



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ÀREA DE CONOCIMIENTO DE CARDIOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Programa de doctorado: 3139 Medicina

TESIS DOCTORAL

**Estudio de las moléculas implicadas en el tráfico celular. Papel
en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante
cardiaco.**

Presentada por:

Silvia Lozano Edo, Graduada en Medicina

Dirigida por:

Dr. Luis Vicente Martínez Dolz

Dr. Ignacio José Sánchez Lázaro

Valencia, mayo de 2023



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ÀREA DE CONOCIMIENTO DE CARDIOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Programa de doctorado: 3139 Medicina

TESIS DOCTORAL

**Estudio de las moléculas implicadas en el tráfico celular. Papel
en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante
cardiaco.**

Presentada por:

Silvia Lozano Edo, Graduada en Medicina

Dirigida por:

Dr. Luis Vicente Martínez Dolz

Dr. Ignacio José Sánchez Lázaro

Valencia, mayo de 2023



**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA, ÁREA DE
CONOCIMIENTO DE CARDIOLOGÍA**

Dr. Luis Vicente Martínez Dolz, Jefe de Servicio de Cardiología y director del Área Clínica de las Enfermedades Cardiovasculares del Hospital La Fe de Valencia, Director del Grupo de Investigación Clínica y Traslacional en Cardiología.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:

“Estudio de las moléculas implicadas en el tráfico celular. Papel en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante cardiaco”

corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Silvia Lozano Edo, para su presentación como Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de artículos. Programa de Doctorado en Medicina, área de conocimiento de Cardiología, de la Universidad de Valencia.

Las revistas seleccionadas pertenecen al ámbito de la Cardiología y el trasplante: *Transplantation, Transplantation Proceedings, Journal of Personalized Medicine*.

Las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral constituyen un trabajo original y novedoso. Por lo que estimamos que este trabajo contribuye de forma significativa al campo de la investigación traslacional en el ámbito del trasplante cardiaco.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, mayo de 2023.

Dr. Luis Vicente Martínez Dolz



**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA, ÁREA DE
CONOCIMIENTO DE CARDIOLOGÍA**

Dr. Ignacio José Sánchez Lázaro, Doctor en Medicina y Cirugía, Médico Adjunto del Servicio de Cardiología del Hospital La Fe de Valencia e integrante de la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:

“Estudio de las moléculas implicadas en el tráfico celular. Papel en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante cardíaco”

corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Silvia Lozano Edo, para su presentación como Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de artículos. Programa de Doctorado en Medicina, área de conocimiento de Cardiología, de la Universidad de Valencia.

Las revistas seleccionadas pertenecen al ámbito de la Cardiología y el trasplante: *Transplantation, Transplantation Proceedings, Journal of Personalized Medicine*.

Las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral constituyen un trabajo original y novedoso. Por lo que estimamos que este trabajo contribuye de forma significativa al campo de la investigación traslacional en el ámbito del trasplante cardíaco.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, mayo de 2023.

Dr. Ignacio José Sánchez Lázaro

A mis padres, Pilar y Rafael.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo y confianza de mis directores de Tesis el Dr. Luis Martínez y el Dr. Ignacio Sánchez, agradecer el esfuerzo realizado y la capacidad de motivación necesaria en momentos difíciles. Gracias por dirigir esta tesis con total disponibilidad y creer en mí.

Gracias también a todos los integrantes del Grupo de Investigación Clínica y Traslacional en Cardiología, la Dra. Esther Roselló, el Dr. Manuel Portolés y la Dra. Estefanía Tarazón, con quienes he tenido la suerte de compartir tantas horas de trabajo, por su implicación, disponibilidad absoluta, colaboración y esfuerzo en estos años. Sin ellos, este proyecto no hubiera sido posible.

Como no, agradecer, al Dr. Luis Almenar y la Dra. Raquel López, junto con todos los miembros de la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante, su apoyo y colaboración. Mi agradecimiento al Dr. Miguel Ángel Arnau por su ayuda en el análisis estadístico de los datos. A parte de ser referentes clínicos y científicos, son personas que dejan su impronta personal.

A mis colegas y amigos del servicio de Cardiología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, adjuntos, becarios y residentes, con quienes he compartido tan buenos momentos y tanto he aprendido durante estos maravillosos años.

Como no, a mis padres, Pilar y Rafael, por estar siempre ahí, dispuestos a ayudarme en todo y confiando plenamente en mí, enseñándome lo que realmente importa.

A ti Adrián, por recordarme en los momentos más difíciles que los únicos límites que existen son los que una misma se pone, por animarme a superarme y por tu paciencia.

Finalmente, gracias a todos los pacientes que han participado incondicionalmente, aportando su granito de arena, para entre todos intentar mejorar los conocimientos actuales en el campo del trasplante cardiaco.

Gracias de nuevo, a todos y cada uno de vosotros, sin vuestra ayuda esta Tesis no hubiera sido posible.

“La mejor actitud para llevar a cabo observaciones originales, es tratar de no centrarse exclusivamente en el punto principal, sin intentar observar lo inesperado, recordando siempre que la observación no consiste en la espera pasiva, sino en un proceso mental activo”.

William Ian Beardmore Beveridge

ÍNDICE

1	RESUMEN	26
1.1	Introducción y objetivos.....	27
1.2	Material y método.....	27
1.3	Resultados	27
1.4	Conclusión.....	28
2	INTRODUCCIÓN	30
2.1	Recuerdo histórico del trasplante cardiaco.....	31
2.2	Los eventos adversos tras el trasplante cardiaco como problema de primera magnitud y necesidad de investigación clínica.....	32
2.3	El fallo primario del injerto como principal causa de muerte en los primeros días tras el trasplante cardiaco	32
2.3.1	SERCA2a.....	34
2.3.2	Fallo primario del injerto y SERCA2a.....	37
2.4	El rechazo agudo celular como una de las principales causas de mortalidad y pérdida de aloinjerto durante el seguimiento.....	38
2.5	Alteración del transporte núcleo-citoplasma en pacientes con rechazo cardiaco	38
2.6	Papel de la proteína activadora 1 de Ran GTPasa (RANGAP1) para identificar rechazo agudo celular	40
2.7	Necesidad de soporte circulatorio mecánico previo al trasplante cardiaco	42

3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo principal	46
3.2	Objetivos específicos	46
3.2.1	Artículo 1	46
3.2.2	Artículo 2	47
3.2.3	Artículo 3	48
3.2.4	Artículos complementarios	49
3.2.4.1	Artículo complementario 1	49
3.2.4.2	Artículo complementario 2	49
4	MATERIAL Y MÉTODO	52
4.1	Selección de pacientes trasplantados cardíacos para la obtención de muestras de sangre periférica, el estudio y seguimiento postrasplante cardíaco	53
4.1.1	Criterios de inclusión	53
4.1.2	Criterios de exclusión	54
4.2	Selección de pacientes para la obtención de muestras de sangre periférica y el estudio pretrasplante cardíaco	54
4.2.1	Criterios de inclusión	54
4.2.2	Criterios de exclusión	54
4.3	Obtención de muestras de sangre periférica	55
4.3.1	Muestras pretrasplante cardíaco	55
4.3.2	Muestras postrasplante cardíaco	55
4.3.3	Procesado de muestras pre y postrasplante cardíaco	55
4.4	Determinación de los niveles de SERCA2a	56

4.5	Determinación de los niveles en suero de NUP 153, RANGAP1 e Imp 5	58
4.6	Seguimiento clínico postrasplante cardiaco	58
4.7	Seguimiento anatomopatológico	61
4.8	Seguimiento ecocardiográfico	62
4.9	Régimen inmunosupresor.....	62
5	RESULTADOS.....	68
5.1	SERCA2a en el fallo primario del injerto.....	69
5.2	Transporte nucleocitoplasmático en el trasplante cardiaco .	73
5.3	RANGAP1 en el rechazo agudo celular	75
6	DISCUSIÓN CONJUNTA.....	80
6.1	Fallo primario del injerto	82
6.2	Rechazo agudo celular	84
7	LIMITACIONES.....	90
8	CONCLUSIONES Y APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS.....	94
9	BIBLIOGRAFÍA.....	99

10 ANEXOS.....	108
10.1 Publicaciones originales que conforman la Tesis Doctoral	110
10.1.1 Anexo 1	110
10.1.1.1 Artículo 1: Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation.....	110
10.1.2 Anexo 2	122
10.1.2.1 Artículo 2: Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection.	122
10.1.3 Anexo 3	129
10.1.3.1 Artículo 3: Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker... ..	129
10.1.4 Ayudas concedidas.....	144
10.2 Otras publicaciones originales realizadas durante el periodo de la Tesis Doctoral en relación con la insuficiencia cardiaca y el trasplante	145
10.2.1 Anexo 4	145
10.2.1.1 Artículo complementario 1: Impact of Circulatory Assistance in the Early Evolution After Heart Transplantation. Unicentric Experience	145
10.2.2 Anexo 5	149
10.2.2.1 Artículo complementario 2: COVID-19 and Heart Transplantation. Initial Experience in a Tertiary Hospital.....	149
10.3 Editorial artículo 1	154
10.3.1 Anexo 6: Unraveling the Causes of Primary Graft Dysfunction... ..	154

ACRÓNIMOS

AUC: Área bajo la curva
BEM: Biopsia endomiocárdica
CA²⁺: Calcio
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EVI: Enfermedad vascular del injerto
GEP: Perfil de expresión génica
IAT: Inmunoglobulina antitimocítica
ICN: Inhibidor de la calcineurina
Imp 5: Importina 5
IV: Intravenoso
ECMO: Oxigenación por membrana extracorpórea
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FPI: Fallo primario del injerto
IC: Insuficiencia cardíaca
MMF: Micofenolato Mofetilo
MPS: Metilprednisolona
MS: Muerte súbita
NT-proBNP: Propéptido natriurético cerebral N-terminal
Nup: Nucleoporina.
OR: Odds ratio
RAC: Rechazo agudo celular
RANGAP1: Proteína activadora 1 de Ran GTPasa
RNA: Ácido ribonucleico
RNs: Receptores nucleares
RIQ: Rango intercuartílico
ROC: Característica operativa del receptor
SERCA2a: ATPasa 2 del calcio del retículo sarcoplásmico
SCM: Soporte circulatorio mecánico

TC: Trasplante cardiaco

TMB: Tetra metilbendicidina

TNTus: Troponina T ultrasensible

VI: Ventrículo izquierdo

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Número anual de trasplantes en España (1984-2021); total y por grupos de edad.</i>	31
<i>Figura 2: Principales causas de muerte en España según el tiempo transcurrido desde el trasplante en el periodo 2012-2021. EVI/MS: enfermedad vascular del injerto/muerte súbita.</i>	33
<i>Figura 3: Evolución de la mortalidad durante el primer año tras el trasplante en el periodo 2012-2021, por trienios.</i>	33
<i>Figura 4: Proceso de acoplamiento excitación contracción y relajación del músculo cardíaco.</i>	35
<i>Figura 5: Alteraciones en el retículo sarcoplásmico en la insuficiencia cardíaca.</i>	36
<i>Figura 6: Receptores nucleares (RNs) y transporte núcleo-citoplasma.</i>	39
<i>Figura 7: Exportación de proteínas a través del complejo del poro nuclear.</i>	41
<i>Figura 8: Esquema de seguimiento post-TC.</i>	60
<i>Figura 9: Microfotografías de muestras de biopsias endomiocárdicas con distintos grados de rechazo agudo, según la clasificación antigua 1990 (grados 1A, 1B, 2, 3A, 3B, y 4) y nueva 2004 (grados 1R, 2R y 3R) de la ISLHT del grado de RAC.</i>	61
<i>Figura 10: Diagrama cronológico del proceso investigador.</i>	66
<i>Figura 11: Niveles plasmáticos de SERCA2a en pacientes con y sin FPI.</i> 70	
<i>Figura 12: Capacidad predictiva del FPI después de TC con la combinación de SCM puente al TC y SERCA2a < 0,60 ng/mL.</i>	73
<i>Figura 13: Niveles circulantes de RANGAP1 y Nup 153 en pacientes sin y con rechazo cardíaco celular.</i>	74
<i>Figura 14: Niveles circulantes de RANGAP1 en pacientes sin y con rechazo cardíaco celular.</i>	76

Figura 15: Curvas ROC de RANGAP1 circulante para la detección de rechazo cardíaco agudo.78

PRESENTACIÓN Y COMENTARIO PRELIMINAR

La presente Tesis Doctoral se ha realizado bajo la modalidad de compendio de publicaciones, cumpliendo con los requisitos determinados por la Escuela de Doctorado de la Universidad de Valencia. Los artículos que conforman esta Tesis Doctoral han sido publicados, con posterioridad al inicio del programa de doctorado, en revistas indexadas en el índice internacional JCR (WoS), siendo la doctoranda la primera firmante de todos los trabajos que presenta.

Esta Tesis Doctoral es el fruto de una línea de trabajo que aúna investigación clínica y básica y que fue iniciada en 2017, resultado de la colaboración entre el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y del Grupo de Investigación Clínica y Traslacional en Cardiología del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Resultado de la colaboración entre ambos servicios, de sus integrantes, y en especial de la presente doctoranda, la línea de investigación en la que se enmarca esta tesis ha generado cinco artículos en revistas internacionales, de los que soy primera firmante de tres de ellos, así como comunicaciones a congresos nacionales e internacionales. Esta línea de investigación ha sido merecedora de financiación por parte del Instituto De Salud Carlos III, contando con la aprobación del Ministerio de Economía y Competitividad, así como de la subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación.

La Universidad de Valencia brinda la oportunidad de presentar la Tesis Doctoral como compendio de publicaciones científicas sobre una misma línea de investigación, en revistas indexadas en algún índice internacional

como JCR (WoS). Esta posibilidad estimula la investigación y premia el trabajo científico, facilitando la elaboración de Tesis Doctorales e investigaciones con resultados notables. El hecho de que la publicación de artículos deba ser en revistas con revisores independientes, extranjeros y por pares añade un extra de calidad a las tesis realizadas bajo este formato.

Así pues, el núcleo fundamental de esta Tesis Doctoral son 3 de los artículos publicados durante estos años de investigación, y su estructura y formato está centrado en la justificación, presentación y discusión de estas publicaciones.

APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE

El estudio se ha realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Previamente el Comité de Ética Institucional del Hospital Universitario y Politécnico La Fe aprobó la realización del estudio (código de protocolo 2016-0198 y fecha de aprobación, 14 de febrero de 2017).

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrados en el estudio. Este consentimiento incluía el permiso para extraer, almacenar y analizar sus muestras de sangre (plasma/suero), así como para publicar los resultados obtenidos de la investigación.

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **14 de febrero de 2017**, el Proyecto de Investigación:

Título: "ESTUDIO DE MOLÉCULAS IMPLICADAS EN TRÁFICO CELULAR. PAPEL EN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON SOPORTE CIRCULATORIO CON ECMO COMO PUENTE A TRASPLANTE CARDÍACO."

Nº de registro: **2016/0198**

Versión/fecha de la memoria del proyecto: **CONVOCATORIA DE AYUDAS DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado: **Primera/ Enero 2017**

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. LUIS MARTINEZ DOLZ** del servicio/unidad/grupo de investigación de **CARDIOLOGÍA** como Investigador Principal.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a 14 de febrero de 2017.



Fdo.: Don Serafín Rodríguez Capellán
Secretario del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos

1 RESUMEN

1.1 Introducción y objetivos

Tras el trasplante cardiaco (TC) pueden acontecer importantes complicaciones, tales como el fallo primario del injerto (FPI) y el rechazo agudo celular (RAC). El estudio de nuevos biomarcadores capaces de detectar de manera no invasiva estos eventos es un tema de interés creciente.

Como objetivo de esta Tesis Doctoral, me propongo valorar si los pacientes TC presentan alteraciones en el transporte núcleo-citoplasma y en el metabolismo del calcio que permitan la predicción de RAC y FPI respectivamente.

1.2 Material y método

Se incluyeron pacientes sometidos a TC, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, entre enero de 2009 y diciembre de 2019 para las muestras pre-TC y entre enero de 2017 y diciembre de 2019 para las muestras post-TC. A cada paciente se le extrajo una muestra de sangre venosa para aislar el suero y el plasma, posteriormente se almacenaron en el Biobanco del Hospital La Fe a -80°C hasta su análisis. Los niveles de SERCA2a, de la proteína activadora 1 de Ran GTPasa (RANGAP1), nucleoporina 153 (Nup153) e importina 5 (Imp5) se determinaron mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Simultáneamente se recogieron variables analíticas, ecocardiográficas, tratamiento inmunosupresor y resultados de biopsias endomiocárdicas.

1.3 Resultados

En los artículos publicados de nuestro estudio (Lozano-Edo, et al. *Transplantation*. 2022; Lozano-Edo, et al. *Transplant Proc*. 2021; Lozano-

Edo, et al. *J Pers Med.* 2022), observamos alteraciones en el metabolismo del calcio y en el transporte nucleocitoplasmático (Imp5, RANGAP1 y Nup153) en pacientes que desarrollaron FPI y RAC tras el TC.

En el artículo Lozano-Edo, et al. *Transplantation.* 2022, observamos cómo los niveles plasmáticos de SERCA2a determinados inmediatamente pre-TC fueron significativamente más bajos en los pacientes que posteriormente experimentaron FPI en comparación con aquellos que no presentaron esta complicación (0,430 ng/mL [Rango intercuartílico (RIQ), 0,260–0,945] versus 0,830 ng/mL [RIQ, 0,582-1,052]; $p=0,001$). La concentración de SERCA2a $\geq 0,60$ ng/mL fue un predictor protector independiente de FPI (Odds Ratio (OR), 0,215, $p=0,004$).

En el artículo Lozano-Edo, et al. *J Pers Med.* 2022, observamos cómo los niveles séricos de RANGAP1 fueron más altos en pacientes con RAC al menos moderado en comparación con el grupo de pacientes sin RAC significativo (63,15 ng/mL [RIQ, 36,61-105,69] versus 35,33 ng/mL [RIQ, 19,18-64,59]; $p=0,02$). La concentración de RANGAP1 ≥ 90 ng/mL fue un predictor independiente de RAC (OR 6,8, $p=0,006$).

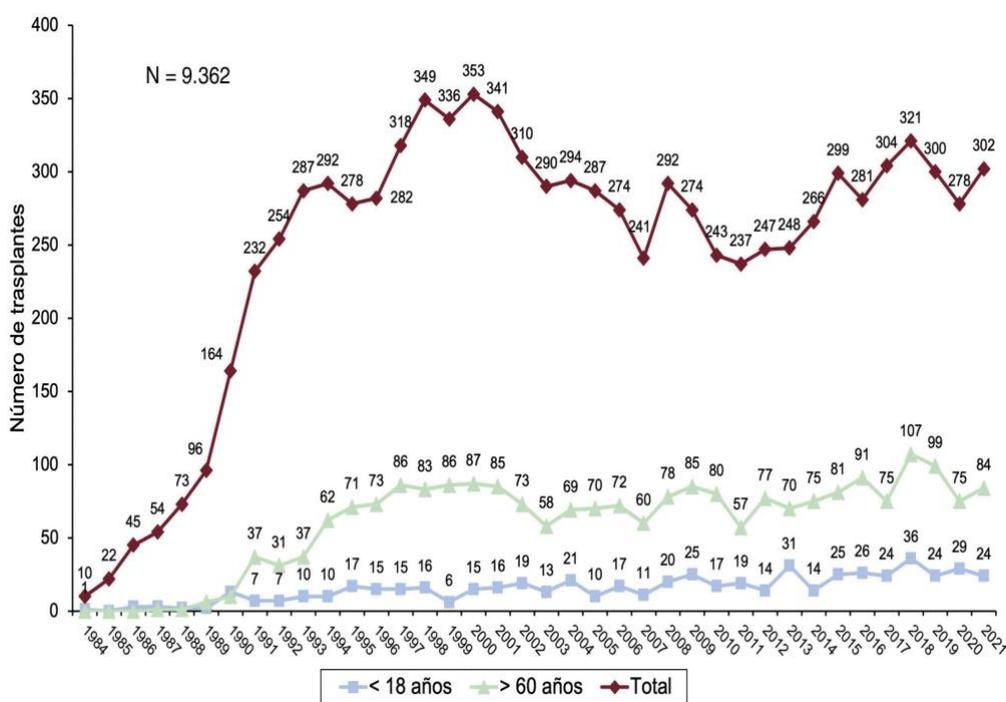
1.4 Conclusión

El análisis de las muestras de plasma pre-TC y suero post-TC sugiere que existen alteraciones en el metabolismo del calcio (SERCA2a) y en el transporte núcleo-citoplasma (RANGAP1) de los pacientes TC que desarrollan eventos adversos durante el seguimiento, FPI y RAC respectivamente. Ambos podrían ser considerados potenciales biomarcadores no invasivos, de confirmarse en series más amplias de pacientes.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Recuerdo histórico del trasplante cardiaco

Tras la primera experiencia de trasplante cardiaco (TC) de humano a humano en 1967 en el Hospital Groote Schuur en Sudáfrica (1), se han realizado hasta la fecha miles de TC en todo el mundo. En España la primera intervención con éxito se realizó en el año 1984 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (2); desde entonces se han llevado a cabo más de 9000 procedimientos en nuestro país (3) (Figura 1).



Rev Esp Cardiol. 2022;75:926-35

Figura 1: Número anual de trasplantes en España (1984-2021); total y por grupos de edad.

Tomado de F. González-Vílchez, et al. Rev Esp Cardiol. 2022;75(11):923-932 (3).

2.2 Los eventos adversos tras el trasplante cardiaco como problema de primera magnitud y necesidad de investigación clínica

La supervivencia después de un TC ha mejorado en los últimos años debido a un mayor conocimiento en todos los ámbitos del proceso. No obstante, durante el seguimiento de estos pacientes pueden acontecer importantes complicaciones con una morbimortalidad no desdeñable. El fallo primario del injerto (FPI) y el rechazo agudo celular (RAC) tras el TC constituyen dos importantes complicaciones que marcan la evolución de este grupo de pacientes (3-5), por lo que la investigación de nuevas moléculas capaces de predecirlos supone un importante reto y suscitan gran interés científico.

2.3 El fallo primario del injerto como principal causa de muerte en los primeros días tras el trasplante cardiaco

El FPI continúa siendo una complicación con una incidencia elevada y potencialmente mortal, siendo la principal causa de mortalidad en los primeros 30 días posteriores al TC (3,6) (Figura 2, Figura 3). Se define como el desarrollo de disfunción sistólica del ventrículo izquierdo y derecho en las primeras 24 horas tras el TC, que no puede atribuirse a causas identificables como rechazo agudo, hipertensión pulmonar o complicaciones quirúrgicas. En 2014 la *International Society for Heart and Lung Transplantation* publicó una declaración de consenso, en la que se estableció una definición uniforme de FPI y se describió una escala de gravedad. Los casos leves y moderados se caracterizan por presentar una hemodinámica alterada o parámetros ecocardiográficos anormales, distinguiéndose entre sí según las dosis necesarias de tratamiento inotrópico. Por otro lado, los pacientes con FPI grave son aquellos que requieren soporte circulatorio mecánico (SCM),

como un dispositivo de asistencia ventricular +/- oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) (6).

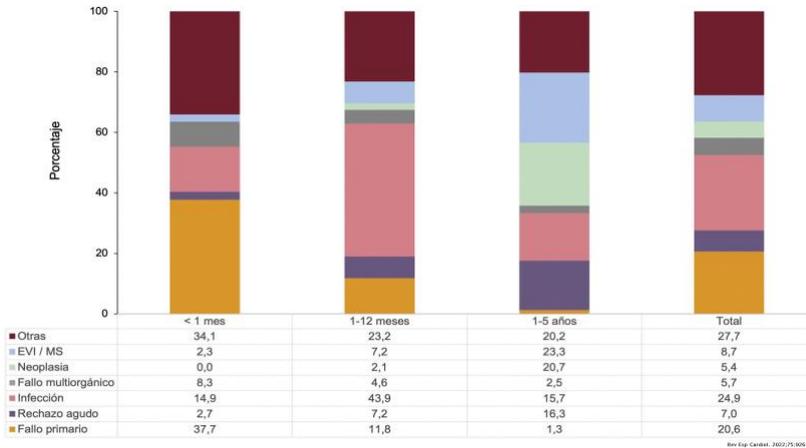


Figura 2: Principales causas de muerte en España según el tiempo transcurrido desde el trasplante en el periodo 2012-2021. EVI/MS: enfermedad vascular del injerto/muerte súbita.

Tomado de F. González-Vílchez, et al. Rev Esp Cardiol. 2022;75(11):923–932 (3).

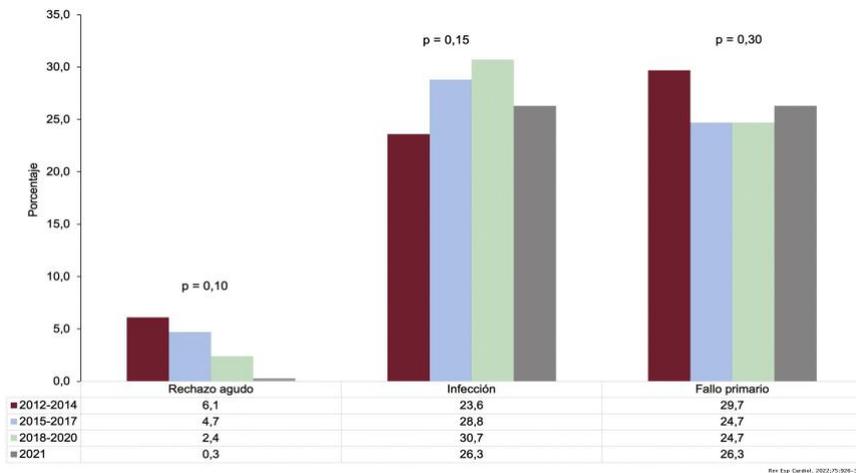


Figura 3: Evolución de la mortalidad durante el primer año tras el trasplante en el periodo 2012-2021, por trienios.

Tomado de F. González-Vílchez, et al. Rev Esp Cardiol. 2022;75(11):923–932 (3).

La prevalencia del FPI oscila entre el 2,5 % y el 31 %. Esta amplia variabilidad es reflejo de los diferentes enfoques diagnósticos y de tratamiento entre los centros, con diferentes umbrales para la administración de inotrópicos e implante de SCM (7-9).

Dada la importancia de este fenómeno y su incidencia relativamente alta en todo el mundo, se han utilizado diversos modelos para predecir este evento, entre ellos el score RADIAL (10) y, más recientemente, el score PREDICTA (11), junto con otras alternativas no invasivas.

2.3.1 SERCA2a

En este contexto, creemos necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores no invasivos capaces de predecir el FPI. Por lo que nos centramos en el análisis de la ATPasa 2 del calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA2a), la cual es responsable de la recarga de calcio del retículo sarcoplásmico durante la diástole y juega un papel importante en la modulación de la insuficiencia cardiaca (IC). La alteración de los niveles de esta molécula contribuye directamente en el deterioro de la contracción/relajación (12) (Figura 4 y 5), siendo una diana terapéutica en terapia génica para este grupo de pacientes (13-14). También se ha observado reducción de la expresión de SERCA2a en pacientes que desarrollan rechazo cardíaco (15). Por estas razones, dado que el FPI se caracteriza por disfunción ventricular, creemos que una mayor investigación de esta molécula es apropiada en los pacientes trasplantados cardiacos.

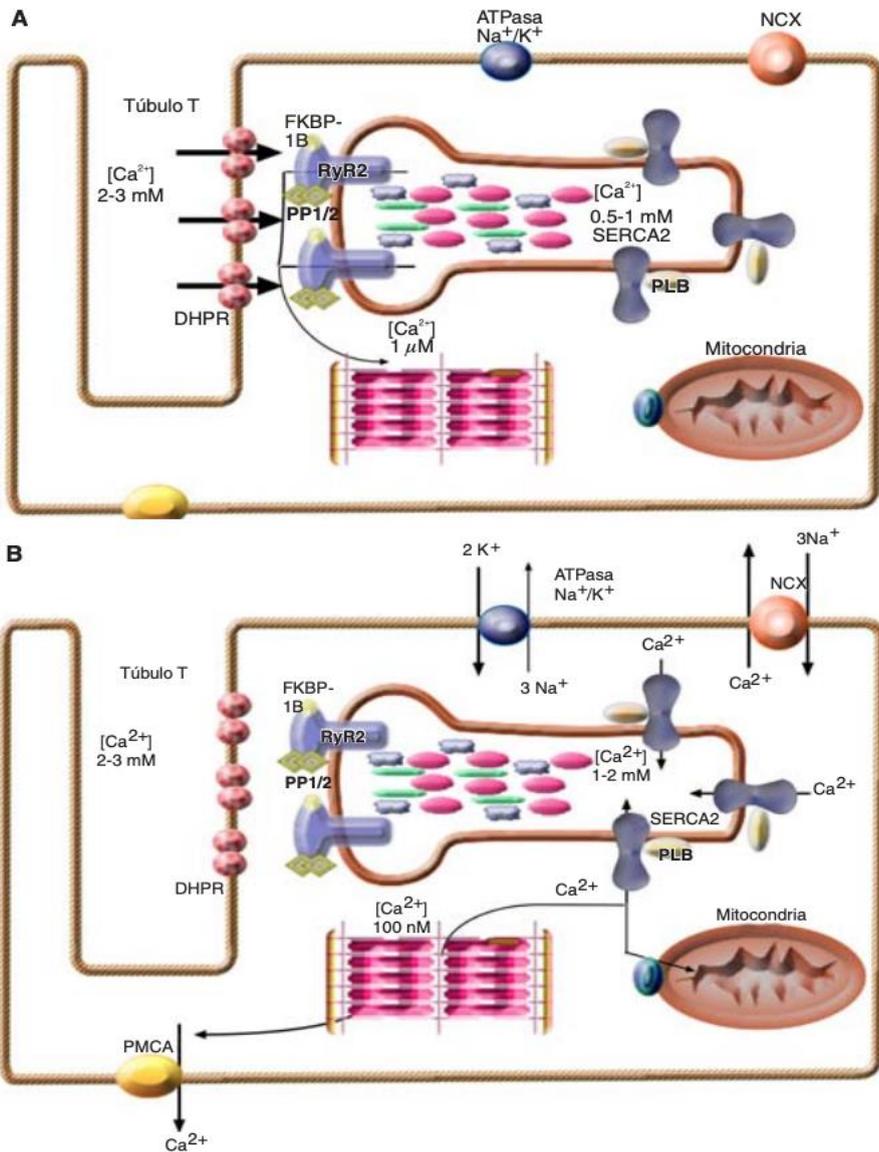


Figura 4: Proceso de acoplamiento excitación-contracción y relajación del músculo cardíaco.

A. El acoplamiento excitación-contracción se inicia cuando los canales de Ca^{2+} tipo L (DHPR) perciben la despolarización de la membrana celular, lo que los activa y permite la entrada de una pequeña cantidad de Ca^{2+} . Esta entrada de Ca^{2+} es percibida por el canal de liberación de calcio (RyR), lo que provoca que se active y libere masivamente cantidades de

Ca^{2+} . Por lo que aumenta rápidamente la concentración citoplásmica de Ca^{2+} hasta $1 \mu\text{M}$, con lo que se permite una interacción con la troponina C, y consecuentemente el entrecruzamiento de la actina y la miosina.

B. Una vez concluido el proceso de contracción, es necesario retirar el Ca^{2+} del citoplasma para regresar a las concentraciones basales y permitir el reposo, el proceso es llevado a cabo por dos proteínas. La ATPasa 2 de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA2a), se encarga de regresar 60-70% del Ca^{2+} liberado al interior del retículo sarcoplásmico, recargándolo para que tenga una cantidad suficiente de Ca^{2+} para liberar en el siguiente ciclo cardíaco. Por otro lado, el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) se encarga del 30-40% del Ca^{2+} restante, transportándolo al exterior de la célula.

Tomado de JL Reyes-Juárez, et al. Arch Cardiol Mex. 2006;76 Suppl 4: S18-S32 (16).

