



Josep M. Pujal i Reyes

Doctor en immunologia (UB), Maîtrise en Biologie cellulaire et physiologie (U. Paul Sabatier III). Director del Laboratori de Processament Cel·lular de Seville Cells i cap de laboratori d'investigació en teràpies cel·lulars del Parc Científic de la Universitat de Girona

En aquesta xerrada es va presentar el procediment científic que es va seguir durant el desenvolupament de la tesi doctoral en immunologia. Aquesta ponència 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 literatura existent o fins i tot d'una idea original d'un dia d'inspiració. El fet és que de tots els temes possibles de la medicina actual ens vam centrar en els trasplantaments d'òrgans i, més en concret, en el rebuig que s'estableix enfront d'aquests òrgans trasplantats. Encara hi ha molts interrogants respecte al rebuig, com quina n'és la causa, com aturar-lo i com evitar-ne les conseqüències. Per tant, el ventall de temes per tractar és força ampli.

La idea inicial va sorgir en tenir en compte que molts dels pacients que rebien un òrgan encara presentaven episodis de rebuig, que en algunes ocasions els podia provocar danys més greus i, fins i tot, la pèrdua de funció de l'òrgan trasplantat. En el cas dels trasplantaments de ronyó, aquesta pèrdua suposava tornar a diàlisi però en el cas de trasplantaments de fetge o de cor podia ser fatal.

Actualment hi ha fàrmacs destinats a evitar el rebuig i que el pacient ha de prendre de forma crònica. Aquests mateixos fàrmacs poden tenir una sèrie d'efectes no desitjats que a llarg termini poden suposar una càrrega important per a l'equilibri de l'organisme del pacient trasplantat. Aquests efectes secundaris poden arribar fins i tot a perjudicar la salut del pacient. Tot i que actualment científics d'arreu del món treballen per reduir aquests efectes secundaris, encara són massa presents en els pacients. La investigació actual en aquest camp cerca tots els mitjans possibles per aconseguir finalment un trasplantament que pugui ser acceptat directament sense tenir altres conseqüències indesitjables, o reduint-les al màxim.

Amb aquest estudi volíem aportar algun coneixement a la comunitat científica per poder evitar aquest tipus d'incidents i fer que els pacients trasplantats puguin tenir un ritme de vida



Josep M. Pujal i Reyes

Conferència plenària

A la recerca de la recerca

al més normal possible, evitant al màxim les complicacions. El contingut íntegre de l'experimentació l'han elaborat professionals de l'àmbit dels trasplantaments, sobretot amb la col·laboració dels pacients, ja que sense ells aquest estudi no hauria estat possible. L'estructura de l'article es presentarà inicialment amb una introducció en el tema dels trasplantaments i, en segon lloc, amb la hipòtesi que ens vam formular abans d'iniciar l'estudi i els objectius plantejats. Tot seguit es presentaran tots els mètodes emprats per desenvolupar el projecte i les tècniques utilitzades. Òbviament seguirà aquest apartat l'enumeració dels resultats obtinguts per respondre a tots els objectius plantejats. Finalment es proposarà una conclusió de l'estudi i un plantejament més global dels resultats obtinguts enfront a literatura existent sobre el tema.

Els trasplantaments d'òrgans

El somni de l'home de poder volar com un ocell o la també comparable recerca de la immortalitat poden ser atribuïbles a qualsevol individu en qualsevol època. La idea de renovar els membres fracturats i irreparables o els òrgans defectuosos o vells, tot reemplaçant-los, sempre ha perseguit l'ésser humà en la seva cerca de la immortalitat.

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 el rep). Aquesta pràctica s'utilitza per canviar un òrgan defectuós per un altre de plenament funcional i així poder restablir-ne la funció.

Cal destacar que hi ha 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). Actualment, el trasplantament d'òrgans és la millor, o potser l'única, tècnica terapèutica d'elecció per al reemplaçament d'un òrgan el funcionament del qual s'ha deteriorat de forma irreversible.

