

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

Tesi doctoral

Josep-Maria Pujal



Programa de Doctorat en Immunologia
Bienni 2001-2003

INFLUÈNCIA DEL MICROQUIMERISME HEMOPOÈTIC EN L'ESTABLIMENT DEL REBUIG EN TRASPLANTAMENTS D'ÒRGANS SÒLIDS.

Memòria presentada per
Josep-Maria Pujal Reyes

per a optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. David Gallardo Giralt
a l'Institut Català d'Oncologia

Tesi adscrita a la unitat d'Immunologia del Departament de Fisiologia de la
Universitat de Barcelona sota la tutoria de Dr. Antonio Celada Cotarelo

Dr. David Gallardo

Dr. Antonio Celada

Josep-Maria Pujal

INDEX GENERAL

Introducció	1
1-Històric	1
2- Trasplantaments d'òrgans a Catalunya	3
Immunosupressió del pacient trasplantat	6
1- Els fàrmacs	6
1.1- Ciclosporina	6
1.2- Tacrolimus	8
1.3- Àcid micofenòlic	8
1.4- Glucocorticoides	9
1.5- Altres immunosupressors	11
1.5.1- Anticossos monoclonals	11
1.5.2- Rapamicina (Sirolimus)	11
1.5.3- Citostàtics antimetabòlics	12
1.6 Immunosupressió més emprada a Catalunya	13
2- Multiteràpia o acció combinada	14
3- Efectes col·laterals	14
Immunobiologia del trasplantament	17
1- Reconeixement al·logènic	17
1.1- L'antigen leucocitari humà	18
1.2- Interaccions per al reconeixement al·logènic	22
2- Biologia de l'òrgan trasplantat	23
2.1- Mort encefàlica del donant	24
2.2- Síndrome d'isquèmia-reperfusió	24
3- Resposta immunològica contra l'empelt	26
3.1- Resposta innata	26
3.1.1- Síndrome d'isquèmia-reperfusió	26
3.1.2- Complement	26
3.1.3- Reclutament de leucòcits	26
3.1.4- Interacció leucòcits-endoteli	27
3.1.5- Les cèl·lules NK	27
3.2- Resposta adaptativa	27
3.2.1- Producció de limfòcits	28
3.2.2- Reconeixement d'antígens	28
3.2.2.1- Les cèl·lules presentadores d'antígens	28
3.2.2.2- Sistemes de reconeixement de l'antigen	29
3.2.3- Activació i proliferació de limfòcits T	31
4- Rebuig i danys ocasionats a l'òrgan	33
4.1- Rebuig i disfunció post-trasplantament cardíac	34
4.1.1- Malaltia vascular de l'empelt	35
4.1.2- Risc immunològic	35
4.2- Rebuig i nefropatia crònica en trasplantament renal	36
4.2.1- Rebuig crònic	36

4.2.2-	Lesions histològiques per nefropatia crònica	36
4.2.3-	Factors fisiopatològics	37
4.2.4-	Factors immunològics	37
4.2.4.1-	Rebuig agut	37
4.2.4.2-	Rebuig subagut	38
4.2.4.3-	La immunosupressió	38
5.1-	Educació normotolerant del sistema immunològic	41
5.1.1-	Deleció central: el sistema tímic	41
5.1.2-	Mecanismes perifèrics	42
5.1.2.1-	Anèrgia	42
5.1.2.2-	Deleció	43
5.1.2.3-	Supressió de l'activació	43
5.1.2.4-	Les cèl·lules T reguladores	43
5.2-	Un cas diferent: el sistema hepàtic	45
5.2.1-	Alta capacitat regenerativa del fetge	46
5.2.2-	Tipus de cèl·lules especialitzades	46
5.2.3-	Anatomia peculiar	48
5.2.4-	Secreció de molècules solubles de CMH I i II	48
5.2.5-	Activació de cèl·lules T incompleta	49
5.2.6-	Resum de les peculiaritats tolerogèniques del fetge	50
5.3-	Requeriments per a la tolerància central i perifèrica	50
5.4-	Protocols tolerogènics	52
Quimerisme		53
1-	Definicions	53
1.1-	Mitològica	53
1.2-	Científica	53
2-	Efectes del quimerisme	54
2.1-	Epifenomen del trasplantament	55
2.2-	Absència de correlació amb la disminució de rebuig	56
2.3-	Inductor de tolerància	57
2.3.1-	Correlació amb disminució de rebuig	59
2.3.2-	Inductor de tolerància però no del manteniment	59
2.3.3-	Prolongació i augment del microquimerisme per infusions de moll de l'os	60
2.3.4-	Tolerància completa a llarg termini amb o sense retirada de la immunosupressió	61
Hipòtesi		65
Objectius		71
Pacients i mètodes		73
Pacients i mètodes		
1-	Pacients	73
1.1	Cohort prospectiva en trasplantament renal i cardíac	73
1.2-	Cohort no prospectiva	74
1.3-	Grup d'estudi cinètic	75
1.4-	Grup control	75

Mostres	
2- Processament de les mostres de sang perifèrica	76
2.1- Separació de les fraccions cel·lulars	76
2.2- Extracció del DNA	77
Estatut de Rebuig	
3- Definició de l'estatut de rebuig adoptat	79
3.1- Renal	79
3.2- Cardíac	80
3.3- Hepàtic	80
Detecció del microquimerisme	
4- El Complex Major d'Histocompatibilitat	81
4.1- Tipatge de l'HLA de classe I: el mètode RSCA	81
4.1.1- condicions per HLA-A	85
4.1.2- condicions per HLA-B	86
4.1.3- Condicions de migració del gel de poliacrilamida per RSCA	87
4.1.4- Al·lels tipificats	87
4.2- Sistema de tipatge de l'HLA de classe II	88
4.3- Recerca clàssica del microquimerisme mitjançant estudi de les disparitats en el Complex Major d'Histocompatibilitat.	90
4.3.1- Recerca de microquimerisme en HLA-A i HLA-B per RSCA	90
4.3.2- Recerca de microquimerisme mitjançant PCR-SSP per HLA-DR	91
4.3.2.1- PCR SSP	92
4.3.2.2- PCR SSP hemi-nested	92
4.3.2.3- PCR-SSP nested	94
5- Recerca del microquimerisme mitjançant l'estudi de disparitats en la quantitat de repeticions en tàndem situades en els satèl·lits	95
5.1- Descripció de la tècnica	95
6- Quantificació del microquimerisme per PCR quantitativa a temps real	97
6.1- Sistema de funcionament del LightCycler	97
6.2- Detecció i quantificació del microquimerisme per Q-PCR del gen SRY	101
6.3- Detecció i quantificació del microquimerisme per Q-PCR basada en polimorfismes de HLA-DRB1.	106
7- Estudi preliminar de factors tolerogènics perifèrics residents en el receptor	107
7.1- Estudi molecular de la presència de Treg per FOXP3	107
7.2- Citometria de Flux	108
Estadística	
8- Establiment del número de rèpliques: aplicació estadística del test de distribució binomial	110
9- Anàlisi de dades: tests emprats	112
10- Validació de la proporcionalitat de risc de les variables en un test	113

multivariant emprant el model de regressió de Cox.	
10.1- Exemple	113
10.2- Validació de la veracitat del test multivariant	114
Resultats	
Descripció general	117
Secció I	119
<i>Frequency of HLA-DPB1 disparities detected by reference strand-mediated conformation analysis in HLA-A, -B, and -DRB1 matched siblings</i>	121
Resum	122
<i>PCR-based methodology for molecular microchimerism detection and quantification</i>	127
Resum	128
Secció II	147
<i>Influence of hematopoietic microchimerism in organ tolerance after kidney or heart transplantation</i>	149
Resum	150
<i>Early haematopoietic microchimerism predicts clinical outcome after kidney transplantation</i>	155
Resum	156
Secció III	167
<i>Microchimerism and rejection after solid organ transplantation: is there a tolerogenic remain?</i>	169
Resum	170
	171
Discussió	187
Conclusions	211
Bibliografia	215

RELACIÓ DE FIGURES I TAULES

FIGURES

1-	Il·lustració del “ <i>Miracle de la cama negra</i> ”	2
2-	Comparació internacional de la taxa de trasplantaments renals efectuats a Catalunya en el 2005	4
3-	Trasplantaments a Catalunya entre el 1984 i el 2006.	5
4-	l’activació cel·lular T i de l’acció dels inhibidors de la calcineurina.	7
5-	Localització de l’acció dels diferents fàrmacs en el sistema d’interacció entre la cèl·lula presentadora i la cèl·lula efectora	13
6-	tractament immunosupressor de manteniment dels trasplantaments funcionants a Catalunya	14
7-	Sistemes de Reconeixement directe i indirecte segons Sayegh i Benseler	22
8-	Els tres sistemes d’al·loreconeixement	31
9-	Comparació dels sistemes de senyalització entre una cèl·lula T (a) normalment activada i (b) anèrgica	43
10-	Diferents tipus cel·lulars T i llur potencials mètodes de regulació	45
11-	dels possibles mecanismes d’acceptació del fetge trasplantat.	49
12-	Possibles reaccions immunològiques post-trasplantament	50
13-	Separació de les fraccions cel·lulars per centrifugació per gradient de densitat	76
14-	tècnica Reference Strand Conformation Analysis (RSCA).	83
15-	Exemple de tipificació de dues mostres mitjançant RSCA	84
16-	Tipatge de HLA-DRB1	89
17-	Realització de les quimeres mixtes experimentals	91
18-	Localització de la regió 5’ per a l’amplificació de HLA-DRB1	91
19-	Seqüència d’un microsatèl·lit	96
20-	Visualització dels polimorfismes de talla dels VNTR o STR	96
21-	Funcionament del termociclador a temps real LightCycler	97
22-	Detecció de la fluorescència emesa en LightCycler	98
23-	Corbes d’amplificació i creació de la corba estàndard	103
24-	Corbes de melting	104
25-	Representació gràfica de la probabilitat d’èxit en funció de la distribució binomial	111
26-	Mecanismes que poden succeir amb infusions de moll de l’os del donant concomitant al trasplantament de l’òrgan	

TAULES

1-	Llistat actualitzat dels diferents tipus d’al·lels de l’HLA.	21
2-	Classificació del rebuig segons la ISHLT	35
3-	Dilucions i equivalents genòmics	102
4-	Detecció mínima de DNA del donant en HLA-DRB1	107
5-	Distribució binomial	111

Abreviatures

Abreviació	Significat
CMH	Complex Major d'Histocompatibilitat
CMN	Cèl·lules mononuclears
CPA	Cèl·lula Presentadora d'Antigen
DBMI	Donor Bone Marrow Infusion
DC	Cèl·lules dendrítiques
DIR	Dany per Isquèmia - Reperfusió
G	Granulòcits
GvHD	Graft versus Host Disease (malaltia de l'empelt contra l'hoste)
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLA-II_s	HLA de classe II soluble
HLA-I_s	HLA de classe I soluble
HvG	Host versus Graft (Hoste contra l'Empelt)
IC	Inhibidors de la Calcineurina
ICMOD	Infusió de Cèl·lules de Moll de l'Os del Donant
Ig	Immunoglobulina
IL-<i>n</i>	Interleuquina- <i>n</i>
no-IC	No inhibidors de la Calcineurina
OLS	Òrgans limfoides secundaris
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PCR Nested	PCR niuada
PRA	Panel of reactive antibodies
Primer	cebador- oligonucleotid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SI	Sistema Immunològic
SIR	Síndrome d'isquemia-reperfusió
SNP	Single Nucleotide Polymorphism- Polimorfisme en un sola base
SPOT	Spontaneous Operational Tolerance
ST	Sang total perifèrica comprenent totes les fraccions cel·lulars
TBI	Total Body Irradiation (irradiació total del cos)
TCR	T-Cell Receptor
TOS	Trasplantament d'Òrgan Sòlid
Tregs	Cèl·lules T reguladores
Tx	Trasplantament

INTRODUCCIÓ

CAPÍTOL I

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 del renovament dels membres fracturats i irreparables o dels òrgans defectuosos o vells, mitjançant llur reemplaçament, ha estat sempre perseguint a l'esser humà en la seva cerca cap a la immortalitat.

