, Soker S, Wood K. Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol.* 2009;50(6):1247-57.
18. Borstnar CR, Cardellach F, editors. Farreras Rozman. *Medicina interna.* 19th ed. Barcelona: Elsevier; 2020.
19. Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, O'Leary J, Randhawa PS, Feng S, et al. 2016 comprehensive update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: introduction of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2016;16(10):2816-35.
20. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology.* 1993;17(6):1127-52.

21. Mieli-Vergani G, Vergani D. De novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *J Hepatol.* 2004;40(1):3-7.
22. Herzog D, Dal Soglio D, Fournet J, Martin S, Alvarez F. Interface hepatitis is associated with a high incidence of late graft fibrosis in a group of tightly monitored pediatric orthotopic liver transplantation patients. *Liver Transpl.* 2008;14(7):946-55.
23. Alexander SI, Smith N, Hu M, Verran D, Shun A, Dorney S, et al. Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased-donor liver transplant. *N Engl J Med.* 2008;358(4):369-74.
24. Kamran Hejazi Kenari S, Mirzakhani H, Saidi RF. Pediatric transplantation and tolerance: past, present, and future. *Pediatr Transplant.* 2014;18(5):435-45.
25. Schrezenmeier E, Dörner T, Halleck F, Budde K. Cellular immunobiology and molecular mechanisms in alloimmunity—pathways of immunosuppression. *Transplantation.* 2024;108(1):148-60.
26. Quatrini L, Ugolini S. New insights into the cell- and tissue-specificity of glucocorticoid actions. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(2):269-78.
27. Shimba A, Ikuta K. Control of immunity by glucocorticoids in health and disease. *Semin Immunopathol.* 2020;42(6):669-80.
28. Codoner-Franch P, Bernard O, Alvarez F. Long-term follow-up of growth in height after successful liver transplantation. *J Pediatr.* 1994;124(3):368-73.
29. Reding R, Gras J, Sokal E, Otte JB, Davies HF. Steroid-free liver transplantation in children. *Lancet.* 2003;362(9401):2068-70.
30. Haller W, Hodson J, Brown R, Lloyd C, Hubscher S, McKiernan P, Kelly D. The role of immunosuppression in long-term graft hepatitis and fibrosis after paediatric liver

transplant - comparison of two treatment protocols. *Front Transplant*. 2023 Feb 28;1:1042676. doi: 10.3389/frtra.2022.1042676

31. Trezeguet Renatti G, Riva N, Minetto J, Reijenstein H, Gole M, Meza V, et al. Feasibility of steroid-free tacrolimus-basiliximab immunosuppression in pediatric liver transplantation and predictors for steroid requirement. *Liver Transpl*. 2024;30(1):61-71.
32. Miloh T, Barton A, Wheeler J, Pham Y, Hewitt W, Keegan T, et al. Immunosuppression in pediatric liver transplant recipients: unique aspects. *Liver Transpl*. 2017;23(2):244-56.
33. Slowik V, Lerret SM, Lobritto SJ, Voulgarelis S, Vitola BE. Variation in immunosuppression practices among pediatric liver transplant centers—Society of Pediatric Liver Transplantation survey results. *Pediatr Transplant*. 2021;25(2):e13873.
34. Ng VL, Alonso EM, Bucuvalas JC, Cohen G, Limbers CA, Varni JW, et al. Health status of children alive 10 years after pediatric liver transplantation performed in the US and Canada: report of the Studies of Pediatric Liver Transplantation Experience. *J Pediatr*. 2012;160(5):820-6.e3.
35. Kelly DA, Bucuvalas JC, Alonso EM, Karpen SJ, Allen U, Green M, et al. Long-term medical management of the pediatric patient after liver transplantation: 2013 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation. *Liver Transpl*. 2013;19(8):798-825.
36. Harris F, Berdugo YA, Tree T. IL-2-based approaches to Treg enhancement. *Clin Exp Immunol*. 2023;211(2):149-63.

37. Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MRM, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 2009;30(7):366-73.
38. Dixit V. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(4):521-8.
39. Marinova TT. Epithelial framework reorganization during human thymus involution. *Gerontology.* 2005;51(1):14-8.
40. Chidgey A, Dudakov J, Seach N, Boyd R. Impact of niche aging on thymic regeneration and immune reconstitution. *Semin Immunol.* 2007;19(5):331-40.
41. Shanley DP, Aw D, Manley NR, Palmer DB. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol.* 2009;30(7):374-81.
42. Poulin JF, Viswanathan MN, Harris JM, Komanduri KV, Wieder E, Ringuette N, et al. Direct evidence for thymic function in adult humans. *J Exp Med.* 1999;190(4):479-86.
43. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol.* 2005;174(12):7446-52.
44. Quaglino D, Accorsi A, Malagoli D, Ottaviani E, editors. Thymic maturation and programmed cell death. In: *Ecoimmunology: Evolutive aspects and future perspectives.* Dordrecht: Springer; 2014. p. 105-24.
45. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2006;2(6):e62.
46. Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(4):636-43.

47. Ekin A, Gezer C, Taner CE. Prognostic value of fetal thymus size in intrauterine growth restriction. *J Ultrasound Med.* 2016;35(3):511-7.
48. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T cells and human disease. *Annu Rev Immunol.* 2020;38:541-66. doi:10.1146/annurev-immunol-042718-041717.
49. Scheinecker C, Göschl L, Bonelli M. Treg cells in health and autoimmune diseases: new insights from single cell analysis. *J Autoimmun.* 2020;110:102376. doi:10.1016/j.jaut.2019.102376.
50. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996;17(1):64-102.
51. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):233-47.
52. Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev.* 2000;21(4):412-43.
53. Webster J, Tonelli L, Sternberg E. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:125-63.
54. Barone K, O'Brien P, Stevenson J. Characterization and mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. *Cell Immunol.* 1993;148(1):226-33.
55. D'Attilio L, Santucci N, Bongiovanni B, Bay ML, Bottasso O. Tuberculosis, the disrupted immune-endocrine response and the potential thymic repercussion as a contributing factor to disease physiopathology. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:1-9.

56. Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A, Strindhall J, Wikby A. Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Rev Med Virol*. 2009;19(1):47-56.
57. Demetris AJ, Batts KP, Dhillon AP, et al. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology*. 1997;25(3):658-63.
58. Adam E, Ignotus P. Sonography of the thymus in healthy children: frequency of visualization, size, and appearance. *AJR Am J Roentgenol*. 1993;161(1):153-5.
59. Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, et al. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Transl Med*. 2013;11:119. doi:10.1186/1479-5876-11-119.
60. Clave E, Douay C, Carmagnat M, Busson M, Peffault de Latour R, Charron D, et al. Acute graft-versus-host disease reduces human thymic T-cell differentiation without acting on thymocyte proliferation. *Blood*. 2007;109(9):4074-81.
61. Rosichini M, et al. SARS-CoV-2 infection of thymus induces loss of function that correlates with disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2023;151(4):911-21.
62. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*. 2009;113(4):769-74. doi:10.1182/blood-2008-02-139154.
63. Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest*. 2013;123(3):996-1002.
64. Muhari-Stark E, Burckart GJ. Glomerular filtration rate estimation formulas for pediatric and neonatal use. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2018;23(6):424-31. doi:10.5863/1551-6776-23.6.424.