En un trasplantament realitzat a partir d'un individu de la mateixa espècie (al·lotrasplantament), l'individu trasplantat esdevindrà quimèric, és a dir, que presentarà cèl·lules d'un

altre origen genètic en el seu organisme. Per tant, podran conviure dues formes de DNA dins del mateix individu. El terme de Quimerisme (figura 1) deriva d'un ésser format per varis éssers (cap de lleó i de cabra i cua de drac) anomenat Quimera.

Trobem formes naturals de quimerisme en dones embarassades. Després de la fecundació, la nova cèl·lula composta per DNA de la mare i DNA del pare (DNA estranger en el cos de la mare). El desenvolupament fetal passa en primera instància per una fase d'invasió de territori matern, que modificarà per a poder sobreviure i desenvolupar-se. Aquesta modificació passa per a una invasió i digestió de teixits per cèl·lules especialitzades fetals i, entre altres, una modificació dels vasos per a poder suplir la resta del futur embrió de nutrients i oxigen. En la figura 2 presentem una part de la placenta en el que podem observar la presència de cèl·lules d'origen matern i cèl·lules d'origen fetal (cromosoma X marcat en verd i cromosoma Y marcat en vermell).

1. Immunobiologia del trasplantament: El sistema immunològic i el rebuig de l'òrgan trasplantat

Per garantir la supervivència de l'individu davant d'agressions externes, hi ha un sistema de protecció de l'organisme anomenat *sistema immunològic*. La funció d'aquest sistema consisteix en primera instància a diferenciar entre el propi i el no propi, és a dir, a diferenciar entre el que pertany a l'organisme de l'individu i el que li és estrany. Un cop efectuada aquesta diferenciació primordial, aquest sistema de vigilància procedeix a l'exterminació de l'intrús i, junt amb altres mecanismes fisiològics, al restabliment d'un equilibri primordial per a la vida (figura 3).

A diferència d'una situació considerada normal, en un trasplantament d'òrgan s'introdueixen una sèrie de components (anomenats *antígens*) que són estranys a l'organisme hoste i que provenen de l'altre individu que ha cedit l'òrgan en qüestió. Malgrat tractar-se de trasplantaments entre individus d'una mateixa espècie (anomenats *al·lotrasplantaments*), hi ha una gran quantitat de molècules que caracteritzen la individualitat. Entre d'altres, podem destacar algunes de les diferències més significatives, com ara el grup sanguini o la compatibilitat entre teixits (que també anomenem *histocompatibilitat*). Aquesta darrera

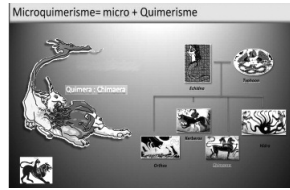


Figura 1 Chimaera, segons la mitologia grega, era fill de Typhoon i Echidna i germà d'Orthos, Kerberos i Hydra

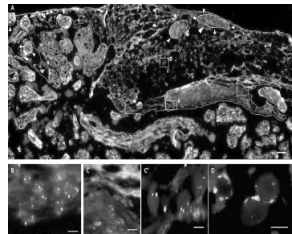


Figura 2 Placenta que mostra cèl·lules d'origen matern (2 cromosomes x (verd)) (B) i fetal (1 cromosoma x (verd) i un cromosoma Y (vermell)). Es pot observar la invasió del territori per cèl·lules d'origen fetal i també es pot observar la convivència dels dos tipus de cèl·lules en les fotografies (C i D)

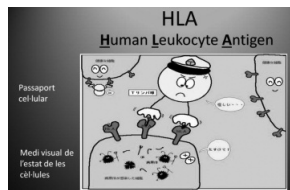


Figura 3 Il·lustració de reconeixement cel·lular en cas de propi i d'infecció viral

representa una barrera important per a l'acceptació de l'òrgan trasplantat, ja que el sistema immunològic reconeix principalment aquest tipus de diferències (la histologia representa l'estudi dels teixits, de gran importància en els trasplantaments, ja que les incompatibilitats entre teixits engendren l'aparició del rebuig).

