



Trasplantaments d'òrgans

Introducció

La recerca científica, com tots els tipus de recerca, es basa inicialment en una hipòtesi que hom es formula. Aquesta sorgeix després d'haver situat el seu saber en la literatura que mostra l'estat actual del coneixement en el camp que s'està estudiant. Entre les moltes preguntes que ens podem formular n'existeix una per la qual podem tenir una idea, tot i que sigui errònia, sobre la seva resolució. Seguidament, es tracta de formular la hipòtesi inicial i tota l'experimentació conseqüent per provar de resoldre-la.

L'article que presentem a continuació pretén mostrar de forma intel·ligible el recull d'un seguit d'experimentacions que s'han dut a terme per demostrar o corregir una hipòtesi inicial. Tot sorgeix a partir d'una idea ja sigui inspirada a partir de la literatura existent o fins i tot d'una idea original en un dia d'inspiració. El fet és que de tots els temes possibles existents en la medicina actual ens varem centrar en els trasplantaments d'òrgans, i de forma més precisa en el rebuig que s'estableix davant aquests òrgans trasplantats. Encara existeixen molts interrogants respecte al rebuig, a quina n'és la causa, a com aturar-lo, a evitar-ne les conseqüències. Per tant, el ventall de temes per tractar és força ampli.

Els trasplantaments d'òrgans

Per definició, en botànica, el trasplantament consisteix a canviar un vegetal d'un lloc a un altre. En el regne animal parlem de trasplantaments d'òrgans quan es canvia un òrgan de lloc, és a dir, entre un donant (que cedeix l'òrgan) i un receptor (que rep l'òrgan).

Aquesta pràctica s'utilitza per canviar un òrgan defectuós per un altre de plenament funcional i així poder restablir la seva funció.

Josep Maria Pujal i Reyes

Doctor en ciències
biològiques i investigador
al Laboratori de Recerca
Translacional de l'Institut
Català d'Oncologia



Josep Maria Pujal i Reyes

Influència del microquimerisme hematopoètic en l'establiment del rebuig en trasplantaments d'òrgans sòlids

Cal destacar que existeixen diferents tipus de trasplantaments, com ara els autotrasplantaments (quan l'òrgan prové d'un mateix individu), els isotrasplantaments (entre dos individus idèntics), els al·lotrasplantaments (entre individus d'una mateixa espècie) i els xenotrasplantaments (entre individus d'espècies diferents).

Des dels inicis del segle XX, hi ha hagut nombrosos avenços en el camp de la cirurgia del trasplantament d'òrgans i teixits, i principalment en el camp de la recerca bàsica, que ha permès la identificació dels mecanismes responsables del rebuig i de la compatibilitat entre teixits (anomenada histocompatibilitat) i sobretot un considerable augment de la supervivència dels pacients trasplantats.

1. Definicions

El terme quimera o quimèric s'utilitza habitualment i de forma metafòrica com a concepte per descriure algun element que conté atributs híbrids o combinats procedents de dues o més fonts diferents.

En el món de la biologia, un organisme o un teixit creat a partir de dues o més fonts genètiques diferents és denominat quimèric. En medicina, els pacients sotmesos a trasplantaments, i per tant compartint dues o més fonts genètiques, tenen la particularitat de ser quimèrics o de tenir un grau de quimerisme.

2. Efectes del quimerisme

Les primeres observacions en el camp del quimerisme es van realitzar de la mà del grup d'Owen (1) l'any 1945, que va ressaltar el fet que, en vedells, els bessons no idèntics que neixen amb comunicacions en els vasos (anomenades anastomosis vasculars) entre les seves placentes compartien grup sanguini. Tanmateix, Billingham (2) va realitzar trasplantaments de pell entre aquest tipus d'animals i va observar que els empelts de pell sobreviuen indefinidament, fins i tot amb la presència de

discrepàncies en sexe. Per tant, el quimerisme resultant de l'intercanvi de cèl·lules entre els dos vedells no idèntics seria responsable de l'acceptació del trasplantament de pell.

Més tard, el mateix grup de Medawar, Billingham i Brent (3) va descriure el fenomen com a tolerància immunològica adquirida (*actively acquired immunological tolerance*). Van induir quimerisme injectant cèl·lules de la melsa del donant en ratolins nous (que encara són immunològicament incompetents), que, en estat adult, es tornaren tolerants als empelts de pell del mateix donant però que rebutjaven altres trasplantaments de pell d'altres donants. També van hipotetitzar que la iniciació de la tolerància requeria una supressió transitòria del sistema immunològic, que aquest quimerisme induïa o mantenia la tolerància i que aquesta es definia com l'absència d'immunitat donant-específica.