65. Starzl TE, Marchioro TL, Von Kaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet.* 1963;117:659-76.
66. Starzl TE, Iwatsuki S, Klintmalm G, et al. Liver transplantation, 1980, with particular reference to cyclosporin-A. *Transplant Proc.* 1981;13(1 Pt 1):281-5.
67. Calne RY, Rolles K, White DJ, et al. Cyclosporin A in organ transplantation. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1981;10:335-47.
68. Haller W, Hodson J, Brown R, Lloyd C, Hubscher S, McKiernan P, Kelly D. The role of immunosuppression in long-term graft hepatitis and fibrosis after paediatric liver transplant - comparison of two treatment protocols. *Front Transplant.* 2023 Feb 28;1:1042676. doi: 10.3389/frtra.2022.1042676.
69. Tasdogan BE, Ma M, Simsek C, Saberi B, Gurakar A. Update on immunosuppression in liver transplantation. *Euroasian J Hepatogastroenterol.* 2019;9(2):96-101. doi:10.5005/jp-journals-10018-1301.
70. Moini M, Schilsky ML, Tichy EM. Review on immunosuppression in liver transplantation. *World J Hepatol.* 2015;7(10):1355-68. doi:10.4254/wjh.v7.i10.1355.
71. Eason JD, Blazek J, Mason A, et al. Steroid-free immunosuppression through thymoglobulin induction in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2001;33(1-2):1470-1. doi:10.1016/S0041-1345(00)02556-2.
72. Lerut JP, Gondolesi GE. Immunosuppression in liver and intestinal transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2021;54-55:101767. doi:10.1016/j.bpg.2021.101767.

73. Mendizabal M, Dip M, Demirdjian E, et al. Changing etiologies and prognostic factors in pediatric acute liver failure. *Liver Transpl.* 2020;26(2):268-75. doi:10.1002/lt.25658.
74. Feng S, Si M, Taranto SE, et al. Trends over a decade of pediatric liver transplantation in the United States. *Liver Transpl.* 2006;12(4):578-84. doi:10.1002/lt.20650.
75. Elisofon SA, Magee JC, Ng VL, et al. Society of Pediatric Liver Transplantation: current registry status 2011–2018. *Pediatr Transplant.* 2020;24(1):e13605. doi:10.1111/petr.13605.
76. LaRosa C, Baluarte HJ, Meyers KE. Outcomes in pediatric solid-organ transplantation. *Pediatr Transplant.* 2011;15(2):128-41.
77. Ng VL, Fecteau A, Shepherd R, et al. Outcomes of 5-year survivors of pediatric liver transplantation: report on 461 children from a North American multicenter registry. *Pediatrics.* 2008;122(6):e1128-35. doi:10.1542/peds.2008-1219.
78. Lee TY, Choi HJ, Seo CH, Ahn J, Hong TH, You YK. Steroid-resistant rejection in liver transplant: a single-center study for risk factor and second-line treatment. *Transplant Proc.* 2022;54(2):443-9. doi:10.1016/j.transproceed.2021.10.019.
79. Aydogan C, Sevmis S, Aktas S, Karakayali H, Demirhan B, Haberal M. Steroid-resistant acute rejections after liver transplant. *Exp Clin Transplant.* 2010;8(2):172-7.
80. Lee JG, Lee J, Lee JJ, et al. Efficacy of rabbit anti-thymocyte globulin for steroid-resistant acute rejection after liver transplantation. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(23):e3711. doi:10.1097/MD.0000000000003711.
81. Gras JM, Gerkens S, Beguin C, et al. Steroid-free, tacrolimus–basiliximab immunosuppression in pediatric liver transplantation: clinical and