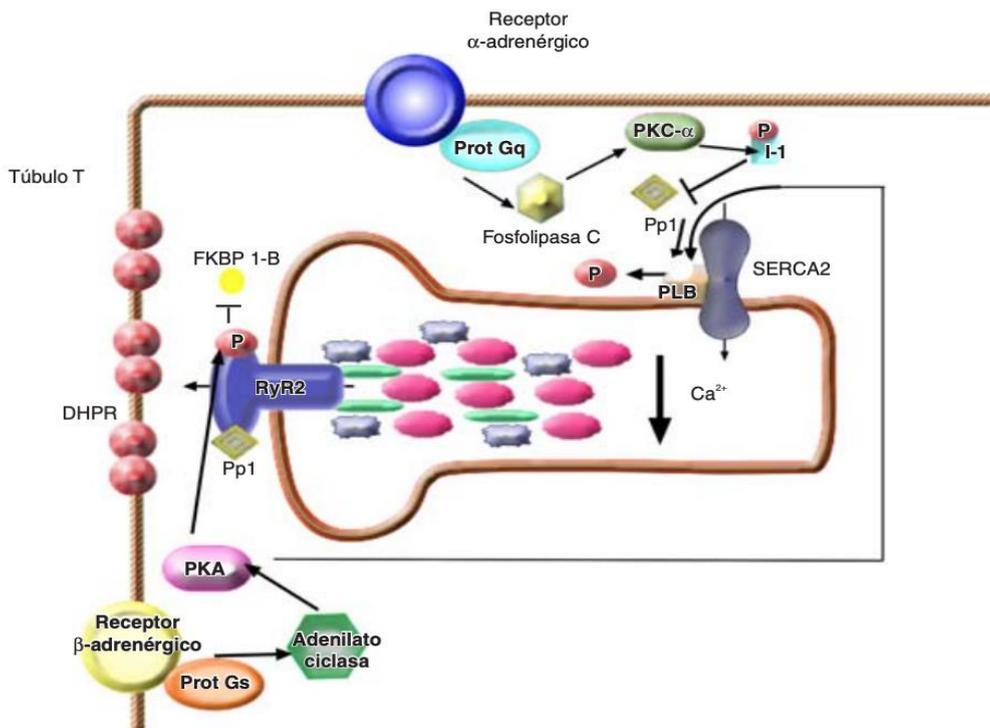


Figura 5: Alteraciones en el retículo sarcoplásmico en la insuficiencia cardíaca.

La relación entre SERCA2a y PLB (regulador de SERCA2) se encuentra disminuida, lo que se traduce en una disminución de la actividad total de SERCA2 y consecuentemente en la cantidad total de Ca^{2+} al interior del retículo sarcoplásmico. Esto provoca que la cantidad de Ca^{2+} liberada durante cada ciclo de acoplamiento excitación contracción, sea menor a la habitual, derivando en una contracción inadecuada.

Tomado de JL Reyes-Juárez, et al. *Arch Cardiol Mex.* 2006;76 Suppl 4: S18-S32 (16).

2.3.2 Fallo primario del injerto y SERCA2a

Hasta la fecha no se ha investigado la posible relación entre el FPI y el cambio en los valores de SERCA2a. Como parte de esta Tesis Doctoral, hemos contribuido en este campo con un artículo original del que como doctoranda soy primera autora y autora de correspondencia. Dicho artículo motivó la publicación de un editorial en el mismo número de la revista, *Transplantation (Baran DA, Copeland H. Unraveling the Causes of Primary Graft Dysfunction. Transplantation. 2022;106(4):707-708. doi:10.1097/TP.0000000000003799).*

Artículo 1 (Anexo 1): “Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation. Este artículo ha sido el primero, hasta nuestro conocimiento, en mostrar la capacidad de SERCA2a de predecir el FPI. Por otra parte, se trata de una contribución relevante al demostrar el potencial de este biomarcador para predecir FPI, con la consiguiente implicación clínica de estos resultados.

2.4 El rechazo agudo celular como una de las principales causas de mortalidad y pérdida de aloinjerto durante el seguimiento

El rechazo cardíaco es una de las principales causas de pérdida del aloinjerto y mortalidad (3,4) (Figura 2,3). Hasta la fecha, la evaluación histológica de la biopsia endomiocárdica (BEM) sigue siendo el *gold standard* para el diagnóstico del RAC. Sin embargo, se trata de un procedimiento invasivo que no está exento de riesgos, con una variabilidad inter-observador significativa a la hora de determinar el grado de rechazo celular (17,18). Debido a las limitaciones de esta técnica, la búsqueda de procedimientos no invasivos para reducir el número de BEM de vigilancia suscita gran interés. Actualmente, la determinación de niveles de troponina T ultrasensible (TnTus), fragmento N-terminal del propéptido natriurético cerebral (NT-proBNP), SERCA2a, AlloMap®, *cell free DNA* y microRNAs son los métodos no invasivos más estudiados para la monitorización del RAC. Sin embargo, ninguno de ellos ha sido por el momento capaz de sustituir a la BEM (15, 19-26).

2.5 Alteración del transporte núcleo-citoplasma en pacientes con rechazo cardíaco

El transporte núcleo-citoplasma es un proceso crucial para el correcto funcionamiento celular (27) y en su actividad intervienen numerosas moléculas, entre ellas nucleoporinas, importinas, exportinas y reguladores RAN, implicadas en la regulación y estructuración del poro nuclear (Figura 6). En el caso de la nucleoporina 153 (Nup153), se han observado niveles más elevados de esta molécula en pacientes con miocardiopatía dilatada o isquémica (28). También se han observado niveles más elevados de

exportinas, importinas y proteínas activadoras de Ran en pacientes con cardiopatía en comparación con sujetos sin cardiopatía, lo que demuestra que en la IC existe una alteración de la maquinaria de tráfico nucleocitoplasmático (29). Por lo tanto, se sabe que las nucleoporinas, las exportinas y los reguladores RAN juegan un papel importante en la modulación de la IC. Sin embargo, no existen datos publicados que evalúen posibles diferencias en la expresión de estas moléculas en receptores de TC en función de su evolución y su relación con la aparición de rechazo cardíaco tras el trasplante. Dado que el rechazo cardíaco produce inflamación, desintegración y necrosis celular (30), planteamos la hipótesis de que también puede alterar el transporte nucleocitoplasmático, lo que daría lugar a cambios en los niveles séricos de los componentes implicados en la regulación y el transporte a través del complejo del poro nuclear en los pacientes con RAC.

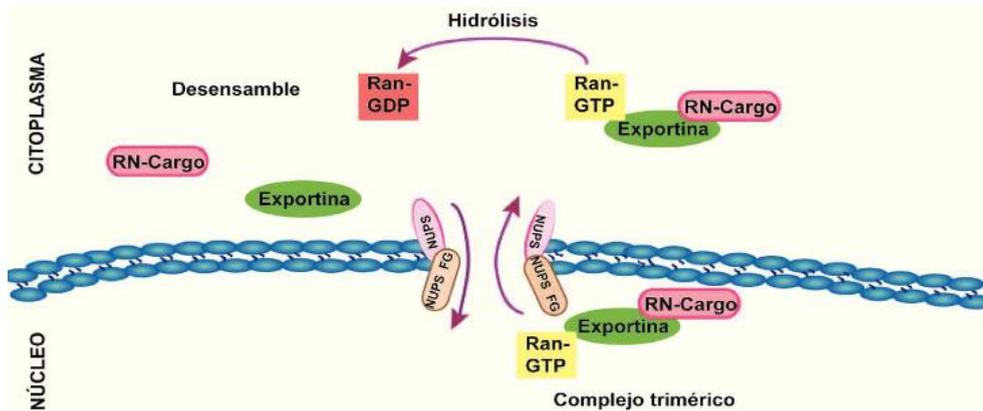


Figura 6: Receptores nucleares (RN) y transporte núcleo-citoplasma.

Tomado de B Ortega-Domínguez, et al. *Rev Esp en Ciencias Químico-Biológicas*. 2015; 18(2):131-143 (31).

Como parte de esta Tesis Doctoral, hemos contribuido en este campo con la publicación de un artículo original en el que mostramos un análisis preliminar de moléculas implicadas en el transporte nucleocitoplasma en pacientes con RAC durante el primer año de seguimiento tras el TC.

Artículo 2 (Anexo 2): Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection. Hasta la fecha se habían descrito alteraciones del transporte nucleocitoplasmático en pacientes con IC, pero no en el ámbito del RAC. Este estudio constituye un importante punto de partida en la búsqueda de nuevos biomarcadores de RAC, al objetivar que el transporte nucleocitoplasmático se encuentra alterado en los pacientes que desarrollan RAC al menos moderado durante el seguimiento a un año.

2.6 Papel de la proteína activadora 1 de Ran GTPasa (RANGAP1) para identificar rechazo agudo celular

Previamente, nuestro grupo observó alteraciones en los componentes de la maquinaria de tráfico nucleocitoplasmático en un pequeño grupo de pacientes con RAC (Artículo 2; Lozano-Edo et al. *Transplant Proc.* 2021). En este estudio, nos hemos centrado en la evaluación de los niveles séricos de la RANGAP1, molécula que en el análisis preliminar mostraba resultados más favorables.

En el tráfico nucleocitoplasmático las proteínas nucleares forman un complejo con RanGTP para pasar a través del complejo de poros nucleares, posteriormente RanGTP se hidroliza a RanGDP por la proteína activadora 1 de Ran GTPasa (RanGAP1) ubicada en el citoplasma celular, liberando posteriormente la proteína nuclear en el citoplasma (32-34). Por lo que

RANGAP1 juega un papel crucial en la exportación de proteínas desde el núcleo al citoplasma y la regulación del complejo del poro nuclear (Figura 7).

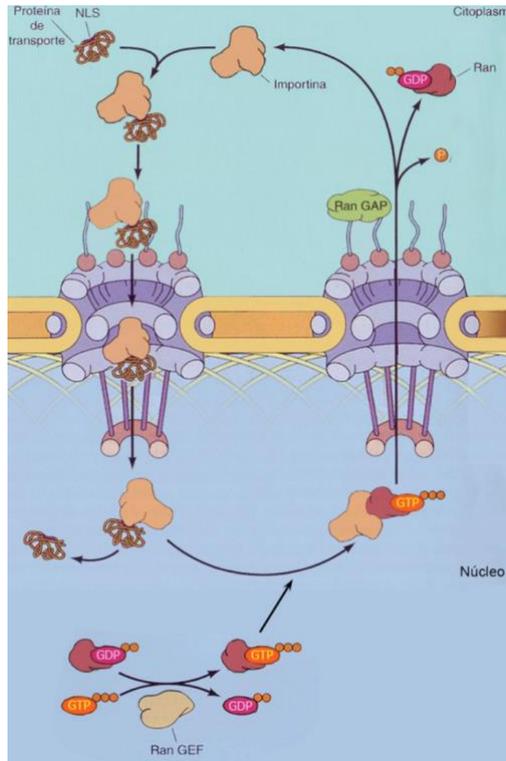


Figura 7: Exportación de proteínas a través del complejo del poro nuclear.

Tomado de Molecular Biology of The Cell 5E,2012 (35).

Como parte de esta Tesis Doctoral, hemos contribuido en este campo con un artículo original de los que como doctoranda soy la primera autora y autora de correspondencia:

Artículo 3 (Anexo 3): Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker. En este estudio analizamos en profundidad la RANGAP1 en el ámbito del RAC, por mostrar resultados preliminares más favorables. Observamos como niveles más elevados de esta molécula tiene capacidad predictiva de RAC. Este artículo aporta información relevante en el campo del TC que podría brindar una nueva herramienta para el seguimiento de este grupo de pacientes y su tratamiento individualizado.

2.7 Necesidad de soporte circulatorio mecánico previo al trasplante cardiaco

La necesidad de SCM puente al TC se asocia con un número significativo de complicaciones que tienen impacto sobre la morbimortalidad de estos pacientes. No obstante, en ocasiones la inestabilidad hemodinámica hace necesario su implante. Estos dispositivos generan flujo circulatorio para sustituir parcial o totalmente la función del corazón en situaciones agudas o crónicas de fracaso cardiaco severo que no responde a otros tratamientos, pudiendo brindar soporte uni o biventricular (36,37).

Hay varias opciones disponibles de SCM temporal; los sistemas de asistencia percutánea más utilizados son el balón de contrapulsación intraaórtico y el Impella® (AbioMed, Danvers, MA, USA). Otros dispositivos son el TandemHeart® (LivaNova, Houston, TX), el ECMO veno-arterial y las nuevas bombas centrífugas de levitación magnética. Estas últimas en comparación con los primeros dispositivos pulsátiles, causan menos tensión de cizallamiento y generación de calor, y son empleadas para el apoyo circulatorio a corto plazo, Levitronix CentriMag® (Abbott, Abbott Park, IL).

Los dispositivos de asistencia temporal pueden utilizarse solos o combinados entre sí (38).

Pese a que no forma parte del estudio molecular de esta Tesis Doctoral hemos contribuido en este campo con la redacción de un artículo del que soy firmante, en el que se muestran las principales complicaciones que presentan los pacientes que precisan de SCM como puente al TC en nuestro centro. *Impact of Circulatory Assistance in the Early Evolution After Heart Transplantation. Unicentric Experience (39)*. En este estudio, observamos que el grupo de pacientes que precisó SCM previo al TC presentó mayor incidencia de FPI, infecciones y una mayor mortalidad a un año de seguimiento (Anexo IV).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

- Analizar en muestras de sangre periférica, de pacientes sometidos a TC electivo o que por inestabilidad clínica o hemodinámica precisaran de SCM (Levitronix CentriMag® o ECMO) como puente al trasplante, los niveles séricos de RanGAP1, Importina 5 (Imp 5) y Nup 153, así como los niveles plasmáticos de SERCA2a y correlacionarlos con el desarrollo de complicaciones a corto-medio plazo (FPI y RAC).
- Valorar si un perfil diferencial de estos marcadores moleculares en suero/plasma, de pacientes sometidos a TC, facilitaría la identificación precoz de complicaciones y permitiría realizar un manejo clínico individualizado con la optimización de los tratamientos correspondientes o de las medidas preventivas necesarias.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Artículo 1

Título del Artículo 1:

Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation.

Lozano-Edo S, Sánchez-Lázaro I, Portolés M, et al. Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation. *Transplantation*. 2022;106(4):887-893.

doi:10.1097/TP.0000000000003798.

Objetivos del Artículo 1:

- Comprobar si existe una relación entre los niveles plasmáticos de SERCA2a inmediatamente pre-TC y el desarrollo de FPI.
- Determinar la potencial utilidad de SERCA2a pre-TC como nuevo biomarcador para predecir el desarrollo del FPI.

3.2.2 Artículo 2

Título del Artículo 2:

Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection.

Lozano-Edo S, Sánchez-Lázaro I, Almenar-Bonet L, et al. Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection. *Transplant Proc.* 2021;53(9):2718-2720.

doi:10.1016/j.transproceed.2021.09.003

Objetivos del Artículo 2:

- Evaluar si existen alteraciones en el transporte núcleo-citoplasma en pacientes que desarrollan RAC al menos moderado durante el primer año tras el TC.

- Analizar si existe asociación entre los niveles séricos de Imp 5, Nup 153 y RANGAP1 extraídos en periodo de estabilidad clínica tras el TC y el desarrollo de RAC a corto-medio plazo.

3.2.3 Artículo 3

Título del Artículo 3:

Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker.

Lozano-Edo S, Roselló-Lletí E, Sánchez-Lázaro I, et al. Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker. *J Pers Med.* 2022;12(6):913. Published 2022 May 31. doi:10.3390/jpm12060913

Objetivos del Artículo 3:

- Determinar si el aumento de los niveles séricos circulantes de RANGAP1, una vez que el paciente alcanza el período de estabilidad clínica, es decir, 1-3 meses después del trasplante, podría servir como marcador predictivo de RAC durante el primer año de seguimiento.
- Determinar la potencial utilidad de RANGAP1 como nuevo biomarcador para predecir el desarrollo del RAC.

3.2.4 Artículos complementarios

3.2.4.1 Artículo complementario 1

Título del Artículo complementario 1:

Impact of Circulatory Assistance in the Early Evolution After Heart Transplantation. Unicentric Experience.

Martínez-Lauwers A, Arenas P, Pérez-Roselló V, et al. Impact of Circulatory Assistance in the Early Evolution After Heart Transplantation. Unicentric Experience. *Transplant Proc.* 2021;53(9):2731-2733. doi:10.1016/j.transproceed.2021.08.041

Objetivo del Artículo complementario 1:

- Determinar el impacto pronóstico de la asistencia circulatoria mecánica puente al TC en nuestro centro, Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

3.2.4.2 Artículo complementario 2

Título del Artículo complementario 2:

COVID-19 and Heart Transplantation. Initial Experience in a Tertiary Hospital.

López-Vilella R, Sánchez-Lázaro I, Trenado VD, Edo SL, Dolz LM, Bonet LA. COVID-19 and Heart Transplantation. Initial Experience in a Tertiary Hospital. *Transplant Proc.* 2021;53(9):2743-2746. doi:10.1016/j.transproceed.2021.07.054

Objetivo del Artículo complementario 2:

- Evaluación del impacto de la COVID-19 en pacientes trasplantados cardiacos, mediante un estudio unicéntrico, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

4 MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Selección de pacientes trasplantados cardiacos para la obtención de muestras de sangre periférica, el estudio y seguimiento postrasplante cardiaco

4.1.1 Criterios de inclusión

Los pacientes entraron en el estudio en base a los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes adultos sometidos a TC en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe entre el 1 de enero de 2017 y el 31 de diciembre de 2019.
- Llegar a presentar estabilidad clínica tras el TC, superando las complicaciones agudas acontecidas inmediatamente tras el mismo. Se excluyen por tanto los pacientes fallecidos en el primer mes tras el TC sin llegar a presentar estabilidad clínica y hemodinámica tras el mismo. Teniendo en cuenta que la mortalidad en este periodo depende fundamentalmente de complicaciones quirúrgicas y las derivadas del FPI.
- Haber cumplido seguimiento completo en nuestro centro durante el primer año tras el TC, o en su defecto hasta el momento de la muerte en aquellos pacientes fallecidos durante el primer año, tanto por causas cardiacas como por todas las causas.
- Posibilidad de extracción de una muestra de sangre periférica en los primeros meses tras el TC, 1 a 3 meses, una vez alcanzada la estabilidad clínica y hemodinámica para el análisis en suero de moléculas implicadas en el transporte núcleo-citoplasma: Nup153, RanGAP1, Imp 5 y en el metabolismo del calcio (SERCA2a).

4.1.2 Criterios de exclusión

- Mortalidad previa a la estabilidad clínica y hemodinámica tras el TC.
- Pérdida de seguimiento durante el primer año.
- Imposibilidad de extraer la muestra de sangre periférica para el análisis molecular una vez alcanzado el periodo de estabilidad clínica y hemodinámica.
- Pérdida de la muestra de sangre periférica durante el análisis molecular.
- Trasplantes cardiopulmonares.
- Trasplantes pediátricos y retrasplantes cardiacos.
- Imposibilidad de adquirir el consentimiento informado previo a la obtención de la muestra.

4.2 Selección de pacientes para la obtención de muestras de sangre periférica y el estudio pretrasplante cardiaco

4.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes adultos sometidos a TC en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe entre enero de 2009 y diciembre de 2019.
- Posibilidad de extracción de una muestra de sangre periférica entre las 2 y las 6 horas previas al TC.
- Firma de consentimiento informado.

4.2.2 Criterios de exclusión

- Imposibilidad de adquirir el consentimiento informado previo a la obtención de la muestra.
- Pérdida de la muestra de sangre periférica durante el análisis molecular.

- Trasplantes cardiopulmonares.
- Trasplantes pediátricos y retrasplantes cardiacos.

4.3 Obtención de muestras de sangre periférica

4.3.1 Muestras pretrasplante cardiaco

Se incluyeron pacientes sometidos a TC, en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, entre 2009 y 2019. La extracción de sangre periférica se realizó de dos a seis horas antes del TC. El total de pacientes incluidos fue de 135.

4.3.2 Muestras postrasplante cardiaco

Se incluyeron consecutivamente los pacientes sometidos a TC en nuestro centro, Hospital Universitario y Politécnico La Fe durante un periodo de 3 años, enero del 2017 – diciembre 2019. La extracción se realizó en los primeros meses tras el TC, una vez alcanzado el periodo de estabilidad clínica. El total de pacientes incluidos fue de 75.

4.3.3 Procesado de muestras pre y postrasplante cardiaco

Las muestras de plasma y suero se recolectaron en tubos de plástico con anticoagulante EDTA al 15% (BD Vacutainer® K3E; REF 368480) y tubo suero (BD Vacutainer® SST II Advance, REF 366468).

Posteriormente fueron centrifugadas (Eppendorf® 5415R, Germany) a 1300 rpm durante 10 minutos a 4°C, se aisló el sobrenadante y se alicuotó

en criotubos de plástico serigrafiados. Las muestras se almacenaron a una temperatura de - 80°C, hasta su posterior análisis, en los ultracongeladores del Biobanco del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, los cuales están monitorizados continuamente para mantener los límites de control adecuados para su correcta conservación.

4.4 Determinación de los niveles de SERCA2a

Previamente al análisis se descongelaron las muestras a 4°C. Seguidamente se centrifugó el plasma en una microcentrífuga (Eppendorf® 5415R, Germany) a 1.300 rpm, 10 minutos a 4°C, aislándose el sobrenadante. La muestra obtenida se alicuotó en volúmenes de 150 µL en tubos estériles tipo “eppendorfs” de plástico.

Los niveles de SERCA2a se determinaron mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (SEG374Hu, Cloud-Clone Corp., Katy, TX 77494) basado en la técnica “*sandwich*” o de doble anticuerpo. Con una variabilidad intra e inter-ensayo < 10% y < 12%, respectivamente:

- Incubación durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación, de 100 µL de cada muestra de plasma, con un anticuerpo monoclonal específico que se encuentra anclado a la pared de los pocillos de la microplaca.
- Lavado de los pocillos (5 veces) con 300 µL de tampón de lavado.
- Incubación de 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación, con el anticuerpo secundario biotinilado.
- Lavado de los pocillos (5 veces) con 300 µL de tampón de lavado.

- Incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación, con 100 μL de conjugado de estreptavidina-peroxidasa, que se une al antígeno formando un “inmunocomplejo”
- Lavado de los pocillos (cinco veces) 300 μL de tampón de lavado, para eliminar el exceso de anticuerpo de detección no unido al “complejo”
- Incubación de 30 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente, con 100 μL de 3,3', 5,5' tetra metilbencidina (TMB), que al unirse a la peroxidasa del anticuerpo de detección da un producto coloreado.
- Adición de 100 μL de “solución de parada” (H_2SO_4) a la reacción colorimétrica entre la peroxidasa y el TMB, produciendo un cambio de color.
- Cuantificación de la absorbancia en densidades ópticas a una longitud de onda de 450 nm (longitud de referencia de 620 nm), en un lector de microplacas de longitud de onda dual (Sunrise, TECAN, Austria) usando un software Magellan (versión 2.5, TECAN, Austria). Los resultados se obtuvieron mediante la interpolación de la densidad óptica obtenida para cada muestra en una curva lineal obtenida a partir de las distintas concentraciones de la proteína sintética.

No se identificó reactividad cruzada significativa entre SERCA2a y sus análogos.

4.5 Determinación de los niveles en suero de NUP 153, RANGAP1 e Imp 5

Previamente al análisis se descongelaron las muestras a 4°C y se alicuotaron en volúmenes de 150 µL en tubos estériles tipo “ependorfs” de plástico. Los sueros fueron centrifugados previamente al ensayo en una microcentrífuga (Eppendorf® 5415R, Germany) a 1.300 rpm, 10 minutos a 4°C, se aisló el sobrenadante.

Los niveles de cada molécula se determinaron mediante un kit de inmunoensayo enzimático “ELISA” (*Cat. N^{os}. MBS011353 y MBS9321016, from MyBiosource, Inc., San Diego, Calif United States*), del mismo modo que el análisis anteriormente citado.

4.6 Seguimiento clínico postrasplante cardiaco

En nuestro centro, durante el primer año post-TC, los pacientes ingresan de forma programada al mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses tras el mismo. En dichos ingresos el equipo de IC y Trasplante realiza el seguimiento especializado de cada paciente. Durante la pandemia Covid-19 los seguimientos se vieron levemente alterados debido al colapso hospitalario y la dificultad para realizar ingresos programados. Pese a que no forma parte del análisis molecular de esta Tesis Doctoral, mencionar que hemos analizado el impacto de la infección por Covid-19 en nuestros pacientes y hemos publicado un artículo al respecto, del que soy firmante. COVID-19 and Heart Transplantation. Initial Experience in a Tertiary Hospital (40). En este estudio, realizado entre febrero de 2020 y febrero de 2021, hemos observado como un número significativo de pacientes TC (5,24%) se han infectado por Covid-19, y

hemos evaluado el impacto del ajuste de la medicación inmunosupresor en estos pacientes en función de la gravedad de la enfermedad (Anexo V).

Durante los ingresos programados se realiza un control clínico, con su correspondiente anamnesis y exploración física, control analítico con biomarcadores como TnTus y NT-proBNP, función renal (creatinina y filtrado glomerular), iones, hemoglobina, perfil férrico (ferritina, índice de saturación de la transferrina y hierro), perfil hepático y perfil lipídico. Así como niveles de fármacos inmunosupresores, habitualmente tacrólimus y micofenolato de mofetilo (MMF). En todos estos ingresos programados se realiza una BEM y un estudio ecocardiográfico (Figura 8).

A las 24h de la biopsia el paciente es dado de alta. Durante la pandemia Covid-19 el alta se realizó el mismo día del procedimiento, con los ajustes farmacológicos correspondientes y se contactó telefónicamente con los pacientes para informar de los resultados de la BEM y proceder al tratamiento individualizado.

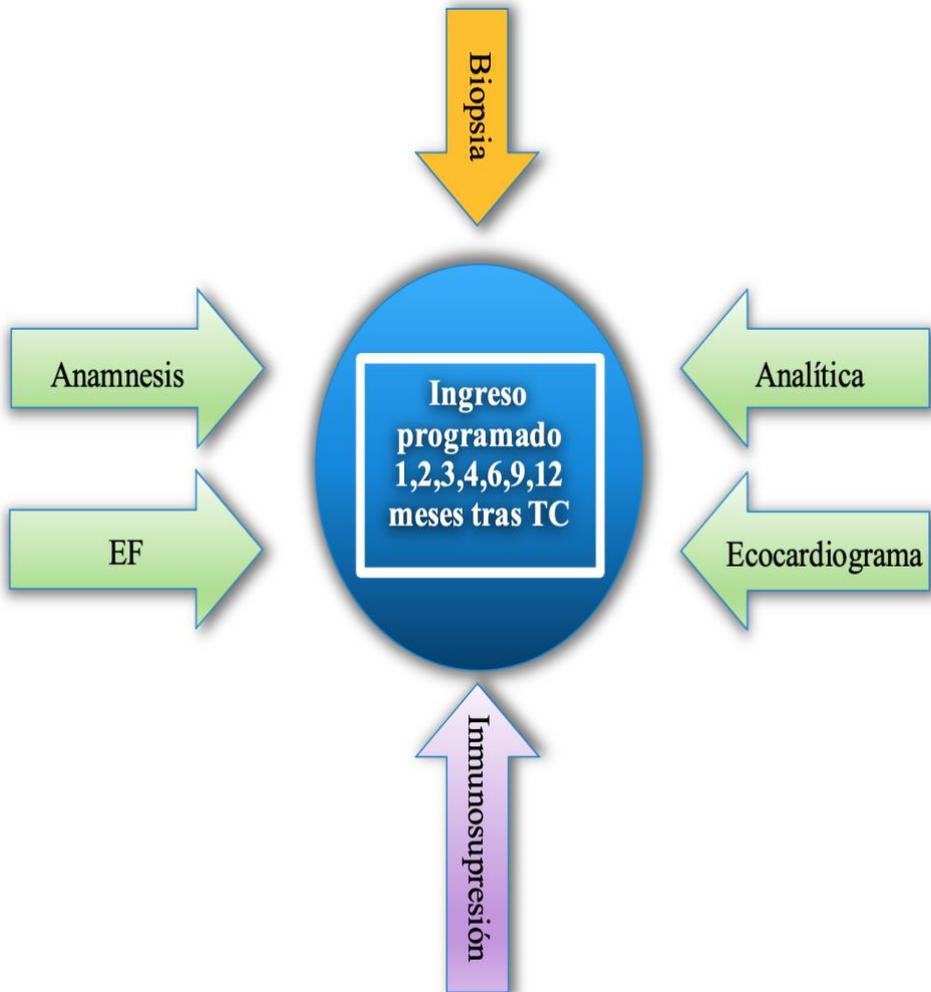


Figura 8: Esquema de seguimiento post-TC.

EF, exploración física.

4.7 Seguimiento anatomopatológico

Se realizan una serie de BEM seriadas a los 1, 2, 3, 4, 6, 9 y 12 meses tras el TC, coincidiendo con los ingresos programados, con el objetivo de monitorizar rechazo tanto celular como humoral. En cada BEM se extraen muestras en formol (4-5 muestras) para el estudio de rechazo celular y en fresco (1 muestra) para la realización de inmunofluorescencia, estudio de rechazo humoral. La obtención de las muestras se realiza principalmente por vía femoral. El grado de rechazo se clasificó según la clasificación de la *International Society for Heart and Lung Transplantation 2004* (30) (Figura 9).

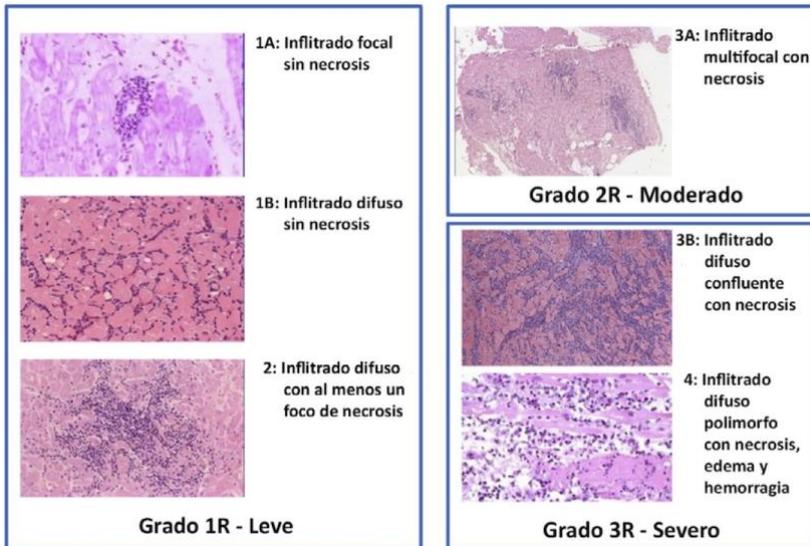


Figura 9: Microfotografías de muestras de biopsias endomiocárdicas con distintos grados de rechazo agudo, según la clasificación antigua 1990 (grados 1A, 1B, 2, 3A, 3B, y 4) y nueva 2004 (grados 1R, 2R y 3R) de la ISLHT del grado de RAC.

Tomado de V. Moñivas, et al. Visión crítica de los parámetros ecocardiográficos para el diagnóstico del rechazo agudo en los pacientes trasplantados cardíacos. Sociedad Española de imagen cardíaca. RETIC 2017; 7: 1-72 (41).

4.8 Seguimiento ecocardiográfico

Durante estos ingresos se realiza un control ecocardiográfico para valorar:

- Dimensiones del ventrículo izquierdo (VI), grosor del tabique interventricular y la pared posterior del VI, así como la función sistólica del VI.
- Dimensiones y función del ventrículo derecho.
- Presencia de derrame pericárdico.
- Valoración de valvulopatías.
- Medición de la vena cava inferior y estimación de la presión pulmonar.
- Control de posibles complicaciones relacionadas con la BEM.