El concepte de microquimerisme va ser introduït per primer cop pel grup de Monaco i Wood (4) (i més recentment revisat (5)), en descriure l'associació entre la persistència de cèl·lules originàries del moll de l'os del donant en el receptor i la supervivència dels empelts de pell en ratolins amb injeccions de moll de l'os del mateix donant. Més tard, el grup d'Starzl (6, 7) va definir el fenomen del microquimerisme i en va descriure l'associació amb la supervivència a llarg termini de pacients trasplantats de ronyó o de fetge. Va definir el microquimerisme com la presència d'un nombre de cèl·lules del donant inferior a l'1% de les cèl·lules del receptor en sang perifèrica. També va descriure les observacions realitzades en els diferents contextos de trasplantament i de rebuig.

En el microquimerisme, la quantitat de cèl·lules del donant és molt minoritària i actualment la manera més fiable per a llur detecció és emprant tècniques de biologia molecular, que en rares ocasions poden ser verificades per altres tècniques, a causa, sobretot, de llur sensibilitat.

3. Premissa

L'encara massa alta prevalença d'episodis de rebuig que posen en perill la funció de l'òrgan i s'insinuen com a factors negatius en la supervivència de l'empelt i fins i tot del receptor han estat el punt de sortida per a l'estudi. Inicialment, ens va motivar la idea remota de poder establir un sistema predictiu que permetés identificar els pacients amb més risc de rebuig i així afavorir un seguiment més exhaustiu en aquest grup.

D'un punt de vista més immunobiològic, existeix encara molta ambigüitat respecte a la detecció de quantitats tan ínfimes de cèl·lules del donant en la sang perifèrica dels pacients després d'un trasplantament d'un òrgan sòlid. També, en els casos en què s'ha descrit la presència de cèl·lules del donant existeix encara molta disparitat d'opinions respecte al possible efecte tolerogènic d'aquestes cèl·lules.

4. Hipòtesi

La presència de cèl·lules circulants del donant en sang perifèrica del receptor posttrasplantament d'òrgan sòlid s'associaria a una menor incidència de rebuig de l'òrgan.

5. Objectius de l'estudi

- a) Estandardització de tècniques moleculars i reproduïbles per a la detecció específica de cèl·lules del donant en un receptor posttrasplantament.
- b) Determinació de la incidència real de microquimerisme hemopoètic en pacients trasplantats de ronyó, cor i fetge. Si existeix, establir el nombre de cèl·lules circulants en cada trasplantament i finalment, la cinètica d'establiment i del manteniment (perdurança) d'aquest microquimerisme.
- c) Determinació de la relació entre la incidència de rebuig i la presència de microquimerisme. Determinar la presència d'alteracions clíniques degudes a la presència

de microquimerisme posttrasplantament (variacions en la incidència d'infeccions...).

d) Establiment d'una escala de risc de rebuig aplicable a nous trasplantaments.

Resultats

Tenint en compte la gran quantitat d'articles que han descrit alguns dels aspectes relacionats amb la tolerància en els trasplantaments d'òrgans, el nostre objectiu era, sens dubte, provar de descriure de forma exclusiva-ment observacional un dels aspectes inexplicats a hores d'ara: la persistència de cèl·lules del donant després del trasplantament o microquimerisme.

Existeixen nombroses teories per intentar explicar aquest fenomen. La seva presència ha estat dubtosa fins a l'aparició de la biologia molecular, que sembla que unifica algunes de les experimentacions realitzades en ratolins, primats o fins i tot humans. El seu rol queda totalment inexplicat i les conseqüències de la presència d'aquestes cèl·lules del donant no estan actualment definides.

Una lectura del recull bibliogràfic actual sobre aquest tema ens mostra que moltes de les experimentacions dutes a terme es realitzen en temps diferents, amb equips diferents i, per a moltes, amb conclusions diferents i fins i tot contradictòries.

A causa d'aquesta falta de consens i per poder contribuir a aportar alguna observació a aquest fenomen, el nostre estudi es va basar a descriure i demostrar l'existència i les conseqüències de la presència d'aquest microquimerisme en els pacients.

Els resultats d'aquest estudi estan dividits en tres línies de treball. Així, descrivim en primer lloc la validació de les diferents tècniques que van ser utilitzades en la resta de l'estudi. A causa de la falta de consens actual en l'homogeneïtzació de les tècniques moleculars per a la determinació de l'existència del microquimerisme, vàrem creure que era fonamental centrar la primera part

Publicacions resultants de l'estudi

Should microchimerism turn into rejection prophylactics?