1- Històric

Per definició, el trasplantament en botànica consisteix en 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, es a dir entre un donant (que cedeix l'òrgan) i un receptor (que rep l'òrgan). Aquesta pràctica s'utilitza per a canviar un òrgan defectuós per un altre plenament funcional i així poder restablir la seva funció.

Cal destacar que existeixen diferents tipus de trasplantaments, com ara els autotrasplantaments (provinent 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).

La història del trasplantament en humans es remunta a temps ancestrals. Existeixen indicis de trasplantaments de pell efectuats a la Índia al segle VI A.C. Efectivament, Sushruta, va ser el primer cirurgià del món i va viure a la Índia. Va descriure en un llibre intítulat *Sushruta Samhita* fins a 120 instruments i 300 procediments quirúrgics, i va classificar la cirurgia en humans en 8 categories. Va efectuar autotrasplantaments de pell en rinoplàsties reconstructives, essent un dels pioners en cirurgia plàstica.



Figura 1: Pintura del segle XV en panel de fusta descrivint a Sant Cosme i Sant Damià efectuant el trasplantament d'una cama d'un etiòpic (Moor) a un pacient blanc (Justinià).

També, a mitjans del segle III, els màrtirs santificats i germans Sant Cosme i Sant Damià varen trasplantar en un pacient caucasià blanc amb la cama gangrenada, la cama d'un etiòpic mort. Essent així responsables de la llegenda del “*Miracle de la cama negra*” (figura 1).

Però l'èxit o el fracàs d'aquests trasplantaments no ha estat tant ben documentat degut a una falta de seguiment.

Un italià, en Gaspare Tagliacozzi, també realitzava nombrosos autotrasplantaments de pell, tots realitzats amb èxit, però també va documentar el fracàs obtingut en els al·lotrasplantaments. Va intentar d'explicar aquest fet com atribuïble a “*la força i el poder de la*

individualitat”, el que, en el seu llibre “*De Curtorum Chirurgia per Insitionem*” publicat l'any 1596, va ser una de les primeres explicacions i descripcions del que més endavant seria descrit com el rebuig; es a dir segles abans que es pogués aportar una explicació per a aquest fenomen.

L'any 1902, Alexis Carrel efectuava trasplantaments experimentals en animals i va ser un dels primers investigadors a identificar el problema del rebuig.

Les dues guerres mundials van ser el bressol de nombrosos avenços en trasplantaments de pell i cirurgia reconstructiva, de la mà de, entre altres, H.Gillies i A.Melndoe en la 1^a i 2^a guerra mundial respectivament.

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

En la cronologia següent, podem apreciar alguns dels esdeveniments més destacats en la història del trasplantament:

- 1905: 1^{er} trasplantament de còrnia per E. Zirm
- 1938: Inici de la preservació dels òrgans per A.Carrel i C.A. Lindberg

- 1954: 1^{er} trasplantament de ronyó per J.Murray
- 1960: Introducció de les solucions de preservació per Beltzer i Collins
- 1966: 1^{er} trasplantament de pàncrees per R.Lillehei i W.Kelly
- 1967: 1^{er} trasplantament de fetge per T.Starzl
- 1967: 1^{er} trasplantament de cor per C.Barnard
- 1981: 1^{er} trasplantament de pulmó i cor per B.Reitz
- 1983: 1^{er} trasplantament de lòbul de pulmó per J.Cooper
- 1983: Introducció de la ciclosporina
- 1985: Inici del trasplantament de teixits productors de catecolamines en el cervell de pacients amb malaltia de Parkinson per E.O. Backlund
- 1987: 1^{er} trasplantament de pulmó complert per J.Cooper
- 1995: 1^a nefrectomia per laparoscòpia de donant viu per L.Ratner i L.Kavoussi
- 1998: 1^{er} trasplantament parcial de pàncrees de donant viu per D.Sutherland
- 1998: 1^{er} trasplantament de mà per J.M.Dubernard
- 2005: 1^{er} trasplantament de cara per J.M.Dubernard i B.Devauchelle

Actualment, el trasplantament d'òrgans és la millor, o potser la única, tècnica terapèutica d'elecció per al reemplaçament d'un òrgan que ha vist el seu funcionament deteriorat de forma irreversible.

2- Els trasplantaments d'òrgans a Catalunya

Catalunya ha estat en els darrers anys capdavantera en quant a la taxa de trasplantaments efectuats enfront a altres països d'Europa i fins i tot del món i l'OCAT o Organització Catalana de Trasplantaments, entre les seves múltiples funcions, emet regularment uns registres que recullen l'estadística del trasplantament a Catalunya (figura 2).

Així, poden dir que en els anys que ha estat vigent l'estudi corresponent a aquesta tesi doctoral (2001 fins 2006), s'han efectuat a Catalunya 2525 trasplantaments renals (corresponent a 393+372+425+438+489+408), 296 trasplantaments cardíacs

(corresponent a 53+50+47+51+56+39), i 1268 trasplantaments hepàtics (corresponent a 200+204+230+202+227+205).

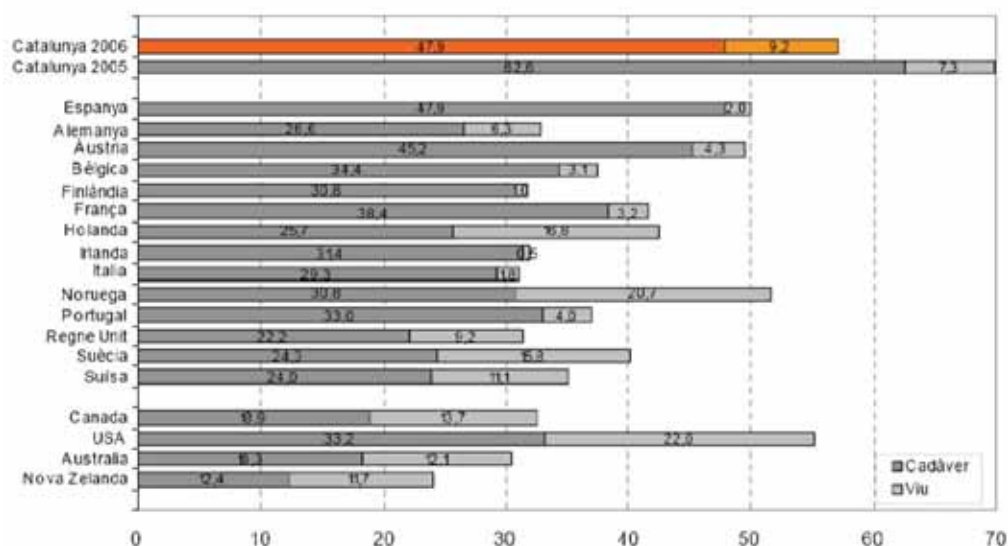


Figura 2: Representació gràfica de la comparació internacional de la taxa de trasplantaments renals efectuats a Catalunya en el 2005 (dades facilitades per OCAT (*Newsletter Transplantation.2006. Vol 11 n°1*)).

Cal destacar que els avenços tècnics i humans efectuats en les tècniques de cirurgia, tant en l'extracció dels òrgans com en el trasplantament, en les tècniques de preservació de l'òrgan, en la qualitat i eficàcia dels fàrmacs immunomoduladors, en l'optimització de la coordinació i gestió dels recursos i del personal implicat en el trasplantament, així com la formació cada cop més completa de tot el personal responsable del trasplantament, han permès:

- augmentar el nombre de trasplantaments i així reduir el temps i el nombre de pacients en llista d'espera
- augmentar la taxa de supervivència del pacient trasplantat en el primer any degut a la disminució del nombre i la intensitat de rebutjos hiperagut i agut
- augmentar la supervivència de l'empelt i del pacient gràcies a la reducció i el control dels episodis de rebuig agut i crònic després del primer any

- conscienciar la població de la importància de la donació dels òrgans i per consegüent augmentar el nombre de donacions
- fer créixer la voluntat de crear associacions per al seguiment i l'enquadrament del pacient trasplantat i fer créixer les ajudes a la recerca biomèdica que han aportat i aportaran nombrosos avenços per a la millora de la qualitat de vida del pacient trasplantat

Les figures presentades a continuació (figura 3) són la representació gràfica de l'evolució marcada a Catalunya en els darrers 16 anys (1990-2006).

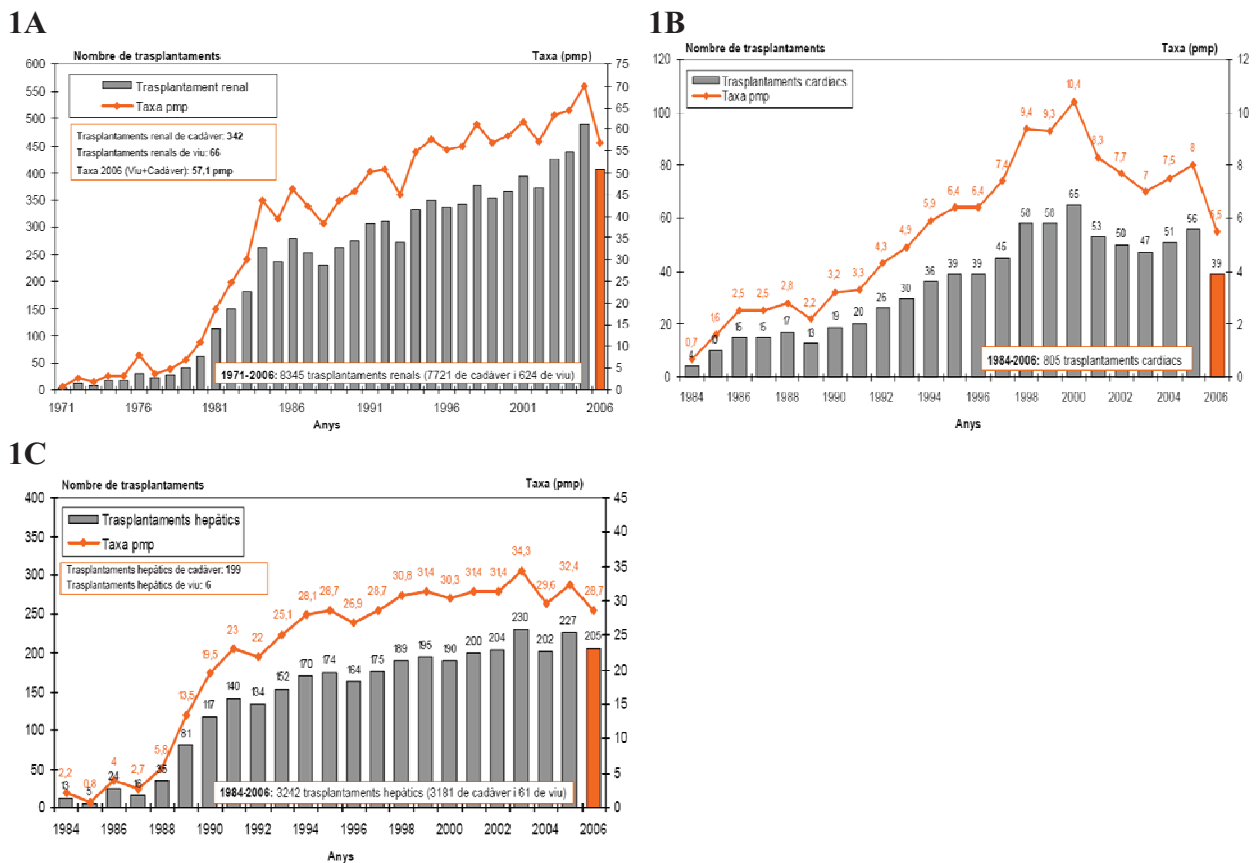


Figura 3: Trasplantaments a Catalunya entre el 1984 i el 2006.