Para la obtención de los estudios ecocardiográficos se utilizó un ecógrafo Philips Ultrasound CX50 Bothell, WA 9802 USA (GMDN 40761, SN SG71000755).

4.9 Régimen inmunosupresor

El mantenimiento de una supresión efectiva de la respuesta inmune es la clave para prevenir el rechazo agudo y crónico del órgano trasplantado. Los regímenes de inmunosupresión emplean una combinación de varios fármacos que actúan de forma sinérgica. La medicación inmunosupresora en el TC se basa principalmente en el protocolo de triple terapia con corticoides, inhibidor de la calcineurina (ICN) y MMF.

El tratamiento inmunosupresor se divide en tres etapas claramente diferenciadas: inducción, mantenimiento y rechazo agudo.

- El tratamiento de inducción hace referencia a un grado de inmunosupresión más intensa y se inicia en las primeras horas tras el TC, para garantizar una profunda y rápida respuesta inmunosupresora. Su objetivo es reducir la incidencia de rechazo agudo severo y retrasar la introducción de fármacos con efecto nefrotóxico como los inhibidores de la calcineurina. Los pacientes, salvo contraindicación, recibieron por protocolo 2 dosis de basiliximab (anticuerpo monoclonal antiCD 25), la primera dosis en las primeras 24h y la segunda el 5º día tras el TC. Así mismo se administró un tratamiento corticoideo con metilprednisolona 1gr en el quirófano antes de la reperfusión, con pauta descendente en los días sucesivos.
- La inmunosupresión de mantenimiento incluyó, en la mayoría de los casos, tres componentes básicos, un ICN (tacrólimus generalmente), un agente antiproliferativo (MMF) y corticoides. El grado de inmunosupresión durante el seguimiento se vio determinado por el periodo temporal, el riesgo individual y los resultados de las BEM.
- Rechazo agudo. Esta situación requirió un manejo individualizado de cada paciente, en función del grado de repercusión hemodinámica. En casos de RAC sin inestabilidad hemodinámica se administraron bolos de metilprednisolona intravenosos. En aquellos casos con deterioro hemodinámico se administraron bolos de metilprednisolona ± Timoglobulina, requiriendo en algunos casos implante de ECMO. En uno de los casos en el que la sospecha fue un rechazo humoral agudo se administraron bolos de corticoides iv + plamaféresis + rituximab.

Intraoperatorio	Postoperatorio					
Al terminar la CEC	< 24 horas	2º - 7º día	2ª semana	3ª semana	4ª semana a 6º mes	> 6 mes
MPS 1.000 mg i.v.	MPS 125 mg/8h	Deflazacort 1.2 mg/Kg	Deflazacort 0.9 mg/Kg	Deflazacort 0.6 mg/Kg	Deflazacort 0.3 mg/Kg	Deflazacort 0.2 mg/Kg
	BASILIXIMAB 20 mg IV a las 4h de la cirugía BASILIXIMAB 20 mg IV al cuarto día					
	Tacrólimus Inicio: 4 mg/24 h si es de liberación sostenida y la mitad en dos dosis diarias si es de liberación normal. Niveles: 10-15 ng/ml					
	Ciclosporina (Inicio: 3 mg/Kg) Niveles 200-300 ng/ml					
	MMF: 1gr/12h					

Tabla 1. Régimen inmunosupresor en los diferentes periodos del trasplante cardíaco.

CEC: circulación extracorpórea, MPS: metiprednisolona, MMF: Micofenolato de Mofetilo.

	< 3 meses post-TC (Grados R2, R3)	> 3 meses post-TC
<p>Deterioro hemodinámico</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">NO</p>	<p>MPS 500 mg/día durante 3 días</p> <p><i>-Si no se resuelve, pero mejora el grado de rechazo → 500 mg/día durante 3 días</i></p> <p><i>-Si no se resuelve o no mejora el grado de rechazo (rechazo córtico-resistente) → 1000 mg MPS 3 días + IAT: 1,5 mg/Kg/día durante 5-14 días.*)</i></p> <p><i>-Si no se resuelve →Plantear metrotexate →Sospechar rechazo vascular</i></p>	<p>-Rechazo R1 con infiltración manifiesta. Subir niveles de inmunosupresores</p> <p>-Rechazo R2 MPS (250 mg/día durante 3 días) ○ Deflazacort -30 mg/6h durante 3 días -30 mg/8h durante 3 días -30 mg/12h durante 3 días -30 mg/día (mantenimiento)</p> <p>-Rechazo R3 MPS (500 mg/día durante 3 días)</p>
<p>Deterioro hemodinámico</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">SI (Bajo gasto)</p>	<p>MPS+IAT (MPS; 1000 mg/día durante 3 días + IAT 1,5 mg/Kg/día durante 5-10 días.*)</p> <p><i>-Si no se resuelve → Considerar rechazo humoral (plasmaféresis + rituximab) + retrasplante</i></p>	<p>MPS+IAT (MPS; 1000 mg/día durante 3 días + IAT:1,5 mg/Kg/día durante 5-10 días.*)</p> <p><i>-Si no se resuelve → Considerar rechazo humoral (plasmaféresis + rituximab) + retrasplante</i></p>

Tabla 2. Tratamiento del rechazo agudo.

MPS: metiprednisolona; IAT: inmunoglobulina antitimocítica.

* Premedicación con: 1 mg/Kg de metilprednisolona, 1 ampolla de dexclorferiamina y 1 g de paracetamol iv 30 minutos antes de la administración de la timoglobulina. Asociar quimioprofilaxis antimicrobiana. Biopsia de control en 1-2 semanas.

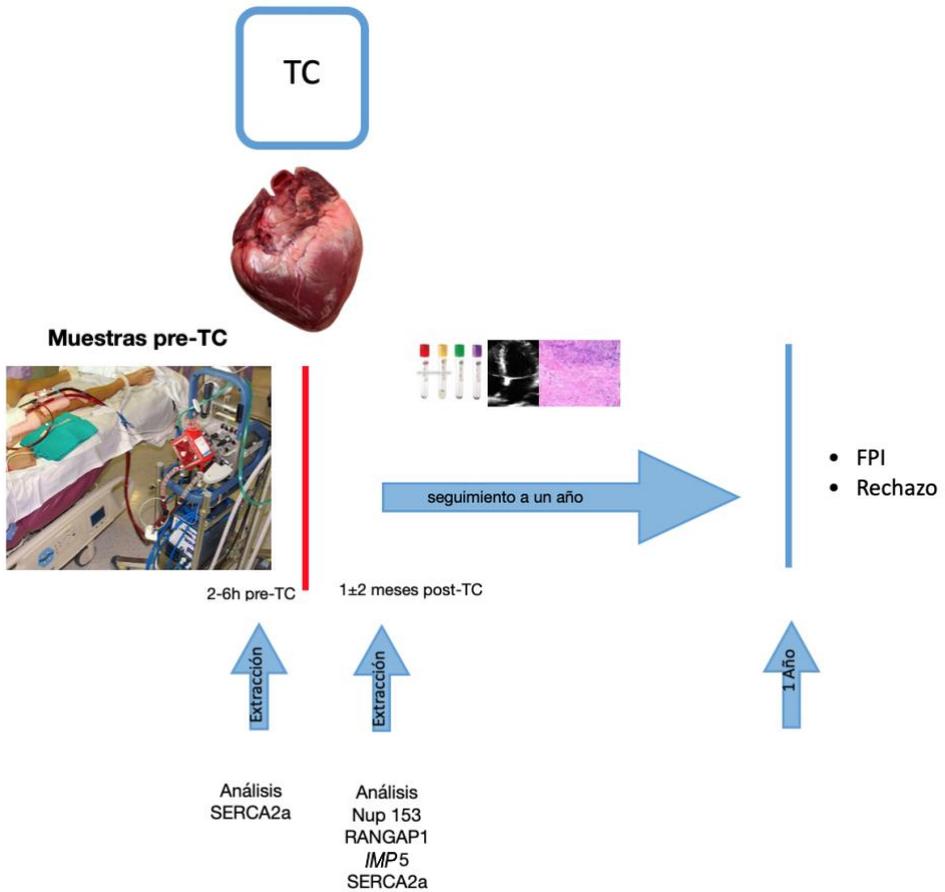


Figura 10: Diagrama cronológico del proceso investigador.

5 RESULTADOS

Los resultados de la esta Tesis Doctoral por compendio por publicaciones se enumeran de acuerdo al orden de publicación de las mismas. En primer lugar, mostraremos los resultados del estudio que analiza los niveles de SERCA2a pre-TC en relación al FPI (Lozano-Edo, et al. *Transplantation*. 2022). Posteriormente comentaremos los resultados del análisis preliminar de las moléculas implicadas en el transporte nucleocitoplasmático (Lozano-Edo, et al. *Transplant Proc*. 2021), para finalizar con el análisis pormenorizado de RANGAP1 y su implicación en el RAC (Lozano-Edo, et al. *J Pers Med*. 2022).

5.1 SERCA2a en el fallo primario del injerto

Los niveles plasmáticos de SERCA2a determinados inmediatamente antes del TC fueron significativamente más bajos en los pacientes que posteriormente experimentaron FPI en comparación con aquellos que no presentaron esta complicación después del TC (mediana de 0,430 ng/mL [Rango Intercuartílico (RIQ), 0,260–0,945] versus 0,830 ng/ mL [RIQ, 0,582-1,052]; $p = 0,001$). Cuando dividimos la muestra en tres grupos de pacientes: sin FPI, con FPI no grave y con FPI grave (necesidad de SCM), encontramos diferencias significativas en los niveles plasmáticos de SERCA2a entre pacientes sin FPI (mediana, 0,830 ng/mL [RIQ, 0,582-1,052]) con respecto a los pacientes con FPI no grave (0,475 ng/mL [RIQ, 0,332-0,997], $p = 0,004$) y también con FPI grave (0,350 ng/mL [RIQ, 0,150–0,860], $p = 0,004$). Sin embargo, cuando se compararon los niveles de SERCA2a de pacientes con FPI no severo y severo, no hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura 11).

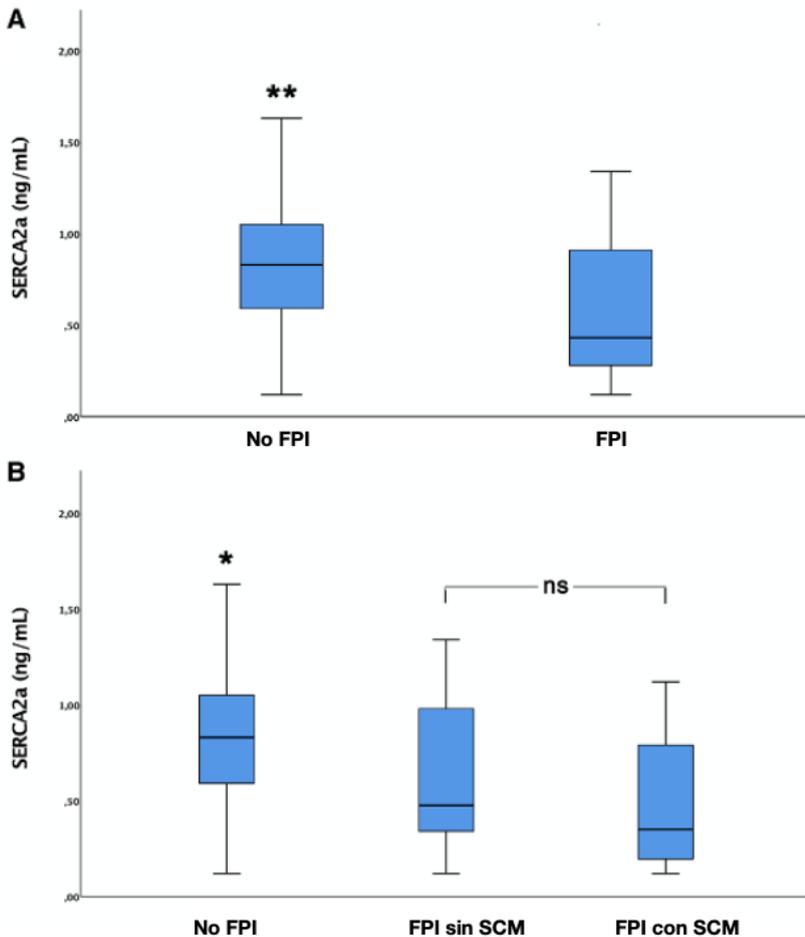


Figura 11: Niveles plasmáticos de SERCA2a en pacientes con y sin FPI.

A, Comparación de pacientes sin FPI y todos los grados de FPI.

B, Comparación de pacientes sin FPI y pacientes con FPI sin necesidad de SCM; y aquellos con FPI severo que requirieron SCM; y comparación de pacientes con FPI no grave y FPI grave. La línea central en los diagramas de caja representa la mediana, la línea inferior del cuadrado el primer cuartil y la superior el tercer cuartil y los bigotes indican el intervalo de confianza del 95%. ** $p = 0,001$; * $p = 0,004$. SCM, soporte

circulatorio mecánico; ns, sin diferencias estadísticamente significativas; FPI, Fallo primario del injerto.

Se realizó el análisis de la curva ROC (característica operativa del receptor) para analizar la capacidad de SERCA2a de detectar FPI y reveló un área significativa bajo la curva ROC (Área bajo la curva (AUC), $0,682 \pm 0,057$ [intervalo de confianza (IC) del 95%, $0,571-0,794$]; $p = 0,001$), con un punto de corte óptimo de $0,60$ ng/mL (sensibilidad 60%; especificidad 75%; valor predictivo positivo, 47%; y valor predictivo negativo, 84%). Se observó que en pacientes con SERCA2a $< 0,60$ ng/mL, el 47% presentó FPI, mientras que en aquellos con SERCA2a $\geq 0,60$ ng/mL, la incidencia fue solo del 16%.

También se realizó una regresión logística multivariante para determinar si los niveles plasmáticos circulantes de SERCA2a eran predictores independientes de FPI. Se incluyeron en el modelo predictores univariados con $p < 0,10$ (IMC, sexo, niveles de SERCA2a pre-TC, niveles de bilirrubina pre-TC y necesidad de SCM puente al TC). Cuando se aplicó el modelo multivariante, un valor de SERCA2a $\geq 0,60$ ng/mL (punto de corte óptimo obtenido a partir de la curva ROC) fue un predictor protector independiente de FPI (OR, $0,215$; IC 95%, $0,075-0,614$; $p = 0,004$), así como los niveles de bilirrubina pre-TC (OR, $1,849$; IC 95%, $1,152-2,969$; $p = 0,011$) y la necesidad de SCM temporal puente al trasplante (dispositivo de asistencia ventricular o ECMO) (odds ratio (OR), $3,762$; IC 95%, $1,280-11,052$; $p = 0,016$). Se realizó el análisis de la curva ROC con la combinación de las 3 variables independientes obtenidas en la regresión logística, obteniendo un AUC significativa ($0,788 \pm 0,054$ [IC 95%, $0,683-0,893$]; $p = 0,0001$).

La comparación de los 3 factores predictivos independientes para FPI (SERCA2a, SCM temporal puente al trasplante y bilirrubina pre-TC) reveló que los niveles de SERCA2a no se correlacionaron con la necesidad de SCM temporal puente al trasplante. El 30 % de los pacientes con niveles de SERCA2a $< 0,60$ ng/mL y el 26 % de aquellos con SERCA2a $\geq 0,6$ ng/mL requirieron SCM temporal puente al trasplante ($p = 0,652$). Por lo tanto, el SCM temporal puente al trasplante no actúa como una variable de confusión entre SERCA2a y FPI. No hubo correlación entre los niveles de SERCA2a y el tiempo que los pacientes requirieron apoyo con SCM temporal $p = 0,34$, R de Pearson = 0,03. Los niveles circulantes de SERCA2a tampoco estaban relacionados con los niveles de bilirrubina antes del TC (SERCA2a $< 0,6$ ng/mL versus $\geq 0,6$ ng/mL: 1,065 ng/mL [RIQ, 0,542–1,870] versus 1,160 ng/mL [RIQ, 0,565–1,917]; $p = 0,873$). Sin embargo, los pacientes que requirieron SCM temporal puente al trasplante tenían niveles de bilirrubina más elevados (1,655 ng/ml [RIQ, 0,847-2,465] frente a 1,000 ng/ml [RIQ, 0,500-1,785]; $p = 0,015$).

Cuando se combinaron 2 variables independientes predictoras de FPI que no estaban asociadas entre sí (SERCA2a $< 0,6$ ng/mL y SCM puente al TC), la presencia de ambas se asoció fuertemente con la aparición de FPI (71%) en comparación con cuando ninguna de ellas estaba presente (14%). La presencia de uno de ellos se asoció de manera intermedia con el FPI (26-36%) (Figura 12).

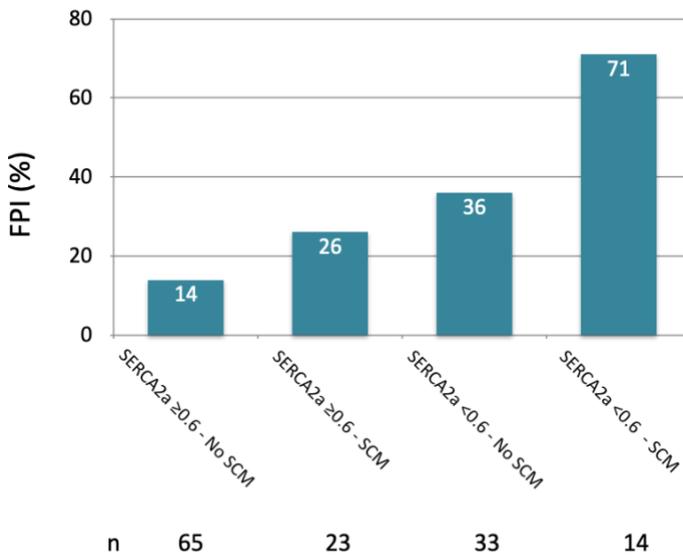


Figura 12: Capacidad predictiva del FPI después de TC con la combinación de SCM puente al TC y SERCA2a < 0,60 ng/mL.

Las tasas de eventos aumentan significativamente al combinar la necesidad de SCM puente al TC y los niveles de SERCA2a < 0,60 ng/mL ($p = 0,0001$ [chi-cuadrado]). TC, trasplante cardiaco; SCM, soporte circulatorio mecánico; FPI, fallo primario del injerto.

5.2 Transporte nucleocitoplasmático en el trasplante cardiaco

Se incluyeron en el análisis un total de 46 receptores de TC. Los resultados mostraron que el 17,39 % ($n = 8$) de los pacientes tenían al menos RAC moderado durante el primer año de seguimiento. En este grupo se observaron niveles más altos de Imp 5, Nup153 y RanGAP1. Esta diferencia fue estadísticamente significativa en el caso de Nup153 y RanGAP1 ($p = 0,048$; $p = 0,026$, respectivamente) (Figura 13). También se observaron niveles más altos de Imp 5 en el grupo de pacientes con RAC al menos moderado, pero sin alcanzar la significación estadística.

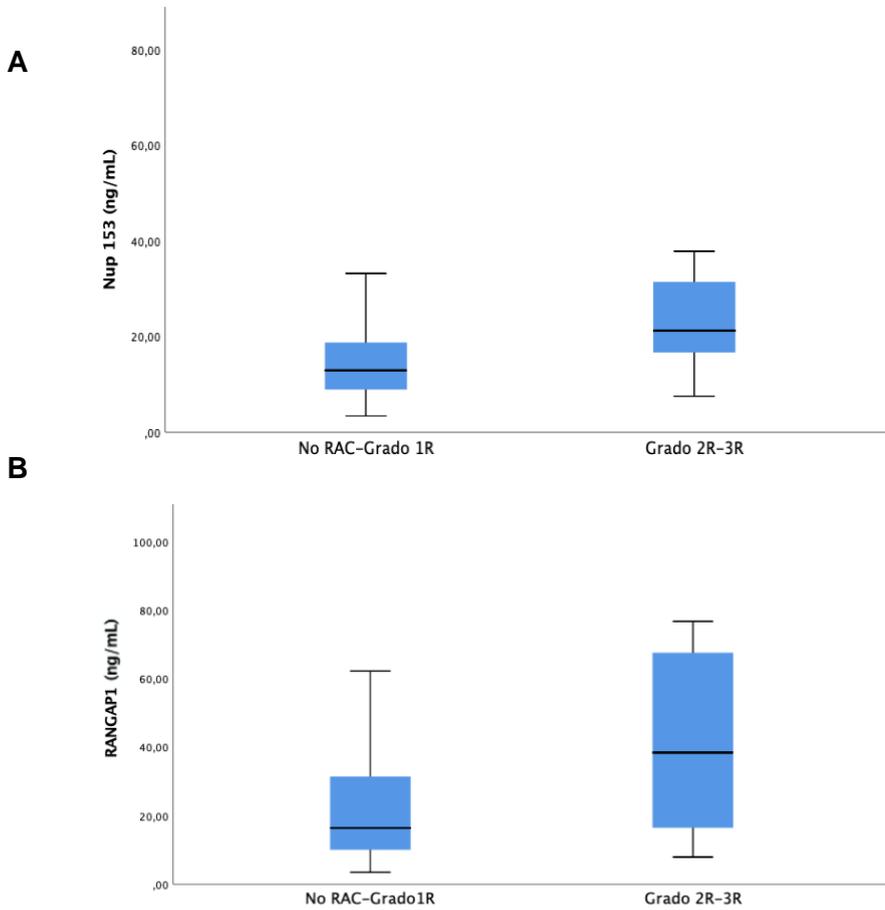


Figura 13: Niveles circulantes de RANGAP1 y Nup 153 en pacientes sin y con rechazo cardíaco celular.

A, Comparación entre los niveles séricos de Nup 153 en pacientes sin y con rechazo celular agudo significativo.

B, Comparación entre los niveles séricos de RANGAP1 en pacientes sin y con rechazo celular agudo significativo. La línea central en los diagramas de caja representa la mediana. El cuadro inferior representa el primer cuartil. El cuadro superior representa el tercer cuartil. Los bigotes indican el 95% de intervalo de confianza. Grado 1R, rechazo leve; grado 2R, rechazo moderado; grado 3R, rechazo severo.

5.3 RANGAP1 en el rechazo agudo celular

Los niveles séricos de RANGAP1 fueron más altos en pacientes con RAC significativo (moderado o severo) en comparación con el grupo de pacientes sin RAC significativo (mediana 63,15 ng/mL (RIQ, 36,61 - 105,69) versus 35,33 ng/mL (RIQ, 19,18 - 64,59); $p = 0,02$). Cuando comparamos los niveles de RANGAP1 en pacientes sin RAC con aquellos con rechazo leve, no encontramos diferencias significativas (mediana 50,11 ng/mL (RIQ, 11,11 a 74,2) versus 34,04 ng/mL (RIQ, 20,00 - 60,71); $p = 0,98$). Por el contrario, se observaron niveles de RANGAP1 significativamente más altos en el grupo de pacientes con rechazo severo en comparación con aquellos con rechazo moderado (mediana 166,33 ng/mL (RIQ, 105,69 - 166,33) versus 52,60 ng/mL (RIQ, 29,48 - 94,38), $p = 0,03$) (Figura 14).

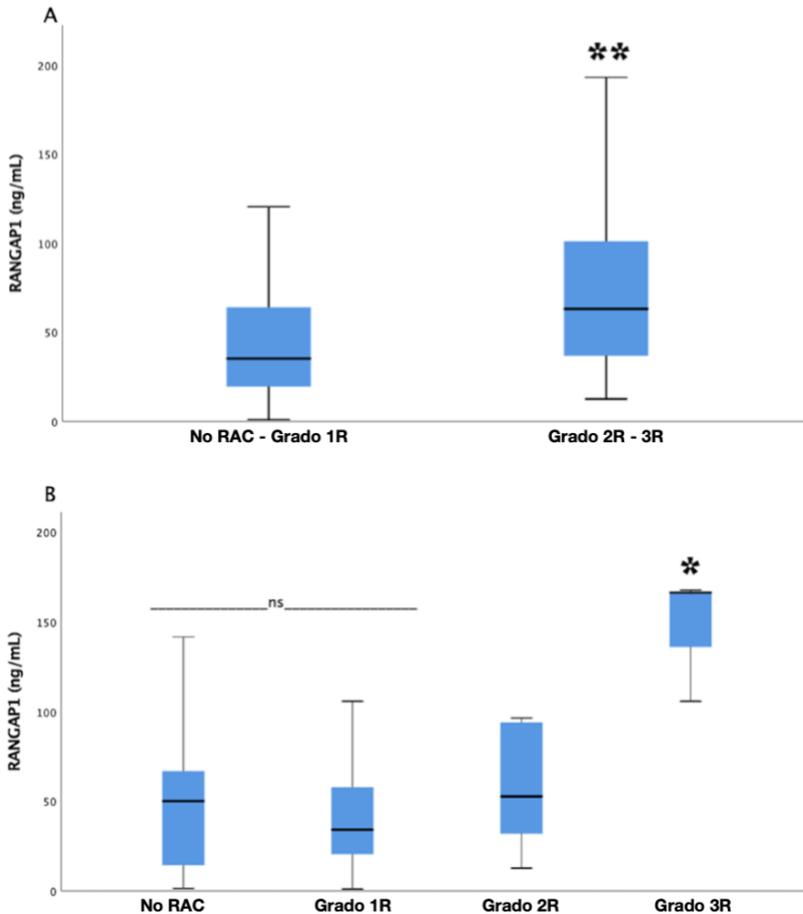


Figura 14: Niveles circulantes de RANGAP1 en pacientes sin y con rechazo cardiaco celular.

A, Comparación entre los niveles séricos de RANGAP1 en pacientes sin y con rechazo celular agudo significativo.

B, Comparación entre los niveles séricos de RANGAP1 en diferentes grados de rechazo cardiaco agudo. La línea central en los diagramas de caja representa la mediana. El cuadro inferior representa el primer cuartil. El cuadro superior representa el tercer cuartil. Los bigotes indican el 95% de intervalo de confianza. ** $p = 0,02$, * $p = 0,03$. Grado 1R, rechazo leve; grado 2R, rechazo moderado; grado 3R, rechazo severo; ns, sin diferencias estadísticamente significativas.

Construimos curvas ROC para determinar la capacidad de RANGAP1 para detectar RAC, obteniendo un área significativa bajo la curva (AUC, $0,70 \pm 0,08$ (95% IC $0,55 - 0,85$); $p = 0,02$), con un punto de corte óptimo de 90 ng/mL (sensibilidad 47%; especificidad 86%; valor predictivo positivo 45,6% y valor predictivo negativo 86,6%). Observamos que en pacientes con niveles de RANGAP1 > 90 ng/mL, el 44% presentó RAC en el primer año tras el TC, mientras que en aquellos con niveles de RANGAP1 < 90 ng/mL, solo el 14% presentó RAC. Posteriormente, obtuvimos una curva ROC del log NT-proBNP, variable que había bordeado la significación estadística en nuestro estudio; sin embargo, no se obtuvo significación estadística (AUC, $0,60 \pm 0,09$ (IC del 95 %, $0,42 - 0,77$); $p = 0,24$).

Luego realizamos un análisis de regresión logística multivariado para determinar si los niveles séricos circulantes de RANGAP1 eran predictores independientes de RAC. Se incluyeron en el modelo la edad, el sexo, el IMC, los niveles séricos de RANGAP1, la creatinina, la hemoglobina y el logaritmo de TNTus y NT-proBNP determinados durante el período de estabilidad clínica. El modelo multivariable reveló que un valor de RANGAP1 >90 ng/mL (punto de corte óptimo determinado por la curva ROC) fue un predictor independiente de RAC con un OR de 6,8 (IC 95 %, $1,74-26,88$; $p = 0,006$) y estadística C de $0,79 \pm 0,07$ (IC 95 % $0,66-0,93$) $p = 0,001$).

El logaritmo de los valores de NT-proBNP también se identificó como un factor independiente en el modelo (OR, 3,52; IC 95 %, $0,97-12,71$; $p = 0,05$). Además, construimos una curva ROC con la combinación de los dos parámetros sanguíneos predictivos independientes de RAC, es decir, RANGAP1 y Log NT-proBNP, obteniendo un AUC significativa (AUC, $0,77 \pm 0,07$ (95% IC $0,64 - 0,91$), $p = 0,001$) (Figura 15).

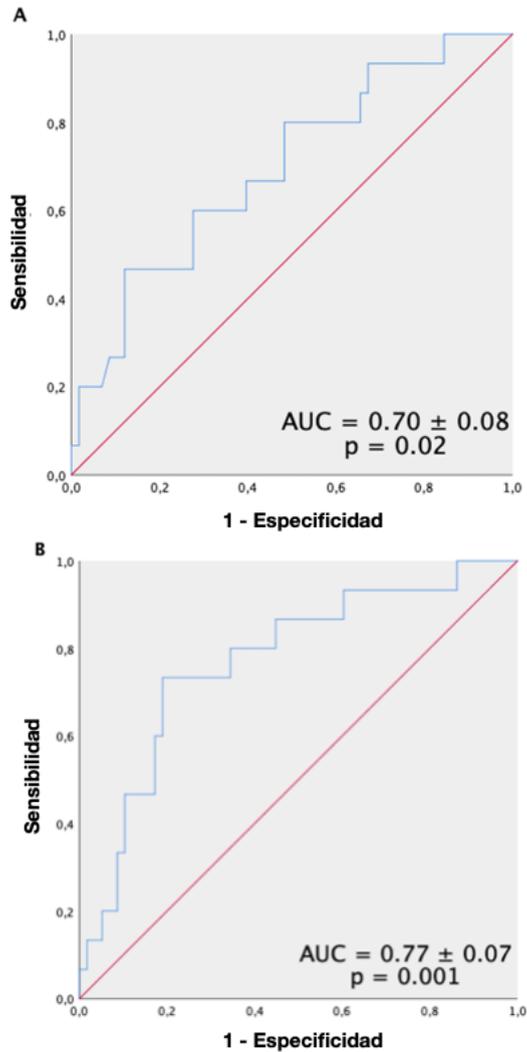


Figura 15: Curvas ROC de RANGAP1 circulante para la detección de rechazo cardíaco agudo.

A, Capacidad de RANGAP1 para detectar RAC significativo (grados 2R-3R). B, RANGAP1 y log NT-proBNP combinados.

6 DISCUSIÓN CONJUNTA

La supervivencia después de un TC ha mejorado en los últimos años debido a un mayor conocimiento en todos los ámbitos del proceso. No obstante, durante el seguimiento de estos pacientes pueden acontecer importantes complicaciones. Dos problemas importantes en el TC son el FPI y el RAC, los cuales marcan la evolución de este grupo de pacientes (3-5). El FPI es la principal causa de mortalidad en los primeros 30 días posteriores al TC (3,6) y el rechazo cardíaco una de las principales causas de pérdida del aloinjerto y mortalidad, difícil de detectar de forma precoz, ya que a menudo cursa de manera asintomática en etapas iniciales (4,18).

Por tanto, el diagnóstico en etapas tempranas es necesario para mejorar aún más la supervivencia de los pacientes trasplantados. La búsqueda de biomarcadores, que permitan detectar o predecir de forma temprana estos eventos de manera no invasiva, ha cobrado gran importancia en los últimos años. Hoy en día el perfil de expresión génica (GEP) AlloMap® es la única prueba analítica no invasiva incluida en las guías de práctica clínica de la *International Society for Heart and Lung Transplantation* desde 2010 para identificar el riesgo de RAC en receptores de TC (42,43). Sin embargo, carece de un buen valor predictivo positivo, identificando únicamente rechazos de un grado mayor o igual a moderado (2R) y no siendo capaz de distinguir entre rechazo celular y humoral. Además, se trata de una técnica compleja, y su determinación es costosa, tanto técnica como económicamente, ya que aísla células mononucleares de sangre periférica de las que posteriormente se aísla el RNA (20). Esta circunstancia ha propiciado que emerjan otros análisis genómicos, como la identificación y cuantificación del *cell free DNA* del donante. Esto es posible debido a que cuando las células del donante mueren liberan fragmentos cortos de DNA en la circulación del receptor, pero su determinación también es técnicamente laboriosa (21,22). Otro ámbito novedoso es la

secuenciación de microRNAs, los cuales son una clase de pequeños RNA no codificantes que regulan la expresión génica. Algunos de estos microRNAs han mostrado expresión tisular y sérica diferencial entre aloinjertos cardiacos normales y con rechazo. Su determinación es técnicamente más sencilla, además los microRNAs son estables en sangre y no se degradan, lo que aporta un valor añadido a la técnica (23-26).