1.1. El funcionament del sistema immunològic

Les cèl·lules del sistema immunològic neixen en el moll de l'os, juntament amb els eritròcits, els monòcits, granulòcits i d'altres. El moll de l'os conté progenitors anomenats *cèl·lules mare*, que són responsables de fer néixer les diferents descendències. Hi ha globalment dues línies, la línia mieloide, que proporcionarà els glòbuls vermells, les plaquetes, els monòcits, els granulòcits i l'altra línia, anomenada *limfoide*, que, com el seu nom indica, donarà com a descendència els limfòcits. Per entrar més en detall en el sistema immunològic, podem dir que es divideix en dos tipus, el sistema innat i el sistema adquirit. Com a innat entenem el sistema més primitiu i que és indiferent de l'especificitat de l'antigen. Es tracta del primer contacte que té l'antigen quan penetra en l'organisme. És la primera línia de defensa i està compost, entre d'altres, pels elements bioquímics que formen el complement, les cèl·lules que poden captar l'antigen (macròfags i CPA), els granulòcits...

2. Una alternativa al rebuig: la tolerància

2.1. Definició

En el camp de la immunologia, la tolerància es defineix com la no reactivitat del sistema immunològic (SI) a un determinat grup d'antígens, quan aquest manté una reactivitat normal en tots els altres. Per això, la tolerància és específica. La definició funcional de tolerància des del punt de vista del trasplantament és l'acceptació de l'òrgan a llarg termini sense immunosupressió exògena.

Actualment moltes tasques d'investigació treballen en mecanismes de tolerància per part del receptor, fet que consistiria a aconseguir que el receptor pogués tolerar específicament el donant sense haver de ressentir-se en el reconeixement de la resta dels antígens per aquest motiu. Es a dir que es cerca que es toleri l'òrgan implantat i al mateix temps que el SI sigui capaç de lluitar contra agressions externes amb la mateixa eficàcia. En el món de la investigació,

aquesta cerca s'anomena "la recerca del Sant Grial", ja que aconseguir la tolerància immunològica envers l'òrgan trasplantat suposaria, entre d'altres, retirar la immunosupressió crònica en el pacient, aconseguir un estat estable en què l'òrgan no seria rebutjat de forma contínua però el SI del pacient continuaria actiu enfront a agressions externes. El més important potser seria el fet que podríem traspasar la barrera entre espècies i aconseguir trasplantar òrgans d'altres espècies a humans: assolir amb èxit el xenotrasplantament. Aquest fet permetria obtenir més òrgans i consegüentment reduir de forma dràstica les llistes d'espera dels pacients a trasplantament.

2.2. Actors i mecanismes

El sistema immunològic contempla per se una part de la seva educació destinada a la tolerància i/o evitar l'aparició de cèl·lules autoimmunes. També, després de la repressió dels antígens estrangers o en el cas de l'existència d'autoimmunitat, preveu un sistema de regulació per evitar una hiperestimulació o bé l'estimulació crònica dels actors de la immunitat. Aquesta regulació perifèrica, és a dir que té lloc fora del timus, preveu una frenada de l'activació dels limfòcits un cop ja han eliminat l'antigen diana o, en el cas de cèl·lules autoreactives, evitar que s'activin o, un cop estan activades, reprimir-les o anul·lar-ne l'activació.