Aquestes figures mostren l'evolució del nombre i de la taxa per milió de població (pmp) dels diferents tipus de trasplantaments durant els períodes 1971-2006 per el trasplantament (1A) renal i els períodes 1984-2006 per als trasplantaments (1B) cardíac i (1C) hepàtic, a Catalunya. (dades facilitades per l'OCAT)

CAPÍTOL II

LA IMMUNOSUPRESSIÓ EN EL PACIENT TRASPLANTAT

La inducció de la immunosupressió sol ser provocada per a evitar un tipus d'atac inherent a la naturalesa del sistema immunològic, atac que provocaria el rebuig de l'òrgan en trasplantaments, o bé, per al tractament de malalties autoimmunes com ara l'artritis reumatoïde, la malaltia de *Crohn* o l'esclerosi múltiple.

Per a poder assolir aquesta finalitat, que no es més que evitar que el SI faci la seva funció (que pot ser fruit d'un error com es el cas en l'autoimmunitat), s'utilitza un mètode immunosupressiu químic, mitjançant drogues. També existeixen altres mètodes com ara la plasmafèresis (sobretot utilitzada per a “netejar” el plasma d'anticossos en malalties autoimmunes a component humoral no cel·lular), la cirurgia (esplenectomia, timectomia) o la irradiació.

En el món dels trasplantaments d'òrgans sòlids, existeixen múltiples agents immunosupressors que poden ser utilitzats de forma individual o bé en combinació, aconseguint així una reducció de la dosi individual de cada fàrmac i un efecte global més accentuat. A continuació seran presentats els fàrmacs més utilitzats en els trasplantaments.

1- Els fàrmacs

La introducció de la immunosupressió ha permès sobrepassar amb èxit la barrera crítica del primer any i actualment s'assoleixen taxes de supervivència de l'empelt del 80 al 90% en aquest primer any. Així doncs, la pèrdua de l'empelt per rebuig hiperagut o rebuig agut irreversibles són actualment poc freqüents degut, entre altres, a l'eficàcia de la immunosupressió.

1.1- La ciclosporina

L'aparició de la ciclosporina als inicis dels anys 80 va marcar un abans i un després en el món dels trasplantaments, augmentant de forma considerable la supervivència de l'empelt reduint de forma dràstica la incidència del rebuig en el primer any (*Pazderka et al. 1996; Radovancevic et al. 2001*).

L'acció immunosupressora de la ciclosporina va ser descoberta el 31 de Gener de 1972 per treballadors de l'empresa Sandoz i la seva utilització va ser autoritzada per la FDA l'any 1983. Exemptant la seva utilització en trasplantaments, també és utilitzada com a droga immunosupressora en malalties autoimmunes (psoriasis, artritis reumatoïde, ...).

Es tracta d'un component hidròfob soluble únicament en solvents orgànics o lipídics. Penetra passivament en la cèl·lula on entra en contacte amb el citoplasma cel·lular. Es lliga específicament a una immunofilina citosòlica anomenada

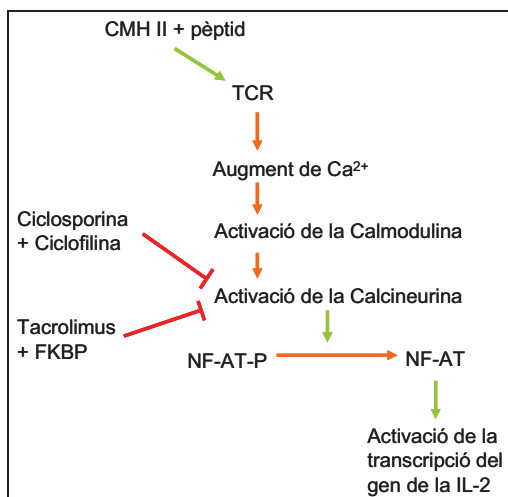


Figura 4: Esquema de l'activació cel·lular T i de l'acció dels inhibidors de la calcineurina.

ciclofilina (figura 4) formant un complex ciclofilina-ciclosporina que es lliga a la calcineurina inhibint així la seva activitat fosfatasa, el que condueix a l'acumulació de proteïnes fosforilades. Entre elles està NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-Cells), que, al estar fosforilada, no pot penetrar al nucli, i per tant no pot induir la síntesi de IL-2. A més de IL-2, la ciclosporina inhibeix la síntesi de IL-3, IL-4, GM-CSF, IFN- γ que

intervenen en la inducció del rebuig. Aquesta davallada en la transcripció dels gens de les citoquines condueix a una reducció de la proliferació dels limfòcits immuno-competents depenents de IL-2 i especialment de les cèl·lules T i *Thelper*, però no redueix l'acció de les cèl·lules T citotòxiques i no sembla tenir un gran impacte en els limfòcits B. La ciclosporina no redueix la incidència de rebuig però en redueix la severitat, el que beneficia considerablement la supervivència de l'empelt (*Pazderka et al. 1996*).

Els efectes col·laterals no desitjats de la ciclosporina registrats actualment són:

- insuficiència renal reversible per nefrotoxicitat que pot ser accentuada per l'ús simultani d'antiinflamatoris. Insuficiència de tipus pre-renal per disminució del flux sanguini renal, del grau de filtració glomerular. Associada a vasoconstricció pre i post glomerular. La ciclosporina té una acció tòxica directament sobre les cèl·lules tubulars proximals (*Skorecki et al. 1992*).
- hipertensió arterial (lligada als efectes nefrotòxics i de vasoconstricció)
- tremolors parestèsia per neurotoxicitat associada a l'ús simultani d'altres fàrmacs i factors associats
- hepatotoxicitat dosi-depenent
- anomalies digestives i metabòliques
- risc elevat de neoplàsies (limfomes no-Hodgkin, sarcomes, ...) i infeccions.

Sabent que el més gran inconvenient d'aquest fàrmac és sense dubte la nefrotoxicitat que origina i degut a la reducció de la severitat i de la freqüència dels episodis de rebuig del pacient en el transcurs del temps, les dosis de CyA poden ser més reduïdes en els pacients amb més llarga supervivència de l'empelt.

1.2- Tacrolimus

També conegut amb el nom de FK506, es tracta d'una lactona macrolítica hidròfoba aïllada al Japó a partir de *Streptomyces tsukubaensis*. El seu mecanisme d'acció (*Peters et al. 1993*) és similar al de la ciclosporina, però, no es lliga a la ciclofilina, sinó que es lliga a una proteïna anomenada FKBP-12 (FK binding protein). El complex FKBP-tacrolimus inhibeix l'activitat fosfatasa de la calcineurina el que provoca la inhibició de la síntesi de IL-2.

Els efectes secundaris son molts semblants als de la ciclosporina

1.3- Àcid micofenòlic

Administrat com a micofenolat mofetil (MMF), es tracta d'una prodroga per a augmentar la biodisponibilitat de l'àcid micofenòlic. Prové d'un fong anomenat

Penicillium stoloniferum. El MMF es metabolitza en el fetge en la fracció activa que és l'àcid micofenòlic. Aquest, inhibeix la inosina monofosfat deshidrogenasa, enzim responsable de la síntesi de la guanina monofosfat (procés del que depenen molt els limfòcits B i T) en la via de síntesi de les purines, evitant així la proliferació de les cèl·lules B i T.

Els efectes col·laterals no desitjats són diarrea, nàusees, vòmits, infeccions, leucopènia, anèmia i trombosis.

1.4- Glucocorticoides

Es tracta d'una classe d'hormones esteroïdes que tenen la propietat de reconèixer el receptor cel·lular del cortisol. Els glucocorticoides es diferencien dels mineralocorticoides i dels esteroides sexuals per la seva adhesió a receptors específics, i tots estan agrupats com a corticoesteroides. Existeixen receptors cel·lulars als glucocorticoides en quasi bé tots els teixits dels vertebrats i poden permetre la regulació de funcions cardiovasculars, metabòliques, homeostàtiques i immunològiques.

Els glucocorticoides (*Hricik et al. 1994*) són un dels pilars de la immunosupressió emprada en els trasplantaments d'òrgans sòlids. També estan utilitzats com a tractament de primera línia per al rebuig ja establert (tractament del rebuig agut en trasplantaments renals des de l'any 1960). Poden ser administrats en forma de bolus per al tractament del rebuig i també al moment del trasplantament.

Tenen un ampli espectre sobre el sistema immunològic, però també un gran nombre d'efectes col·laterals no desitjats.

Inhibeixen la producció de IL-1 dels macròfags i alteren llur presentació d'antígens, ja que alteren la producció del receptor al fragment Fc dels anticossos disminuint així la fagocitosi.

Suprimeixen la immunitat cel·lular ja que inhibeixen la producció de les principals citocines com ara IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -8 i IFN- γ . La inhibició de la producció de IL-2, altera l'activació cel·lular T responsable del rebuig cel·lular així com l'activació cel·lular B i per tant la producció d'anticossos.

Els glucocorticoides són limfotòxics i afecten la distribució del limfòcits. Degut a la seva acció antiinflamatòria generalitzada que inhibeix els components principals de la inflamació com són els leucotriens i les prostaglandines.

Tenen una acció sobre el calci cel·lular i en modifiquen els fluxes transmembranars, el que bloqueja la proliferació dels limfòcits després de llur estimulació del receptor CD3 (in vitro).

L'acció antiinflamatòria és inespecífica. Els glucocorticoides disminueixen el quimiotactisme dels polimorfonuclears neutròfils i dels monòcits, així com la maturació del monòcit en macròfag i la seva activitat fagocitària.

Retarden la cicatrització per inhibició dels fibroblasts i de la formació del col·lagen. Disminueixen la cooperació entre macròfags i limfòcits així com el lligam amb factors del complement i el lligam entre IgG i IgE als receptors dels leucòcits.

Inhibeixen la producció de IL-1 dels monòcits-macròfags i la producció de IL-2 i interferó dels limfòcits activats.