Debido al creciente interés en la búsqueda de biomarcadores capaces de detectar y predecir eventos en los pacientes TC, he centrado esta Tesis Doctoral en la investigación de nuevas moléculas con potencial capacidad de predecir estos eventos clínicos, explorando aspectos no estudiados hasta la fecha en cada uno de estos campos, y extendiendo nuestra línea de investigación en el TC. De esta forma, la estructura de la discusión de esta Tesis Doctoral, se plantea analizando los hallazgos de cada uno de los artículos en cada ámbito del estudio (FPI y RAC). Así mismo, he intentado identificar biomarcadores capaces de predecir estos eventos y cuya determinación sea asequible tanto técnica como económicamente, con el fin de implementar su uso en un futuro, de confirmarse estos hallazgos en estudios con un mayor número de pacientes.

6.1 Fallo primario del injerto

La predicción e identificación precoz del FPI constituye uno de los desafíos más importantes en el ámbito del TC. Con una definición uniforme publicada por la *International Society for Heart and Lung Transplantation* en 2014 (6), se esperaba que la unificación de criterios diagnósticos conllevara a una reducción de la incidencia de esta devastadora complicación, sin embargo, eso no ha sucedido.

Hasta la fecha factores del receptor como la edad, la diabetes y el tratamiento con amiodarona (44,45), así como la necesidad de SCM previo al TC (46), se han asociado con FPI. No obstante, el FPI continúa ocurriendo incluso sin la presencia de estos factores de riesgo. Por ello, sería ideal tener un biomarcador que evaluara el riesgo de desarrollar FPI, particularmente del componente que es independiente de las especificidades del corazón del donante. Con estas premisas determiné los objetivos del artículo 1 (Lozano-Edo, et al. *Transplantation*. 2022), en el que se analizó la incidencia de FPI en una cohorte de 135 pacientes.

La elección de SERCA2a para determinar el poder predictivo del FPI se basó en que en estudios previos se había asociado esta molécula con el rechazo cardíaco y en el ámbito de la IC (12,15), siendo la reducción en la expresión y actividad de SERCA2a causa de deterioro de la función cardíaca (47-49). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, nunca se había estudiado como biomarcador no invasivo en el FPI.

Hemos observado cómo los niveles de SERCA2a determinados en muestras de plasma extraídas 2-6 horas antes del TC son significativamente más bajos en pacientes que posteriormente desarrollan FPI, con un punto de corte óptimo $< 0,6$ ng/mL. En nuestro estudio los factores de riesgo que se asociaron de manera independiente al desarrollo de FPI fueron la necesidad de soporte circulatorio previo al TC, niveles elevados de bilirrubina previos al TC y niveles bajos de SERCA2a antes del TC. Los dos primeros mostraron asociación entre sí, ya que reflejaban un paciente más enfermo, con disfunción multiorgánica. Sin embargo, SERCA2a no se asoció con estas circunstancias. Combinando la necesidad de asistencia circulatoria con los niveles de SERCA2a $<0,6$ ng/mL previos al TC

identificamos el 70% de los casos de FPI. Con estos resultados sugerimos que podría existir una desregulación pre-TC en SERCA2a que podría reflejar un mayor grado de severidad de la enfermedad no siempre identificable por parámetros convencionales, así como factores sistémicos en el receptor que favorecieran un ambiente hostil que alterase la función del nuevo órgano, asociándose a una mayor incidencia de FPI, que podría ser identificado con los niveles circulantes de SERCA2a.

También analizamos los niveles de Nup 153 y RanGAP1 pre-TC, moléculas analizadas previamente en pacientes con IC (28-29), y su correlación con la aparición de FPI. No obstante, no mostraron variaciones relevantes en la predicción de este evento. Esto puede ser debido a que los niveles más elevados de estas moléculas en estudios previos se han objetivado al comparar las muestras de tejido cardíaco de corazones enfermos frente a controles (donantes sanos), sin observar diferencias entre las etiologías más prevalentes, miocardiopatía dilatada idiopática e isquémica. Nuestro estudio tampoco mostró diferencias significativas en cuanto a la etiología de la IC que propició el TC. Así pues, teniendo en cuenta que los 135 pacientes incluidos en nuestro estudio eran pacientes con cardiopatías en situación de pre-TC (urgente o electivo), lo esperable era no encontrar diferencias significativas en los niveles de esas moléculas, debido a que la muestra seleccionada se encontraba en una situación muy avanzada de la enfermedad, la cual derivó en la necesidad de TC.

6.2 Rechazo agudo celular

En el diagnóstico del RAC la BEM sigue siendo el *gold standard*. No obstante, se trata de un procedimiento invasivo con riesgos asociados (17). Por este motivo la búsqueda de nuevos biomarcadores capaces de predecir

e identificar precozmente el RAC es un campo de gran interés.

Nuestro equipo cuenta con experiencia en el estudio de los componentes involucrados en el transporte nucleocitoplasmático y el conocimiento de la importancia de su correcto funcionamiento para la homeostasis celular (28,29), observando cambios perinucleares en biopsias de pacientes con rechazo celular (50). Esto me ha llevado a investigar si existen alteraciones en determinados componentes del transporte nucleocitoplasmático en pacientes TC que desarrollan RAC. Me he centrado en el estudio de Nup 153, RANGAP1 e Imp 5 dados los resultados de estudios previos (28,29).

En el caso de la Nup 153, se han observado niveles más elevados de esta molécula en pacientes con miocardiopatía dilatada o isquémica, por lo que una desregulación de la maquinaria involucrada en el transporte núcleo-citoplasma es presumible en este conjunto de pacientes (28). Otros estudios han observado niveles más elevados de importinas, exportinas y proteínas activadoras de RanGTPasa en pacientes con cardiopatía, lo que afianza la teoría de que en la IC existe una alteración de la maquinaria de tráfico nucleocitoplasmático (29). Sin embargo, estos estudios han analizado los niveles de estas moléculas en tejido cardíaco de pacientes sometidos a TC, sin llegar a comprobar cómo se comportaría su concentración y análisis en sangre periférica. Por lo tanto, se sabe que las nucleoporinas, las exportinas y los reguladores RAN (RANGAP1) juegan un papel importante en la modulación de la IC. Sin embargo, hasta la fecha, no existen datos publicados que evalúen posibles diferencias en la expresión de estas moléculas en receptores de TC y su relación con la aparición de RAC, ni tampoco su comportamiento en sangre periférica, lo que aporta un valor

añadido en referencia al estudio de biomarcadores por técnicas no invasivas.

En el artículo 2 (Lozano-Edo, et al. *Transplant Proc.* 2021) se realizó un análisis preliminar con 46 pacientes TC, se analizó la relación entre los niveles séricos de RANGAP1, Nup153, Imp 5 y SERCA2a extraídos en periodo de estabilidad clínica tras el TC y la aparición de RAC al menos moderado durante el seguimiento a un año. Un total de 8 pacientes (17,39%) presentaron RAC objetivándose en este grupo de pacientes niveles significativamente más elevados de RANGAP1 ($p=0,026$) y Nup 153 ($p=0,048$). Con estos resultados observamos que los pacientes que desarrollaban RAC presentaban alteraciones en el transporte nucleocitoplasmático.

En cuanto al análisis de SERCA2a, en estudios previos con un mayor tamaño muestral se constataron niveles más bajos de SERCA2a tanto en suero como en tejido de pacientes TC con rechazo cardiaco (15). En nuestro análisis preliminar no encontramos diferencias significativas, posiblemente debido al pequeño tamaño muestral, ya que sí se objetivó una tendencia en el grupo de pacientes con RAC a presentar niveles de SERCA2a más reducidos en las muestras de sangre periférica.

Debido a que RANGAP1 fue la molécula con un mayor grado de significación en nuestro análisis preliminar, ampliamos el tamaño muestral para confirmar su comportamiento en una serie más amplia de pacientes TC. Pese a que se han observado alteraciones en RANGAP1 en pacientes con IC (29), hasta nuestro conocimiento no se han realizado investigaciones de esta molécula en el ámbito del RAC y no se han valorado sus alteraciones en sangre periférica.

El papel de la señalización de la respuesta inmune en la regulación del complejo del poro nuclear sigue siendo poco conocido. Estudios previos han demostrado que la activación de las células T promueve la activación de RanGAP1, lo que resulta en un aumento de la actividad del poro nuclear (51). Otros estudios inmunohistoquímicos realizados en el músculo liso de las arterias coronaria y carótida han observado que los niveles de RANGAP1 son bajos en células diferenciadas no lesionadas, mientras que la proliferación neointimal se asocia con un aumento significativo de los niveles de RANGAP1 (52). En el rechazo cardíaco se produce afectación y el daño vascular, junto con proliferación neointimal, así como activación de los linfocitos T (53). Todos estos datos apuntan a que nuestros hallazgos son consistentes con nuestra hipótesis de investigación y los resultados de nuestro estudio, que revelan niveles más elevados de RanGAP1 en el grupo de pacientes con RAC.

Así, en el artículo 3 (Lozano-Edo, et al. *J Pers Med.* 2022) observamos cómo niveles de RANGAP1 $\geq 90\text{ng/mL}$, extraídos en periodo de estabilidad clínica tras el TC, eran capaces de identificar pacientes que durante el seguimiento a un año desarrollaban RAC significativo (mayor o igual a moderado) (AUC=0,7). En nuestro estudio RANGAP1 y NT-proBNP resultaron ser predictores independientes de RAC, complementándose entre sí e incrementando la capacidad de detección de RAC.

Con estos resultados, sugerimos que existe una alteración en el transporte nucleocitoplasmático de pacientes que desarrollan RAC durante el primer año de seguimiento. Centrándonos principalmente en RANGAP1, esta molécula podría ser un nuevo biomarcador no invasivo de RAC.

Por tanto, la determinación de estos biomarcadores capaces de predecir eventos adversos en pacientes TC de manera no invasiva, constituyen una aportación novedosa al ámbito del TC. Permitiendo mediante una técnica relativamente sencilla y asequible como es el ELISA, basado en la técnica "sándwich" o de doble anticuerpo, determinar alteraciones en el transporte núcleo-citoplasma y el metabolismo del calcio capaces de predecir la aparición de FPI y RAC, de confirmarse estos hallazgos en series más amplias de pacientes.

7 LIMITACIONES

La presente Tesis Doctoral se compone de 3 artículos fundamentales (Lozano-Edo, et al. *Transplantation*. 2022; Lozano-Edo, et al. *Transplant Proc.* 2021; Lozano-Edo, et al. *J Pers Med.* 2022) y 2 artículos complementarios (39,40), enmarcados dentro de la misma línea de investigación del TC. Es por ello que una de las principales limitaciones de esta tesis es que se trata de estudios unicéntricos. No obstante, esto le confiere homogeneidad sobre las estrategias diagnósticas y terapéuticas en estos pacientes.

Los artículos tienen un tamaño muestral pequeño, siendo conocidas las limitaciones a la hora de conseguir grandes tamaños muestrales en pacientes TC, más aún en estudios unicéntricos.

Se trata de estudios preliminares que no investigan la mecánica entre la desregulación de SERCA2a, RANGAP1 y Nup 153 y la disfunción miocárdica. Debiendo tenerse en cuenta la potencial variabilidad de los biomarcadores estudiados en base a otros parámetros no analizados tales como el tratamiento recibido y la situación de estrés orgánico. No se ha evaluado específicamente el rechazo humoral, debido a que éste no se ha registrado de manera exhaustiva, disponiendo de un número insignificante del mismo que no permitía su adecuado análisis.

De validarse estos estudios preliminares, en cohortes de pacientes más grandes, se podría contribuir a una mejor investigación sobre el rechazo cardíaco y conducir al uso de estas determinaciones no invasivas relativamente simples como complemento a otros métodos analíticos y también como una alternativa a la BEM. Los diferentes artículos poseen resultados lo suficientemente claros para su toma en consideración, y por

ello pensamos que las limitaciones no invalidan los resultados ni las conclusiones obtenidas.

8 CONCLUSIONES Y APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS

- El análisis de las muestras de sangre periférica pre y post-TC sugiere que existe una alteración en el metabolismo del calcio y el transporte nucleocitoplasmático en pacientes sometidos a TC, que se asocia con eventos adversos durante el seguimiento, FPI y RAC. (Artículos 1, Lozano-Edo, et al. *Transplantation*. 2022; 2, Lozano-Edo, et al. *Transplant Proc*. 2021; y 3, Lozano-Edo, et al. *J Pers Med*. 2022)
- Niveles plasmáticos bajos de SERCA2a pre-TC se asociaron de manera significativa con el FPI. (Artículo 1, Lozano-Edo, et al. *Transplantation*. 2022)
- En nuestro estudio la combinación de SERCA2a, bilirrubina total y la necesidad de SCM temporal previo al TC, son predictores independientes de FPI y aumentan la capacidad predictiva del mismo, resultando una herramienta eficaz para predecir la aparición de este evento. Por ello, SERCA2a podría ser considerada un potencial biomarcador no invasivo de FPI. (Artículo 1, Lozano-Edo, et al. *Transplantation*. 2022)
- Nuestros resultados sugieren que existe una alteración en el transporte nucleocitoplasmático en los pacientes que experimentan RAC durante el primer año de seguimiento tras el TC, observando niveles séricos más elevados de RanGAP1 en este grupo de pacientes. (Artículos 2, Lozano-Edo, et al. *Transplant Proc*. 2021; y 3, Lozano-Edo, et al. *J Pers Med*. 2022)
- La combinación de los niveles de RANGAP1 y NT-proBNP, ambos predictores independientes de RAC en nuestro estudio, aumenta la capacidad predictiva de RAC y se propone como una herramienta

eficaz para predecir RAC, pudiendo ser RANGAP1 un potencial biomarcador no invasivo de RAC. (Artículo 3, Lozano-Edo, et al. *J Pers Med.* 2022)

De los resultados de los trabajos que se han expuesto en esta Tesis Doctoral se derivan varias posibles aplicaciones prácticas:

- En nuestro estudio los pacientes TC que desarrollan FPI presentan niveles reducidos de SERCA2a pre-TC, que sugieren un entorno hostil del receptor el cual predispone al FPI por lo que la determinación de este biomarcador no invasivo, de confirmarse en series más amplias de pacientes y estudios multicéntricos, podría ayudar a predecir este evento y adelantarnos al mismo con las consiguientes mejoras para nuestros pacientes.
- Confirmar la existencia de alteraciones en el transporte nucleocitoplasmático en pacientes TC que desarrollan RAC significativo (mayor o igual a moderado) durante el seguimiento a corto medio plazo, abre la puerta a la investigación en este campo para la búsqueda de nuevos biomarcadores que nos ayuden al manejo de nuestros pacientes, permitiendo ajustes de medicación y ayudando a la toma de decisiones, con el fin de reducir eventos adversos.
- En nuestro estudio RANGAP1 mostraba niveles significativamente mayores en aquellos pacientes que desarrollaron RAC durante el seguimiento. Por lo que, de confirmarse con un mayor tamaño

muestral en estudios multicéntricos, estaríamos ante un posible nuevo biomarcador de RAC.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J*. 1967;41(48):1271-1274.
2. Caralps JM. El trasplante cardíaco en España. Historia de una década: la primeraintervención. *Rev Esp Cardiol*. 1995;48 Supl:S3–4.
3. González-Vílchez F, Gómez-Bueno M, Almenar-Bonet L, et al. Spanish heart transplant registry. 33rd official report of the Heart failure Association of the Spanish Society of Cardiology [published online ahead of print, 2022 Jul 16]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2022;75(11):923-932.
4. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report - 2019; focus theme: Donor and recipient size match [published correction appears in *J Heart Lung Transplant*. 2020 Jan;39(1):91]. *J Heart Lung Transplant*. 2019;38(10):1056-1066.
5. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report--2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34(10):1244-1254.
6. Kobashigawa J, Zuckermann A, Macdonald P, et al; Consensus Conference participants. Report from a consensus conference on primary graft dysfunction after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33:327–340.

7. Russo MJ, Iribarne A, Hong KN, et al. Factors associated with primary graft failure after heart transplantation. *Transplantation*. 2010;90:444–450.
8. Nicoara A, Ruffin D, Cooter M, et al. Primary graft dysfunction after heart transplantation: incidence, trends, and associated risk factors. *Am J Transplant*. 2018;18:1461–1470.
9. Sabatino M, Vitale G, Manfredini V, et al. Clinical relevance of the International Society for Heart and Lung Transplantation consensus classification of primary graft dysfunction after heart transplantation: epidemiology, risk factors, and outcomes. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:1217–1225.
10. Segovia J, Cosío MD, Barceló JM, et al. RADIAL: a novel primary graft failure risk score in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30:644–651.
11. Avtaar Singh SS, DAS DE S, Rushton S, et al. PREDICTA: a model to predict primary graft dysfunction after adult heart transplantation in the United Kingdom. *J Card Fail*. 2019;25:971–977.
12. Eisner D, Caldwell J, Trafford A. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and heart failure 20 years later. *Circ Res*. 2013;113:958–961.
13. Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, et al. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res*. 2014;114:101–108.
14. Greenberg B, Butler J, Felker GM, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet*. 2016;387:1178–1186.

15. Tarazón E, Ortega A, Gil-Cayuela C, et al. SERCA2a: a potential non-invasive biomarker of cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36:1322–1328.
16. Reyes-Juárez JL, Zarain-Herzberg A. Function and role of the sarcoplasmic reticulum in heart disease. *Arch Cardiol Mex.* 2006;76(4):S18-S32.
17. Nielsen H, Sørensen FB, Nielsen B, et al. Reproducibility of the acute rejection diagnosis in human cardiac allografts. The Stanford Classification and the International Grading System. *J Heart Lung Transplant.* 1993;12(2):239-243.
18. Crespo-Leiro MG, Zuckermann A, Bara C, et al. Concordance among pathologists in the second Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational Study (CARGO II). *Transplantation.* 2012;94(11):1172-1177.
19. Hill DA, Drazner MH, de Lemos JA. Do established biomarkers such as B-type natriuretic peptide and troponin predict rejection?. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18(5): 581–588.
20. Crespo-Leiro MG, Stypmann J, Schulz U, et al. Clinical usefulness of gene-expression profile to rule out acute rejection after heart transplantation: CARGO II. *Eur Heart J.* 2016;37:2591-601.
21. Agbor-Enoh S, Shah P, Tunc I, et al. Cell-Free DNA to Detect Heart Allograft Acute Rejection. *Circulation.* 2021;143,1184–1197.
22. Sharon E, Shi H, Kharbanda S, et al. Quantification of transplant-derived circulating cell-free DNA in absence of a donor genotype. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(8):e1005629. Published 2017 Aug 3.
23. Duong Van Huyen JP, Tible M, Gay A, et al. MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. *Eur Heart J.* 2014;35(45):3194-3202.

24. Di Francesco A, Fedrigo M, Santovito D, et al. MicroRNA signatures in cardiac biopsies and detection of allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37:1329–1340
25. Constanso-Conde I, Hermida-Prieto M, Barge-Caballero E, et al. Circulating miR-181a-5p as a new biomarker for acute cellular rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2020; 39, 1100–1108
26. Pérez-Carrillo L, Sánchez-Lázaro I, Triviño JC, et al. Diagnostic value of serum miR-144-3p for the detection of acute cellular rejection in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2022;41(2):137-147.
27. Jamali T, Jamali Y, Mehrbod M, et al. Nuclear pore complex: biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;287:233–86.
28. Tarazon E, Rivera M, Rosello-Lletí E, et al. Heart failure induces significant changes in nuclear pore complex of human cardiomyocytes. *PLoS One*. 2012;7:e48957.
29. Cortes R, Rosello-Lletí E, Rivera M, et al. Influence of heart failure on nucleocytoplasmic transport in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2010;85:464–72.
30. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2005, 24, 1710–1720.
31. Ortega-Domínguez B, Herrera-Ramírez M, Tecalco-Cruz AC. *Rev Esp en Ciencias Químico-Biológicas*. 2015; 18(2):131-143.
32. Clarke PR, Zhang C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(6):464-477.

33. Pemberton LF, Paschal BM. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*. 2005;6(3):187-198.
34. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)*. 2007;72(13):1439-1457.
35. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell* 5th ed. Garland Science. 2012: fig 9.11.
36. Combes A, Price S, Slutsky AS, et al. Temporary circulatory support for cardio-genic shock. *Lancet*. 2020;396(10245):199-212.
37. Ni hlci T, Boardman HM, Baig K, et al. Mechanical assist devices for acute cardiogenic shock. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;6(6): CD013002.
38. Bernhardt AM, Copeland H, Deswal A, et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation/Heart Failure Society of America Guideline on Acute Mechanical Circulatory Support. *J Card Fail*. 2023;29(3):304-374.
39. Martínez-Lauwers A, Arenas P, Pérez-Roselló V, et al. Impact of Circulatory Assistance in the Early Evolution After Heart Transplantation. Unicentric Experience. *Transplant Proc*. 2021;53(9):2731-2733.
40. López-Vilella R, Sánchez-Lázaro I, Trenado VD, et al. COVID-19 and Heart Transplantation. Initial Experience in a Tertiary Hospital. *Transplant Proc*. 2021;53(9):2743-2746.
41. Moñivas V, Mingo S. Visión crítica de los parámetros ecocardiográficos para el diagnóstico del rechazo agudo en los pacientes trasplantados cardíacos. *SEIC*. 2017;7:1-72.
42. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, et al. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(8):914-956.

43. Velleca A, Shullo MA, Dhital K, et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2023;42(5):e1-e141.
44. Wright M, Takeda K, Mauro C, et al. Dose-dependent association between amiodarone and severe primary graft dysfunction in orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:1226–1233.
45. Singh SSA, Dalzell JR, Berry C, et al. Primary graft dysfunction after heart transplantation: a thorn amongst the roses. *Heart Fail Rev*. 2019;24:805–820
46. Truby LK, Farr MA, Garan AR, et al. Impact of bridge to transplantation with continuous-flow left ventricular assist devices on posttransplantation mortality. *Circulation*. 2019;140:459–469.
47. Park WJ, Oh JG. SERCA2a: a prime target for modulation of cardiac contractility during heart failure. *BMB Rep*. 2013;46:237–243.
48. Stüdeli R, Jung S, Mohacsi P, et al. Diastolic dysfunction in human cardiac allografts is related with reduced SERCA2a gene expression. *Am J Transplant*. 2006;6:775–782.
49. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 793–798.
50. Tarazón E, Pérez-Carrillo L, Portolés M, et al. Electron Microscopy Reveals Evidence of Perinuclear Clustering of Mitochondria in Cardiac Biopsy-Proven Allograft Rejection. *J Pers Med*. 2022;12(2):296.
51. He Y, Yang Z, Zhao CS, et al. T-cell receptor (TCR) signaling promotes the assembly of RanBP2/RanGAP1-SUMO1/Ubc9 nuclear

- pore subcomplex via PKC mediated phosphorylation of RanGAP1. *eLife*. 2021;10:e67123.
52. Vorpahl M, Schönhofer-Merl S, Michaelis C, et al. The Ran GTPase-activating protein (RanGAP1) is critically involved in smooth muscle cell differentiation, proliferation and migration following vascular injury: Implications for neointima formation and restenosis. *PLoS ONE*. 2014;9: e101519.
53. Stoica SC, Cafferty F, Pauriah M, et al. The cumulative effect of acute rejection on development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25:420–425.

10 ANEXOS

COMPENDIO DE TRABAJOS PUBLICADOS

La tesis con título “**Estudio de las moléculas implicadas en el tráfico celular. Papel en la evolución clínica de pacientes sometidos a trasplante cardiaco**” corresponde a un compendio de trabajos previamente publicados. A continuación, se detalla el nombre y afiliación de cada uno de los autores, la referencia completa de la revista o editorial y el DOI de cada uno de ellos.

10.1 Publicaciones originales que conforman la Tesis Doctoral

10.1.1 Anexo 1

10.1.1.1 Artículo 1: Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation

Lozano-Edo S, Sánchez-Lázaro I, Portolés M, et al. Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation. *Transplantation*. 2022;106(4):887-893.

doi:10.1097/TP.0000000000003798

- **AUTORES (P.O. DE FIRMA):**
Silvia Lozano-Edo, MD,^{1,2*} Ignacio Sánchez-Lázaro, MD, PhD,^{1,2,3} Manuel Portolés, PhD,^{2,3} Esther Roselló-Lletí, PhD,^{2,3} Estefania Tarazón, PhD,^{2,3} Miguel Angel Arnau-Vives, MD, PhD,^{1,2} Meryem Ezzitouny, MD,^{1,2} Raquel Lopez-Vilella, MD,^{1,2} Luis Almenar-Bonet, MD, PhD,^{1,2,3} and Luis Martínez-Dolz, MD, PhD^{1,2,3}
- **TITULO: Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation.**
- **REFERENCIA:** DOI: 10.1097/TP.0000000000003798. VOL.106, ISSUE 4, PP. 887-893. ISSN: 0041-1337
- **REVISTA:** Transplantation
- **EDITORIAL:** Wolters Kluwer
- **AFILIACIONES:**
 - 1 Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, University and Polytechnic La Fe Hospital, Valencia, Spain.
 - 2 Myocardial Dysfunction and Cardiac Transplantation Unit, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain.
 - 3 Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P (CIBERCV), Madrid, Spain.
- *E-MAIL: slozanoedo@gmail.com (autora de correspondencia)
- Fondos: Instituto de Salud Carlos III [PI16/01627, PI17/01925, PI17/01232, CP18/00145], “Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P.” (CIBERCV, under Grant CB16/11/00261), y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- **LUGAR DE PUBLICACIÓN:** Philadelphia.

- FECHA DE PUBLICACIÓN: recibido el 15 de enero del 2021, aceptado el 22 de marzo del 2021, publicado online abril de 2021, publicado en número de revista abril del 2022.
- FACTOR DE IMPACTO: PUBLICADO (JCR-2021): 5,385.
- POSICIÓN, rank by Journal Impact Factor:
 - 6/24; JCR-2021; 1º CUARTIL; percentil 77,08%, Transplantation.
 - 67/161; JCR-2021; 2º CUARTIL; percentil 58,7%, Immunology.
 - 24/211; JCR-2021; 1º CUARTIL; percentil 88,86%, Surgery.
- POSICIÓN, rank by Journal Citation Indicator:
 - 5/30; JCR-2021; 1º CUARTIL; percentil 85%, Transplantation.
 - 32/177; JCR-2021; 1º CUARTIL; percentil 82,2%, Immunology.
 - 34/279; JCR-2021; 1º CUARTIL; percentil 87,99, Surgery.

*REVISIÓN POR AL MENOS DOS EXPERTOS INDEPENDIENTES.

EDITORIAL:

Baran DA, Copeland H. Unraveling the Causes of Primary Graft Dysfunction. *Transplantation*. 2022;106(4):707-708.

Doi:10.1097/TP.0000000000003799

TRANSPLANTATION

2021 JOURNAL IMPACT FACTOR

5.385

[View calculation](#)

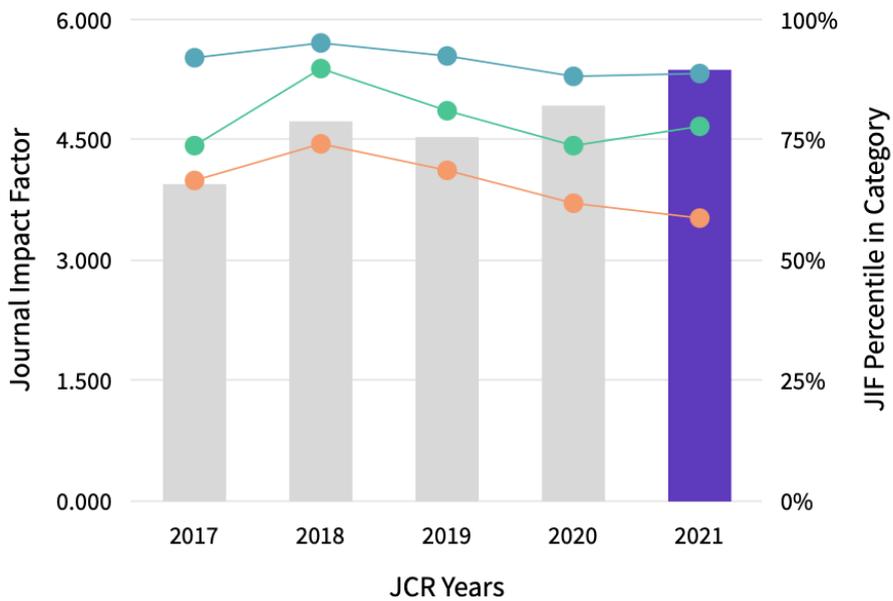
JOURNAL IMPACT FACTOR WITHOUT SELF CITATIONS

4.828

[View calculation](#)

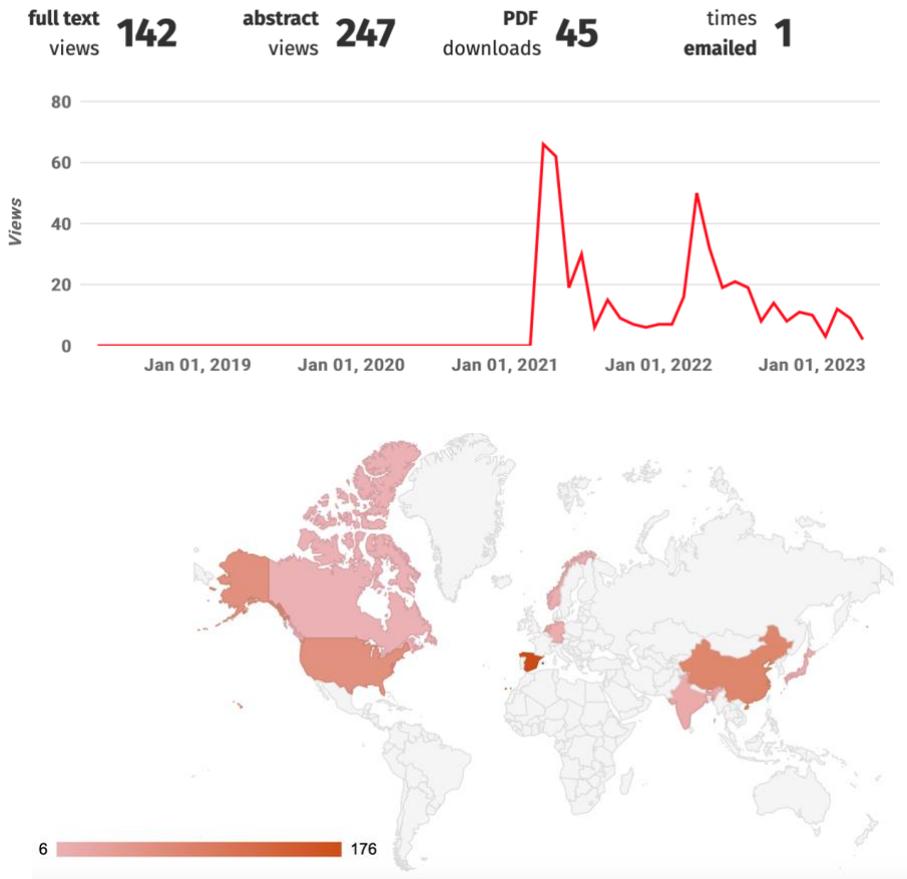
Journal Impact Factor Trend 2021

[Export](#)



- Journal Impact Factor
- SURGERY - SCIE
- IMMUNOLOGY - SCIE
- TRANSPLANTATION - SCIE

Desde su publicación online en abril del 2021 (publicación en número de revista abril del 2022) hasta al momento actual el artículo ha sido citado en cuatro ocasiones.





Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation

Silvia Lozano-Edo, MD,^{1,2} Ignacio Sánchez-Lázaro, MD, PhD,^{1,2,3} Manuel Portolés, PhD,^{2,3} Esther Roselló-Lletí, PhD,^{2,3} Estefania Tarazón, PhD,^{2,3} Miguel Angel Arnau-Vives, MD, PhD,^{1,2} Meryem Ezzitouny, MD,^{1,2} Raquel Lopez-Vilella, MD,^{1,2} Luis Almenar-Bonet, MD, PhD,^{1,2,3} and Luis Martínez-Dolz, MD, PhD^{1,2,3}

Background. Noninvasive detection of primary graft dysfunction (PGD) remains a major challenge. SERCA2a plays an important role in cardiac homeostasis and its dysregulation has been associated with ventricular dysfunction and rejection. This study aimed to determine the potential utility of plasma levels of SERCA2a as a biomarker of PGD. **Methods.** One hundred thirty-five plasma samples were collected from adult recipients 2–6 hours before heart transplantation (HT). Plasma concentrations of SERCA2a were determined using a specific sandwich ELISA. Variables related to the recipient, the donor, and the perioperative were collected to determine a multivariate predictive model of PGD. **Results.** Levels of SERCA2a were decreased in patients who developed PGD (median 0.430 ng/mL [interquartile range, 0.260–0.945] versus 0.830 ng/mL [interquartile range, 0.582–1.052]; $P=0.001$). Receiver operating characteristic curve analysis revealed that SERCA2a discriminated between patients with and without PGD (AUC=0.682; $P=0.001$), and a cutoff point ≥ 0.60 ng/mL was a protective independent predictor of PGD (odds ratio 0.215 [$P=0.004$]). Three independent predictors of PGD in this study were reduced levels of pre-HT SERCA2a, increased bilirubin levels, and short-term mechanical circulatory support bridge to transplantation. The analysis of the receiver operating characteristic curve of the model obtained a significant AUC 0.788, $P=0.0001$. **Conclusions.** Our findings suggest that assessment of SERCA2a plasma levels may improve risk prediction for the occurrence of PGD and could be considered as a novel noninvasive biomarker in patients undergoing HT.

(*Transplantation* 2022;106: 887–893).

Received 15 January 2021. Revision received 18 March 2021.

Accepted 22 March 2021.

¹Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, University and Polytechnic La Fe Hospital, Valencia, Spain.

²Myocardial Dysfunction and Cardiac Transplantation Unit, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain.

³Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P. (CIBERCV), Madrid, Spain.

This work was supported by the National Institute of Health "Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III" [P116/01627, P117/01925, P117/01232, CP18/00145], "Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P." (CIBERCV, under Grant CB16/11/00261), and the European Regional Development Fund (FEDER).

The authors declare no conflicts of interest.

The participation of the authors in the article is as follows. L.M.-D. coordinated this article. S.L.-E., M.P., E.R.-L., and E.T. participated in the design and performance of the research. M.E., R.L.-V., and L.A. participated in the acquisition and interpretation of data. M.A.A. data analysis. S.L.-E., M.A.A., and I.S.-L. participated in the writing of the article.

Correspondence: Silvia Lozano Edo, MD, Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, University and Polytechnic La Fe Hospital, Av/Fernando Abril Martorell, 106, 46026 Valencia, Spain. (slozanoedo@gmail.com).

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/20/1064-887

DOI: 10.1097/TP.00000000000003798

INTRODUCTION

Primary graft dysfunction (PGD) is a life-threatening complication and is the leading cause of mortality in the first 30 days after heart transplantation (HT).¹ PGD is defined as the development of left and right ventricular systolic dysfunction in the first 24 hours after HT, that cannot be attributed to identifiable causes such as acute rejection, pulmonary hypertension, or surgical complications.² A consensus statement, published by the International Society for Heart and Lung Transplantation in 2014 established a uniform definition of PGD and described a severity scale.² Mild and moderate cases are characterized by abnormal hemodynamics or echocardiography and distinguished from one another based on the use of low- versus high-dose inotropes. Patients with severe PGD require mechanical circulatory support (MCS) such as ventricular assist device or extracorporeal membrane oxygenation (ECMO).² The reported prevalence of PGD ranges from 2.5% to 31%. This wide variability may reflect the different treatment approaches across centers that use different thresholds for various high-dose inotropes and MCS.^{3–7}

The cause of PGD is multifactorial and includes donor, recipient, and perioperative risk factors. Given the importance of this phenomenon and its relatively high incidence

around the world, various models have been used to predict this event, including the RADIAL score⁴ and, more recently, the PREDICTA score,⁸ in addition to other noninvasive alternatives.⁹ Nevertheless, it is imperative to search for newer, more accurate methods to predict PGD. In this context, our group has focused on the study of new biomarkers that can predict this event.

Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase (SERCA2a) is responsible for the calcium recharge of the sarcoplasmic reticulum during diastole and plays an important role in the modulation of heart failure, directly contributing to the deterioration of heart contraction/relaxation.¹⁰⁻¹² Reduction of the expression of this molecule has also been observed in patients who develop heart rejection.¹³ This molecule is also a therapeutic target in gene therapy for heart failure.¹⁴⁻¹⁶ For these reasons, given that PGD is characterized by ventricular dysfunction, we believe that further investigation of this molecule is appropriate in this particular patient population. The primary objective of the present study, therefore, was to determine the potential utility of SERCA2a as a new biomarker for predicting the development of PGD.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

Two to six hours before HT, venous blood samples for the analysis of SERCA2a were collected consecutively from 135 adult patients from a single center between 2009 and 2019. Only 1 blood sample was available from each patient. Patients who provided informed consent for the extraction of blood samples in the hours before HT for the analysis of SERCA2a levels were included. During these years, clinical, hemodynamic, analytic, echocardiographic, intraoperative, and immediate posttransplant data were recorded. These data were prospectively compiled in the institutional database.

Patients undergoing cardiopulmonary transplantation and heart retransplants were excluded. Donor characteristics were obtained from the National Transplant Registry, and all organs were obtained from hospitals of the Spanish National Health System. PGD was defined by the onset of right and left dysfunction according to the criteria established by the International Society for Heart and Lung Transplantation.²

Measurement of Circulating SERCA2a

Venous blood samples (3 mL) were obtained by venipuncture and glass collection tubes with 15% EDTA anticoagulant (BD Vacutainer). Samples were subsequently centrifuged at 1300 rpm for 10 minutes at 4°C, aliquoted into 1 mL, screen-printed, plastic cryotubes, and stored in the freezers of the Biobank of La Fe University Hospital (Valencia, Spain) at -80°C until further analysis. The same assay was performed on the full set of samples at the same time.

Plasma concentrations of SERCA2a were determined using a specific sandwich ELISA (SEG374Hu, Cloud-Clone Corp., Katy, TX). The SERCA2a test has a detection limit of 0.115 ng/mL. The intra-assay and interassay coefficients of variation were 10% and 12%, respectively.

No significant crossreactivity or interference between SERCA2a and its analogs were observed. The tests were quantified at 450 nm using a dual-wavelength microplate reader (Sunrise, TECAN, Port Melbourne, Austria) and Magellan version 2.5 software (TECAN, Grödig, Austria).

Ethics Statement

This study was approved by the Ethics Committee (Drug Research Ethics Committee of La Fe University Hospital of Valencia, Valencia, Spain) and was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.¹⁷ Before blood collection, informed written consent was obtained from each patient. When a patient's signature collection was not possible due to hemodynamic deterioration, this task was assigned to his/her legal representative and subsequently endorsed by the patient.

Statistical Methods

Baseline characteristics were screened for association with PGD. Descriptive analyses were performed for all reference variables, and results are expressed as mean and SD for continuous variables and number and percentage for categorical variables. Results for each variable were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov method. For variables that were nonnormally distributed, the results are expressed as median and interquartile range (IQR). Depending on each case, differences between the groups were analyzed using the Student's *t*-test for independent samples and the chi-squared test. Continuous variables not following a normal distribution were compared using the Mann-Whitney *U* test. The sensitivity and specificity of plasma SERCA2a levels for the presence of PGD were assessed by plotting receiver operating characteristic (ROC) curves. The relevant variables that presented in the univariate analysis a nominal significance level $P \leq 0.10$ were included in the multivariate logistic regression model (Forward Step Likelihood ratio) to evaluate the independent association and the statistical significance of each variable. Variables associated with PGD at a $P \leq 0.05$ level of significance were retained in the final model and were considered to be statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS version 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY) for MAC (Apple Inc, Cupertino, CA).

RESULTS

Study Population

A total of 135 HT recipients were included in the analysis. The mean (\pm SD) age of the patients was 53 ± 11 years and males represented 80% of the cohort. The mean creatinine and median bilirubin levels pre-HT were 1.1 ± 0.4 mg/dL and 1.1 mg/dL (IQR, 0.6–1.9), respectively. Among the cohort, the mean pulmonary artery pressure was 36 mm Hg. Short-term MCS bridge to transplantation (BTT) (ECMO or Levitronix CentriMag) was necessary in 27% of the patients (Table 1). Only temporary MCS (t-MCS) was implanted as a bridge to transplantation in our study cohort, and none with long-term MCS. All patients who required ECMO, a peripheral vascular access was performed.

TABLE 1.
Recipient characteristics

Variables ^a	Total (n=135)	No PGD (n=98)	PGD (n=37)	P
Clinics and demographics				
Age (y)	53.3±11	52.7±10.9	54.6±11.3	0.370
Male gender, n (%)	108 (80)	74 (75.5)	34 (91.9)	0.034
Diabetes, n (%)	18 (13.3)	16 (16.7)	2 (5.4)	0.089
Hypertension, n (%)	41 (30.4)	28 (30.1)	13 (38.2)	0.386
Dyslipidemia, n (%)	55 (40.7)	37 (38.1)	18 (50)	0.217
BMI (kg/m ²)	25.5±3.7	25.1±3.6	26.6±3.8	0.036
Cardiomyopathy diagnosis, n (%) ischemic	68 (50.4)	45 (45.9)	23 (62.2)	0.227
Dilated cardiomyopathy	55 (40.7)	43 (43.9)	12 (32.4)	
Other/restrictive/hypertrophic/valvular	12 (8.9)	10 (10.2)	2 (5.4)	
Previous cardiac surgery, n (%)	28 (20.7)	19 (19.4)	9 (24.3)	0.528
Laboratory				
Creatinine (mg/dL)	1.1±0.4	1.1±0.4	1.1±0.4	0.995
Total bilirubin (mg/dL)	1.1 [0.6–1.9]	1.0 [0.5–1.7]	1.8 [0.8–2.9]	0.007
MELD-XI ^b	10.1±6.6	10.0±5.9	10.3±8.2	0.84
SERCA2a (ng/mL)	0.76 [0.5–1.0]	0.83 [0.6–1.1]	0.43 [0.3–0.9]	0.001
Echocardiographic				
LVEF (%)	21.0±12.8	21.8±13.3	18.9±11.4	0.234
Severe RV dysfunction	35 (30.7)	26 (31.3)	9 (29.0)	0.97
Severe mitral regurgitation	16 (15.5)	9 (12.9)	7 (21.2)	0.75
Hemodynamics				
sPAP(mm Hg)	52.9±18.5	50.1±16.6	61.5±21.5	0.009
dPAP (mm Hg)	25.3±10.2	23.7±8.3	29.9±13.5	0.048
mPAP(mm Hg)	35.8±11.6	33.7±10.1	42.1±14.0	0.002
PCP (mm Hg)	26.1±9.8	24.7±8.6	30.3±11.9	0.016
PVR (WU)	2.7±1.9	2.5±1.7	3.5±2.1	0.033
Therapies				
Amiodarone, n (%)	40 (29.6)	28 (28.6)	12 (32.4)	0.661
Beta-blockers	81 (62.8)	63 (66.3)	18 (52.9)	0.16
Inotropes, n (%)	46 (34.1)	30 (30.6)	16 (44.4)	0.135
t-MCS BTT n (%)	37 (27.4)	21 (21.4)	16 (43.2)	0.011
Type of MCS BTT, n (%)				0.614
ECMO		16 (76.2)	11 (68.8)	
Levitronix		5 (23.8)	5 (31.3)	

^aCategorical data are presented as number (%), continuous data as mean (SD) and the only continuous variable, total bilirubin with an abnormal distribution as median (interquartile range). The P value is obtained by comparing no PGD with PGD.

^bThe MELD-XI score was defined as follows: MELD-XI = 5.11 × ln (serum bilirubin) + 11.76 × ln (serum creatinine) + 9.44.

BMI, body mass index; BTT, bridge to transplantation; dPAP, diastolic pulmonary artery pressure; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; LVEF, left ventricular ejection fraction; MELD-XI, model for end-stage liver disease XI; RV, right ventricular; t-MCS, temporary mechanical circulatory support; mPAP, mean pulmonary artery pressure; PCP, pulmonary capillary pressure; PGD, primary graft dysfunction; PVR (WU), pulmonary vascular resistances (Wood Unit); sPAP, systolic pulmonary artery pressure.

Variables Associated With PGD

PGD occurred in 37 patients (27%), of which 19 (14% of the total) required MCS with ECMO (severe PGD). Of the 37 patients with PGD, 27 (73%) showed left or biventricular involvement, whereas in 10 patients (27%), an isolated right ventricular failure was found. As shown in Table 1, both groups of patients with and without PGD were similar in terms of age, diabetes, hypertension, dyslipidemia, cause of heart failure, creatinine levels before HT, previous cardiac surgery, pre-HT right ventricular function, previous treatment with amiodarone, and need for inotropic treatment until HT. However, there was a higher proportion of men in the PGD group (31% of men presented PGD versus 11% of women; $P=0.034$). A higher BMI and higher pre-HT total bilirubin level were also observed in the PGD group (25 ± 4 versus 27 ± 4 kg/

m^2 , $P=0.036$; median bilirubin 1.0 mg/dL [IQR, 0.5–1.7] versus 1.8 mg/dL [IQR 0.8–2.9], $P=0.007$, respectively). Bilirubin levels were higher in patients who presented pre-HT right ventricular systolic dysfunction compared with those with normal function (1.39 mg/dL [0.7–2.05] versus 0.6 mg/dL [0.5–1.4]; $P=0.022$). However, there were no statistically significant differences in bilirubin levels depending on the degree of right ventricular dysfunction. The need for MCS before HT was associated with a higher probability of PGD (43% versus 21%; $P=0.01$). In patients who required Levitronix Centrimag BTT, the meantime of support was 18.4 days ± 13.17 and 11.11 days ± 7.88 in the group of patients who required peripheral ECMO BTT. A comparison of donor characteristics revealed no clinically significant differences in age, gender, BMI, cerebral cause of death, and presence of mild cardiac

dysfunction between the groups (Table 2). There were no clinically significant differences in perioperative characteristics, including ischemic time, extracorporeal circulation time, gender mismatch, and undersized by predicted heart mass match ($\geq 20\%$ difference) between the groups (Table 3).

Significantly higher 30-d mortality was observed in the PGD group (35% [13/37] versus 11% [11/98]; $P=0.001$); moreover, the difference was significantly more striking when considering PGD with requirements for MCS (No PGD 11% [11/98]; nonsevere PGD 11% [2/18]; severe PGD 57% [11/19]; $P=0.0001$).

SERCA2a Analysis in PGD

As shown in Figure 1A, SERCA2a plasma levels determined immediately before HT were significantly lower in patients who subsequently experienced PGD compared with those who did not exhibit this complication after HT (median 0.430 ng/mL [IQR, 0.260–0.945] versus 0.830 ng/mL [IQR, 0.582–1.052]; $P=0.001$). When we compared the 3 groups (patients without PGD, patients with nonsevere PGD and patients with severe PGD), we found significant differences in plasma SERCA2a levels between patients without PGD (median, 0.830 ng/mL [IQR, 0.582–1.052]) in regard to nonsevere PGD (0.475 ng/mL [IQR, 0.332–0.997], $P=0.004$) and also with severe PGD (0.350 ng/mL [0.150–0.860], $P=0.004$) (Figure 1B). However, when patients with nonsevere PGD and severe PGD were compared, there were no statistically significant differences in SERCA2a levels between both groups.

ROC curve analysis was performed to analyze the capacity of SERCA2a to detect PGD and revealed a significant area under the ROC curve (AUC, 0.682 ± 0.057 [95% confidence interval (CI), 0.571–0.794]; $P=0.001$), with an optimum cutoff point of 0.60 ng/mL (sensitivity 60%; specificity 75%; positive predictive value, 47%; and negative predictive value, 84%). It was observed that in patients with SERCA2a < 0.60 ng/mL, 47% presented PGD, while in those with SERCA2a ≥ 0.60 ng/mL, the incidence was only 16%.

Multivariate logistic regression was also performed to determine whether circulating plasma levels of SERCA2a were independent predictors of PGD. Univariate predictors with $P < 0.10$ were included in the model (BMI, gender, pre-HT levels of SERCA2a, pre-HT bilirubin levels, and

TABLE 3.
Perioperative characteristics

Variables ^a	Total (n=135)	No PGD (n=98)	PGD (n=37)	P
Ischemic time (min)	157.7 ± 63.4	152.7 ± 61.3	171.0 ± 67.6	0.135
Extracorporeal circulation time (min)	138.6 ± 67.9	134.9 ± 69.2	148.2 ± 64.3	0.327
Gender mismatch n (%) ^b	43 (31.2)	31 (31.6)	12 (32.4)	0.929
Undersized by PHM Match ($\geq 20\%$ difference)	20 (14.8)	15 (15.3)	5 (13.5)	0.67

^aCategorical data are presented as number (%) and continuous data as mean (SD). The *P* value is obtained by comparing no PGD with PGD.

^bRefers to male recipient with female donor.

PGD, primary graft dysfunction; PHM, Predicted heart mass.

the need for t-MCS BTT. When the multivariable model was applied, a SERCA2a value ≥ 0.60 ng/mL (optimum cutoff point obtained from the ROC curve) was a protective independent predictor of PGD (OR, 0.215; 95% CI, 0.075–0.614; $P=0.004$). Similarly, pre-HT bilirubin levels (OR, 1.849; 95% CI, 1.152–2.969; $P=0.011$) and the need for t-MCS BTT (ventricular assist device or ECMO) (OR, 3.762; 95% CI, 1.280–11.052; $P=0.016$) were multivariate predictors of PGD (Table 4). ROC curve analysis with the combination of the 3 independent variables obtained in the logistic regression was performed, obtaining a significant AUC (0.788 \pm 0.054 [95% CI, 0.683–0.893]; $P=0.0001$).

Comparison of the 3 independent predictive factors for PGD—SERCA2a, t-MCS BTT and pre-HT bilirubin—revealed that SERCA2a levels did not correlate with t-MCS BTT. Thirty percent of patients with SERCA2a levels < 0.60 ng/mL, and 26% of those with SERCA2a ≥ 0.60 ng/mL required t-MCS BTT ($P=0.652$). Therefore, t-MCS BTT does not act as a confounding variable between SERCA2a and PGD. There was no correlation between SERCA2a levels and the time that patients required support with t-MCS ($P=0.34$, Pearson's $R=0.03$). Circulating SERCA2a levels were also unrelated to bilirubin levels before HT (SERCA2a < 0.60 ng/mL versus ≥ 0.60 ng/mL: 1.065 mg/dL [IQR, 0.542–1.870] versus 1.160 mg/dL [IQR, 0.565–1.917]; $P=0.873$). However, patients who required t-MCS BTT had higher bilirubin levels (1.655 mg/dL [IQR, 0.847–2.465] versus 1.000 mg/dL [IQR, 0.500–1.785]; $P=0.015$). When 2 independent predictor variables of PGD that were not associated to one another were combined (SERCA2a < 0.60 ng/mL and t-MCS BTT), the presence of both were strongly associated with the appearance of PGD (71%) compared with when none of them were present (14%). The presence of one of them was associated with an intermediate frequency of PGD (26%–36%) (Figure 2).

DISCUSSION

The incidence of PGD and severe PGD requiring MCS was 27% and 14%, respectively, which were in the range reported in the most recent literature.^{5,7} It is known that reduced SERCA2a expression and activity are causes of impaired cardiac function.^{10–12,14–16} Recent studies have shown the importance of the deterioration of calcium homeostasis not only in heart failure with reduced ejection

TABLE 2.

Donor characteristics

Variables ^a	Total (n=135)	No PGD (n=98)	PGD (n=37)	P
Age (y)	44.9 ± 10.8	44.7 ± 11.2	45.3 ± 9.8	0.775
Male gender, n (%)	75 (54.3%)	52 (53.1%)	23 (62.2%)	0.343
BMI (kg/m ²)	26.1 ± 4.6	25.9 ± 4.7	26.5 ± 4.5	0.467
Cerebral cause of death n (%)	97 (69.8)	71 (72.4)	26 (70.3)	0.802
Mild cardiac dysfunction n (%) ^b	10 (7.4)	6 (6.1)	4 (10.8)	0.510

^aCategorical data are presented as number (%) and continuous data as mean (SD). The *P* value is obtained by comparing no PGD with PGD.

^bMild cardiac dysfunction was defined as the presence of a left ventricular ejection fraction between 45% and 54%.

BMI, body mass index; PGD, primary graft dysfunction.

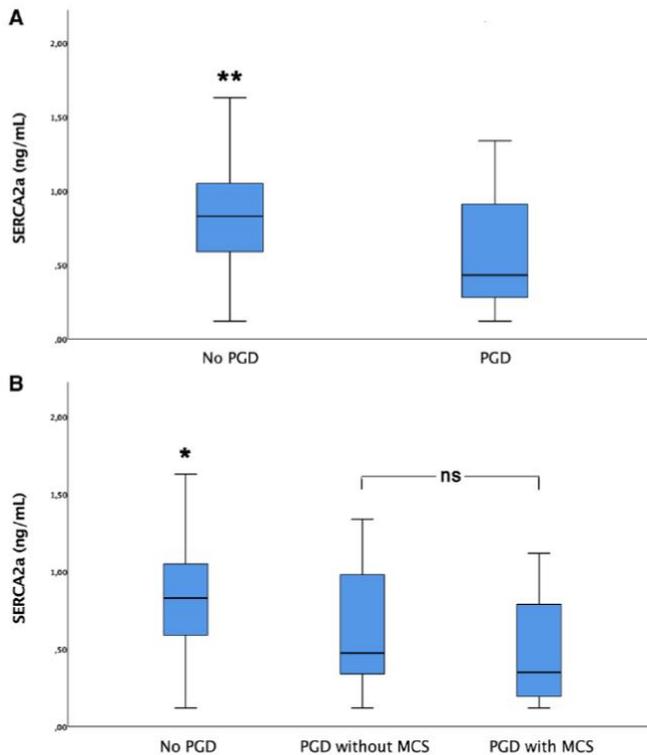


FIGURE 1. Plasma levels of SERCA2a in patients without and with PGD. A, Comparison of patients without PGD and all grades of PGD. B, Comparison of patients without PGD and those with PGD without the need for MCS; and those with severe PGD who required MCS; and comparison of patients with nonsevere PGD and severe PGD. The middle line in the boxplots represents the median, the lower box bounds the first quartile, the upper box bounds the third quartile, and the whiskers indicate the 95% confidence interval for the mean. ** $P=0.001$; * $P=0.004$. MCS, mechanical circulatory support; ns, no statistically significant differences; PGD, primary graft dysfunction; SERCA2a, sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase.

fraction but also in heart failure with preserved ejection fraction, in relation to a greater severity of diastolic dysfunction.¹⁸ Despite the confirmed relevance of SERCA2a in heart failure and HT rejection,¹⁰⁻¹³ the biologic role of SERCA2a in the physiopathology of PGD remains

unexplored. To our knowledge, it has never been analyzed as a predictive biomarker of PGD. In our study, SERCA2a plasma levels determined 2–6 hours before HT were significantly lower in patients who subsequently developed PGD. The ability of SERCA2a to predict PGD, with an optimum cutoff point ≥ 0.60 ng/mL, was a protective independent predictor of PGD.

We observed a higher BMI in patients with PGD. Although the influence of overweight in the development of PGD is controversial, a previous study has linked weight gain as a possible unfavorable factor.¹⁹ We observed higher bilirubin levels in patients who developed PGD. Liver damage with elevated bilirubin levels has been shown to be an independent predictor of PGD.²⁰ High creatinine levels are also associated with an unfavorable evolution; however, the use of t-MCS BTT improved tissue perfusion reflected by improving renal function.²¹ In our study, patients who developed PGD exhibited higher mean pulmonary artery pressure, and the presence of high

TABLE 4.

Variables predictive of primary graft failure by multivariate logistic regression model

Variable	OR (95% CI)	P
SERCA2a (cutoff point of 0.60 ng/mL)	0.215 (0.075-0.614)	0.004
Bilirubin	1.849 (1.152-2.969)	0.011
MCS BTT	3.762 (1.280-11.052)	0.016

Multivariable logistic regression analysis, including the OR assigned to each variable, corresponding 95% CI, and P value. BTT, bridge to transplantation; CI, confidence interval; MCS, mechanical circulatory support; OR, odds ratio; PGD, primary graft dysfunction.

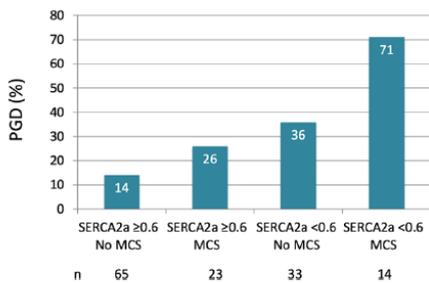


FIGURE 2. PGD capacity prediction after HT with the combination of MCS BTT and SERCA2a <0.60 ng/mL. Event rates increased significantly to combine the need for MCS BTT and the levels of SERCA2a <0.60 ng/mL ($P=0.0001$ [chi-squared]). BTT, bridge to transplantation; HT, heart transplant; MCS, mechanical circulatory support; PGD, primary graft dysfunction.

pulmonary vascular resistance has classically been associated with an increased risk for cardiac graft dysfunction after transplantation.^{2,6}

Recipient, donor, and periprocedural factors have demonstrated associations with PGD in literature reports. Some factors that have been suggested include donor age, recipient age, pretransplant diabetes, longer ischemic time,⁶ preoperative recipient amiodarone or beta-blockers therapy,^{22,23} and donor-to-recipient size mismatching²⁴; however, none of these had predictive value in our study. Multiple studies have identified an association between t-MCS BTT and PGD.^{6,23,25} We observed PGD in 43% of the patients who required t-MCS BTT compared with 21% in those who did not require it (OR, 3.762; $P=0.016$).

In our study, risk factors independently associated with PGD were the need for t-MCS BTT, pre-HT bilirubin, and pre-HT SERCA2a plasma levels. Gender and BMI did not reach statistical significance as independent predictors in this model despite an increase in the percentage of men in the PGD group and a higher BMI in the PGD group. We also observed how the need for t-MCS BTT was associated with an increase in pre-HT bilirubin levels, this may be due to the fact that they were sicker patients, a situation that is associated with liver failure.²⁰ However, SERCA2a levels were unrelated to the presence of MCS BTT or to pre-HT bilirubin levels, suggesting that SERCA2a levels were not associated with the presence of a sicker patient or with multiple organ dysfunction. Thus, in our study, the combination of these 2 variables (SERCA2a <0.6 ng/mL and t-MCS BTT) identified an incidence of PGD above 70% of cases. We also found a 2-fold greater PGD incidence in patients with SERCA2a <0.6 ng/mL overall, regardless of the prior need of t-MCS BTT.

Until now, some studies are being performed to better understand the molecular mechanisms of PGD, thus leading to the possibility of identifying new biomarkers related to it. Consistent with this, several biomarkers have been proposed as potential predictors of PGD, although to date, none has been used in routine care.²⁶ Elevated levels of cardiac troponin in donor serum have not demonstrated an association with PGD.²⁷ NT-proBNP in

donor serum could predict poor cardiac performance in the recipient.²⁸ Actually, some studies have highlighted the role of serum exosome proteomic analysis in the recipient as a potential biomarkers for PGD.²⁹ Although basic research studies in this stage are limited, the ability to identify dysregulations in myocardial biology that can lead to possible treatments to reverse, prevent, or predict PGD is important because despite therapeutic advances in recent years, the mortality associated with PGD remains unacceptably high. We observed in our study a 30-d mortality rate of 35% in the PGD cohort (58% with MCS). These results are similar to those reported in the recent literature,⁶ which described an in-hospital mortality rate of 68% for severe PGD. Therefore, our results indicate that SERCA2a could have potential clinical utility as a noninvasive biomarker of PGD, suggesting that the dysregulation of SERCA2a pre-HT may be related to a greater degree of severity of the disease, not always identified by conventional parameters (analytic, echocardiographic, and hemodynamic), as well as systemic factors in the recipient that can create a hostile environment, altering the donor heart function, and this factor could be associated with a higher incidence of PGD.

STUDY LIMITATIONS

The results of the present investigation must be interpreted in the context of some limitations. First, our study reflects the findings of a single center (University and Polytechnic La Fe Hospital, Valencia, Spain), including a relatively limited number of patients. Second, the potential variability in plasma levels of SERCA2a must also be considered based on other parameters not analyzed, such as pharmacological treatment and time of evolution of heart disease. This was a preliminary study that did not investigated mechanistic insights into the relationship between SERCA2a dysregulation and myocardial dysfunction. However, this was a prospective study, and it reflected the experience of a single center, which confers homogeneity regarding the diagnostic and therapeutic strategies for these patients. To our knowledge, the present study was the first to identify the potential utility of SERCA2a in this clinical setting. Nevertheless, these findings must be validated in broader prospective cohorts.

CONCLUSION

In our study, lower pre-HT SERCA2a plasma levels were significantly associated with PGD. This variable was shown to be an independent predictor of PGD and assessing its concentrations would increase the predictive capacity for PGD in combination with other variables such as total bilirubin and short-term MCS BTT. This combination could be an effective tool for predicting PGD, main cause of early mortality after HT, helping decision-making and individualized management of these patients. For these reasons, SERCA2a could be used as a noninvasive biomarker of PGD if these preliminary findings are validated in larger prospective cohorts.

ACKNOWLEDGMENTS

Biobank of La Fe University Hospital (Valencia, Spain).