2.2.1. Mecanismes perifèrics

Degut a l'absència o la representació insuficient d'alguns antígens en el timus per provocar l'eliminació completa de cèl·lules considerades autoreactives, algunes cèl·lules poden "escapar" d'aquest primer mecanisme de control. Per això hi ha una sèrie de sistemes perifèrics per controlar la presència de cèl·lules que s'hagin "escapat" del sistema de control central. Fet que es traduiria per l'existència de cèl·lules T autoreactives en sang perifèrica. Així, s'aconsegueix evitar mecanismes d'autoimmunitat i frenar una resposta immunològica a un antígen estranger quan ja ha estat eliminat. Per tant, l'existència de mecanismes de regulació perifèrics esdevé una peça fonamental en l'equilibri del sistema immunològic (ja que una resposta mantinguda pot esdevenir crònica i una inflamació mantinguda pot ser molt nefasta per als teixits o per a l'individu).

2.2.1.1. Anèrgia

L'anèrgia és un mecanisme de tolerància perifèrica que condueix a una inactivació funcional de cèl·lules T autoreactives (o considerades autoreactives). Inicialment es va descriure com un procés d'activació incomplet que succeeix quan un limfòcit T, que està en procés d'activació amb una CPA no ha completat la seva activació amb altres senyals de coestimulació.

En un procés d'activació correcte, la cèl·lula que presenta l'antigen (CPA) ha de permetre l'activació del limfòcit mitjançant un senyal coestimulador que transmet al limfòcit. Així, l'anèrgia es produeix quan el limfòcit no s'activa. Actualment s'ha descrit que hi ha molècules accessòries, com per exemple CTLA-4, que podrien induir aquesta falta de coestimulació.

2.2.1.2. Deleció

És possiblement el sistema de control més eficient per erradicar la presència de cèl·lules T autoreactives, ja que permet l'eliminació del perill potencial sense l'amenaça constant d'una possible reactivació. La deleció consistiria en l'eliminació d'aquestes cèl·lules i podria ser induïda en limfòcits autoreactius que rebrien una estimulació prolongada degut a la gran quantitat d'autoantigen present, i que entrarien en apoptosi.

2.2.1.3. Supressió de l'activació

La supressió és el mecanisme associat als limfòcits T reguladors. Poden suprimir l'activitat de les cèl·lules T autoreactives i/o activades que han "escapat" del sistema de deleció central. La supressió de l'activació dels altres limfòcits T s'efectuaria gràcies a un contacte cèl·lula-cèl·lula, que s'anomena la tolerància mediada per cèl·lules T.

2.2.1.4. Les cèl·lules T reguladores

Aquests limfòcits T reguladors o Treg es caracteritzen, en primer lloc, per ser CD4 positius, és a dir, que pertanyen a la classe de limfòcits anomenats *helper* o *mediadors de la immunitat*. Aquests Treg correspondrien a la subclasse Th3 dels limfòcits T *helper*, tenint en compte que els Th1 i Th2 corresponen als T *helper* mediadors de la resposta immunitària cel·lular (activació dels limfòcits T CD8+

citotòxics) i humoral (activació dels limfòcits B), respectivament. Aquest tipus de cèl·lules serien essencials en la prevenció de l'autoimmunitat i en el control i la direcció de la resposta immunològica.

Les cèl·lules T reguladores que inhibeixen el rebuig de l'òrgan han estat identificades en models animals amb tolerància adquirida a l'empelt i són aparentment similars a les Treg, normalment presents en individus no trasplantats (és a dir, les reguladores de naturals del sistema immunològic). Es creu que en humans es podria cultivar *in vitro* aquest tipus de cèl·lules Treg com a teràpia cel·lular d'inducció de tolerància en trasplantaments i autoimmunitat.

Aquestes cèl·lules Treg, a part de tenir el marcador CD4+, tenen en la superfície cel·lular el marcador CD25 en altes quantitats. La presència de grans quantitats d'aquest marcador permet diferenciar aquestes cèl·lules de la resta de limfòcits T *helper*.