Per tant, els glucocorticoides inhibeixen les diferents etapes de la resposta immunològica:

- proliferació limfocitària T depenent de IL-1 i IL-2
- citotoxicitat T i NK depenent de interferó, IL-2 i de presentació d'antígens per part dels monòcits-macròfags

Els efectes col·laterals no desitjats més freqüents són:

- acne
- obesitat per augment de l'apetit i per augment del depòsit de greixos en la zona troncal.
- variacions en els volums d'aigua retinguts i acumulació de sals, hipertensió.
- hiperglucèmia per augment de la gluconeogènesi i resistència a la insulina.
- reducció la densitat dels ossos per osteoporosi

Degut al fet que en trasplantaments, els glucocorticoides han estat generalment administrats en combinació a altres fàrmacs, existeixen poques dades epidemiològiques respecte a la l'efecte pro-oncogènic dels glucocorticoides

A dosis farmacològiques altes, llur acció generalitzada sobre el SI permet obtenir una ràpida reducció de la resposta immunològica.

1.5- Altres immunosupressors

1.5.1- Anticossos monoclonals

Es tracta d'anticossos monoclonals (acabats en “mab” per “**m**onoclonal **a**ntibody”) dirigits contra antígens de membrana de limfòcits T i B, contra macròfags, i altres actors implicats en sistema immunològic, el que permet dirigir l'acció immunosupressora i evitar la presència d'efectes col·laterals deguts a la inespecificitat.

- OKT3 anticòs dirigit contra CD3. Bloqueja la lligació del complex TCR-antigen per pèrdua d'estabilitat i provoca la pèrdua de tot el complex TCR-CD3 de la superfície cel·lular. Tanmateix, la unió a CD3 permet una activació paral·lel que provoca anergia o apoptosi si la cèl·lula no rep un senyal de coestimulació. Actualment ja no està en ús degut al fet que produeix una excessiva immunosupressió i que el pacient genera anticossos neutralitzants.
- Anti-CD25: La molècula CD25 o receptor de membrana de la IL-2 es situa en la membrana del limfòcit T activat. Els Daclizumab i Basiliximab son immunoglobulines quimèriques humà/murí que es fixen al receptor de la IL-2 sense activar el receptor, bloquejant l'acció de la IL-2 i per tant, inhibint l'expansió clonal dels limfòcits activats i tanmateix reduint la seva durada de vida, ja que sense un altre senyal per part de la IL-2 entren en apoptosi.
- Altres anticossos dirigits contra dianes específiques com ara ICAM-1 (monòcits-macròfags i cèl·lules endotelials), LFA-1 (limfòcits T activats), CD4 (limfòcits *Thelper*), ...

1.5.2- Rapamicina (Sirolimus)

Inhibidor de la transducció, la rapamicina (RAPA o Sirolimus) es un macròlid semblant al tacrolimus. Es fixa a la mateixa proteïna FKBP-12 però el seu mode

d'acció es diferent ja que el complex RAPA-FKBP-12 es lliga a la proteïna FRAP (també anomenada mTOR (mammalian Target of Rapamicine)), diferent de la calcineurina. Per tant, no inhibeix directament la síntesi de IL-2, però inhibeix la transducció intracel·lular de la senyal.

1.5.3- Citostàtics antimetabòlics

Interfereixen en la síntesi d'àcids nucleics per analogia a precursors en la cadena de producció.

- Metotrexat: anàleg a l'àcid fòlic, es lliga a la dehidrofolat reductasa inhibint la producció de tetrahidrofolat i per consegüent la síntesi del DNA.
- Azatioprina i 6-Mercaptopurina: l'azatioprina es transforma en mercaptopurina i actuen com a anàlegs de la purina, inhibint la síntesi del DNA.

La seva acció inhibeix la proliferació cel·lular i per tant, l'expansió clonal dels limfòcits a l'inici de la resposta immune.

La figura 5 presentada a continuació mostra un resum gràfic de l'acció dels fàrmacs descrits anteriorment.

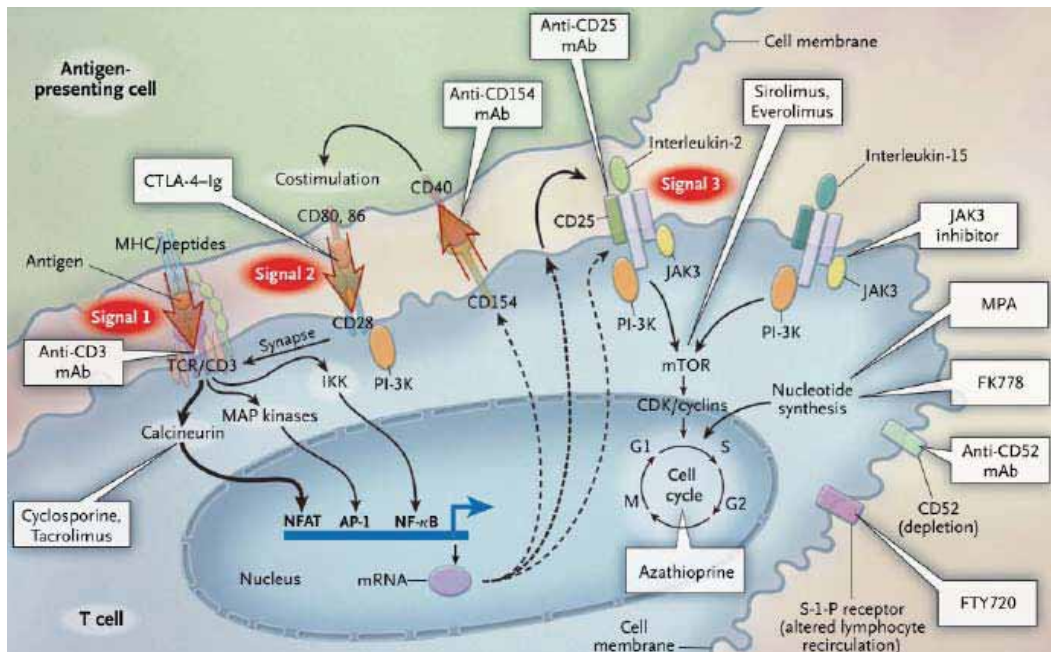


Figura 5: Localització de l'acció dels diferents fàrmacs en el sistema d'interacció entre la cèl·lula presentadora i la cèl·lula efectora (model d'interacció cel·lular a 3 senyals). Esquema procedent de *Halloran, P. F. (2004). "Immunosuppressive drugs for kidney transplantation." N Engl J Med 351(26): 2715-29.*

1.6- Immunosupressió més emprada a Catalunya

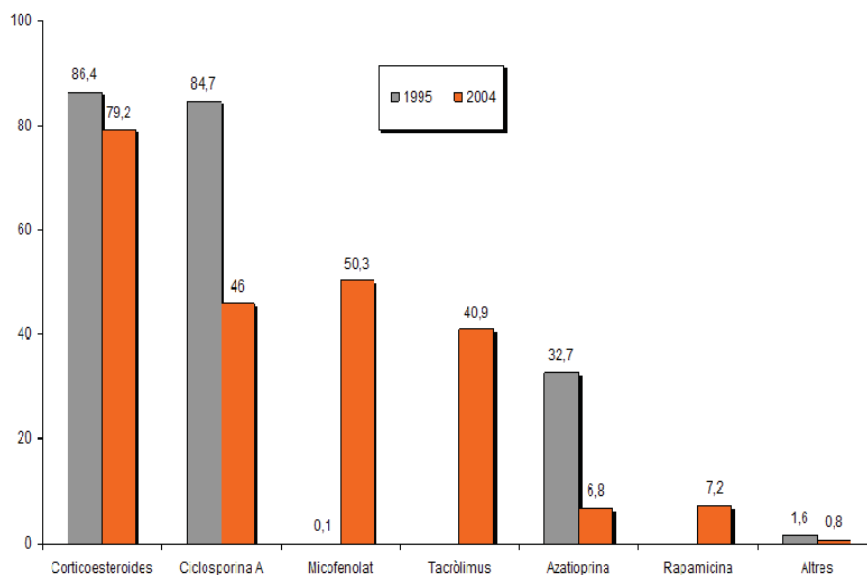


Figura 6: Resum del tractament immunosupressor de manteniment dels trasplantaments funcionants a Catalunya el 31 de desembre de 1995 i de 2004. Percentatge dels malalts amb un trasplantament funcional (dades facilitades per l'OCAT).

2- Multiteràpia o acció combinada

Aprofitant l'efecte sinèrgic que tenen entre sí alguns d'aquests fàrmacs, des d'un punt de vista teòric, es possible utilitzar diferents combinacions d'aquests agents que actuïn en diferents fases del cicle cel·lular, amb la intenció d'aconseguir un nivell adient d'immunosupressió i reduir els efectes secundaris, sovint dosi-dependents, associats a cadascun. La Taula 1 mostra un resum de les accions dels diferents fàrmacs en les fases cel·lulars així com els processos que inhibeixen. (llibre David p146 i taula p148)

Fase cel·lular o acció	Fàrmac	Procés que inhibeix
G1	Ciclosporina	Síntesi de citoquines
	Tacrolimus	
S	Sirolimus	Síntesi de citoquines i inhibició de l'acció de IL-2
	Antagonistes de IL-2	
M	Azatioprina	Síntesi d'àcids nucleics
	Micofenolat Mofètil	
Reconeixement al·logènic	Ac policlonals antilimfocitàris	Varis
	Ac monoclonals	

L'administració del tractament immunosupressor es basa en diferents estratègies de cada centre hospitalari, però globalment es classifiquen en tres grups:

- immunosupressió d'inducció peri-operativa
- immunosupressió de manteniment
- tractament del rebuig

3- Efectes col·laterals (destacables indesitjats)

La immensa majoria dels immunosupressors emprats en trasplantaments han permès augmentar de forma considerable la supervivència del l'òrgan trasplantat i reduir la incidència de rebuig de forma dràstica. Però, i és el revés de la moneda,

L'elevada incidència de complicacions i efectes col·laterals no desitjats que indueix aquest tractament immunosupressor crònic representa sovint un gran obstacle per al correcte funcionament de l'òrgan trasplantat i fins i tot per a la salut i la supervivència del pacient. La població de pacients trasplantats amb tractament immunosupressor té una més alta incidència de complicacions com ara infeccions, insuficiències renals i cardíaques, neoplàsies, hipertensions, diabetis, per a citar només les més freqüents.

Aquesta malignitat post-trasplantament és una de les majors limitacions en el trasplantament d'òrgans sòlids i es considera actualment com una de les inevitables càrregues a llarg termini de l'ús de la immunosupressió crònica. El risc i la incidència i de malignitat són elevats en la població de pacients trasplantats, en comparació a la resta de la població. Tanmateix, estudis epidemiològics han demostrat que el temps i la intensitat del tractament immunosupressor estan directament lligats a la incidència de tumors. També, un cop s'ha desenvolupat el tumor, una immunosupressió d'alta intensitat es correlaciona directament amb una alta agressivitat del tumor en quan a creixement cel·lular accelerat, metàstasi i reducció de la supervivència del pacient (*Gutierrez-Dalmau and Campistol 2007*).