REFERENCES

- Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report-2015; Focus Theme: early graft failure. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34:1244–1254.
- Kobashigawa J, Zuckermann A, Macdonald P, et al; Consensus Conference participants. Report from a consensus conference on primary graft dysfunction after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2014;33:327–340.
- Russo MJ, Imbarne A, Hong KN, et al. Factors associated with primary graft failure after heart transplantation. *Transplantation.* 2010;90:444–450.
- Segovia J, Cosio MD, Barceló JM, et al. RADIAL: a novel primary graft failure risk score in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30:644–651.
- Nicoara A, Ruffin D, Cooter M, et al. Primary graft dysfunction after heart transplantation: incidence, trends, and associated risk factors. *Am J Transplant.* 2018;18:1461–1470.
- Sabatino M, Vitale G, Manfredini V, et al. Clinical relevance of the International Society for Heart and Lung Transplantation consensus classification of primary graft dysfunction after heart transplantation: epidemiology, risk factors, and outcomes. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36:1217–1225.
- Squiers JJ, Saracino G, Chamogeorgakis T, et al. Application of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) criteria for primary graft dysfunction after cardiac transplantation: outcomes from a high-volume centre. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2017;51:263–270.
- Avtaar Singh SS, DAS DE S, Rushton S, et al. PREDICTA: a model to predict primary graft dysfunction after adult heart transplantation in the United Kingdom. *J Card Fail.* 2019;25:971–977.
- Agbor-Enoh S, Tuno I, De Vlaminc I, et al. Applying rigor and reproducibility standards to assay donor-derived cell-free DNA as a non-invasive method for detection of acute rejection and graft injury after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36:1004–1012.
- Eisner D, Caldwell J, Trafford A. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and heart failure 20 years later. *Circ Res.* 2013;113:958–961.
- Park WJ, Oh JG. SERCA2a: a prime target for modulation of cardiac contractility during heart failure. *BMB Rep.* 2013;46:237–243.
- Stüdeli R, Jung S, Mohacsí P, et al. Diastolic dysfunction in human cardiac allografts is related with reduced SERCA2a gene expression. *Am J Transplant.* 2006;6:775–782.
- Tarazón E, Ortega A, Gil-Cayuela C, et al. SERCA2a: a potential non-invasive biomarker of cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36:1322–1328.
- Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:793–798.
- Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, et al. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res.* 2014;114:101–108.
- Greenberg B, Butler J, Felker GM, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet.* 2016;387:1178–1186.
- Macrae DJ. The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) guidelines on ethics of clinical trials. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4:176–8, discussion 178.
- Frisk M, Le C, Shen X, et al. Etiology-dependent impairment of diastolic cardiomyocyte calcium homeostasis in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol.* 2021;77:405–419.
- Guisado Rasco A, Sobrino Márquez JM, Nevado Portero J, et al. Impact of overweight on survival and primary graft failure after heart transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42:3178–3180.
- Lebray P, Varnous S, Pascale A, et al. Predictive value of liver damage for severe early complications and survival after heart transplantation: a retrospective analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2018;42:416–426.
- Gupta S, Woldendorp K, Muthiah K, et al. Normalisation of haemodynamics in patients with end-stage heart failure with continuous-flow left ventricular assist device therapy. *Heart Lung Circ.* 2014;23:963–969.
- Wright M, Takeda K, Mauro C, et al. Dose-dependent association between amiodarone and severe primary graft dysfunction in orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36:1228–1233.
- Truby LK, Takeda K, Topkara VK, et al. Risk of severe primary graft dysfunction in patients bridged to heart transplantation with continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37:1433–1442.
- Gong TA, Joseph SM, Lima B, et al. Donor predicted heart mass as predictor of primary graft dysfunction. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37:826–835.
- Tea C. Primary graft failure is more common in patients bridged to heart transplant with LVAD: role of early peripheral ECMO. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37: S349.
- Singh SSA, Dalzell JR, Berry C, et al. Primary graft dysfunction after heart transplantation: a thorn amongst the roses. *Heart Fail Rev.* 2019;24:805–820.
- Madan S, Saeed O, Shin J, et al. Donor troponin and survival after cardiac transplantation: an analysis of the United Network of Organ Sharing Registry. *Circ Heart Fail.* 2016;9:e002909.
- Vorlat A, Conraads VM, Jorens PG, et al. Donor B-type natriuretic peptide predicts early cardiac performance after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2012;31:579–584.
- Fine B, Chen E, Lebreton G, et al. Pre-transplant serum exosome proteomics differentiates right and left ventricular primary graft dysfunction. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37:S24.

10.1.2 Anexo 2

10.1.2.1 Artículo 2: Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection.

Lozano-Edo S, Sánchez-Lázaro I, Almenar-Bonet L, et al. Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection. *Transplant*

Proc. 2021;53(9):2718-2720.

doi:10.1016/j.transproceed.2021.09.003

- **AUTORES (P.O. DE FIRMA):**
Silvia Lozano-Edo,^{1,2*} Ignacio Sanchez-Lazaro,^{1,2,3} Luis Almenar-Bonet,^{1,2,3} Manuel Portoles,^{2,3} Maryem Ezzitouny,^{1,2} Estefanía Tarazon,^{2,3} Esther Rosello-Lleti,^{2,3} Raquel Lopez-Vilella,^{1,2} Luis Martínez-Dolz^{1,2,3}
- **TÍTULO: Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection.**
- **REFERENCIA:** DOI: 10.1016/j.transproceed.2021.09.003. VOL.53, ISSUE 9, PP. 2718-2720. ISSN: 0041-1345.
- **REVISTA:** Transplantation Proceedings.
- **EDITORIAL:** Elsevier.
- **AFILIACIONES:**
 - 1 Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, University and Polytechnic La Fe Hospital, Valencia, Spain.
 - 2 Myocardial Dysfunction and Cardiac Transplantation Unit, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain.
 - 3 Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P (CIBERCV), Madrid, España.
- *E-MAIL: slozanoedo@gmail.com (autora de correspondencia)
- Fondos: Instituto de Salud Carlos III [PI16/01627, PI17/01925]; Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P. (CIBERCV) [CB16/11/00261] y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- **LUGAR DE PUBLICACIÓN:** New York.
- **FECHA DE PUBLICACIÓN:** publicado el 18 de octubre del 2021 (online), 23 de noviembre del 2021 (versión de registro).
- **FACTOR DE IMPACTO:** PUBLICADO JCR-2021: 1,014.
- **POSICIÓN, rank by Journal Impact Factor:**

- 23/24; JCR-2021; 4º CUARTIL; percentil 6,25%, Transplantation.
- 158/161; JCR-2021; 4º CUARTIL; percentil 2,17%, Immunology.
- 189/211; JCR-2021; 4º CUARTIL; percentil 10,66%, Surgery.
- POSICIÓN, rank by Journal Citation Indicator:
 - 25/30; JCR-2021; 4º CUARTIL; percentil 18,33%, Transplantation.
 - 160/177; JCR-2021; 4º CUARTIL; percentil 9,89%, Immunology.
 - 225/279; JCR-2021; 4º CUARTIL; percentil 19,53, Surgery.

*REVISIÓN POR AL MENOS DOS EXPERTOS INDEPENDIENTES.

*Una vez citado.

*Visualizaciones no disponibles.

TRANSPLANTATION PROCEEDINGS

2021 JOURNAL IMPACT FACTOR

1.014

[View calculation](#)

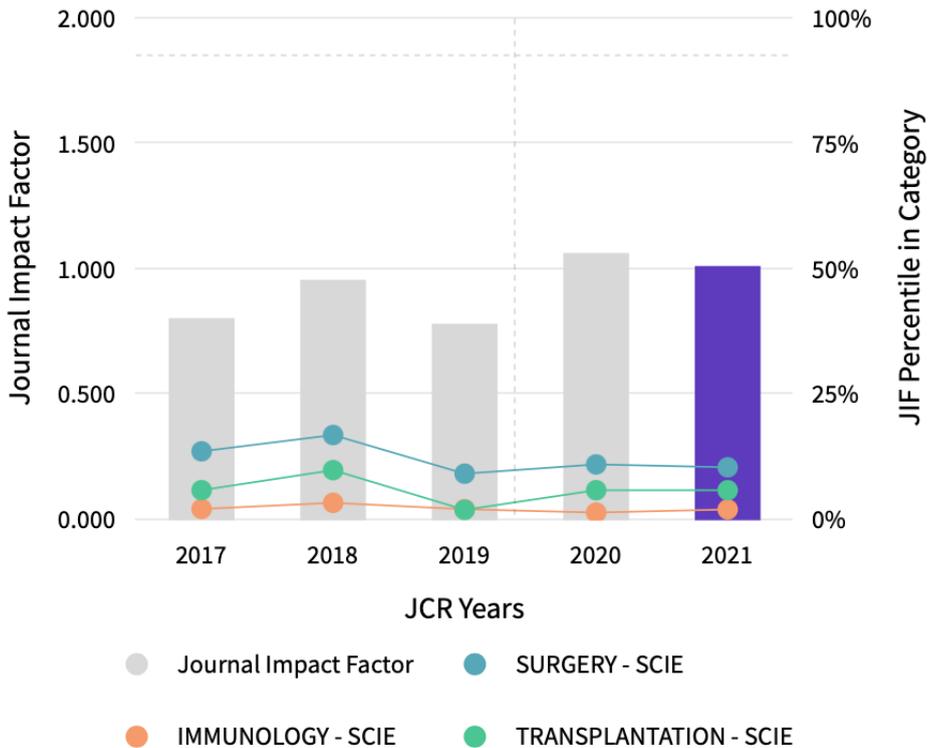
JOURNAL IMPACT FACTOR WITHOUT SELF CITATIONS

0.944

[View calculation](#)

Journal Impact Factor Trend 2021

[↓ Expor](#)





Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection

Silvia Lozano-Edo^{a,b*}, Ignacio Sánchez-Lázaro^{a,b,c}, Luis Almenar-Bonet^{a,b,c}, Manuel Portolés^{b,c}, Maryem Ezzitouny^{a,b}, Estefanía Tarazón^{b,c}, Esther Roselló-Lleti^{b,c}, Raquel Lopez-Vilella^{a,b}, and Luis Martínez-Dolz^{a,b,c}

^aHeart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, University and Polytechnic La Fe Hospital, Valencia, Spain; ^bMyocardial Dysfunction and Cardiac Transplantation Unit, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain; and ^cConsortio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P (CIBERCV), Madrid, Spain

ABSTRACT

Background. Nucleocytoplasmic transport is a crucial process for cell function. Previous studies have observed alterations in different molecules involved in it, relating them to ventricular function. However, there are no published data evaluating possible differences in the expression of these molecules in heart transplantation (HT) recipients. Our objective is to evaluate whether its levels are related to the appearance of cellular rejection (CR) during the first year after HT.

Methods. A prospective clinical cohort that included patients undergoing HT between January 2017 and January 2019 (n = 46). Blood samples for the analysis of importin 5 (IMP5), nucleoporin 153 (Nup153); RAN-GTPaseA1 (RanGAP1), and sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (ATP-aseCaTransp) were collected approximately 2 months post-HT. The levels obtained were correlated with the incidence of at least moderate CR during the first year of follow-up.

Results. Results showed that 17.39% of the patients had at least moderate CR during the first year of follow-up. Higher levels of IMP5, Nup153, and RanGAP1 were observed in this group. This difference was statistically significant in the case of Nup153 and RanGAP1 (15.94 ± 14.00 vs 28.62 ± 23.61, *P* = .048; 21.95 ± 15.97 vs 40.90 ± 27.16, *P* = .026, respectively); there was an opposite trend in the ATP-aseCaTransp case.

Conclusion. Patients with at least a moderate degree of CR during follow-up showed higher serum levels of IMP5, Nup153, and RanGAP1. The prognostic usefulness of the determination of these biomarkers and whether their elevation during follow-up would facilitate early, noninvasive identification of patients with CR remains to be clarified.

HEART transplant (HT) rejection is a leading cause of death after transplantation [1]. Endomyocardial biopsy is considered the standard rejection screening procedure despite its invasive nature and relevant risks [2,3]. Noninvasive techniques for monitoring heart rejection continue to be a major challenge. Nucleocytoplasmic transport is a crucial process for cell function [4]. Previous studies have observed alterations in different molecules involved in it, relating them to ventricular function. Some of the molecules involved in nucleocytoplasmic transport analyzed have been nucleoporins, exportins, and RAN regulators. In the case of nucleoporin 153 (Nup153), higher levels of this molecule have been observed in patients with dilated

Funding for this study was provided by the Instituto de Salud Carlos III (PI16/01627) to Luis Martínez Dolz; Instituto de Salud Carlos III (PI17/01925) to Esther Roselló Lleti; Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P. (CIBERCV) (CB16/11/00261) to Luis Martínez Dolz; and the European Regional Development Fund (FEDER).

*Address correspondence to Silvia Lozano Edo, Cardiology Service, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avinguda de Fernando Abril Martorell, 106, Valencia 44026, Spain. Tel: (+34) 96 124 48 59; Fax: (+34) 96 124 62 38. E-mail: slozanoedo@gmail.com

0041-1345/20
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2021.09.003>

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.
 230 Park Avenue, New York, NY 10169

CHANGES IN NUCLEOCYTOPLASMIC TRANSPORT

2719

or ischemic cardiomyopathy [5]. Other studies have observed higher levels of exportins and RanGTPase-activating proteins in patients with heart disease compared with subjects without heart disease, which shows that in heart failure there is an alteration of the nucleocytoplasmic trafficking machinery [6,7].

Therefore, it is known that nucleoporins, exportins, and RAN regulators plays an important role in the modulation of heart failure. However, there are no published data evaluating possible differences in the expression of these molecules in HT recipients based on their evolution and its relationship with the appearance of cardiac rejection after transplantation. For this reason, given that cell rejection is characterized by impaired ventricular function, we believe that further investigation of these molecules is appropriate in this group of patients. The primary objective of the present study was evaluated whether its levels are related to the appearance of cellular rejection (CR) during the first year after HT.

MATERIALS AND METHODS

Prospective clinical cohort that included patients undergoing HT between January 2017 and January 2019 (n = 46). Once the period of clinical stability has been reached, venous blood samples for the analysis of importin 5 (IMP5), Nup153, RAN-GTPaseAPI (RanGAP1), and ATP-aseCaTransp were collected. During these years, clinical, hemodynamic, analytical, echocardiographic, and intraoperative data were recorded. The levels obtained were correlated with the incidence of at least moderate CR during the first year of follow-up.

Blood samples were obtained using peripheral venipuncture. The blood tubes were centrifuged (Eppendorf centrifuge, model 5415R, Hamburg, Germany) at 1300 rpm for 10 minutes at 4°C and the supernatant was collected and aliquoted into 500 µL screen-printed plastic cryotubes that were stored in a biobank at -80°C until further analysis. For analysis, each aliquot was brought to 4°C, thawed, and then centrifuged (Eppendorf centrifuge, model 5702R, Hamburg, Germany) at 1300 rpm for 10 minutes at 4°C.

Analysis of the molecules in serum was determined using enzyme-linked immunosorbent assay kits (Cat. Nos. MBS011353 and MBS9321016, respectively, from MyBioSource, Inc., San Diego, Calif,

United States). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation (%) were less than 15%.

Prior to extraction of the peripheral blood samples, patients completed an informed consent form. Patients undergoing cardiopulmonary transplantation were excluded. Heart transplant rejection was defined according to the criteria established by the International Society for Heart and Lung Transplantation [8]. This study was approved by the Ethics Committee (Drug Research Ethical Committee of La Fe University Hospital) and was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki [9].

RESULTS

A total of 46 HT recipients were included in the analysis. The mean (±SD) patient age was 51 years and men represented 83% of the cohort. Age, sex, cardiovascular risk factors, primary heart disease, transplant code, and need for mechanical circulatory support bridge to transplantation are provided in Table 1.

Results showed that 17.39% (n = 8) of patients had at least moderate CR during the first year of follow-up. Higher levels of IMP5, Nup153, and RanGAP1 were observed in this group. This difference was statistically significant in the case of Nup153 and RanGAP1 (15.94 ± 14.00 vs 28.62 ± 23.61, P = .048; 21.95 ± 15.97 vs 40.90 ± 27.16, P = .026, respectively). Higher levels of IMP5 were also observed in the group of patients with at least moderate CR but was not significantly different (1.81 ± 1.45 vs 3.31 ± 3.31, P = .248); an opposite trend was observed in the ATP-aseCaTransp case (Table 2). Receiver operating characteristic curves were drawn to analyze the capacity of these molecules to detect heart CR, and a significant area under the curve was observed in the case of Nup153 (0.745 ± 0.098; 95% confidence interval, 0.553-0.937; P = .031), with an optimum cutoff point of 15 ng/mL (sensitivity 75%, specificity 62%, positive predictive value 14.6%, negative predictive value 96.61%).

Table 1. Demographic Characteristics of Patients

	Total (n = 46)	No rejection	Rejection 1R (n = 38)	Rejection 2R-3R (n = 8)	P Value
Age (y)	50.8 ± 14.7	51.2 ± 14.8		49.13 ± 15.0	.73
Male sex, n (%)	38 (82.6)	32 (84.2)		6 (75.0)	.53
Diabetes, n (%)	6 (13.0)	5 (13.9)		1 (12.5)	.92
Hypertension, n (%)	18 (39.1)	16 (44.4)		2 (25.0)	.31
Dyslipidemia, n (%)	9 (19.6)	9 (24.3)		0 (0.0)	.14
Previous smoker, n (%)	11 (23.9)	9 (26.5)		2 (28.6)	.91
Cardiomyopathy diagnosis, n (%)					.05
Ischemia	10 (21.7)	8 (21.1)		2 (20.0)	
Dilated cardiomyopathy	22 (47.8)	21 (55.3)		1 (12.5)	
Other/restrictive/hypertrophic/valvular	14 (30.4)	9 (23.7)		5 (62.5)	
Urgent transplant, n (%)	14 (30.4)	11 (28.9)		3 (37.5)	.63
Mechanical circulatory support bridge to transplantation n (%)	12 (26.1)	9 (23.7)		3 (37.5)	.42

1R, mild rejection; 2R, moderate rejection; 3R, severe rejection, according to the criteria established by the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT).

Table 2. Variation of Nup153, RanGAP1, IMP5, and ATPCa Levels Between Patients With and Without Cellular Rejection

Molecules	Rejection	n	Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)	P Value
Nup153	No rejection	37	15.94	14.00	.048
	Rejection 1R				
	Rejection 2R-3R	8	28.62	23.61	
RanGAP1	No rejection	29	21.95	15.97	.026
	Rejection 1R				
	Rejection 2R-3R	6	40.90	27.16	
IMP5	No rejection	38	1.81	1.45	.248
	Rejection 1R				
	Rejection 2R-3R	8	3.31	3.31	
ATPCa	No rejection	37	0.72	1.17	.32
	Rejection 1R				
	Rejection 2R-3R	7	0.28	0.20	

1R, mild rejection; 2R, moderate rejection; 3R, severe rejection; ATPCa, ATP-aseCaTransp; IMP5, importin 5; Nup153, nucleoporin 153; RanGAP1, RAN-GTPaseA1.

CONCLUSIONS

Our results suggest that there is an alteration in nucleocytoplasmic transport in patients who experience CR after HT. Patients with at least a moderate degree of CR during follow-up showed higher serum levels of IMP5, Nup153, and RanGAP1. The prognostic usefulness of the determination of these biomarkers in a larger series of HT recipients and whether their elevation during follow-up would facilitate early, noninvasive identification of patients with CR remains to be clarified.

REFERENCES

- [1] Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report—2012. *J Heart Lung Transplant* 2012;31:1052–64.
- [2] Bergersen L, Marshall A, Gauvreau K, et al. Adverse event rates in congenital cardiac catheterization—a multi-center experience. *Catheter Cardiovasc Interv* 2010;75:389–400.
- [3] Nielsen H, Sørensen FB, Nielsen B, et al. Reproducibility of the acute rejection diagnosis in human cardiac allografts. The Stanford Classification and the International Grading System. *J Heart Lung Transplant* 1993;12:239–43.
- [4] Jamali T, Jamali Y, Mehrbod M, Mofrad MR. Nuclear pore complex: biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011;287:233–86.
- [5] Tarazón E, Rivera M, Roselló-Lleti E, et al. Heart failure induces significant changes in nuclear pore complex of human cardiomyocytes. *PLoS One* 2012;7:e48957.
- [6] Cortes R, Roselló-Lleti E, Rivera M, et al. Influence of heart failure on nucleocytoplasmic transport in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2010;85:464–72.
- [7] Roselló-Lleti E, Rivera M, Cortes R, et al. Influence of heart failure on nucleolar organization and protein expression in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;418:222–8.
- [8] Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1710–20.
- [9] Macnae DJ. The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) guidelines on ethics of clinical trials. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:176–9.

10.1.3 Anexo 3

10.1.3.1 Artículo 3: Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker

Lozano-Edo S, Roselló-Lletí E, Sánchez-Lázaro I, et al. Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker. *J Pers Med.* 2022;12(6):913.

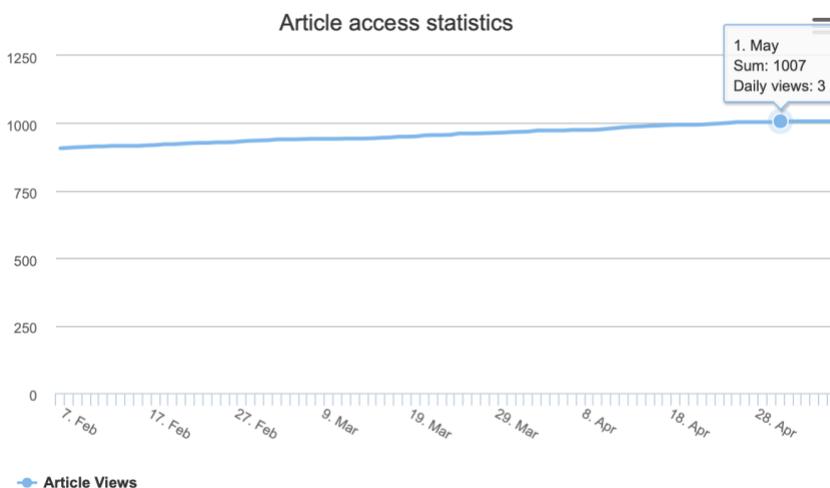
Published 2022 May 31. doi:10.3390/jpm12060913

- **AUTORES (P.O. DE FIRMA):**
Silvia Lozano-Edo,^{1,2*} Esther Roselló-Lletí,^{2,3} Ignacio Sánchez-Lázaro,^{1,2,3} Estefanía Tarazón,^{2,3} Manuel Portolés,^{2,3} Maryem Ezzitouny,^{1,2} Raquel Lopez-Vilella,^{1,2} Miguel Angel Arnau,^{1,2} Luis Almenar,^{1,2,3} Luis Martínez-Dolz^{1,2,3}
- **TITULO: Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker**
- **REFERENCIA:** DOI:10.3390/jpm12060913. VOL.12, ISSUE 6, PP. 913. ISSN: 2075-4426.
- **REVISTA:** Journal of Personalized Medicine.
- **EDITORIAL:** MDPI.
- **AFILIACIONES:**
 - 1 Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, University and Polytechnic La Fe Hospital, 46026 Valencia, Spain.
 - 2 Clinical and Translational Research Group in Cardiology, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), 46026 Valencia, Spain.
 - 3 Center for Biomedical Research Network on Cardiovascular Diseases (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares: CIBERCV), 28029 Madrid, Spain.
- *E-MAIL: slozanoedo@gmail.com (autora de correspondencia)
- Fondos: Instituto de Salud Carlos III" [PI16/01627, PI20/00071, PI20/01469, CP18/00145, CP21/00041], "Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P." (CIBERCV, CB16/11/00261) y cofinanciado por la Unión Europea.
- **LUGAR DE PUBLICACIÓN:** BASEL (SWITZERLAND)

- FECHA DE PUBLICACIÓN: recibido el 28 de abril del 2022, aceptado el 29 de mayo del 2022, publicado el 31 mayo del 2022.
- FACTOR DE IMPACTO: PUBLICADO JCR-2021: 3,508.
- POSICIÓN, rank by Journal impact factor:
 - 41/109; JCR-2021; 2º CUARTIL; percentil 62,84%, Health care sciences & services.
 - 69/172; JCR-2021; 2º CUARTIL; percentil 60,17%, Medicine, general & internal.
- POSICIÓN, rank by Journal citation indicator:
 - 46/159; JCR-2021; 2º CUARTIL; percentil 71,38%, Health care sciences & services.
 - 55/329; JCR-2021; 1º CUARTIL; percentil 83,43%, Medicine, general & internal.

*REVISIÓN POR AL MENOS DOS EXPERTOS INDEPENDIENTES.

* Mas de 1000 visualizaciones.



JOURNAL OF PERSONALIZED MEDICINE

2021 JOURNAL IMPACT FACTOR

3.508

[View calculation](#)

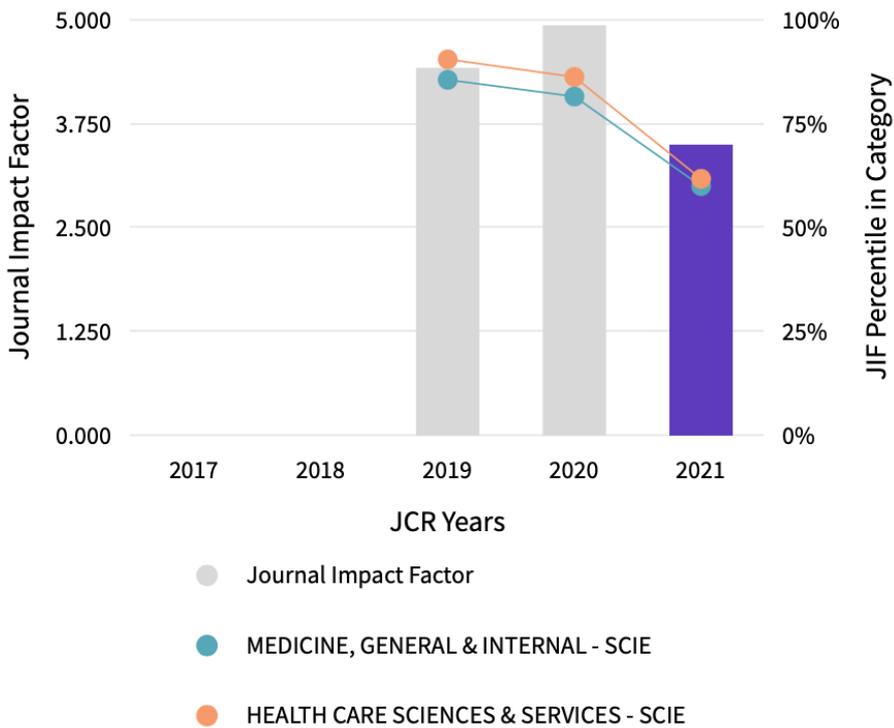
JOURNAL IMPACT FACTOR WITHOUT SELF CITATIONS

3.138

[View calculation](#)

Journal Impact Factor Trend 2021

[Export](#)



Article

Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker

Silvia Lozano-Edo ^{1,2,*}, Esther Roselló-Lleti ^{2,3}, Ignacio Sánchez-Lázaro ^{1,2,3}, Estefanía Tarazón ^{2,3}, Manuel Portolés ^{2,3}, Maryem Ezzitouny ^{1,2}, Raquel Lopez-Vilella ^{1,2}, Miguel Angel Arnau ^{1,2}, Luis Almenar ^{1,2,3} and Luis Martínez-Dolz ^{1,2,3}

¹ Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, University and Polytechnic La Fe Hospital, 46026 Valencia, Spain; ignaciosanchezlazaro@gmail.com (I.S.-L.); mezzitouny@gmail.com (M.E.); cune10@hotmail.com (R.L.-V.); shattowsky@gmail.com (M.A.A.); lualmenar@gmail.com (L.A.); luismartinezdolz@gmail.com (L.M.-D.)

² Clinical and Translational Research Group in Cardiology, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), 46026 Valencia, Spain; esther_rosello@iislafe.es (E.R.-L.); tarazon_est@gva.es (E.T.); portoles_man@gva.es (M.P.)

³ Center for Biomedical Research Network on Cardiovascular Diseases (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares: CIBERCV), 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: slozanoedo@gmail.com



Citation: Lozano-Edo, S.;

Roselló-Lleti, E.; Sánchez-Lázaro, I.; Tarazón, E.; Portolés, M.; Ezzitouny, M.; Lopez-Vilella, R.; Arnau, M.A.; Almenar, L.; Martínez-Dolz, L.

Cardiac Allograft Rejection Induces Changes in Nucleocytoplasmic Transport: RANGAP1 as a Potential Non-Invasive Biomarker. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 913. <https://doi.org/10.3390/jpm12060913>

Academic Editor: Gwo-Ping Jong

Received: 28 April 2022

Accepted: 29 May 2022

Published: 31 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The non-invasive diagnosis of acute cellular rejection (ACR) is a major challenge. We performed a molecular study analyzing the predictive capacity of serum RanGTPase AP1 (RANGAP1) for diagnosing ACR during the first year after heart transplantation (HT). We included the serum samples of 75 consecutive HT patients, extracted after clinical stability, to determine the RANGAP1 levels through ELISA. In addition, various clinical, analytical, and echocardiographic variables, as well as endomyocardial biopsy results, were collected. RANGAP1 levels were higher in patients who developed ACR (median 63.15 ng/mL; (inter-quartile range (IQR), 36.61–105.69) vs. 35.33 ng/mL (IQR, 19.18–64.59); $p = 0.02$). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis confirmed that RANGAP1 differentiated between patients with and without ACR (area under curve (AUC), 0.70; $p = 0.02$), and a RANGAP1 level exceeding the cut-off point (≥ 90 ng/mL) was identified as a risk factor for the development of ACR (OR, 6.8; $p = 0.006$). Two independent predictors of ACR identified in this study were higher RANGAP1 and N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels. The analysis of the ROC curve of the model showed a significant AUC of 0.77, $p = 0.001$. Our findings suggest that RANGAP1 quantification facilitates risk prediction for the occurrence of ACR and could be considered as a novel non-invasive biomarker of ACR.

Keywords: biomarkers; RANGAP1; cardiac rejection; heart transplantation; nucleocytoplasmic transport

1. Introduction

Cardiac rejection is a major cause of allograft loss and mortality [1]. The detection of cardiac rejection using non-invasive methods continues to be a major challenge. To date, the histological evaluation of endomyocardial biopsy (EMB) remains the gold standard for the diagnosis of acute cellular rejection (ACR). However, it is an invasive procedure associated with several risks [2,3]. Currently, the determination of troponin, natriuretic peptide, calcium regulator, microRNA, cell-free DNA, and inflammatory marker levels are the most studied non-invasive methods for monitoring ACR; however, none of them provide accuracy comparable to EMB [4–10].

In this study, our team has investigated the influence of cellular rejection on nucleolar organization in patients undergoing heart transplantation (HT). The nucleus plays a fundamental role in the general functioning of the cell [11]. Previous studies have shown

that patients with HF present alterations in the nucleocytoplasmic trafficking machinery, leading to increased levels of importins, exportins, Ran regulators, and nucleoporins, as well as alterations in calcium metabolism [12–14]. Previously, our group observed alterations in the nucleocytoplasmic trafficking machinery components in patients with cardiac rejection in a small group of patients (Lozano-Edo et al., 2021) [15]. Since cardiac rejection produces inflammation, disintegration, and cell necrosis [16], we hypothesized that it can also alter nucleocytoplasmic transport, which would result in changes in the circulating serum levels of the nuclear pore complex components. Specifically, changes are anticipated in the Ran regulatory system, which we could detect in patient serum in a relatively simple and non-invasive way.

Therefore, due to its crucial role in protein export from the nucleus to the cytoplasm and regulation of the nuclear pore complex, we analyzed the expression of RANGAP1 in HT patients. The objective of this study was to determine whether the increase in circulating levels of RANGAP1, once the patient reaches the period of clinical stability, i.e., 1–3 months after transplantation, could serve as a marker for predicting ACR during the first year of follow-up [17–19].

2. Methods

2.1. Collection of Samples

In this prospective study, 75 adult patients who underwent HT at our center were consecutively enrolled over a 3-year period from January 2017 to December 2019. Serum samples were collected from all patients once the period of clinical stability was reached, between 1–3 months after HT. The average timing of sampling was 1.9 ± 0.9 months. A single sample was available from each patient. Simultaneously, EMB results were collected prospectively to document the rejection episodes that occurred in each patient during the first year of follow-up. In routine clinical practice, EMB is performed to detect rejection at 1, 2, 3, 4, 6, 9, and 12 months after HT. Patients maintained a standard immunosuppression regimen, and rejection episodes were assessed according to the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) consensus report [16]. EMB histology was performed by an expert pathologist blinded to clinical and laboratory information. Various clinical characteristics of transplant patients, including age, sex, body mass index (BMI), primary heart disease, biochemical markers (high-sensitivity troponin T and N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP)), echocardiographic parameters, and immunosuppressive drug regimen, were recorded during the first year after transplantation.

Moreover, patients who died in the first months after HT, without reaching clinical and hemodynamic stability, were excluded, considering that mortality in this period fundamentally occurs due to surgical complications and primary graft dysfunction. Similarly, patients undergoing cardiopulmonary transplantation, heart retransplantation, those whose blood samples were not available for the analysis of RANGAP1, and those who did not sign the informed consent prior to extraction were excluded.

2.2. Measurement of Circulating RANGAP1

Blood samples were obtained using peripheral venipuncture via a 10 mL glass vacuum extraction tube, treated with 15% EDTA anticoagulant (0.12 mL) (BD Vacutainer® K3E; REF 368480). The tubes were centrifuged (Eppendorf 5415R, Eppendorf, Germany) at 1300 rpm for 10 min at 4 °C, and the supernatant was collected and aliquoted into 500 µL screen-printed plastic cryotubes, which were subsequently stored in the biobank of La Fe University Hospital (Valencia, Spain) at –80 °C until further analysis. The assay was performed on all samples at the same time.