Hi ha, però, un altre marcador intracel·lular que permet diferenciar aquests Treg; es tracta d'un factor anomenat FOXP3. Mutacions naturals o generades mitjançant experimentacions i que inactiven aquest marcador poden provocar l'aparició de malalties autoimmunes, ja sigui en ratolins (experimentació) o fins i tot s'ha descrit en humans. Efectivament alguns pacients amb malaltia autoimmuna específica han demostrat que tenen mutacions en el gen FOXP3 responsable de la creació del marcador FOXP3 de la cèl·lula.

2.3. Un cas diferent: el sistema hepàtic

Immunològicament el fetge sembla que té un paper diferent, ja sigui pel que fa a la resposta intrahepàtica o d'immunitat sistèmica. Igual que en molts altres òrgans, el tractament d'elecció per a malalties hepàtiques irreversibles i terminals és el trasplantament. A diferència de la pell, el ronyó o el cor, els trasplantaments de fetge poden beneficiar-se d'una acceptació per part de receptor fins i tot sense immunosupressió. Efectivament, és l'únic que pot ser acceptat de forma espontània i per un temps indefinit fins i tot en total incompatibilitat de teixits, com ja ha estat demostrat en algunes espècies. En canvi, altres trasplantaments amb les mateixes incompatibilitats ofereixen ràpidament un rebuig. No obstant, aquesta acceptació no repercuteix en la resta de

les reaccions immunològiques enfront d'agents patògens estrangers. Per tant, l'acceptació de l'òrgan en qüestió no es deu bàsicament a una immunosupressió generalitzada, sinó a una tolerància que per redundància podríem classificar d'específica.

Però aquest aspecte tolerogènic del fetge pot crear un gran problema respecte d'infeccions en què el SI és ineficient. Agents patògens específics del fetge (anomenats *hepatotòxics*), com ara els causants de l'hepatitis B, l'hepatitis C o la malària, provoquen infeccions cròniques que deterioren l'òrgan i en què el SI és ineficient. Generalment els trasplantaments de fetge requereixen menys immunosupressió i experimenten menys episodis de rebuig o episodis de menor intensitat que en altres òrgans vascularitzats. S'han dut a terme diverses experimentacions en el camp de la tolerància per evidenciar aquest paper tan marcat en el fetge. Sabent que està exposat de forma contínua a antígens potencialment nocius provinents de la nutrició, així com a components bacterians del tracte intestinal, es pensa que hi pot haver una predisposició tolerogènica innata per protegir l'òrgan d'inflamacions constants i d'un consegüent dany tissular imminent.

La tolerància engendrada no es deu només a una ignorància dels antígens, sinó a un procés actiu format per diversos mecanismes, que poden ser:

-Una alta capacitat regenerativa del fetge. Una de les propietats més característiques d'aquest òrgan és sens dubte la seva gran capacitat de regeneració. Aquesta propietat és deguda a la seva funció intrínseca catabòlica de filtratge i depuració que el sotmet constantment al contacte directe amb agents altament tòxics per a la resta de l'organisme. La seva regeneració assegura la supervivència de l'òrgan a agressions per substàncies tòxiques i també a agressions cel·lulars de rebuig d'intensitat moderada. Per tant, hi ha una primera "resistència" fisiològica a un rebuig actiu però moderat.

-Activació de cèl·lules T incompleta i tipus de cèl·lules especialitzades. Hi ha diferents tipus de cèl·lules especialitzades en el fetge que permeten obtenir un grau addicional de tolerància. Entre elles, moltes d'aquestes cèl·lules són cèl·lules dendrítiques, es a dir, cèl·lules especialitzades en la presentació d'antígens (CPA), però amb

unes propietats específiques. Les cèl·lules dendrítiques són cèl·lules anomenades "professionals" quant a la presentació d'antígens a la seva superfície, fet que les classifica com el més potent dels activadors responsables de l'inici de la resposta immunològica. Com ja s'ha descrit anteriorment, l'activació dels limfòcits requereix senyals co-estimuladors per poder ser efectiva. Aquesta falta de coestimulació pot succeir quan les DC són immadures i no poden proveir senyals de coestimulació, com pot passar en el fetge.