- pharmacoeconomic study in 50 children. *Liver Transpl.* 2008;14(4):469-77.
doi:10.1002/lt.21397.
82. Joh JW, Park JW, Lee KW, et al. Basiliximab with delayed tacrolimus induction therapy in liver transplantation. *Transplantation.* 2004;78(2):379-80.
83. Ferah O, Akbulut A, Açık ME, et al. Acute kidney injury after pediatric liver transplantation. *Transplant Proc.* 2019;51(7):2486-91.
doi:10.1016/j.transproceed.2019.01.179.
84. Kowalewski G, Kaliciński P, Stefanowicz M, Grenda R, Czubkowski P, Szymczak M. Long-term follow-up of renal function in children after liver transplantation: a single-center retrospective study. *Children (Basel).* 2021;8(8):633.
doi:10.3390/children8080633.
85. Campbell KM, Bucuvalas JC. Renal function in the long term after pediatric liver transplantation: is there a need for protocol kidney biopsies? *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(5):608-13. doi:10.1097/MOT.0b013e32833da439.
86. Herzog D, Martin S, Turpin S, Alvarez F. Normal glomerular filtration rate in long-term follow-up of children after orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 2006;81(5):672-7. doi:10.1097/01.tp.0000185194.62108.a7.
87. Herlenius G, Hansson S, Krantz M, Olausson M, Kullberg-Lindh C, Friman S. Stable long-term renal function after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2010;14(3):409-16. doi:10.1111/j.1399-3046.2010.01301.x.
88. Lacquaniti A, Campo S, Casuscelli Di Tocco T, et al. Acute and chronic kidney disease after pediatric liver transplantation: an underestimated problem. *Clin Transplant.* 2020;34(11):e14082. doi:10.1111/ctr.14082.

89. Nakata S, Kakimoto K, Numa K, et al. Risk factors for nephrotoxicity due to tacrolimus therapy for ulcerative colitis. *Digestion*. 2022;103(5):339-46. doi:10.1159/000524594.
90. Harambat J, Ranchin B, Dubourg L, Liutkus A, Hadj-Haïssa A, Rivet C, Boillot O, Lachaux A, Cochat P. Renal function in pediatric liver transplantation: a long-term follow-up study. *Transplantation*. 2008 Oct 27;86(8):1028-34. doi:10.1097/TP.0b013e318187748f.
91. Duvoux C, Pageaux GP. Immunosuppression in liver transplant recipients with renal impairment. *J Hepatol*. 2011;54(5):1041-54. doi:10.1016/j.jhep.2010.12.001.
92. Yodoshi T, Arce-Clachar AC, Sun Q, et al. Glomerular hyperfiltration is associated with liver disease severity in children with nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr*. 2020;222:127-33. doi:10.1016/j.jpeds.2020.03.038.
93. Dalbeni A, Garbin M, Zoncapè M, et al. Glomerular hyperfiltration: a marker of fibrosis severity in metabolic associated steatotic liver disease in an adult population. *Int J Mol Sci*. 2023;24(21):15837. doi:10.3390/ijms242115837.
94. Yoshida EM, Marotta PJ, Greig PD, et al. Evaluation of renal function in liver transplant recipients receiving daclizumab (Zenapax), mycophenolate mofetil, and a delayed, low-dose tacrolimus regimen vs. a standard-dose tacrolimus and mycophenolate mofetil regimen: a multicenter randomized clinical trial. *Liver Transpl*. 2005;11(9):1064-72. doi:10.1002/lt.20490.
95. Tchervenkov JI, Tzimas GN, Cantarovich M, Barkun JS, Metrakos P. The impact of thymoglobulin on renal function and calcineurin inhibitor initiation in recipients of

- orthotopic liver transplant: a retrospective analysis of 298 consecutive patients. *Transplant Proc.* 2004;36(6):1747-52. doi:10.1016/j.transproceed.2004.06.014.
96. Al-Sinani S, Dhawan A. Corticosteroids usage in oediatric liver transplantation: To be or not to be! *Pediatr Transplant.* 2009 Mar;13(2):160-70. doi: 10.1111/j.1399-3046.2008.01043.x.
97. Ewing CB, Farnan S, Squires JE, Raghu VK. Association between perioperative costs and induction immunosuppression in pediatric liver transplant recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2023;76(5):634-9.
98. Costaguta AC, Costaguta GA, Rumbo C, et al. Lack of differences in outcomes between 3 immunosuppression protocols in the first year after pediatric liver transplantation: a multicenter study. *Liver Transpl.* 2025;31(2):201-10.
99. Raghu VK, Zhang X, Squires JE, et al. Impact of early immunosuppression on pediatric liver transplantation outcomes within 1 year. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2024;78(3):328-38.
100. Yekeler E, Tambag A, Tunaci A, Genchellac H, Dursun M, Gokcay G, Acunas G. Analysis of the Thymus in 151 healthy infants from 0 to 2 years of age. *J Ultrasound Med* 2004; 23:1321– 1326.
101. Aspinall R, Andrew D. Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of the thymic environment. *Vaccine.* 2000;18(13):1629-37.
102. Savino W, Dardenne M, Guaraldi F, Homo-Delarche F. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(2):77-89. doi:10.1038/nrendo.2015.168.