RANGAP1 expression was determined using a specific ELISA kit (cat. MBS9321016; MyBiosource Inc., San Diego, CA, USA). The RANGAP1 test has a detection limit of 1.00 ng/mL and sensitivity of 1.00 ng/mL; both intra-assay CV (%) and inter-assay CV (%) are less than 15%.

2.3. Measurement of Circulating NT-proBNP and High-Sensitivity Troponin T

Peripheral blood samples were collected in the first months after heart transplantation (once the period of clinical stability had been reached) and 12 months after it, in order to determine the levels of NT-proBNP and high-sensitivity troponin T. NT-proBNP measurement was performed by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) (analyzer; Alinity i; trading house: Abbott[®]), and high-sensitivity troponin T measurement was performed by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) (analyzer: Cobas e; commercial house: Roche[®]).

2.4. Statistical Analysis

Descriptive analyses were performed for all reference variables, and the results were expressed as mean and standard deviation (SD), median and interquartile range (IQR) for continuous variables, and as number and percentage for discrete variables. The results for each variable were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov method. Differences between groups were analyzed using Student's t-test for independent samples and the chi-square test. Continuous variables that did not follow normal distribution were compared using the Mann–Whitney U test.

The sensitivity and specificity of plasma RANGAP1 levels for ACR detection were assessed by plotting receiver operating characteristic (ROC) curves. Logistic regression was performed to evaluate the contribution of circulating RANGAP1 in combination with age, sex, BMI, hemoglobin, creatinine, and logarithm (log) of troponin and Nt-proBNP determined in the period of clinical stability, which were included in the model for predicting ACR. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS version 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Study Population and ACR

A total of 75 HT recipients were included in this analysis. The mean (\pm SD) age of the patients was 52 ± 14 years, and men constituted 79% of the cohort. The patients were divided into two groups: those who did not present clinically relevant ACR (no rejection or mild rejection (grade 1R)) during the first year after HT ($n = 59$), and those who presented clinically relevant ACR (moderate or severe rejection (grades 2R or 3R)) ($n = 16$). Of the 16 patients who presented ACR 2R–3R, 68.75% presented it in the first 4 months after HT, 12.5% between 4 and 8 months after HT, and 18.75% between 9 and 12 months after transplantation. In patients who presented rejection $\geq 2R$ in the first four months after HT, the RANGAP1 sample was extracted at a mean of 1.82 ± 0.98 months after HT. In patients who presented rejection $\geq 2R$ between the fourth and the eighth month after HT, the RANGAP1 sample was extracted, on average, at 1.50 ± 0.71 months after HT. Finally, in patients who presented ACR $\geq 2R$ between the ninth and twelfth month after HT, RANGAP1 levels were obtained, on average, at 1.33 ± 0.58 months after HT. In the group of patients with ACR $\geq 2R$, the mean time between the HT and the extraction of the sample for the RANGAP1 analysis was 1.69 ± 0.87 months.

As shown in Table 1, both groups of patients displayed similarities in terms of clinical and demographic variables, i.e., sex, age, BMI, presence of diabetes, hypertension, and dyslipidemia prior to HT, and subsequent immunosuppressive regimen. Furthermore, significant differences were not observed in ventricular function between patients with clinically relevant rejection and those who did not show ACR during the first three months after HT (stability period). However, 12 months after HT, a higher percentage of ventricular dysfunction was observed in the group of patients who presented ACR during the first year after transplantation (13.3% vs. 1.7%; $p = 0.05$) (Table 1).

Table 1. Recipient characteristics, immunosuppressive therapy and echo-Doppler study.

Variables ^a	Total (n = 75)	Non-Rejection— Grade 1R (n = 59)	Grades 2R–3R Rejection (n = 16)	P
Clinics and demographics				
Age, years	52.3 (14.0)	51.88 (14.5)	53.7 (12.3)	0.69
Male sex (%)	59 (78.7)	48 (81.4)	11 (68.8)	0.28
Body mass index (kg/m ²)	25.48 (3.67)	25.48 (3.87)	25.46 (3.04)	0.99
Hypertension (%)	24 (32.9)	20 (35.1)	4 (25.0)	0.45
Diabetes mellitus (%)	8 (11.0)	6 (10.5)	2 (12.5)	0.82
Dyslipemia (%)	20 (27.4)	14 (24.1)	6 (40.0)	0.22
Ejection fraction pre-HT (%)	25.13 (15.64)	24.36 (16.42)	28.0 (12.37)	0.41
Indication for cardiac transplantation				
0.73				
Ischemic cardiomyopathy (%)	18 (24.0)	13 (22.0)	5 (31.3)	
Idiopathic dilated cardiomyopathy (%)	22 (29.3)	18 (30.5)	4 (25.0)	
Other (%)	35 (46.7)	28 (47.5)	7 (43.8)	
Immunosuppressive therapy				
Tacrolimus (%)	72 (96)	56 (94.9)	16 (100)	0.36
Mycophenolic acid (%)	71 (94.7)	55 (93.2)	16 (100)	0.28
Steroids (%)	75 (100)	59 (100)	16 (100)	
Echo-Doppler study post-HT				
Moderate/severe ventricular dysfunction (%) 1–3 months	2 (2.9)	1 (1.7)	1 (6.3)	0.32
Moderate/severe ventricular dysfunction (%) 12 months	3 (4)	1 (1.7)	2 (13.3)	0.05
Moderate/severe pericardial effusion (%) 1–3 months	8 (10.7)	5 (8.5)	3 (18.8)	0.24
Moderate/severe pericardial effusion (%) 12 months	2 (2.9)	2 (3.6)	0 (0)	0.45
Moderate/severe left ventricular hypertrophy (%) 1–3 months	7 (9.3)	5 (8.5)	2 (12.5)	0.62
Moderate/severe left ventricular hypertrophy (%) 12 months	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

^a Categorical data are presented as number (%) and continuous data as mean (SD). The *p* value was obtained by comparing non-rejection grade 1R with rejection grades 2R–3R. Grade 1R, mild rejection; grade 2R, moderate rejection; grade 3R, severe rejection; HT, heart transplantation.

Similarly, statistically non-significant trends were observed when the group of patients with clinically relevant ACR and those who did not present clinically relevant ACR were compared based on NT-proBNP (1499 pg/mL (798–2841) vs. 2070 pg/mL (757–7825), *p* = 0.23) and troponin levels (68.76 ng/L (42.7–186) vs. 87.93 ng/L (56.1–139), *p* = 0.31) in the first months after HT. Since NT-proBNP and troponins did not present normal distribution in our analysis, we performed logarithmic transformation of their values to reveal higher levels of both categories of biomarkers in the group of patients with clinically relevant ACR, bordering on statistical significance in the case of log NT-proBNP (3.42 (0.64) vs. 3.18 (0.45), *p* = 0.09)). The analytical parameters are presented in Table 2.

3.2. RamGAP1 Analysis in ACR

The serum RANGAP1 levels were higher in patients with significant ACR (2R–3R) compared to the group of patients without significant ACR (median 63.15 ng/mL (IQR, 36.61 to 105.69] vs. 35.33 ng/mL (IQR, 19.18 to 64.59); *p* = 0.02) (Figure 1A). When we compared RANGAP1 levels in patients without ACR to those with mild rejection (1R), we found no significant differences (mean 50.11 ng/mL (IQR, 11.11 to 74.2) vs. 34.04 ng/mL (IQR, 20.00 to 60.71); *p* = 0.98). In contrast, significantly higher RANGAP1 levels were observed in the group of patients with severe rejection compared to those with moderate rejection (mean 166.33 ng/mL (IQR, 105.69 to 166.33) vs. 52.60 ng/mL (IQR, 29.48 to 94.38); *p* = 0.03) (Figure 1B).

Table 2. Laboratory.

Variables ^a	Total (n = 75)	Non-Rejection— Grade 1R (n = 59)	Grades 2R–3R Rejection (n = 16)	p
NT-proBNP (pg/mL)	1523	1499	2070	0.24
1–3 months	(798–3548)	(798–2841)	(757–7825)	
Log NT-proBNP (pg/mL)	3.23 (0.50)	3.18 (0.45)	3.42 (0.64)	0.09
1–3 months				
NT-proBNP (pg/mL)	341	334	460	0.31
12 months	(215–586)	(216–540)	(211–1066)	
Log NT-proBNP (pg/mL)	2.60 (0.48)	2.53 (0.36)	2.82 (0.73)	0.15
12 months				
Troponin T (ng/L)	7134	6876	8793	0.31
1–3 months	(4778–159)	(4273–186)	(56.18–139)	
Log Troponin T (ng/L)	1.95 (0.47)	1.92 (0.46)	2.06 (0.51)	0.29
1–3 months				
Troponin T (ng/L)	17.58	17.03	19.90	0.90
12 months	(8.39–33.36)	(8.68–33.93)	(8.04–37.34)	
Log Troponin T (ng/L)	1.25 (0.34)	1.24 (0.33)	1.27 (0.37)	0.78
12 months				
Hemoglobine 1–3 months	11.25 (1.83)	11.45 (1.85)	10.54 (1.62)	0.08
12 months	12.8 (1.71)	12.95 (1.59)	12.27 (2.11)	
Hemoglobine 12 months	12.8 (1.71)	12.95 (1.59)	12.27 (2.11)	0.17
Creatinine 1–3 months	1.07 (0.51)	1.06 (0.56)	1.09 (0.31)	0.89
Creatinine 12 months	1.13 (0.33)	1.12 (0.33)	1.18 (0.32)	0.54

^a Continuous data are presented as mean (SD) and continuous variables with an abnormal distribution as median (interquartile range). Variables with non-normal distribution were converted to logarithms to obtain normal distribution. The p value is obtained by comparing non-rejection grade 1R with rejection grades 2R–3R. Grade 1R, mild rejection; grade 2R, moderate rejection; grade 3R, severe rejection.

We constructed receiver operating characteristic (ROC) curves to determine the ability of RANGAP1 to detect ACR, obtaining a significant area under the curve (AUC, 0.70 ± 0.08 (95% confidence interval (CI) 0.55 to 0.85); $p = 0.02$) (Figure 2A), with an optimal cut-off point of 90 ng/mL (sensitivity, 47%; specificity, 86%; positive predictive value, 45.6%; and negative predictive value, 86.6%). We observed that in patients with RANGAP1 levels >90 ng/mL, 44% presented ACR in the first year after HT, while in those with RANGAP1 levels <90 ng/mL, only 14% presented ACR. Subsequently, we obtained an ROC curve of the log NT-proBNP, a variable that had bordered on statistical significance in our study; however, statistical significance was not obtained (AUC, 0.60 ± 0.09 (95% CI, 0.42 to 0.77); $p = 0.24$).

We then performed multivariate logistic regression analysis to determine whether circulating serum levels of RANGAP1 were independent predictors of ACR. Age, sex, BMI, serum RANGAP1 levels, creatinine, hemoglobin, and log of troponins and NT-proBNP determined during the clinical stability period were included in the model. The multivariate model revealed that a RANGAP1 value >90 ng/mL (optimal cut-off point determined by the ROC curve) was an independent predictor of ACR with an odds ratio (OR) of 6.8 (95% CI, 1.74–26.88; $p = 0.006$) and C-statistic of 0.79 ± 0.07 (95% CI 0.66–0.93) $p = 0.001$. The log of NT-proBNP values was also identified as an independent factor in the model (OR, 3.52; 95% CI, 0.97–12.71; $p = 0.05$). Furthermore, we constructed a ROC curve with the combination of the two independent predictive blood parameters of ACR, i.e., RANGAP1 and Log NT-proBNP, obtaining a significant AUC (AUC, 0.77 ± 0.07 (95% CI 0.64 to 0.91), $p = 0.001$) (Figure 2B).

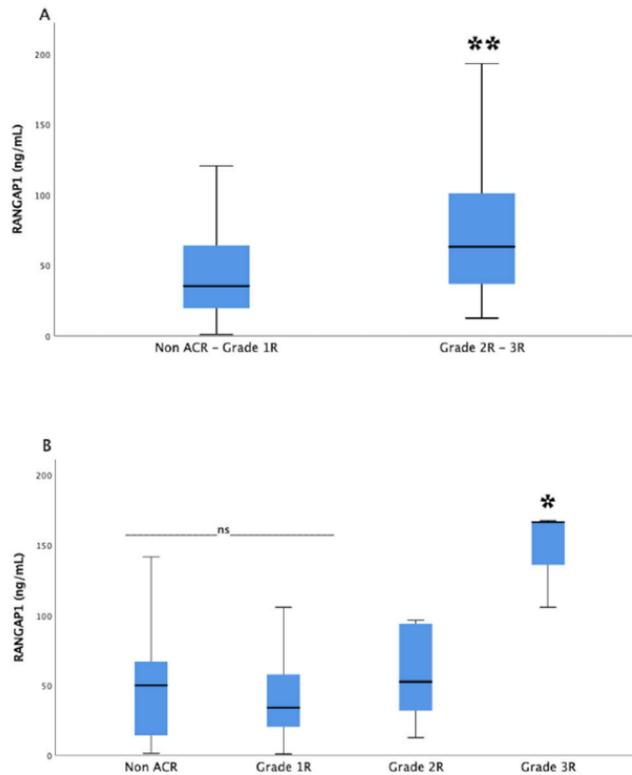


Figure 1. Circulating levels of RANGAP1 between normal and rejection heart allografts. Comparison between the serum levels of RANGAP1 in patients without and with significant acute cell rejection (ACR) (A). Comparison between the serum levels of RANGAP1 across different grades of rejection in heart allografts (B). The middle line in the box plots represents the median. The lower box represents the first quartile. The upper box represents the third quartile. Whiskers indicate the 95% confidence interval of the mean. ** $p = 0.02$, * $p = 0.03$. Grade 1R, mild rejection; grade 2R, moderate rejection; grade 3R, severe rejection; ns, no statistically significant differences.

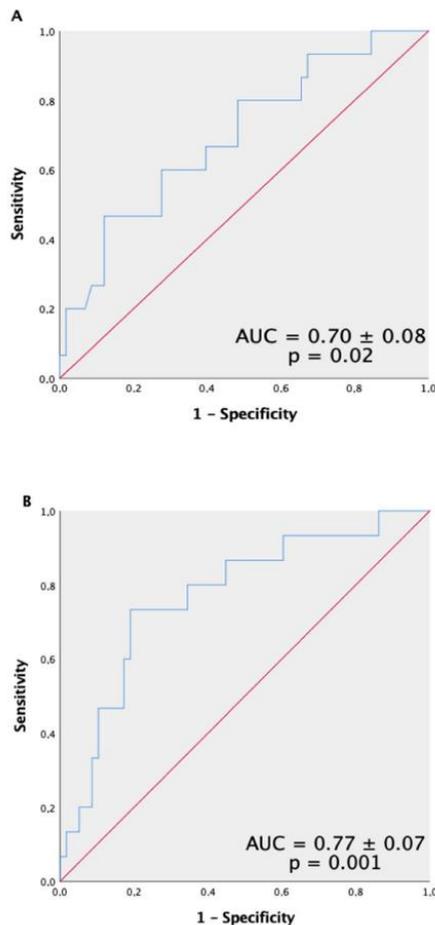


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curve of circulating RANGAP1 for the detection of cardiac allograft rejection. Ability of RANGAP1 to detect significant ACR (grades 2R–3R) (A). The two independent predictive blood parameters indicative of significant ACR: RANGAP1 and log NT-proBNP combined (B).

4. Discussion

Our study proposes that since nucleocytoplasmic transport is altered in patients suffering from ACR after HT, the determination of RANGAP1 levels could be useful in predicting ACR during follow-up, as a non-invasive biomarker of rejection. We found significantly higher serum levels of RANGAP1 in patients with ACR, suggesting that a serum RANGAP1 level >90 ng/mL is an independent predictor of ACR.

The conventional “gold standard” of rejection, EMB, is associated with sampling errors and inter-observer variability [3], and since it is an invasive procedure, there are

potential complications for the patient [2]. Owing to these limitations and risk factors, many studies have focused on investigating non-invasive techniques to provide additional information for predictions after HT. The study of cardiac biomarkers capable of predicting cardiac rejection has gained substantial interest. Previous studies have reported alterations in calcium metabolism in patients with cellular rejection and primary graft dysfunction, with lower levels of Serca2a in patients who present these complications after HT [5,20]. In addition, perinuclear changes have been observed in biopsies of patients with cellular rejection [21]. Furthermore, ACR episodes have been associated with elevated levels of circulating troponin [6], and especially B-type natriuretic peptide, in addition to NT-proBNP [6,22–24]. Our results are in accordance with these studies, and we observed that NT-proBNP level was an independent predictor of ACR during the first year of follow-up in the multivariate model. Even though therapeutic strategies have advanced in recent years, substantial mortality is recorded in this group of patients [25]. However, studies presenting fundamental research on this subject remain limited. Therefore, research aimed at improving the ability to identify dysregulations in myocardial biology and to formulate potential treatments to reverse, prevent, or predict ACR is important.

Our results showed that circulating levels of RANGAP1 were able to distinguish patients with clinically relevant ACR, during the first year of follow-up, from those without this complication (AUC = 0.70), with an optimal cut-off point of 90 ng/mL. We observed that the log of NT-proBNP level was higher in the group of patients with clinically relevant ACR (2R-3R), bordering on statistical significance. However, consistent with previous studies [26], our study shows that NT-proBNP in isolation does not have a high discriminative capacity to differentiate between patients with and without cardiac rejection. Our results verified RANGAP1 and NT-proBNP as independent predictors of ACR, which display a complementary value for the prediction of rejection and, thus, increase the detection capacity with an AUC of 0.77. Based on these results, we obtained a very good negative predictive value and an acceptable positive predictive value.

Even though alterations in nucleocytoplasmic transport have been discovered in patients with HF, with increased levels of RANGAP1 [12], these changes have not been analyzed for ACR to date. The role of immune response signaling in the regulation of the nuclear pore complex remains poorly understood. Previous studies have shown that the activation of T cells promotes the activation of RanGAP1, resulting in an increase in nuclear pore activity [27]. These findings are consistent with the results of our study, which reveal increased RanGAP1 levels in the group of patients with ACR involving the activation of T lymphocytes. Since the biological role of RanGAP1 in the pathophysiology of this process remains unexplored, our study presents a preliminary analysis that did not investigate the mechanistic insights into the relationship between RANGAP1 dysregulation and ACR. Nevertheless, a loss of myocytes has been reported in ACR, similar to left ventricular remodeling in heart failure, wherein myocyte necrosis or apoptosis leads to fibrosis [28]. Consequently, an increase in the activity of the nucleo-cytoplasmic machinery is required for de novo protein synthesis, thereby necessitating the overexpression of the Ran regulatory system [12]. Other immunohistochemical studies carried out in the smooth muscle of coronary and carotid arteries have observed that RANGAP1 levels are low in uninjured differentiated cells, while neointimal proliferation is associated with a significant increase in RANGAP1 levels [29]. Cardiac rejection leads to vascular involvement and damage, along with neointimal proliferation [30], in consistency with our findings.

The indicators identified in this study offer the possibility of detecting individuals with a high risk of ACR at an early stage during the first year of follow-up. However, more multicenter trials are needed to validate the use of this entity. The preliminary findings of our study need to be validated in larger cohorts to facilitate the use of this biomarker for substantial improvement in the surveillance strategy for cardiac rejection as a complement to EMB.

Our study had several limitations, and the results must be interpreted accordingly. This investigation involved only a single center, and included a relatively limited number

of patients. Thus, the potential variability in serum levels of RANGAP1 must also be considered based on other parameters that were not analyzed in the present study, such as patient population and stress situations. In addition, our study focused on ACR and did not specifically evaluate antibody-mediated rejection (AMR). However, our findings provide important information for the prediction of ACR, which may be further supported by addressing the limiting factors in future studies. As this prospective study represents the observations from a single center, the results are relatively homogenous regarding the diagnostic and therapeutic strategies for these patients. This study is the continuation of the first study published by our research group (Lozano-Edo et al., 2021) in which we showed the initial results [15].

5. Conclusions

Patients with at least a moderate degree of ACR during the follow-up after HT showed higher serum levels of RANGAP1. This variable was found to be an independent predictor of ACR, and assessing its concentrations in combination with other variables, such as NT-proBNP, will possibly increase its predictive capacity for ACR. This combination is proposed as an effective tool for predicting ACR to facilitate decision making and individualized management of these patients. However, these preliminary findings need to be validated in larger prospective cohorts. Overall, RANGAP1 is a potential non-invasive biomarker of ACR.

Author Contributions: Conceptualization, S.L.-E., L.M.-D., L.A., R.L.-V. and M.E.; Data curation, S.L.-E., M.A.A.; methodology, S.L.-E., E.R.-L., M.A.A., L.M.-D. and I.S.-L.; software, M.A.A.; validation, E.R.-L. and L.M.-D.; formal analysis, S.L.-E., E.R.-L., M.A.A., E.T. and L.M.-D.; investigation, S.L.-E., M.E., E.R.-L., L.M.-D., E.T., and M.P.; resources, S.L.-E., E.R.-L., E.T., M.P., L.A., L.M.-D.; writing—original draft preparation, S.L.-E.; writing—review and editing, S.L.-E., E.R.-L., L.M.-D., I.S.-L. and M.P.; supervision, E.R.-L. and L.M.-D.; project administration, L.M.-D.; funding acquisition, L.M.-D. and E.R.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Institute of Health “Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III” [PI16/01627, PI20/00071, PI20/01469, CP18/00145, CP21/00041], “Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P.” (CIBERCV, under Grant CB16/11/00261) and Co-financed by the European Union.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the University and Polytechnic Hospital La Fe (protocol code 2016-0198 and date of approval, 14 February 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study. This consent included permission to extract and store their samples as well as to publish the results obtained from the research.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical reasons.

Acknowledgments: Biobank of La Fe University Hospital (Valencia, Spain).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Khush, K.K.; Cherikh, W.S.; Chambers, D.C.; Harhay, M.O.; Hayes, D.; Hsieh, E.; Meiser, B.; Potena, L.; Robinson, A.; Rossano, J.W.; et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report-2019; focus theme: Donor and recipient size match. *J. Heart Lung Transplant.* **2019**, *38*, 1056–1066. Correction in *J. Heart Lung Transplant.* **2020**, *39*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bergersen, L.; Marshall, A.; Gauvreau, K.; Beekman, R.; Hirsch, R.; Foerster, S.; Balzer, D.; Vincent, J.; Hellenbrand, W.; Cheatham, J.; et al. Adverse event rates in congenital cardiac catheterization—a multi-center experience. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **2010**, *75*, 389–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Nielsen, H.; Sørensen, E.B.; Nielsen, B.; Bagger, J.P.; Thyssen, P.; Baandrup, U. Reproducibility of the acute rejection diagnosis in human cardiac allografts. The Stanford Classification and the International Grading System. *J. Heart Lung Transplant.* **1993**, *12*, 239–243. [[PubMed](#)]

4. Tarazón, E.; Gil-Cayuela, C.; Manzanares, M.G.; Roca, M.; Lago, F.; González-Juanatey, J.R.; Sánchez-Lacuesta, E.; Martínez-Dolz, L.; Portolés, M.; Roselló-Lleti, E. Circulating Sphingosine-1-Phosphate as A Non-Invasive Biomarker of Heart Transplant Rejection. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13880. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Tarazón, E.; Ortega, A.; Gil-Cayuela, C.; Sánchez-Lacuesta, E.; Marín, P.; Lago, F.; González-Juanatey, J.R.; Martínez-Dolz, L.; Portolés, M.; Rivera, M.; et al. SERCA2a: A potential non-invasive biomarker of cardiac allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant.* **2017**, *36*, 1322–1328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Hill, D.A.; Drazner, M.H.; de Lemos, J.A. Do established biomarkers such as B-type natriuretic peptide and troponin predict rejection? *Curr. Opin. Organ Transplant.* **2013**, *18*, 581–588. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Martínez-Dolz, L.; Almenar, L.; Reganon, E.; Vila, V.; Sánchez-Soriano, R.; Martínez-Sales, V.; Moro, J.; Agüero, J.; Sánchez-Lázaro, I.; Salvador, A. What is the best biomarker for diagnosis of rejection in heart transplantation? *Clin. Transplant.* **2009**, *23*, 672–680. [\[CrossRef\]](#)
8. Di Francesco, A.; Fedrigo, M.; Santovito, D.; Natarelli, L.; Castellani, C.; De Pascale, F.; Toscano, G.; Fraiese, A.; Feltrin, G.; Benazzi, E.; et al. MicroRNA signatures in cardiac biopsies and detection of allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant.* **2018**, *37*, 1329–1340. [\[CrossRef\]](#)
9. Constanso-Conde, I.; Hermida-Prieto, M.; Barge-Caballero, E.; Núñez, L.; Pombo-Otero, J.; Suárez-Fuentetaja, N.; Paniagua-Martin, M.J.; Barge-Caballero, G.; Couto-Mallón, D.; Pan-Lizcano, R.; et al. Circulating miR-181a-5p as a new biomarker for acute cellular rejection in heart transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **2020**, *39*, 1100–1108. [\[CrossRef\]](#)
10. Agbor-Enoh, S.; Shah, P.; Tunc, I.; Hsu, S.; Russell, S.; Feller, E.; Shah, K.; Rodrigo, M.E.; Najjar, S.S.; Kong, H.; et al. Cell-Free DNA to Detect Heart Allograft Acute Rejection. *Circulation* **2021**, *143*, 1184–1197. [\[CrossRef\]](#)
11. Jamali, T.; Jamali, Y.; Mehrbod, M.; Mofrad, M.R. Nuclear pore complex: Biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2011**, *287*, 233–286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Cortes, R.; Roselló-Lleti, E.; Rivera, M.; Martínez-Dolz, L.; Salvador, A.; Azorin, I.; Portoles, M. Influence of heart failure on nucleocytoplasmic transport in human cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *85*, 464–472. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Tarazón, E.; Rivera, M.; Roselló-Lleti, E.; Molina-Navarro, M.M.; Sánchez-Lázaro, I.J.; España, F.; Montero, J.A.; Lago, F.; González-Juanatey, J.R.; Portolés, M. Heart failure induces significant changes in nuclear pore complex of human cardiomyocytes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48957. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Ezzitouny, M.; Roselló-Lleti, E.; Portolés, M.; Sánchez-Lázaro, I.; Arnau-Vives, M.Á.; Tarazón, E.; Gil-Cayuela, C.; Lozano-Edo, S.; Lopez-Vilella, R.; Almenar-Bonet, L.; et al. Value of SERCA2a as a Biomarker for the Identification of Patients with Heart Failure Requiring Circulatory Support. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 1122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Lozano-Edo, S.; Sánchez-Lázaro, I.; Almenar-Bonet, L.; Portolés, M.; Ezzitouny, M.; Tarazón, E.; Roselló-Lleti, E.; Lopez-Vilella, R.; Martínez-Dolz, L. Alterations in the Nucleocytoplasmic Transport in Heart Transplant Rejection. *Transp. Proc.* **2021**, *53*, 2718–2720. [\[CrossRef\]](#)
16. Stewart, S.; Winters, G.L.; Fishbein, M.C.; Tazelaar, H.D.; Kobashigawa, J.; Abrams, J.; Andersen, C.B.; Angelini, A.; Berry, G.J.; Burke, M.M.; et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J. Heart Lung Transplant.* **2005**, *24*, 1710–1720. [\[CrossRef\]](#)
17. Clarke, P.R.; Zhang, C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 464–477. [\[CrossRef\]](#)
18. Pemberton, L.F.; Paschal, B.M. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* **2005**, *6*, 187–198. [\[CrossRef\]](#)
19. Sorokin, A.V.; Kim, E.R.; Ovchinnikov, L.P. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry* **2007**, *72*, 1439–1457. [\[CrossRef\]](#)
20. Lozano-Edo, S.; Sánchez-Lázaro, I.; Portolés, M.; Roselló-Lleti, E.; Tarazón, E.; Arnau-Vives, M.A.; Ezzitouny, M.; Lopez-Vilella, R.; Almenar-Bonet, L.; Martínez-Dolz, L. Plasma Levels of SERCA2a as a Noninvasive Biomarker of Primary Graft Dysfunction After Heart Transplantation. *Transplantation* **2022**, *106*, 887–893. [\[CrossRef\]](#)
21. Tarazón, E.; Pérez-Carrillo, L.; Portolés, M.; Roselló-Lleti, E. Electron Microscopy Reveals Evidence of Perinuclear Clustering of Mitochondria in Cardiac Biopsy-Proven Allograft Rejection. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Wu, A.H.; Johnson, M.L.; Aaronson, K.D.; Gordon, D.; Dyke, D.B.; Koelling, T.M. Brain natriuretic peptide predicts serious cardiac allograft rejection independent of hemodynamic measurements. *J. Heart Lung Transplant.* **2005**, *24*, 52–57. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Kittleson, M.M.; Skojec, D.V.; Wittstein, I.S.; Champion, H.C.; Judge, D.P.; Barouch, L.A.; Halushka, M.; Hare, J.M.; Kasper, E.K.; Russell, S.D. The change in B-type natriuretic peptide levels over time predicts significant rejection in cardiac transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant.* **2009**, *28*, 704–709. [\[CrossRef\]](#)
24. Garrido, I.P.; Pascual-Figal, D.A.; Nicolás, F.; González-Carrillo, M.J.; Manzano-Fernández, S.; Sánchez-Mas, J.; Valdés-Chavarri, M. Usefulness of serial monitoring of B-type natriuretic peptide for the detection of acute rejection after heart transplantation. *Am. J. Cardiol.* **2009**, *103*, 1149–1153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Stehlik, J.; Edwards, L.B.; Kucheryavaya, A.Y.; Benden, C.; Christie, J.D.; Dipchand, A.I.; Dobbels, F.; Kirk, R.; Rahmel, A.O.; Hertz, M.I. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report—2012. *J. Heart Lung Transplant.* **2012**, *31*, 1052–1064. [\[CrossRef\]](#)
26. Shaw, S.M.; Williams, S.G. Is brain natriuretic peptide clinically useful after cardiac transplantation? *J. Heart Lung Transplant.* **2006**, *25*, 1396–1401. [\[CrossRef\]](#)

27. He, Y.; Yang, Z.; Zhao, C.S.; Xiao, Z.; Gong, Y.; Li, Y.Y.; Chen, Y.; Du, Y.; Feng, D.; Altman, A.; et al. T-cell receptor (TCR) signaling promotes the assembly of RanBP2/RanGAP1-SUMO1/Ubc9 nuclear pore subcomplex via PKC- θ -mediated phosphorylation of RanGAP1. *eLife* **2021**, *10*, e67123. [[CrossRef](#)]
28. Timonen, P.; Magga, J.; Risteli, J.; Punnonen, K.; Vanninen, E.; Turpeinen, A.; Tuomainen, P.; Kuusisto, J.; Vuolteenaho, O.; Peuhkurinen, K. Cytokines, interstitial collagen and ventricular remodelling in dilated cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* **2008**, *124*, 293–300. [[CrossRef](#)]
29. Vorpahl, M.; Schönhofer-Merl, S.; Michaelis, C.; Flotho, A.; Melchior, F.; Wessely, R. The Ran GTPase-activating protein (RanGAP1) is critically involved in smooth muscle cell differentiation, proliferation and migration following vascular injury: Implications for neointima formation and restenosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101519. [[CrossRef](#)]
30. Stoica, S.C.; Cafferty, F.; Pauriah, M.; Taylor, C.J.; Sharples, L.D.; Wallwork, J.; Large, S.R.; Parameshwar, J. The cumulative effect of acute rejection on development of cardiac allograft vasculopathy. *J. Heart Lung Transplant.* **2006**, *25*, 420–425. [[CrossRef](#)]

10.1.4 Ayudas concedidas

Los artículos originales que constituyen esta Tesis Doctoral (Lozano-Edo, et al. *Transplantation*. 2022; Lozano-Edo, et al. *Transplant Proc*. 2021; Lozano-Edo, et al. *J Pers Med*. 2022) han sido financiados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III” [PI16/01627, PI17/01925, PI17/01232, CP18/00145], “Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red, M.P.” (CIBERCV, under Grant CB16/11/00261) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

10.2 Otras publicaciones originales realizadas durante el periodo de la Tesis Doctoral en relación con la insuficiencia cardiaca y el trasplante

10.2.1 Anexo 4

10.2.1.1 Artículo complementario 1: Impact of Circulatory Assistance in the Early Evolution After Heart Transplantation. Unicentric Experience

Martínez-Lauwers A, Arenas P, Pérez-Roselló V, et al. Impact of Circulatory Assistance in the Early Evolution After Heart Transplantation. Unicentric Experience. *Transplant Proc.* 2021;53(9):2731-2733.
doi: 10.1016/j.transproceed.2021.08.041



Impact of Circulatory Assistance in the Early Evolution After Heart Transplantation. Unicentric Experience

Ana Martínez-Lauwers^a, Patricia Arenas^b, Víctor Pérez-Roselló^b, Víctor Donoso^b, Maryem Ezzitouny^b, Silvia Lozano^b, Pablo Jover^b, Javier Navarrete^b, José A. Sorolla^b, Raquel López-Vilella^b, Ignacio Sánchez-Lázaro^{b,c}, Miguel A. Arnau^{b,c}, Luis Almenar^{b,c}, and Luis Martínez-Dolz^{b,c,*}

^aUniversity of Valencia, Faculty of Medicine, Valencia, Spain; ^bUniversity and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain; and ^cConsortio de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, Spain

ABSTRACT

Background. Heart transplantation (HT) is the reference treatment for patients with terminal heart failure. In recent years there has been a progressive increase in HT procedures in patients who have a circulatory support (CS).