2.4. Requeriments per assolir la tolerància

Cal destacar, però, que la inducció de tolerància ja ha estat descrita fa molt de temps però els mecanismes responsables d'aquesta acceptació encara no han estat elucidats. El descobriment d'aquests mecanismes aportaria grans beneficis en la immunobiologia del trasplantament i una solució enfront al rebuig dels òrgans i de l'acceptació de l'antigen o antígens diana en l'autoimmunitat. Segons el pioner en el trasplantament de fetge i una de les referències en l'estudi dels trasplantaments, Thomas Starzl, després del trasplantament s'estableix un equilibri que pot dirigir-se generalment cap a tres desenllaços diferents:

- L'atac del sistema immunològic del donant contra el receptor, anomenat *malaltia de l'empelt contra l'hoste* (en el cas d'un trasplantament de moll de l'os, fet que generaria tota la descendència de cèl·lules immunològiques del donant en el receptor).

- Rebuig (estat normal del sistema immunològic).

- Èxit (és a dir, cap resposta immunològica i per tant acceptació de l'empelt).

La resposta immunològica efectiva es basa en quatre factors, que són la dosi antigènica, el temps de presència antigènica, la ruta i moviments dels antígens i, finalment, la localització de l'antigen. Aquests factors determinen el quan, l'on, el durant quant de temps (manteniment, cronicitat...) i el factor intensitat i seqüeles clíniques. La fallida de la resposta immunològica respecte a l'òrgan trasplantat podria conduir a l'èxit en el cas del trasplantament.

Degut a la complexitat del SI hi poden haver diferents possibilitats per induir la tolerància: la tolerància central, que permetria l'educació *de novo* de cèl·lules reactives i l'eliminació de cèl·lules considerades autoreactives, i la

deleció perifèrica, que permetria l'eliminació, el silenciament o la repressió de cèl·lules ja reactives.

La tolerància central es basaria en la deleció clonal de les cèl·lules T reactives dirigides contra el donant, gràcies a la presència i l'actuació de cèl·lules dendrítiques (CPA) derivades del donant en el timus del receptor, que "educarien" les noves cèl·lules T del timus. Així, les cèl·lules T dirigides contra el donant són considerades autoreactives. Aquest mètode està considerat el més segur per a la inducció de tolerància al donant, ja que es tracta el problema de la base i, per tant, la probabilitat teòrica de rebuig seria la mateixa que en l'autoimmunitat.

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 exclusivament observacional un dels aspectes inexplicats a hores d'ara: la persistència de cèl·lules del donant després del trasplantament o microquimerisme. Hi ha 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 fetes 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 s'han dut a terme en temps diferents, amb equipaments diferents i, en molts casos, amb conclusions diferents i fins i tot contradictòries. Degut a 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 es presentaran en forma d'articles, dividits en tres línies de treball. Així, es descriurà, en primer lloc, la validació de les diferents tècniques utilitzades en la resta de l'estudi. Degut a la falta de consens actual en l'homogeneïtzació de les tècniques moleculars per determinar l'existència del microquimerisme, es va creure que era

fonamental centrar la primera part de l'estudi en la validació d'aquestes tècniques, fet 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 es centra en la detecció d'aquestes cèl·lules originàries del donant en els pacients trasplantats, la seva evolució en el temps i la relació de la seva presència amb el rebuig de l'òrgan. Finalment, centrem la darrera part de l'estudi en la recerca de factors que hagin estat alterats degut a la presència d'aquest microquimerisme en els pacients trasplantats. En aquesta tercera fase, basant-nos en els resultats de la segona, es van 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.