Pujal JM.

Expert Rev Mol Diagn. 2010 Jan;10(1):107-18. Review.PMID: 20014925

PCR-based methodology for molecular microchimerism detection and quantification

Pujal JM, Gallardo D.

Exp Biol Med (Maywood). 2008 Sep; 233(9):1161-70. Epub 2008 Jun 5. PMID: 18535170

Early hematopoietic microchimerism predicts clinical outcome after kidney transplantation.

Pujal JM, Grinyó JM, Gil-Vernet S, Caldes A, Hernández P, Mestre M, Encuentra M, Perez-Garcia A, Gallardo D.

Transplantation. 2007 Nov 15; 84 (9): 1103-11. PMID: 17998864

Influence of hematopoietic microchimerism in organ tolerance after kidney or heart transplantation.

Pujal JM, Grinyó JM, Manito N, Gil-Vernet S, Hueso M, Caldes A, Costa S, Benítez D, Grañena A, Gallardo D.

Transplant Proc. 2003 Aug; 35(5): 1775-7. PMID: 12962791

Frequency of HLA-DPB1 disparities detected by reference strand-mediated conformation analysis in HLA-A, -B, and -DRB1 matched siblings.

Büchler T, Gallardo D, Rodríguez-Luaces M, Pujal JM, Grañena A. Hum Immunol. 2002 Feb; 63(2): 139-42. PMID: 11821161

de l'estudi en la validació d'aquestes tècniques, cosa que ens permetria en segona instància confirmar l'existència de la persistència de cèl·lules del donant en la sang perifèrica del receptor. Així, la segona part dels resultats se centra en la detecció d'aquestes cèl·lules originàries del donant en els pacients trasplantats, llur evolució en el temps i la relació de llur presència amb el rebuig de l'òrgan. Finalment, centrem la darrera part de l'estudi en la recerca de factors que hagin estat alterats per la presència d'aquest microquimerisme en els pacients trasplantats. En aquesta tercera fase, basant-nos en els resultats de la segona fase, varem cercar alteracions en les quantitats globals de cèl·lules en sang perifèrica i en l'aparició de tipus cel·lulars especialitzats involucrats en la tolerància.

L'estudi dels mètodes emprats ha permès establir quins d'ells són millors per a la detecció del microquimerisme i definir al mateix temps els que es podrien utilitzar per a la detecció de quimerisme en trasplantaments de moll de l'os. Així, per expressar-ho de forma més grollera, ja teníem més eines per poder trobar l'agulla en el paller. Seria impertinent qualificar la no-detecció com a absència de microquimerisme, ja que els mètodes presentats exhibeixen limitacions pròpies, inherents a les mateixes tècniques, i entre d'altres, a les dilucions i al nombre de rèpliques necessàries a la seva identificació.

Consegüentment, és lògic pensar que existeixen nivells inferiors de microquimerisme que els que varem poder detectar en el nostre estudi. És el que podríem anomenar nanoquimerisme.

Cal destacar també que l'aplicabilitat d'aquests mètodes no només es limita als trasplantaments d'òrgans sòlids o de moll de l'os, sinó que també podrien ser utilitzats per a la identificació de microquimerisme fetal i/o la identificació del sexe de fetus en els primers mesos de l'embaràs (8, 9), o fins i tot per a la identificació d'individus i de restes orgàniques en criminologia.

Un cop enllestida la fase d'estandardització de l'arsenal tècnic, el següent pas era l'aplicació en un context clínic. Després d'haver identificat tots els polimorfismes no compartits entre donants i receptors es va procedir a la recerca personalitzada del microquimerisme.

La detecció de microquimerisme en més de la meitat dels trasplantaments de ronyó i de cor al cap de dos mesos posttrasplantament va permetre en primer lloc validar les tècniques en el context clínic. Tanmateix, podem dir que el microquimerisme no era ni un fenomen aïllat ni un artefacte, o si més no, que es tractava d'un fenomen altament reproducible i detectable. A més, tal com s'havia publicat prèviament (10-11), la gran majoria de pacients trasplantats de fetge presentaven cèl·lules del donant circulants en sang perifèrica.

També es va poder verificar que la quantitat de cèl·lules detectades era proporcional a la massa de l'òrgan trasplantat; així trasplantaments de ronyó i cor presentaven menys cèl·lules que els trasplantaments de fetge. Es va poder comprovar que en trasplantaments de fetge, a més llarg termini, la quantitat de cèl·lules detectades continuava sent superior als trasplantaments d'òrgans de massa més reduïda. D'altra banda també és conegut que, entre d'altres factors, el renovament cel·lular del fetge podria contribuir a magnificar aquesta diferència (12, 13).