La toxicitat descrita en l'utilització crònica d'alguns fàrmacs s'acompanya d'una reducció inespecífica de l'eficiència del sistema immunològic (que és l'efecte cercat), però que també és el punt d'entrada insospitat per a infeccions oportunistes i per al desenvolupament de tumors. Efectivament, la disminució dràstica de la vigilància immunològica enfront dels tumors és un dels conceptes més destacats per a explicar aquest fenomen (*Dunn et al. 2002*). L'experimentació del grup de Shankaran l'any 2001 (*Shankaran et al. 2001*) va demostrar que els limfòcits del ratolí no solament protegien de la formació de tumors induïts químicament, sinó que també protegien de la formació de tumors epitelials espontanis.

Cal destacar també que l'augment d'infeccions també pot conduir a la formació de tumors degut a infeccions amb agents virals directament o indirectament oncogènics (per la inactivació de gens supressors de tumors). Efectivament, la immunosupressió és un cofactor important ja que permet l'entrada o la reactivació d'un més alt nombre de partícules virals i perquè la cèl·lula transformada té més

probabilitats d'ultrapassar la barrera de vigilància immunològica i poder proliferar sense cap limitació.

Per tant, la immunosupressió ha reduït la incidència de rebuig agut en el inici del període post-trasplantament, que correspon al moment on la funció de l'òrgan és més fràgil i és més vulnerable al rebuig. Però molts pacients trasplantats encara són víctimes del rebuig crònic que és responsable de la pèrdua de funció progressiva de l'òrgan, que pot desembocar a una eventual pèrdua de l'empelt.

CAPÍTOL III

IMMUNOBIOLOGIA DEL TRASPLANTAMENT

1- Reconeixement al·logènic

Per a poder diferenciar varis individus, el nostre estudi s'ha basat essencialment en la recerca de disparitats genètiques que existeixen entre subjectes de la mateixa espècie.

A principis del segle XX, la única diferència que es podia tipificar en el teixit sanguini, entre individus, era el fenotip eritrocitari o grup ABO degut al fet que va ser el primer en ser descobert. En trasplantaments, aquesta tècnica va veure ràpidament les seves limitacions degut a les diverses transfusions que requereix el pacient en post-trasplantament. Els falsos positius originats post-transfusió i la baixa sensibilitat de detecció en trasplantaments d'òrgans sòlids han accelerat el desús d'aquesta metodologia per a la detecció del quimerisme, fins i tot en trasplantaments de moll de l'os, on estava inicialment indicada. Existeixen però, varies aplicacions on la determinació qualitativa del grup sanguini es primordial, sobretot en transplaments, per a evitar l'aparició del tipus de rebuig hiperagut de l'empelt.

En el món de la genètica, es parla d'un polimorfisme quan existeix un mínim de dos al·lels per a un locus determinat. Els polimorfismes són doncs diferències al·lèliques que creen una variació entre individus dins d'una mateixa espècie. Tots els polimorfismes són la conseqüència d'alteracions en la seqüència del DNA, que poden provocar canvis fenotípics considerables entre individus, detectables per determinació indirecta del quimerisme, o poden ser alteracions de seqüències no codificants del DNA que no obtenen expressió fenotípica.

1.1- L'antigen leucocitari humà o HLA

Un dels tipus de disparitats més característiques de l'individualitat de cada persona és sense dubte el complex major d'histocompatibilitat (CMH) o Human Leucocyte Antigen (HLA).

Aquest CMH és el que caracteritza histològicament a cada persona, es transmet de forma hereditària en una segregació Mendeliana i permet al sistema immunològic diferenciar el “*propi*” del “*no propi*”. Per analogia, seria el passaport cel·lular identificatiu d'un individu.

El sistema HLA està format per un conjunt de gens situats en el braç curt del cromosoma 6, concretament en la localització 6p21.3. Principalment es divideix en 3 regions que formen 3 classes, cadascuna composta per diversos gens :

- **classe I** : la més telomèrica, conté els gens de classe I clàssics de HLA-A, - B i C que codifiquen per glicoproteïnes de membrana que s'associen a la $\beta 2$ microglobulina. S'expressen en gairebé la totalitat de les cèl·lules nucleades. Aquesta regió també conté gens no clàssics com ara HLA-E, F, G, H, J i X
- **classe II** : es pot dividir aquesta regió en 3 principals sub-regions que son els loci DP, DQ i DR. Cadascun d'aquests loci comporta 2 tipus de gens, els gens A i els gens B que codifiquen per una cadena α i una cadena β respectivament que al unir-se formen dímers de classe II. Altres gens dits no clàssics, com ara DM, han estat identificats com a adjuvants que intervenen en les vies de presentació dels antígens exògens i faciliten el carregament dels pèptids en les molècules d'HLA de classe II clàssiques. També existeixen els gens TAP (*transporter of antigenic peptides* o *transporter associated with antigen processing*), que codifiquen per una proteïna de la família dels transportadors trans-membrana, i, que sota forma heterodimèrica a la superfície del reticle endoplasmàtic, permet la translocació de pèptids citosòlics que seran carregats a les molècules de classe II clàssiques. Gens LMP (*low molecular weight protein*) que codifiquen per 2 proteïnes, subunitats del proteasoma que s'encarrega de la degradació de les proteïnes citosòliques en pèptids, que seran transportats (via TAP) al reticle endoplasmàtic.

Les molècules de classe II s'expressen essencialment en cèl·lules presentadores d'antigen (CPAg) que poden ser cèl·lules dendrítiques, macròfags o cèl·lules B.

- **classe III** : aquesta regió intermitja no disposa de gens d'histocompatibilitat pròpiament dit, però codifica per proteïnes implicades en la resposta immunològica com factors del complement (C2, C4A, C4B et Bf), factors necrosants de tumors (TNF-alfa i TNF-beta), proteïnes de xoc tèrmic (HSP70), i també per altres factors com hidroxilases.

Actualment, degut a l'optimització i automatització de la seqüenciació genòmica, s'han descrit un total de 429 al·lels per HLA-A, 751 al·lels per HLA-B, 219 al·lels per HLA-Cw, 121 al·lels per HLA-DPB1, 69 al·lels per HLA-DQB1 i 429 al·lels per HLA-DRB1 (veure Taula 1, llistat actualitzat el 1er de Gener de 2006 provinent de la base de dades de l'Anthony Nolan Institute).

La variabilitat teòrica que genera el sistema HLA és de l'ordre de $2,5 \cdot 10^{14}$ possibles combinacions diferents per individu, tenint només en compte les variacions induïdes per aquests 6 loci. Cal destacar, però, que totes les combinacions possibles no estan representades en la població. Segurament, algunes han desaparegut al llarg de l'evolució. Es creu que un avantatge selectiu hagi afavorit la supervivència de certs haplotips al llarg de l'evolució (per exemple, una millor resistència a infeccions greus, millor presentació d'antígens estrangers, disminució de la presentació de superantígens que podrien induir autoimmunitat,...). Cal destacar que existeixen combinacions de gens de forma molt més freqüent que el que voldria l'atzar, es el que es qualifica com a desequilibri de lligament entre diferents al·lels. Per exemple, l'haplotip HLA-A1/B8/DR3 es sol trobar a representat globalment en 7% de la població, mentre que la freqüència teòrica d'aquesta combinació, tenint en compte les freqüències individuals de A1, B8 i DR3, seria inferior a l'1%. La freqüència d'antígens HLA depèn de la composició ètnica de la població analitzada. Parlem de distribucions geogràfiques d'al·lels per àrees. Actualment, i degut a la facilitat del moviment geogràfic, trobem a Europa, una més alta diversitat en combinacions al·lèliques. Com a exemple, podem dir que l'haplotip més freqüent en la població Catalana i

Basca és A-29, B-44, Cw*1601, DRB1*0701, DQA1-0201, DPA1-0103, DPB1*0401.

Cal destacar que actualment i degut a la intervenció de la biologia molecular en l'àmbit del tipatge, s'ha assolit un nivell de tipatge d'alta resolució. Aquest tipus de tipatge s'aconsegueix mitjançant seqüenciació directa del locus HLA, per RSCA o mitjançant varies PCRs específiques de seqüència, també anomenades SSP-PCR, que també hem utilitzat en el nostre estudi i que seran detallades mes endavant. La nomenclatura de l'HLA en baixa resolució es compon del locus i tot seguit l'al·lel, com per exemple A01 o B24. En general, en alta resolució, l'al·lel es descriu mitjançant les dues primeres xifres i les següents xifres especifiquen el subgrup de l'al·lel, precedits per un símbol (*). Per exemple en el gen A de classe I amb l'al·lel 02 i el subgrup 05 d'aquest al·lel s'escriurà A*XXxx que, en aquest cas seria A*0205.

Allele Information	
HLA Class I Alleles:	1,450
HLA Class II Alleles:	791
HLA Alleles:	2,241
Other Alleles:	96

HLA Class I										
Gene	A	B	C	E	F	G	H	J	K	L
Alleles	429	751	219	8	20	23	0	0	0	0
Proteins	340	648	173	3	4	6	0	0	0	0
Nulls	33	22	6	0	0	1	0	0	0	0

HLA Class II										
Gene	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DOA	DOB
Alleles	3	511	32	69	23	121	4	7	12	9
Proteins	2	419	24	54	14	108	4	7	3	4
Nulls	0	7	1	1	0	2	0	0	1	0

HLA-DRB									
Gene	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9
Alleles	429	1	43	13	18	3	2	1	1
Proteins	362	0	35	7	15	0	0	0	0
Nulls	2	0	0	3	2	0	0	0	0

Component Information	
Number of Component Entries:	5,585
Number of Source Cells:	3,729

Other non-HLA Genes									
Gene	MICA	MICB	MICC	MICD	MICE	TAP1	TAP2	LMP2	LMP7
Alleles	60	25	0	0	0	7	4	0	0
Proteins	52	20	0	0	0	5	4	0	0
Nulls	0	2	0	0	0	1	0	0	0

Taula 1 : Llistat actualitzat dels diferents tipus d'al·lels de l'HLA.

Llistat dels al·lels HLA actualitzat el 1 de Gener de 2004 per *HLA Informatics Group Anthony Nolan Research Institute*.

1.2- Interaccions per al reconeixement al·logènic

L'habilitat del sistema immunològic per a discriminar el *propi* del *no-propi* és essencial per a poder erradicar patògens infiltrats, però és al mateix temps un desafiament per al tractament de l'autoimmunitat i per als trasplantaments.

La solució idònia seria trasplantar un òrgan generat a partir de cèl·lules mare del pacient o, enganyar el sistema immunològic fent que reconegui l'òrgan trasplantat com a propi. Sense per això haver alterat la resposta immunològica enfront d'agents patògens estrangers (o no-propis). Sense immunosupressió, l'òrgan trasplantat es veuria rebutjat pel sistema immunològic entre la 1a i la 2a setmana post-trasplantament. Això si, si l'òrgan prové d'un bessó genèticament idèntic, la probabilitat de rebuig és mínima (*Sayegh and Turka 1998*).

Les cèl·lules procedents del donant expressen molècules del CMH del donant. Aquest fet condueix inexorablement a dos sistemes de reconeixement antigènic (*Sayegh et al. 1994*): el reconeixement directe i el reconeixement indirecte. Podríem dir que el primer (directe) seria responsable d'una resposta immune punyent de rebuig agut, mentre que el segon (indirecte) tindria un paper més important en el rebuig crònic. Ambdós seran explicats més en detall en la secció de rebuig (Figura 7).