Resultats de la 1ª fase

Per poder diferenciar la presència de microquimerisme de la d'un artefacte, la identificació de mètodes que permetessin determinar la presència de microquimerisme de forma reproducible va ser el primer pas cap a l'estandardització i la validació de les tècniques.

Segons les diferències genètiques que hi ha entre individus, es va establir un procés en quatre fases per identificar les cèl·lules del donant.

1. **Discriminació.** Identificar les tècniques que permetin discriminar el donant del receptor, és a dir, identificar les disparitats genètiques entre els dos individus (*screening*).
2. **Especificitat.** Poder detectar selectivament aquesta disparitat, sense la presència de falsos positius.
3. **Sensibilitat.** Detectar aquesta disparitat en una quantitat de cèl·lules al més petita possible, establir el llindar mínim de detecció.
4. **Reproductibilitat.** Poder reproduir els resultats en el màxim nombre de casos possibles. Establir si és possible el grau de veracitat de la tècnica.

En aquest estudi es van establir les bases per a la detecció fiable del microquimerisme. Aquestes tècniques poden ser d'utilitat en la majoria dels casos de trasplantaments d'òrgans sòlids, trasplantaments de moll de l'os i fins i tot per a la recerca de microquimerisme fetal (autoimmunitat, etc.).

Resultats de la 2ª fase

Un cop establertes les bases de la detecció del microquimerisme, la següent fase era sens dubte la verificació de la presència de les cèl·lules del donant en la sang perifèrica del pacient trasplantat (figura 4). Aquest primer estudi mostrava resultats preliminars sobre l'anàlisi de la presència de microquimerisme i la seva influència en l'aparició d'un episodi de rebuig. Es van analitzar 66 pacients trasplantats de ronyó i 17 trasplantats de cor. Aproximadament la meitat dels trasplantaments mostraven la presència de microquimerisme en la sang perifèrica dels pacients al cap de 30 dies del trasplantament.

En ambdós tipus de trasplantaments, es va poder veure una tendència cap a una menor incidència de rebuig en presència de microquimerisme al cap de 30 dies del trasplantament. La incidència de rebuig analitzada va tenir en compte qualsevol tipus de rebuig que podia patir el pacient, incloent-hi rebuig provat per biòpsia i/o per detecció clínica, de tipus agut o crònic. El baix nombre de pacients i l'anàlisi global dels episodis de rebuig no van permetre obtenir dades estadísticament significatives, però van mostrar la tendència a la disminució de rebuig en presència de cèl·lules del donant. Gràcies a totes les tècniques prèviament descrites i a la inclusió d'un més gran nombre de pacients en l'estudi, es va continuar l'anàlisi de la correlació del microquimerisme amb l'establiment del rebuig, però aquest cop centrat en els trasplantaments de ronyó (n=84). Vam demostrar la presència de microquimerisme en més de la meitat dels pacients al cap de dos mesos del trasplantament, el qual finalment esdevenia indetectable en la majoria d'aquests pacients de més de 18 mesos, deixant clar que el microquimerisme es perdia progressivament en el temps. En aquest estudi el rebuig analitzat era de tipus agut i provat per biòpsia (RAPB), de manera que s'evitaven interpretacions que poguessin conduir a l'aparició de falsos positius. Es va constatar que la presència de microquimerisme es relacionava clarament amb l'absència d'episodis de RAPB. Tanmateix, i per generalitzar, es va contrastar la presència de qualsevol tipus de rebuig (RAPB i rebuig clínic) amb la presència de microquimerisme, i es van trobar unes tendències molt similars.