Vàrem observar, d'acord amb altres publicacions, una pèrdua progressiva de la detecció del microquimerisme al llarg del temps. Evolució que el qualifica de fenomen evolutiu i no estàtic.

Així, com a prova d'aquesta activitat, vàrem mostrar que el microquimerisme no existia moments previs al trasplantament i que, posteriorment al desclampatge de l'òrgan, aquest apareixia i evolucionava durant les tres primeres hores. Evolució que mantenia els nivells constants entre el setè dia i el segon mes posttrasplantament i amb el segon mes com el punt a partir del qual comen-

Referències bibliogràfiques

1. Owen RD. "Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins." *Science*. 1945; 102: 400.
2. Billingham RE, Reynolds J. "Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions." *Br J Plast Surg*. 1952 Apr; 5(1): 25-36.
3. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. "Acquired tolerance of skin homografts." *Ann N Y Acad Sci*. 1955 Jan 24; 59(3): 409-16.
4. Monaco AP, Liegeois A, Wood ML. "Advances in Nephrology." 1975:p.135.
5. Monaco AP. "Tolerance and chimerism: separate and unequal concepts." *Transplant Proc*. 2002 Sep; 34(6): 1991-7.
6. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, et al. "Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance;" 1993.
7. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. "Cell migration, chimerism, and graft acceptance." *Lancet*. 1992 Jun 27;339(8809):1579-82.
8. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. "Direct quantification of fetal cells in maternal blood by realtime PCR." *Prenat Diagn*. 2006 Sep; 26(9): 850-4.
9. Piper KP, McLarnon A, Arrazi J, Horlock C, Ainsworth J, Kilby MD, et al. "Functional HYSpecific CD8+ T cells are found in a high proportion of women following pregnancy with a male fetus."

Biol Reprod. 2007 Jan;76(1):96-101.

10. Domiati-Saad R, Klintmalm GB, Netto G, Agura ED, Chinnakotla S, Smith DM. "Acute graft versus host disease after liver transplantation: patterns of lymphocyte chimerism." *Am J Transplant.* 2005 Dec; 5(12): 2968-73.

11. Calne R, Davies H. "Organ graft tolerance: the liver effect." *Lancet.* 1994 Jan 8; 343(8889): 67-8.

12. Benseler V, McCaughan GW, Schlitt HJ, Bishop GA, Bowen DG, Bertolino P. "The liver: a special case in transplantation tolerance." *Semin Liver Dis.* 2007 May;27(2):194-213.

13. Starzl TE, Lakkis FG. "The unfinished legacy of liver transplantation: emphasis on immunology." *Hepatology.* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S151-63.

14. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, et al. "HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression." *N Engl J Med.* 2008 Jan 24; 358(4): 353-61.

ça la seva davallada fins a ser indetectable als 18 mesos. Aquest estudi cinètic d'establiment del microquimerisme en un trasplantament doble de ronyó va mostrar la posada en circulació d'un primer pool de cèl·lules del donant amb el primer ronyó i d'un segon pool amb el segon òrgan, que s'addicionava al primer. Els trasplantaments d'un únic òrgan mostraven així l'aparició massiva d'un sol pool, que era també més elevat en trasplantaments de fetge que en cor o ronyó.

Els resultats obtinguts varen suggerir que el microquimerisme era un factor clarament involucrat en l'absència de rebuig en una anàlisi univariant, juntament amb la quantitat d'aliells d'HLA-DRB1 compartits. En l'anàlisi multivariant, aquests dos factors es varen mantenir com a elements implicats en la reducció del rebuig. Conseqüentment es va cercar la relació entre ambdós elements i es va descartar qualsevol lligam, amb dos fenòmens distints i independents i que la presència d'un no comprometia la presència de l'altre, en ambdós sentits.

Així doncs, sobre la base dels nostres resultats, la determinació i monitorització precoç de la presència o no de microquimerisme hematopoètic després d'un trasplantament d'òrgan sòlid podria ser d'utilitat per identificar pacients amb menor risc de rebuig, i, sobre la base d'aquesta determinació, es podrien dissenyar protocols de retirada (o reducció) de la immunosupressió farmacològica per a pacients seleccionats, per intentar reduir el risc d'infeccions i de síndromes limfoproliferatius post-trasplantament. Queda oberta la porta per a les estratègies d'immunomodulació amb cèl·lules hematopoètiques del donant per forçar la presència de microquimerisme. Iniciatives que han estat dutes a terme en humans recentment (14).