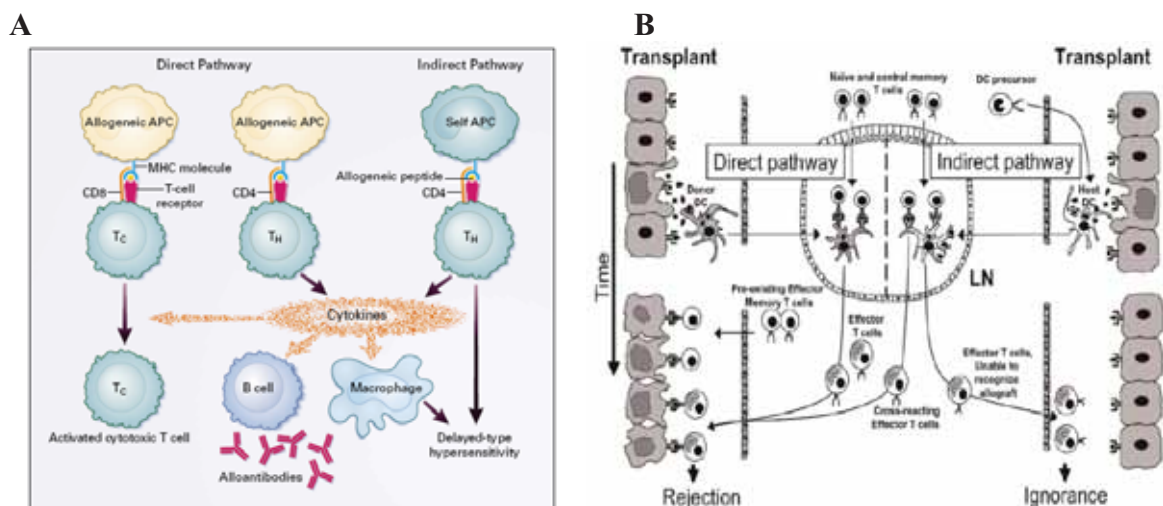


Figura 7: Representacions gràfiques dels sistemes de reconeixement (A) segons Sayegh (*Sayegh and Turka 1998*) i (B) segons Benseler (*Benseler et al. 2007*).

Habitualment, els limfòcits que expressen de forma dominant la glicoproteïna CD4, anomenats T *helper*, serien els responsables de la iniciació de la resposta del rebuig de l'empelt (*Krieger et al. 1996*). També són responsables de la producció de la majoria de les citokines necessàries a l'estimulació de la resposta immunològica. Aquestes citokines actuen de forma autocrina (sobre les mateixes cèl·lules T CD4+), i de forma paracrina sobre les altres cèl·lules, com ara les T CD8+, les cèl·lules B i els macròfags. Tot i que les T CD8+ produeixen poques quantitats de citokines, el seu rol en el rebuig és principalment la destrucció directa de les cèl·lules del donant mitjançant lisis. Els macròfags i les T CD4+ contribuïrien al rebuig en el que s'anomena resposta d'hipersensibilitat retardada ("*delayed-type hypersensitivity response*") que inclou la producció de mediadors solubles com ara el TNF. Aquesta darrera resposta seria suficient per a provocar la pèrdua de l'empelt, fins i tot en absència de T CD8+ (*Krieger et al. 1996*). Tot i no participar directament en la resposta immune de rebuig si no existeix una prèvia immunització del receptor als antígens del donant, els limfòcits B semblen tenir un paper en la formació del rebuig crònic degut a la producció contínua d'anticossos, junt amb el manteniment de la resposta que provoca la resposta d'hipersensibilitat retardada.

2- Biologia de l'òrgan trasplantat

La biologia de l'òrgan trasplantat es veu profundament pertorbada degut, entre altres, a danys cel·lulars inherents a xocs en les intervencions d'emergència i a la mort encefàlica del donant que produeixen alteracions hormonals, inflamatòries, metabòliques i hemodinàmiques. També pateix danys deguts a la cirurgia d'extracció i als períodes d'isquèmia de preservació i de reperfusió. S'ha demostrat millor funció de l'òrgan i més llarga supervivència de l'empelt en pacients receptors d'un òrgan provinent de donant viu en comparació a un òrgan provinent de donant cadavèric.

2.1- Mort encefàlica del donant

La mort encefàlica és un esdeveniment catastròfic fisiològic que es defineix per un dany irreversible al cervell i/o al cerebel i/o al “tronc cerebral” (*brain stem*) i està associat a canvis hemodinàmics, coagulopaties, canvis en l'estructura pulmonar, hipotèrmia i, entre altres, pèrdues en els equilibris en electròlits (*Mertes 1996*).

Estudis experimentals han demostrat un augment en l'expressió de citoquines, de molècules d'adhesió i d'infiltrats leucocitaris en tots els òrgans susceptibles de ser trasplantats (*Takada et al. 1998; Kusaka et al. 2000*).

Segons dades experimentals publicades per Weiss (*Weiss et al. 2007*), l'estudi cinètic de canvis en l'expressió de citoquines i altres factors fisiològics (i immunològics) ha demostrat que la mort encefàlica i els esdeveniments que la precedeixen estan directament associats a un augment significatiu en l'expressió de citoquines pro-inflamatòries i conseqüentment més danys que es podran sumar a la síndrome d'isquèmia-reperfusió.

2.2- Síndrome d'isquèmia-reperfusió

La isquèmia és un fenomen que es produeix quan s'inhibeix la provisió el flux sanguini a un teixit, o, en trasplantaments, a un òrgan. És responsable d'un estat extraordinari en el que tot el metabolisme aeròbic passa a ser anaeròbic (amb pèrdues d'ATP, edema cel·lular per aturada de les bombes sodi/potassi, acumulació de lactat, augment del pH, ruptura de la membrana cel·lular, mort cel·lular per necrosi i apoptosi.).

Parlem d'isquèmia calenta quan s'efectua l'acte quirúrgic d'extracció de l'òrgan del donant i d'isquèmia freda durant tot el procés de preservació extra-corporea de l'òrgan en qüestió. Ambdues indueixen canvis notables en el sistema del complement, els radicals lliures oxigenats, els factors d'activació de plaquetes, els factors protrombòtics, les citoquines, els factors de creixement, els factors d'adhesió cel·lular, els factors de reclutament de neutròfils i entre altres, l'activació i funcionalitat de les molècules d'adhesió presents en les cèl·lules endotelials i els limfòcits (*Baldwin et al. 1995; Hancock et al. 2000; Hancock 2002*).

Debris cel·lulars, interrupcions en la continuïtat cel·lular de l'endoteli durant la reperfusió i augment en la síntesi i expressió de citoquines pro-inflamatòries per estres cel·lular i per les cèl·lules danyades poden atraure monòcits, macròfags, neutròfils i altres tipus de cèl·lules sensibles a aquesta quimio-atracció i que poden haver-se infiltrat en l'òrgan trasplantat (*Benseler et al. 2007*).

La reducció de l'alliberament d'aquests mediadors de la inflamació i de les molècules d'adhesió permetria en primera instància una disminució considerable del dany ocasionat i a més llarg termini, una millor en la supervivència de l'empelt.

El restabliment del flux sanguini en l'òrgan isquèmic s'anomena reperfusió i contempla l'arribada massiva de sang oxigenada a l'òrgan. Contràriament al que es podria pensar en primera instància (és a dir que la restauració de flux sanguini pal·liarà els efectes de la isquèmia), la reperfusió és responsable en gran part del dany ocasionat a l'òrgan. Els canvis bruscs de pressió osmòtica (per provar de restablir l'homeòstasi) i la formació de radicals lliures de l'oxigen són responsables de l'increment de lesió tissular iniciada durant la fase d'isquèmia.

Adicionalment, cal destacar que existeix una regulació a l'alça en l'expressió de CMH de classe I II. Aquest fet comporta un augment considerable de l'exposició d'antígens del donant i per tant incrementa la vulnerabilitat de l'empelt per augment de la susceptibilitat a patir futures respostes innates o adaptatives.

En resum, el conjunt d'aconteixements fisiopatològics que s'originen a conseqüència del restabliment del flux sanguini després d'un període d'isquèmia, porta el nom de síndrome d'isquèmia-reperfusió (SIR). Inclou els danys produïts a l'òrgan ja sigui per isquèmia, trauma quirúrgic, reperfusió, alliberament de citoquines per macròfags o neutròfils, i és present amb més o menys intensitat en tots els trasplantaments d'òrgans. Ha estat descrit que aquesta SIR té un efecte en la supervivència de l'empelt a mig/llarg termini ja que té una influència important en el naixement de la resposta immunològica del receptor i perquè pot alterar la capacitat regenerativa en alguns òrgans trasplantats (*Ghobrial et al. 2002*).

3- Resposta immunològica contra l'empelt

3.1- Resposta innata

La resposta immunològica innata no requereix una sensibilització prèvia. Es caracteritza generalment per a ser la resposta inicial al trasplantament. Aquesta reacció, però, sol ser essencial per al desenvolupament de la resposta adaptativa més tardana i compta amb diferents actors.

3.1.1- Síndrome d'isquèmia-reperfusió (SIR)

Degut al SIR, existeixen evidències clares de l'increment en la producció de factors pro-inflamatoris i, entre altres, de la sobreexposició d'antígens del donant. Aquests factors atrauen en primer lloc als actors de la resposta innata que presentarem a continuació.

3.1.2- Complement

L'activació del complement, antígen inespecífica, té lloc durant la fase d'isquèmia-reperfusió. El grau de dany ocasionat és directament proporcional a la quantitat de complement activat durant aquest període. Existeix però una altra activació del complement antígen-específica que té lloc durant el reconeixement de l'antigen per anticossos específics secretats per limfòcits B.

El sistema del complement té una gran importància en l'establiment del rebuig ja que en animals genèticament modificats deficients en complement, els òrgans trasplantats sobreviuen durant un període de temps més llarg. Cal destacar però, que actualment no s'ha establert amb claretat la contribució de cada factor del complement en el rebuig de l'empelt.

3.1.3- Reclutament de leucòcits

Essent el SIR el punt de sortida a la producció de citoquines, és per conseqüent el punt d'inici del reclutament i l'activació de leucòcits específics i no-específics, responsables en primer lloc del dany inespecífic al teixit trasplantat. Aquestes

citoquines poden estar regulades per una gran varietat d'estímuls pro-inflamatòris i radicals oxigenats.

3.1.4- Interacció leucòcits - endoteli

En condicions normals, el contacte entre leucòcits i cèl·lules endotelials és aleatori i inseqüent ja que els dos tipus cel·lulars no estan activats. En els òrgans reperfosos, les cèl·lules endotelials han estat activades per múltiples vies (complement, cascades de coagulació i d'inflamació) i interactuen directament amb els leucòcits circulants. Dita interacció suposa i comporta tres mecanismes:

- un “*rolling i tethering*” al llarg del vas (mediat per selectines endotelials)
- una adhesió per glicosaminoglicans endotelials i integrines en els leucòcits (VLA-4 i LFA-1 activades per les citoquines presents)
- una emigració del corrent sanguini o extravasació cap als teixits inflamats

3.1.5- Les cèl·lules NK (Natural Killer)

Aquest tipus especial de limfòcits “carent” de receptors de tipus TCR o immunoglobulines de membrana, pot infiltrar els teixits de l'òrgan al poc temps del trasplantament. Aquestes cèl·lules ataquen i lisen les cèl·lules que no expressen (o expressen quantitats insuficients) CMH de classe I mitjançant contacte cèl·lula-cèl·lula (mediada pel receptor KIR).