Methods. This is a retrospective single-center study of 293 consecutive patients who underwent HT from 2009 to 2018, analyzing the evolution of the 2 cohorts: patients with and without CS as a bridge to HT. Baseline and evolutionary clinical data collected following the usual follow-up protocol were recorded, including clinical events observed during the follow-up 1 year after the procedure.

Results. The subgroup of patients transplanted with CS showed a higher incidence of primary graft failure, frequent infection, and mortality. A tendency toward lower cardiac allograft vasculopathy was observed in this subgroup. Mechanical ventilation added to the CS resulted in a higher incidence of primary graft failure, infection, and renal dysfunction. The CS variable as a bridge to HT was shown to be predictive of 1-year mortality in both univariate (odds ratio, 1.84; 95% confidence interval, 1.03-3.3; $P = .038$) and multivariate (odds ratio, 2.1; 95% confidence interval, 1.01-4.3; $P = .047$) analyses.

Conclusions. In our experience, CS as a bridge to HT results in a higher incidence of primary graft failure, frequent infection, and mortality at 1-year follow-up. Mechanical ventilation added to CS has a clear unfavorable prognostic impact. CS as a bridge to HT was shown to be predictive of 1-year mortality in both univariate and multivariate analyses.

CURRENTLY, heart transplantation (HT) is the gold standard for patients with end-stage heart failure, because it improves survival, functional status, and quality of life [1,2]. However, owing to the shortage of donors, as well as the increasing number of unstable patients and long waiting lists, in recent years mechanical circulatory support (CS) has been used as a bridge to transplantation, as a bridge to decision, or even as destination therapy [3,4].

CS as a bridge to transplantation is associated with a significant number of relevant complications that have a variable impact on morbidity and mortality on patients who eventually receive a heart transplant [5].

MATERIALS AND METHODS

This was a retrospective single-center study of 293 consecutive patients who underwent HT in our center from 2009 to 2018, analyzing the evolution of the 2 cohorts: patients with and without CS as a bridge to HT. Baseline and evolutionary clinical data were collected following the usual follow-up protocol during 1 year of follow-up were recorded, including serial analytical controls; echocardiography and

*Address correspondence to Dr Luis Martínez-Dolz, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Edificio F, Planta 4, Av. Fernando Abril Martorell, no. 106, Valencia 46026, Spain. Tel: (+34) 961245849. E-mail: luismartinezdolz@gmail.com

Table 1. Baseline Characteristics of the Patients

Characteristics	With CS (n = 85)	Without CS (n = 207)	P Value
Age (y)	50.4 ± 14	50.9 ± 14	.75
Sex (male) (%)	80	76	.44
BMI (kg/m ²)	24.2 ± 3.4	25.17 ± 4.6	.08
HTA (%)	26	32	.3
Smoking (%)	46.5	46.9	.9
Cardiomyopathy (ICM/DCM) (%)	37.2/34.8	29.8/29.4	.2
DM (%)	14	13	.7
Hypercholesterolemia (%)	25	39	.02
COPD (%)	15	20	.4
PVD (%)	4.8	3.9	.72
Renal dysfunction	15	16	.9
Creatinine (mg/dL)	0.94 ± 0.53	1.16 ± 0.38	<.0001
Bilirubin (mg/dL)	2.19 ± 1.5	1.33 ± 0.9	<.0001
GOT (U/L)	84 ± 18	37 ± 29	.001
GPT (U/L)	69 ± 11	33 ± 39	<.0001
Previous heart surgery (%)	20	18	.7
ICD (%)	42	60	.06
CRT (%)	11	23	.02
Amiodarone (%)	36	30	.36
LVEF (%)	16 ± 9	24 ± 13	<.0001
Cardiac output (L/min)	3.39 ± 1.07	3.78 ± 1.25	.11
mPAP (mm Hg)	40 ± 11	35 ± 12	.046
PCP (mm Hg)	28 ± 11	25 ± 9	.15
PVR (Woods units)	3.70 ± 3	2.8 ± 2.8	.12
Donor age	44 ± 11	43 ± 12	.5
Donor sex (male) (%)	67	51	.01
Ischemic time (min)	161 ± 70	151 ± 63	.23
CPB time (min)	121 ± 64	134 ± 70	.14
Maintenance of immunosuppression (%)			.6
Tac/MFM/steroids	79.4/89.3/98.5	77.5/81.4/96.7	

Data expressed as mean ± standard deviation or as otherwise noted.

Abbreviations: BMI, body mass index; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CPB, cardiopulmonary bypass; CRT, cardiac resynchronization therapy; CS, circulatory support; DCM, dilated cardiomyopathy; DM, diabetes mellitus; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamate pyruvate transaminase; HTA, hypertension; ICD, implantable cardioverter defibrillator; ICM, ischemic cardiomyopathy; LVEF, left ventricular ejection fraction; MFM, mycophenolate mofetil; mPAP, mean pulmonary artery pressure; PCP, pulmonary capillary pressure; PVD, peripheral vascular disease; PVR, pulmonary vascular resistance; Tac, tacrolimus.

endomyocardial biopsies at 1, 2, 3, 4, 6, 9, and 12 months; and a coronary angiography with intravascular ultrasound to detect cardiac allograft vasculopathy at 1 and 12 months.

RESULTS

Table 1 describes the most relevant variables in relation to the heart transplant procedure in the 2 cohorts. The subgroup of patients transplanted with CS showed a statistically significant higher incidence of primary graft failure, frequent infection (>2

requiring hospitalization), and mortality. A tendency toward lower cardiac allograft vasculopathy was observed in this subgroup, with no significant differences in the incidence of frequent rejection or hemodynamic compromise or deterioration of renal function (defined as a 1-year glomerular filtration rate <45 mL/min/1.73 m²) (Table 2). The added impact of mechanical ventilation (MV) on 1-year events after HT was specifically analyzed. MV added to the CS resulted in a higher incidence of primary graft failure, infection, and renal dysfunction. Likewise, this variable was predictive of greater mortality per year, with a clear graduation in the risks in

Table 2. Description of Events Based on the Variable Circulatory Support

	With CS (n = 85), n (%)	Without CS (n = 207), n (%)	P Value
Primary graft failure	27/85 (32%)	42/203 (21%)	.045
Rejection frequent/hemodynamic compromise	7/26 (27%)	32/89 (36%)	.39
Cardiac allograft vasculopathy	10/37 (27%)	48/113 (43%)	.09
Infection 1 year frequent	15/52 (29%)	9/128 (7%)	<.0001
GFR <45 mL/1 year	7/53 (13%)	9/135 (7%)	.14
Mortality 1 year	26/85 (31%)	40/207 (19%)	.037

Abbreviations: CS, circulatory support; GFR, glomerular filtration rate.

CIRCULATORY ASSISTANCE AFTER HT

2733

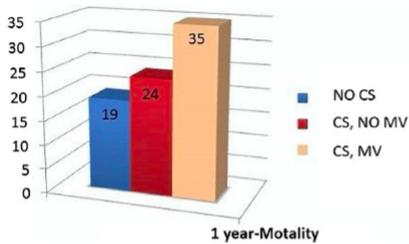


Fig 1. One-year mortality (%) according to the variables circulatory support and mechanical ventilation. Abbreviations: CS, circulatory support; MV, mechanical ventilation.

the 3 subgroups analyzed (MV without CS, CS without MV, and CS with MV) (Fig 1). The CS variable as a bridge to HT was shown to be predictive of 1-year mortality in both univariate (odds ratio, 1.84; 95% confidence interval, 1.03-3.3; $P = .038$) and multivariate (odds ratio, 2.1; 95% confidence interval, 1.01-4.3; $P = .047$) analyses.

CONCLUSIONS

In our experience, CS as a bridge to HT results in a higher incidence of primary graft failure, frequent infection, and mortality

at 1-year follow-up. MV added to CS has a clear unfavorable prognostic impact. CS as a bridge to HT was shown to be predictive of 1-year mortality in both univariate and multivariate analyses.

REFERENCES

- [1] Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* 2016;18:891-975.
- [2] Salyer J, Flattery MP, Joyner PL, et al. Lifestyle and quality of life in long-term cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:309-21.
- [3] Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-sixth adult heart transplantation report—2019; focus theme: donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant* 2019;38:1056-66.
- [4] Gonzalez-Vilchez F, Almenar-Bonet L, Crespo-Leiro MG, et al. Registro Español de Trasplante Cardíaco. XXX Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2018) [Spanish Heart Transplant Registry. 30th Official Report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure (1984-2018)]. *Rev Esp Cardiol* 2019;72:954-62 [in Spanish].
- [5] Barge-Caballero E, Almenar-Bonet L, Gonzalez-Vilchez F. Clinical outcomes of temporary mechanical circulatory support as a direct bridge to heart transplantation: a nationwide Spanish registry. *Eur J Heart Fail* 2018;20:178-86.

10.2.2 Anexo 5

10.2.2.1 Artículo complementario 2: COVID-19 and Heart Transplantation. Initial Experience in a Tertiary Hospital

López-Vilella R, Sánchez-Lázaro I, Trenado VD, Edo SL, Dolz LM, Bonet LA. COVID-19 and Heart Transplantation. Initial Experience in a Tertiary Hospital. *Transplant Proc.* 2021;53(9):2743-2746.
doi: 10.1016/j.transproceed.2021.07.054



ELSEVIER



COVID-19 and Heart Transplantation. Initial Experience in a Tertiary Hospital

Raquel López-Vilella^{a,b*}, Ignacio Sánchez-Lázaro^{a,b,c}, Víctor Donoso Trenado^{a,b}, Silvia Lozano Edo^b, Luis Martínez Dolz^{b,c}, and Luis Almenar Bonet^{a,b,c,d}

^aHeart Failure and Transplant Unit, La Fe University and Polytechnic Hospital, Valencia, Spain; ^bDepartment of Cardiology, La Fe University and Polytechnic Hospital, Valencia, Spain; ^cCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; and ^dUniversidad de Valencia, Valencia, Spain

ABSTRACT

Background. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a viral infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 virus that is affecting the entire world population. The objective of this study was to analyze the repercussion of the disease in a group of patients at risk such as heart transplant recipients.

Methods. From February 2020 to February 2021, heart transplant recipients diagnosed with COVID-19 were consecutively included. The total number of transplant recipients in outpatient follow-up at that time was 381. Three levels of infection were determined: group A: asymptomatic patients or with trivial symptoms without the need for hospital admission (6 patients); group B: patients admitted to the hospital for respiratory symptoms (12 patients); and group C: patients with severe symptoms and need for admission to the critical care unit (2 patients). At each risk level, medical performance was different: group A: close control, no therapeutic modification; group B: reduction of calcineurin inhibitor and substitution of mycophenolate mofetil for everolimus; group C: reduction of calcineurin inhibitor and withdrawal of mycophenolate mofetil.

Results. The prevalence of infection in the series was 5.2%. Most patients admitted had a pathologic chest x-ray with fever, cough, dyspnea, or vomiting. The change in immunosuppression performed in patients in group 2 was well tolerated and there was no graft rejection. Antiviral treatment was little used. However, boluses of steroids and some antibiotics were used frequently. The need for supplemental oxygen was 50% in group 2 and 100% in group 3.

Conclusions. A significant number of transplant recipients will be affected by COVID-19 (5.3%). Management of the infection will depend on the severity of the infection and must be based on a balance between reduction and adjustment of immunosuppression, strict control of the cardiologic situation, and treatment of the infection.

CORONAVIRUS disease 2019 (COVID-19) is an infectious disease caused by a newly discovered virus. Most people who become ill with COVID-19 experience mild to moderate symptoms and recover without special treatment. However, some subgroups of patients, such as heart transplant recipients, may experience more severe infection and higher mortality because of their immunosuppressed condition. Thus, heart transplant recipients constitute a complex group vulnerable to COVID-19 because of the challenge of simultaneously managing infection and immunosuppression to avoid rejection.

The objective of this study was to present the series of cases of heart transplant recipients with COVID-19 in a third-level transplant hospital and the approach taken according to the patient's risk.

*Address correspondence to Dr Raquel López-Vilella. Heart Failure and Transplantation Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Avenida Fernando Abril Martorell, 106, Valencia 46026, Spain. Tel: (+34) 615884883. E-mail: lopez_raqvil@gva.es

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.
230 Park Avenue, New York, NY 10169

0041-1345/20
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2021.07.054>

MATERIALS AND METHODS

Heart transplant recipients diagnosed with COVID-19 were consecutively recruited from February 2020 to February 2021. The diagnosis could be accidental or due to infectious symptoms with positive polymerase chain reaction test. The total number of transplant recipients in outpatient follow-up at that time was 381. At the beginning of the pandemic, and considering the possibility and risk of infection in heart transplant recipients, the center's heart transplant team drew up a protocol for therapeutic action according to the patient's infectious situation. This protocol was carried out in all infected patients. Three levels of infection were determined: group A; asymptomatic patients or with trivial symptoms without the need for hospital admission (6 patients); group B: patients admitted to the hospital ward for respiratory symptoms (12 patients); group C; patients with severe symptoms and need for admission to the critical care unit (2 patients). At each level of risk, medical performance was different: group A: close control, no therapeutic modification; group B: reduction of calcineurin inhibitor (CNI) and substitution of mycophenolate mofetil (MMF) for everolimus (EVE); group C: reduction of CNI and withdrawal of MMF. In addition, patients were administered antiviral and general treatment corresponding to their clinical situation. [Figure 1](#) shows the 3 established groups.

RESULTS

The prevalence of infection in the series was 5.2%. Most patients in the 3 groups were male. Those in higher risk groups were older. Most patients were admitted because of fever associated with cough, dyspnea, or vomiting. These symptoms, together with a pathologic chest x-ray, motivated the hospital admission. Electrocardiographic or arrhythmic abnormalities were observed in none of the 20 patients in the series (Table 1).

The change in immunosuppression performed in patients in group 2 was well tolerated and there was no rejection. Antiviral treatment was little used. However, boluses of steroids and some antibiotics were used frequently. The need for supplemental oxygen was close to 50% in group 2 and 100% in group 3.

The mean hospital stay was just over 2 weeks for hospitalized patients and almost 3 weeks for those admitted to critical care. The need for intubation was identified in a subgroup with a mortality of 100%, although there were only 2 cases.

DISCUSSION

Since the coronavirus pandemic began in Wuhan, China, this infection has spread throughout the worlds. The entire world population is susceptible to being infected, but there are some groups at higher risk owing to their immunosuppressive situation, including heart transplant recipients, in whom prevention of rejection during an infection continues to be a challenge. It is advisable to modify the immunosuppressive treatment according to the severity of the infection to try to protect heart transplant recipients. In this series, 3 risk groups were considered and it was found that patients with few symptoms have a good evolution; when respiratory symptoms (pneumonia) are present it is possible to control the infection with changes in immunosuppression. However, when the patient requires orotracheal intubation, the chances of survival are slim.

In this series, the prevalence of COVID-19 infection in heart transplant recipients was 5.2%. This coincides with the figures in the literature, although the prevalence is variable [1,2] in a country where the prevalence of infection in the general population is around 8% [3]. Most patients are men between the ages of 50 and 64 years, a profile similar to that described in other series of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 –infected heart transplant recipients [2]. None of the cases occurred early after transplantation. The reason for consulting these patients was the same as in the general population and published series of transplants [2]; that is, the presentation of fever, dyspnea, cough, and/or vomiting. Thirty percent of patients (6) did not require hospital admission, 60% (12) required hospital admission without the need for critical care, and only 2 patients (10%) required admission to the critical care unit—a distribution similar to that observed in previous studies [1].

Immunosuppression is common in heart transplant recipients [4], with treatment including CNIs, MMF, and corticosteroids. The usual strategy followed in transplant recipients infected with COVID-19 is to reduce immunosuppression [2,5]. In this series, immunosuppression was not reduced in patients with a

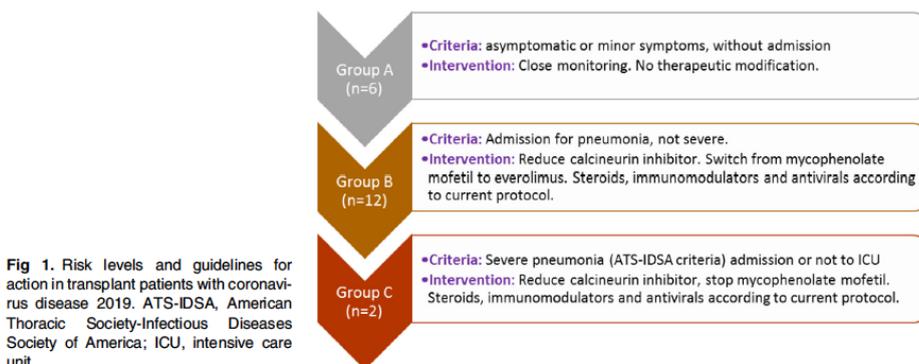


Fig 1. Risk levels and guidelines for action in transplant patients with coronavirus disease 2019. ATS-IDSA, American Thoracic Society-Infectious Diseases Society of America; ICU, intensive care unit.

Table 1. Clinical Profile and Therapeutic Approach According to Risk Group

	Group A (n = 6)	Group B (n = 12)	Group C (n = 2)
Age (y)	51.2 ± 17.5	59.9 ± 13.2	64.0 ± 14.6
Male sex, n (%)	5 (83)	11 (92)	2 (100)
Time since HTx (d)	2897 ± 2780	3777 ± 2462	1901 ± 2480
Reason for admission, n (%)			
Fever (with cough, dyspnea, or vomiting)	0 (0)	11 (92)	2 (100)
Dyspnea	0 (0)	2 (17)	2 (100)
Diarrhea	0 (0)	2 (17)	0 (0)
Chest x-ray, n (%)			
Normal	6 (100)	2 (17)	0 (0)
Pneumonia	0 (0)	10 (83)	2 (100)
QT prolongation, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ventricular arrhythmias, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Treatment during infection, n (%)			
Tacrolimus	4 (66)	5 (42)	1 (50)
Cyclosporine	2 (33)	7 (58)	1 (50)
MMF	5 (83)	0 (0)	0 (0)
Everolimus	1 (17)	12 (100)	0 (0)
Deflazacort	6 (100)	12 (100)	2 (100)
Antiviral treatment, n (%)			
Baricitinib	0 (0)	1 (8)	1 (50)
Remdesivir	0 (0)	1 (8)	0 (0)
Other treatments, n (%)			
Lopinavir + ritonavir	0 (0)	1 (8)	0 (0)
Chloroquine	0 (0)	4 (33)	0 (0)
Azithromycin	0 (0)	6 (50)	0 (0)
Steroid bolus	0 (0)	9 (75)	2 (100)
Other antibiotics	0 (0)	9 (75)	2 (100)
Supplemental O ₂ , n (%)			
Nasal cannulas	0 (0)	4 (33)	0 (0)
Venturi mask	0 (0)	2 (17)	0 (0)
OI	0 (0)	0 (0)	2 (100)
Days of admission	0 (0)	18.2 ± 23.8	19.0 ± 20.1
Exitus, n (%)	0 (0)	0 (0)	2 (100)

Data expressed as mean ± standard deviation or as otherwise noted. Two patients in group B died at the first and second month after infection owing to extra coronary disease causes (neoplasm of the colon and acute coronary syndrome).

HTx, heart transplant; MMF, mycophenolate mofetil; O₂, oxygen; OI, orotracheal intubation.

mild infection and the usual pattern was maintained, adjusting the CNI dose to the detected plasma levels. In group B, on the other hand, the CNI dose was reduced, as in other reported series [2], with the substitution of MMF for the mammalian target of rapamycin inhibitor EVE. This change was made because EVE reduces the risk of infection by other viruses, such as cytomegalovirus, by regulating factors involved in several cellular functions crucial for cytomegalovirus replication [6]. In contrast, MMF has traditionally been associated with viral infections and reactivations [7]. The change in immunosuppression was well tolerated. Only 2 of the 20 patients had poor evolution from the respiratory point of view, requiring orotracheal intubation. In this case, we opted for the suspension of MMF without substitution by EVE, reducing the dose of CNI, and maintaining or increasing if corticosteroid therapy was required. However, these 2 patients died. The mortality of the series was therefore 10%, lower than that reported in other registries [1,2], although the mortality in group 3 was 100% (2 patients).

CONCLUSIONS

A significant number of transplant recipients will be affected by COVID-19. Management of the infection will depend on the severity of the infection and should be based on a balance between reduction and adjustment of immunosuppression, strict control of the cardiologic situation, and treatment of the infection.

REFERENCES

- [1] García-Cosío M, Flores Hemán M, Caravaca Pérez P, López-Medrano F, Arribas F, Delgado Jiménez J. Heart transplantation during the coronavirus disease 2019 pandemic: follow-up organization and characteristics of infected patients. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2020;73:1077-80.
- [2] Bottio T, Bagozzi L, Fiocco A, Nadali M, Caraffa R, Bifulco O. COVID-19 in heart transplant recipients: A Multicenter Analysis of the Northern Italian Outbreak. *JACC Heart Fail* 2021;9:52-61.
- [3] Antonio L, Borraz M, Giménez M, Carrera P, González E, Ortíz C, et al. [Prevalence of SARS-CoV-2 coronavirus infection in patients and professional staff at a medium or long-stay hospital in Spain]. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2021;56:75-80 [in Spanish].

2746

LÓPEZ-VILELLA, SÁNCHEZ-LÁZARO, TRENADO ET AL

[4] González-Vílchez F, Almenar Bonet L, Crespo-Leiro MG, Gómez-Bueno M, González-Costello J, Pérez-Villa F, et al. Spanish Heart Transplant Registry. 31th Official Report of the Heart Failure Association of the Spanish Society of Cardiology. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2020;74:954–62.

[5] Sa MA, Ferna C, Defilippis EM, Farr MA, Givertz MM. Challenges in heart transplantation in the era of COVID-19. *Circulation* 2020;73:2048–51.

[6] Tan L, Sato N, Shiraki A, Yanagita M, Yoshida Y, Takemura Y, et al. Everolimus delayed and suppressed cytomegalovirus DNA synthesis, spread of the infection, and alleviated cytomegalovirus infection. *Antiviral Res* 2019;162:30–8.

[7] Song AT, Abdala E, Bonazzi PR, Bacchella T, Machado MC. Does mycophenolate mofetil increase the risk of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients? A mini-review. *Braz J Infect Dis* 2006;10:132–8.

10.3 Editorial artículo 1

10.3.1 Anexo 6: Unraveling the Causes of Primary Graft Dysfunction

Baran DA, Copeland H. Unraveling the Causes of Primary Graft Dysfunction. *Transplantation*. 2022;106(4):707-708.
doi:10.1097/TP.0000000000003799



Unraveling the Causes of Primary Graft Dysfunction

David A. Baran, MD, FACC, FSCAI, FHFA¹ and Hannah Copeland, MD²

Primary graft dysfunction (PGD) is one of the most significant challenges to successful heart transplantation in the modern era. With a uniform definition released by the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) in 2014,¹ hopes were high for progress towards reducing the incidence of this devastating complication, yet that has not been realized.

A variety of recipient factors have been associated with an enhanced risk of PGD, yet evidence remains limited and conflicting. Recipient age, diabetes, and treatment with amiodarone² have been associated with PGD,³ as has a history of prior ventricular assist device,⁴ and yet PGD continues to occur sporadically even without these risk factors present. It would be ideal to have a biomarker that would assess the risk of developing PGD, particularly the component that is independent of the specifics of the donor heart.

In this issue of *Transplantation*, Lozano-Edo et al⁵ present provocative evidence that measurement of plasma levels of Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a (SERCA2a) before transplantation correlates with the subsequent development of PGD. The study included 135 adults over a 10-y period of time with SERCA2a samples obtained within 2–6 hours before transplant. PGD was defined per ISHLT consensus recommendations.¹ At this center, durable mechanical circulatory support (MCS) devices were not available as a bridge to transplantation with the alternatives being Levitronix/Abbott Centrimag extracorporeal centrifugal MCS or extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). In all, 37 patients (27.4%) required temporary MCS or ECMO before transplantation. The rate of PGD was 21.4% for patients not requiring MCS before transplantation and 43.2% for those

needing ECMO or Centrimag support, a difference that was highly statistically significant ($P=0.011$).

The median SERCA2a level was 0.83 ng/mL in the patients without PGD but 0.43 ng/mL in those with any degree of PGD ($P=0.001$). Perhaps owing to small numbers, there was no statistically significant difference between mild PGD and severe PGD. When studied with multivariate analysis, the only independent risk factors for the development of PGD were the need for pretransplant temporary MCS, bilirubin level, and the SERCA2a level (with lower levels conferring higher risk of PGD). The findings are particularly striking when the combination of temporary MCS before transplant and low SERCA2a (<0.6 ng/mL) are combined with 71% of such patients experiencing PGD.

What can we learn from the current study? SERCA2a levels are not widely available and the evidence supporting the association is preliminary in nature. However, this study highlights several important points. First, PGD is associated with high mortality. Perhaps owing to the deleterious effects of cardiopulmonary bypass, transplant recipients with PGD are often quite ill with multisystem illness including acute renal failure, volume overload, and respiratory compromise. Consequently, despite circulatory support, the mortality of these patients is high. In the current report, the mortality of severe PGD patients was 35% at 1-mo posttransplant with 57% mortality for severe PGD (requiring MCS).

The authors are to be commended for examining patients over a 10-y period, but this only yielded 135 patients, with 37 having PGD. What is needed are large uniform datasets, but the ISHLT Thoracic Transplant registry and the United Network for Organ Sharing registries do not collect data on the incidence and types of PGD. This should change, as this would allow robust determination of causes across a multitude of sites, as opposed to the current single-center conflicting reports.

Perhaps the most important point from the study of Lozano-Edo et al⁵ is that it reminds us of the incredible complexity of the physiologic environment of critically ill patients, whether they be donors or transplant recipients. We do not fully understand the changes that occur when a patient is in shock, waiting for an organ transplant. The MCS devices themselves add an additional variable with the artificial surfaces and nonphysiologic continuous flow altering the environment.⁴

With the continual donor shortage, transplantation increasingly is an option reserved for the most critically ill patients or ones who have been on MCS devices for a protracted period of time.⁶ Therefore, the recipients are physiologically distinct from those who previously were

Received 11 April 2021.

Accepted 13 April 2021.

¹ Advanced Heart Failure Center, Sentara Heart Hospital, Norfolk, VA.

² Division of Cardiothoracic Surgery, Lutheran Hospital, Fort Wayne, IN.

D.A.B. is a Consultant for Getinge, Abbott, Abiomed, LivaNova, and Steering committee Procyon and CareDx, and Speaker for Pfizer. H.C. received consulting fees from Paragonix and Bridge to Life, and her spouse is a paid consultant for SynCardia.

D.A.B. wrote the primary draft and H.C. participated in the writing of the primary draft and critical revisions.

Correspondence: David A. Baran, MD, FACC, FSCAI, FHFA, System Director, Advanced HF, Tx and MCS, Sentara Heart Hospital, Advanced Heart Failure Center, 600 Gresham Dr., Norfolk, VA 23507. (docbaran@gmail.com).

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/20/1064-707

DOI: 10.1097/TP.00000000000003799

transplanted as outpatients, on oral medical therapy for heart failure. We are also pushed to make compromises on donor factors such as age as we try to get patients a transplant before they are too ill to survive the surgery.⁷

We are continually surprised when a “good” heart fails to perform as expected when implanted into a patient who is arguably “in flames,” although their monitor screens and laboratory values may appear reassuring.⁸ If the shock state was simply about inadequate cardiac output, then no patient would die with the availability of robust MCS, and yet, we know that this is not the case. We need to find ways to quantitate disturbances in the circulatory system that correlate with the development of PGD.

The current treatment of PGD is evolving with ECMO becoming one of the preferred options for management.^{9,10} It is a primitive approach compared with the precision with which we approach other medical problems. In essence, since we do not understand the pathophysiology of PGD, we support the transplant recipient with complication prone ECMO and wait for the “flames to burn out” and the heart to recover. We need to find the proper “fire extinguisher” for this devastating complication rather than the supportive care approach we currently have in our limited armamentarium.

The search for blood biomarkers that can predict PGD should intensify and ideally be organized to allow multi-institutional experiences to be pooled. Understanding and quantifying the “hostile host” will not only improve the outcomes of transplantation but hopefully lead to treatments that may have benefits far beyond the realm of transplantation. As we understand the complex spiral of PGD, we will hopefully have insight into the mechanisms that lead to potentially related issues such as vasoplegia and sepsis-related cardiomyopathy. The lessons learned

as we unravel the mysteries of PGD will carry forward to other areas of critical care and positively impact lives beyond those of transplant recipients.

REFERENCES

1. Kobashigawa J, Zuckermann A, Macdonald P, et al; Consensus Conference participants. Report from a consensus conference on primary graft dysfunction after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2014;33:327–340.
2. Wright M, Takeda K, Mauro C, et al. Dose-dependent association between amiodarone and severe primary graft dysfunction in orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36:1226–1233.
3. Singh SSA, Dalzell JR, Berry C, et al. Primary graft dysfunction after heart transplantation: a thorn amongst the roses. *Heart Fail Rev.* 2019;24:805–820.
4. Truby LK, Farr MA, Garan AR, et al. Impact of bridge to transplantation with continuous-flow left ventricular assist devices on posttransplantation mortality. *Circulation.* 2019;140:459–469.
5. Lozano-Edo S, Sánchez-Lázaro I, Portolés M, et al. Plasma levels of SERCA2a as a noninvasive biomarker of primary graft dysfunction after heart transplantation. *Transplantation.* 2022;106:887–893.
6. Immohr MB, Boeken U, Mueller F, et al. Complications of left ventricular assist devices causing high urgency status on waiting list: impact on outcome after heart transplantation. *ESC Heart Fail.* 2021;8:1253–1262.
7. Galeone A, Lebreton G, Coutance G, et al. A single-center long-term experience with marginal donor utilization for heart transplantation. *Clin Transplant.* 2020;34:e14057.
8. Stone ML, Everett MD. Primary graft dysfunction: worry less about organ quality and do more to improve candidate condition. *J Heart Lung Transplant.* 2019;38:609–610.
9. DeRoo SC, Takayama H, Nemeth S, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for primary graft dysfunction after heart transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2019;158:1576–1584.e3.
10. Kawabori M, Mastroianni MA, Zhan Y, et al. A case series: the outcomes, support duration, and graft function recovery after VA-ECMO use in primary graft dysfunction after heart transplantation. *J Artif Organs.* 2020;23:140–146.