No es va establir cap relació entre la presència de microquimerisme (figura 4) i la incidència de pèrdua de

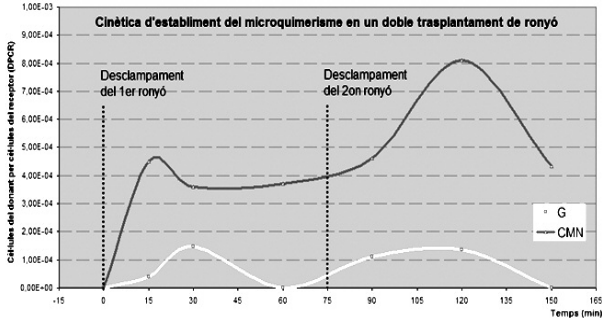


Figura 4. Exemple d'establiment del microquimerisme en el temps, durant el trasplantament de ronyó

l'empelt, però es va confirmar que la presència d'un episodi previ de rebuig (RAPB o clínic) representava un risc de perdre l'empelt. L'estudi de la cinètica d'establiment del microquimerisme va mostrar que apareix al moment del restabliment del corrent sanguini a l'òrgan i que, en el cas d'un trasplantament doble de ronyó, el microquimerisme del segon ronyó es sumava al del primer òrgan. També es va descriure que la determinació del microquimerisme al cap de 7-14 dies era predictiva de la determinació al segon mes posttrasplantament.

En aquest treball, i de forma preliminar, es va establir que la recerca del microquimerisme podria ser un factor pronòstic de l'establiment de rebuig provat per biòpsia en un termini de quatre anys (figura 5).

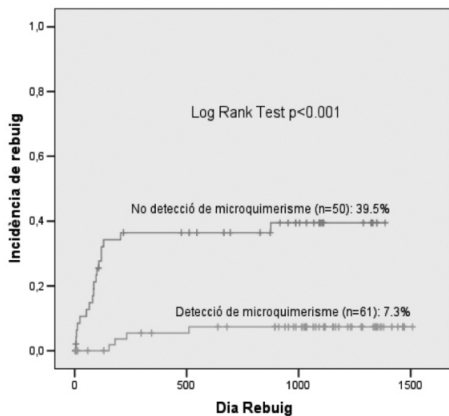


Figura 5. La presència de microquimerisme en trasplantaments de ronyó es correlaciona amb una disminució del rebuig a quatre anys

Sumari

Hi ha nombrosos mecanismes que poden iniciar, continuar o estar globalment inclosos en el desencadenament del rebuig de l'òrgan trasplantat. Els mecanismes de rebuig de l'òrgan en humans són difícils de visualitzar degut a l'alt grau de complexitat que comporten i a la gran quantitat de variables que es poden alterar amb l'estudi. La major part del coneixement actual en la immunobiologia del rebuig prové d'estudis controlats i ben dissenyats en animals de laboratori però reduccionistes per no alterar el sistema estudiat amb altres factors. Tot i això, aquesta experimentació conté unes limitacions inherents a la seva simplificació extremada però necessària. Efectivament aquestes dades poden no reflectir el rebuig real que ocorre en humans i requereix una interpretació molt més cautelosa.

Actualment, aquest coneixement continua creixent, ja que s'obtenen a diari noves dades sobre els diferents mecanismes per poder, en última instància, instaurar la tolerància entre el donant i el receptor. Per això, tots els factors que contribueixin a qualsevol nivell en el rebuig al·logènic han de ser identificats i considerats amb un objectiu terapèutic. Cal destacar, però, que l'actual sistema de tractament consisteix exclusivament a aturar la reacció immunològica. Però un tractament personalitzat hauria d'apuntar a alterar específicament aquests mecanismes immunològics de forma al·lo específica a favor del receptor.

Així doncs, d'acord amb els 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, segons aquesta determinació, es podrien dissenyar protocols de retirada (o reducció) de la immunosupressió farmacològica per a pacients seleccionats, intentant reduir el risc d'infeccions i de síndromes limfoproliferatives posttrasplantament. Queda oberta la porta per a les estratègies d'immuno-modul·lació amb cèl·lules hematopoètiques del donant per forçar la presència de microquimerisme, iniciatives que han estat dutes a terme recentment en humans (Kawai *et al.*, 2008).