També disposen d'un receptor de membrana de baixa afinitat dirigit contra el fragment constant (Fc) de la immunoglobulina de classe G. Així, també poden lisar les cèl·lules que han estat reconegudes per anticossos; el que s'anomena citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos o ADCC (*antibody dependant cell cytotoxicity*).

3.2- Resposta adaptativa

Aquest tipus de resposta és un procés immunològic resultant del reconeixement d'al·loantgens per els limfòcits T. Es poden diferenciar inicialment en 3 etapes.

3.2.1- Producció de limfòcits

La producció de limfòcits T és un fenomen àmpliament descrit en la literatura científica i comporta una producció de precursors de cèl·lules T que neixen al moll de l'os i es dirigeixen cap al timus. Els limfòcits que sobreviuen a la selecció tímica, estan restringits per el propi CMH però no són, en teoria, autorreactius. Tanmateix, entren en circulació cap als òrgans limfoides secundaris (OLS) i, sense interacció del TCR amb l'antigen al que està dirigit, queden en estat quiescent en espera de la interacció específica.

3.2.2- Reconeixement d'al·loantgens

3.2.2.1- Les cèl·lules presentadores d'antígens (CPA)

Els limfòcits T no poden reconèixer directament els antígens solubles. La iniciació de la fase del rebuig requereix la presentació dels antígens estrangers als limfòcits T. Dita presentació s'efectua per part de cèl·lules especialitzades anomenades presentadores d'antígens (CPA). Aquestes cèl·lules presentadores poden ser originàries del receptor o, en alguns casos, del donant. Es pot tractar de macròfags, de cèl·lules B activades o de cèl·lules dendrítiques. Aquestes darreres són les més especialitzades en la captura, el processament i la presentació d'antígens, en l'estimulació de limfòcits T naïves i poden migrar als òrgans limfoides secundaris. Per a resumir el *modus operandi* d'aquestes DC, podem dir en el estat immadur, presenten poc CMH I, II i molècules de co-estimulació en superfície. Després de la captació de l'antigen en el lloc de la inflamació (que també els hi aporta una primera estimulació), migren cap a les àrees T del òrgans limfoides secundaris. Durant llur migració, les DC maduren i perden la capacitat de captació d'antígens, però augmenten la capacitat d'estimulació dels limfòcits T per canvis d'expressió específics que, junt amb un augment en l'extensió dels processos dendrítics, afavoreixen l'augment de la superfície per a la captació de cèl·lules T.

3.2.2.2- Sistemes de Reconeixement de l'antigen.

Al·loreconeixement directe: Es tracta d'un fenomen reservat a l'al·lotrasplantament. Les CPA intactes del donant (trasplantades amb l'empelt) presenten, mitjançant CMH I o II, antígens a cèl·lules T del receptor CD8+ o CD4+ respectivament. Les cèl·lules T s'activen en front de l'antigen específic que reconeix el seu TCR. Però la presentació de l'antigen s'efectua per una APC del donant i per tant, en un context CMH al·logènic, es a dir que pot ser diferent del receptor.

Tot i que aquest fenomen no hagi estat elucidat actualment, es creu que es tracta de reconeixement per mimetisme molecular que permet a les cèl·lules T reconèixer l'antigen tot i estar portat per un CMH al·logènic que podria compartir estructures similars. Es doncs la conseqüència d'una reactivitat creuada (*cross-reactivity*) natural i és més freqüent del que es podria esperar (0,1-1%) (*Hornick and Lechler 1997; Caballero et al. 2006*). Aquesta interacció en pot produir entre T-CD8+ i CMH-I i així generar una resposta específica a un endo-antigen qualsevol presentat per un CMH-I al·logènic (resposta no específicament dirigida contra el donant i que per tant pot ser atenuada per mecanismes reguladors tolerogènics o conduir a una neo-autoimmunitat que també pot provocar un rebuig crònic (*Fedoseyeva et al. 1999*). També es pot produir entre T-CD4+ i CMH-II i en aquest cas activaria una resposta TH1, el que conduiria a una resposta CD8+ específica.

Actualment existeixen varies teories sobre els sistemes de reconeixement directe, coincidint totes en que té lloc inicialment en post trasplantament. No es pot descartar llur influència en el rebuig (veure revisions (*Hornick and Lechler 1997; Caballero et al. 2006*)) o sobre la inducció de tolerància (*Marelli-Berg et al. 1997*).

Al·loreconeixement indirecte: Es tracta de l'activació de les cèl·lules T del receptor per la presentació d'antígens del donant (HLA, ...) processats i presentats en el context de molècules pròpies del CMH a la superfície de les APC del receptor, seguint el protocol normal de presentació similar al procés de presentació d'antígens virals o bacterians. Es podria definir com el sistema majoritari i

“immunològicament normal”, degut a que es tracta d’una presentació d’antígens estrangers per cèl·lules del receptor.

El repertori de cèl·lules T és compost per un alt nombre de cèl·lules reactives al reconeixement directe i una freqüència força més baixa de cèl·lules reactives al reconeixement indirecte (*Caballero et al. 2006*), el que suggereix que el reconeixement directe és responsable dels episodis precoços de rebuig mentre que el reconeixement indirecte seria responsable del rebuig crònic.

A més, les APC del donant tenen tendència a desaparèixer amb el temps (si no hi ha empelt de cèl·lules mare al moll de l’os que proporcionaria una font continua de cèl·lules de donant), el que provoca que el reconeixement directe desaparegui progressivament. Tanmateix, la captació, el processament i la presentació de les molècules del CMH del donant és un procés més lent i més eficient a llarg termini.

Aquestes dues nocions de rebuig causat per la presentació directa o indirecta no poden explicar per si soles totes les causes de rebuig a l’empelt. Actualment també es veuen aparèixer noves teories que suggereixen una altra contribució a la inducció de la tolerància. Existeix una altra teoria que permet explicar altres fenòmens de rebuig que porta el nom d’al·loreconeixement semidirecte o híbrid (figura 8).

Al·loreconeixement semidirecte o híbrid: Es tracta d’un sistema híbrid entre el primer i el segon mecanisme. La cèl·lula CPA del donant processa el seu propi CMH-I i el presenta mitjançant el CMH-II de forma natural (presentació dels antígens endògens). La cèl·lula CD4⁺ del receptor reconeix el CMH-II del donant (que està compartit o semi-compartit (mimetisme)) que presenta l’antigen del CMH-I no compartit i processat. Aquest tipus de reconeixement ha estat descrit sobretot en sistemes materno-fetals i també en al·lotrasplantaments amb identitat total o parcial en CMH-II (*Caballero et al. 2006*).

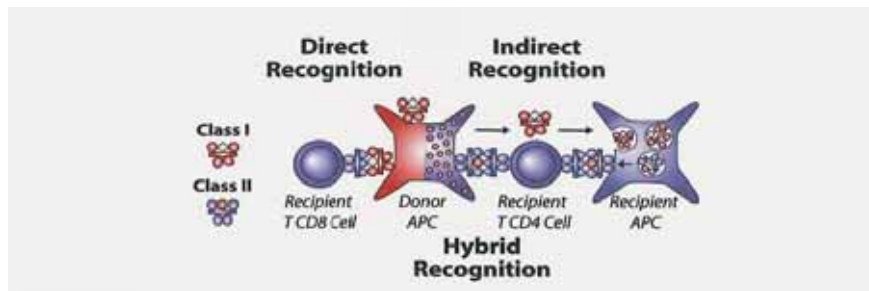


Figura 8: Resum gràfic dels tres sistemes d'allo-reconeixement. En aquesta figura, donant i receptor comparteixen el mateix HLA de classe II (blau) però no comparteixen HLA de classe I (vermell) (*Burlingham and Wilkes 2004*).

3.2.3- Activació i proliferació de limfòcits T

S'ha descrit que la presència d'OLS és indispensable per al reconeixement al·logènic (*Lakkis et al. 2000*) ja que experimentalment, sense els processos controlats en aquests òrgans, no es produeix el rebuig d'òrgans vascularitzats. Tanmateix, també existeix un reconeixement (més minoritari) directament en l'òrgan trasplantat.

La mobilitat de les CPA i dels limfòcits (B o T) és la conseqüència de la secreció de citocines homeostàtiques i de la presència dels receptors en aquestes cèl·lules. Així, les DC immadures que han capturat (i processat) un antigen i que han estat en contacte amb mediadors de la inflamació, expressen més CCR7 (essent un receptor de citocines homeostàtiques), el que permet llur acumulació en les zones T dels nòduls limfàtics. Tanmateix el receptor CCR7 és important per als limfòcits ja que també marca llur migració o sortida dels OLS (*Bromley et al. 2005*).

Sense una interacció del TCR amb el seu antigen específic, els limfòcits T madurs romanen quiescents i circulen entre els òrgans limfoides secundaris en espera d'aquest reconeixement específic. Cada limfòcit T té un únic i específic TCR lligat de forma no-covalent a CD3. Aquest darrer inicia una cascada de transducció d'una senyal activadora després de la interacció específica TCR-antigen-CMH (*Nel 2002; Nel and Slaughter 2002*). Aquesta interacció condiona un canvi de conformació del limfòcit d'un estat migratori a un estat estacionari degut a l'expressió de molècules d'adhesió i de senyalització majoritàriament en l'àrea de la membrana de la sinapsi immunològica (*Grakoui et al. 1999*), el que confereix més estabilitat per a seguir el procés i aconseguir superar el llindar d'activació del

limfòcit (que també dependrà de la seva aviditat per a l'antigen). Cal destacar que no totes les interaccions amb CPA tenen com a resultat l'activació del limfòcit.

A partir d'aquest punt, entra en joc l'anomenada “segona senyal” o “senyal de co-estimulació” que permetrà l'activació total del limfòcit. També permet la reorganització de la sinapsi immunològica, de la proliferació del limfòcit, evita l'anèrgia o l'apoptosi i indueix la transformació final vers el nivell efector o memòria. Existeixen diverses classes de molècules de co-estimulació a la superfície del limfòcit que interaccionen amb llurs corresponents lligands en l'APC per a donar senyals d'activació:

- Superfamília B7-CD28. Formada per CD28 i ICOS (*Inducible Co-Stimulatory*) en el limfòcit. Aquests es lliguen a la família B7 per a obtenir les interaccions CD28-B7.1 (o CD28-CD80), CD28-B7.2 (o CD28-CD86) i ICOS-ICOSL.
- Família dels receptors TNF (TNFR) i llurs lligands. Formada per CD40L (CD154), OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), CD30, CD27 i GITR (AITR) com a receptors en el limfòcit que es lliguen a CD40, OX-40L, CD30L, 4-1BBL, CD70 i GITRL respectivament.

També existeixen segones senyals que tenen efectes inhibidors com ara CTLA-4 que es fixa a B7.1 o B7.2 i que estaria involucrada directament en la tolerància.

La inhibició de la senyal de co-estimulació i/o l'activació de senyals inhibidores han estat i estan en estudi per a poder evitar el rebuig (o bé la autoimmunitat).