103. Liepinsh DJ, Kruglov AA, Galimov AR, Shakhov AN, Shebzukhov YV, Kuchmiy AA, et al. Accelerated thymic atrophy as a result of elevated homeostatic expression of the genes encoded by the TNF/lymphotoxin cytokine locus. *Eur J Immunol.* 2009;39(11):2906-15. doi:10.1002/eji.200839191.
104. Pérez AR, Roggero E, Nicora A, Palazzi J, Besedovsky HO, del Rey A, et al. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain Behav Immun.* 2007;21(8):890-900.
105. Wrenshall LE, Stevens ET, Smith DR, Miller JD. Maternal microchimerism leads to the presence of interleukin-2 in interleukin-2 knockout mice: implications for the role of interleukin-2 in thymic function. *Cell Immunol.* 2007;245(2):80-90. doi:10.1016/j.cellimm.2007.04.002.
106. Palmer S, Albergante L, Blackburn CC, Newman TJ. Thymic involution and rising disease incidence with age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(8):1883-8. doi:10.1073/pnas.1714478115.
107. Courivaud C, Bamoulid J, Crepin T, Gaiffe E, Laheurte C, Saas P, et al. Pre-transplant thymic function is associated with patient death after kidney transplantation. *Front Immunol.* 2020;11:1653. doi:10.3389/fimmu.2020.01653.
108. Bohacova P, Terekhova M, Tsurinov P, Mullins R, Husarcikova K, Shchukina I, et al. Multidimensional profiling of human T cells reveals high CD38 expression, marking recent thymic emigrants and age-related naive T cell remodeling. *Immunity.* 2024;57(10):2362-79.e10. doi:10.1016/j.immuni.2024.08.019.

109. Démoulin T, Baron ML, Gauchat D, Kettaf N, Reed SJ, Charpentier T, et al. Induction of thymic atrophy and loss of thymic output by type-I interferons during chronic viral infection. *Virology*. 2022;567:77-86. doi:10.1016/j.virol.2021.12.007.
110. Ansari AR, Liu H. Acute thymic involution and mechanisms for recovery. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65(5):401-20. doi:10.1007/s00005-017-0462-x.
111. Qiu L, Zhao Y, Yang Y, et al. Thymic rebound hyperplasia post-chemotherapy mistaken as disease progression in a patient with lymphoma involving the mediastinum: a case report and reflection. *BMC Surg*. 2021;21:38. doi:10.1186/s12893-021-01048-y.
112. Franke FC, Damek A, Steglich J, Kurch L, Hasenclever D, Georgi TW, et al. Differentiation between rebound thymic hyperplasia and thymic relapse after chemotherapy in pediatric Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2023;70(8):e30421. doi:10.1002/pbc.30421.
113. Venables T, Griffith AV, DeAraujo A, Petrie HT. Dynamic changes in epithelial cell morphology control thymic organ size during atrophy and regeneration. *Nat Commun*. 2019;10:4402. doi:10.1038/s41467-019-11879-2.
114. Ayáu Y, Monsonego A. Thymus involution sets the clock of the aging T-cell landscape: implications for declined immunity and tissue repair. *Ageing Res Rev*. 2021;65:101231. doi:10.1016/j.arr.2020.101231.
115. Varga I, Uhrinova A, Toth F, Mistinova J. Assessment of the thymic morphometry using ultrasound in full-term newborns. *Surg Radiol Anat*. 2011;33(8):689-95. doi:10.1007/s00276-011-0806-x.