Un cop passat el llindar d'activació, també comença la transducció de senyals de cicle cel·lular que condueixen a la divisió cel·lular (i per tant a l'expansió clonal) i a l'adquisició de receptors de senyals anomenats “receptors de senyal 3” (per a factors de creixement, receptors a citoquines, a interleuquines 2-4-7-9-15, ...) . Aquesta tercera senyalització pot esdevenir molt important per a diferenciar el limfòcit en cèl·lula efectora citotòxica, en reguladora o en induir apoptosi i pot ser utilitzada per a induir tolerància (*Zheng et al. 2003*).

Generalment, la diferenciació de les cèl·lules T *naïves* en cèl·lules T efectores (citotòxica, reguladora) té una duració de entre 3 i 5 dies.

4- Rebuig i danys ocasionats a l'òrgan

Totes les cèl·lules nucleades de l'òrgan trasplantat poden ser dianes potencials de resposta al·loimmune per part del receptor, ja que presenten constitutivament a la membrana nivells considerables (fins i tot baixos) de CMH de classe I i alguns tipus cel·lulars, de classe II. Presentació que pot estar alterada a l'alta degut als canvis que pateix dit òrgan trasplantat. Després del trasplantament, existeixen perturbacions de la regulació vasomotora, de la permeabilitat vascular i fins i tot coagulació intravascular que poden alterar o posar en perill altres elements de l'òrgan (*Briscoe and Sayegh 2002*). La vasculopatia arterial coronària pot ser un clar exemple de dany endotelial a llarg termini que condueix a la disfunció de l'òrgan.

El rebuig immunològic és la principal complicació en el període post-trasplantament. Basant-nos en la seva aparició en el temps, la patogènia, la clínica i les troballes histològiques, els podem classificar en 4 grups que són hiperagut, accelerat, agut i crònic.

- **El rebuig hiperagut** apareix com a conseqüència de l'existència d'anticossos pre-formatos que actuen de forma immediata (hores)
- **El rebuig agut accelerat**, es creu que es una forma més lenta del rebuig hiperagut (primera setmana)
- **El rebuig agut** es caracteritza histològicament per un robust infiltrat cel·lular que es forma al voltant de la petita vascularització de l'empelt. Globalment, esta formada per una resposta antigen-específica i antigen-inespecífica.
- **El rebuig crònic** es caracteritza histològicament per una fibrosi del teixit. Es tracta d'una resposta immunològica antigen-específica que, contràriament a altres respostes immunològiques, no es dissipa amb el temps i gradualment compensa els mecanismes de reparació de l'empelt. Aquesta reparació però, no pot subsistir indefinidament i arriba inexorablement al seu límit. Tanmateix la proliferació de teixit fibròtic segueix. També, i és característica, l'aparició progressiva de l'engrossiment de la íntima arterial de l'empelt que desemboca a la

isquèmia per reducció del flux sanguini. La funció de l'òrgan es perd gradualment i apareixen manifestacions clíniques aparents. Aquesta resposta immune quasi be no es sensible a tractaments immunosupressors clàssics

L'estratègia per al tractament del rebuig, en general, és basa en les següents variables:

- grau histològic del rebuig
- severitat d'episodis previs de rebuig i immunosupressors emprats
- factors de risc de rebuig del pacient

4.1- Rebuig i disfunció post-trasplantament cardíac

La morbiditat i mortalitat del rebuig pot ser directament atribuïda a una disfunció ventricular esquerra així com a una incidència elevada en infeccions i danys severs deguts a altes dosis d'immunosupressors després d'un trasplantament de cor.

El desenvolupament de les tècniques de biòpsia de l'endomiocardi en transplantaments a suposat un avenç significatiu en l'especificitat i la sensibilitat del diagnòstic histològic del rebuig cardíac i actualment la biòpsia endomiocardiaca continua essent la referència per al diagnòstic del rebuig cel·lular.

Aquesta biòpsia és realitza per angiografia per via venosa i generalment permet obtenir una mostra del miocardi corresponent al ventricle dret. Actualment, es tracta de la tècnica més segura i fiable per a determinar el rebuig o altres malalties cardíques, permetent observar:

- L'efecte Quilty: petits infiltrats limfocitaris d'origen desconegut (existeix la teoria que es degut a la ciclosporina). Pot ser la causa d'un fals diagnòstic de rebuig.
- Infeccions: poden coincidir en una mostra histològica lesions per infeccions de miocardi o rebuig agut.
- Danys per isquèmia: provoca necrosis dels miòcits i cal diferenciar-la del rebuig quan hi ha presencia de cèl·lules inflamatòries.

- Rebuig: la Taula 2 mostra una classificació histològica del rebuig en trasplantament cardíac

Taula 2 : Classificació del rebuig segons la ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) (Billingham et al. 1990)

<i>Grau</i>	<i>Descripció</i>
0	No Rebuig
1	A - Infiltrat Focal (perivascular o intersticial) sense necrosis B - Infiltrat Difús però escàs sense necrosis
2	Existència d'un sol focus amb infiltració extensiva i/o dany miocític focal
3	A - Infiltrats multifocals agressius amb dany miocític B - Processos inflamatoris difusos amb necrosis
4	Polimòrfic agressiu i difus ± infiltrat ± edema ± hemorràgia ± vasculitis amb necrosis

4.1.1- Malaltia vascular de l'empelt

Els considerables avenços en la disminució de l'aparició i la severitat del rebuig han permès una supervivència més elevada a curt termini, però a llarg termini, la supervivència es veu limitada per la malaltia vascular de l'empelt (MVE) o CAV (Cardiac allograft vasculopathy) (Cotts and Johnson 2001). Es tracta d'una malaltia difusa i progressiva diagnosticada per angiografia amb una prevalença en el 42% dels pacients trasplantats als 5 anys. Existeixen però, tècniques d'ultrasons intravasculars que revelen una més alta prevalença de MVE que ronda el 75% a un any post-trasplantament i que permeten observar una reducció de l'espai vascular per inflamació de la intima, mentre que l'angiografia no mostrava malaltia arterial. Estudis en autòpsies han demostrat el caràcter difús i ubicu de la malaltia.

4.1.2- Risc immunològic

Múltiples factors poden contribuir al desenvolupament de la MVE. Entre ells, es lògic pensar que mecanismes immunològics poden tenir un paper important. De fet, l'endoteli arterial coronari podria presentar en superfície CMH de classe II, el que pot fàcilment induir una resposta immune cel·lular (Libby et al. 1992).

Actualment, no s'ha definit cap relació entre el rebuig agut i la vasculopatia de l'empelt i no resta clar si una prevenció o una disminució de la severitat del rebuig podria disminuir la incidència de MVE.

4.2- Rebuig crònic i/o nefropatia crònica en trasplantament renal

La biòpsia renal és fonamental en el diagnòstic de complicacions del trasplantament. Existeixen varis tipus de lesions per rebuig hiperagut o agut accelerat, per rebuig agut (tubulo-intersticial, vascular agut o provocant glomerulopatia) o lesions per fàrmacs immunosupressors.

4.2.1- El rebuig crònic

En biòpsies renals de pacients amb rebuig crònic, es pot apreciar l'existència característica de lesions arterials i glomerulars. Aquest tipus de lesió arterial, que també rep el nom d'arteriosclerosi de l'empelt, és molt semblant al que es pot apreciar en els vasos coronaris en els pacients trasplantats de cor. Es tracta d'una proliferació de la íntima que implica les cèl·lules de la musculatura llisa i que condueix a disminució progressiva de la llum del vas que acaba en isquèmia. Es considera que la inflamació i el dany de l'endoteli són els esdeveniments inicials que condueixen a l'engrossiment de la paret vascular.

La lesió glomerular és deguda a la proliferació del mesangi i la consegüent oclusió de l'espai capil·lar, que condueix finalment a la glomerulosclerosi. El resultat final d'aquests dos tipus de lesions és inexorablement l'atrofia i la fibrosi intersticial (*Sayegh and Turka 1998*).

4.2.2- Lesions histològiques per nefropatia crònica de l'empelt (NCE)

Existeixen tres principals tipus de lesions de la NCE: l'atrofia tubular (i fibrosi intersticial amb infiltrats focals de CMN), l'esclerosi glomerular (augment de la matriu mesangial i engrossiment de la membrana basal glomerular) i l'engrossiment de la íntima arterial (format per teixit connectiu, CMN, proliferació

dels miofibroblastes i duplicació de la lamina elàstica interna). La immunofluorescència pot mostrar dipòsits de C3, IgG i fibrinogen.

4.2.3- Factors fisiopatològics de la NCE

<u><i>Factors immunològics</i></u>	<u><i>Factors de Risc</i></u>
Rebuig agut	Hipertensió arterial
Rebuig subagut	Lípids
Immunosupressió inadequada	Funció retardada de l'empelt
Anticossos	Hiperfiltració glomerular
Incompatibilitat HLA	Edat i causa de mort del donant
Trasplantament de cadàver	Isquèmia freda
Retrasplantament	Diabetis
	Sexe del donant
	Temps de diàlisi
	Hepatitis C

<u><i>Factors preventius</i></u>	<u><i>Factors de risc</i></u>
Compatibilitat HLA	Trasplantament de cadàver
Prevenió de rebuig agut	Hiperimmunització
Immunosupressió	Retrasplantament
Disminució de la isquèmia freda	Incompliment del tractament
Profilaxis anti-CMV	Edat del donant
Control de la tensió arterial	Proteïnúria
Control dels lípids en sang	Diabetis <i>mellitus</i>
Prevenió de la diabetis de <i>novo</i>	Hepatitis C

4.2.4- Factors immunològics

La NCE és més freqüent en pacients amb rebuig agut, amb incompatibilitats HLA i amb tractament immunosupressor inadequat.

4.2.4.1- El rebuig agut

Incloent episodis de rebuig lleus, la incidència de NCE amb aquest tipus de rebuig és superior a la dels pacients sense rebuig. Tanmateix, la més gran prevalença de

NCE té lloc en els casos amb lesions histològiques severes i amb afectació vascular, i en episodis repetits o tardius de rebuig

4.2.4.2- El rebuig subagut

Aquest tipus de rebuig afavoreix la NCE. Pacients amb lesions histològiques de NCE, valors de creatinina sèrica estable i tubulitis, milloren la seva funció renal quan se'ls hi administra bolus d'esteroides i pacients sotmesos a biòpsia als tres mesos, mostren una prevalença de 30% de lesions histològiques de rebuig de grau 1. Aquest infiltrat subclínic mantingut de CMN no té cap repercussió sobre els valors de creatinina durant el primer any, el que explica el seu caràcter subclínic, però es relaciona amb una disfunció renal a llarg termini. (*Nankivell et al. 2004*)

4.2.4.3- La immunosupressió

Existeixen múltiples factors que poden alterar l'aparició de la NCE:

- Els anticalcineurínics: L'altra cara de la moneda ha estat l'alta prevalença de NCE als 10 anys de tractament. Contribueixen a l'aparició de hialinosis arteriolar, glomerulosclerosi i dany tubulointersticial.
- Rapamicina: En models animals, aquest inhibidor de la resposta a la IL-2, tindria la facultat de prevenir la NCE per inhibició de la via mTor-akt (via akt pot ser estimulada per CD40 que està sobreexpressat en pacients amb NCE).
- Micofenolat Mofètil: En associació a la rapamicina, representa el tractament immunosupressor més eficient per a la prevenció de lesions histològiques degudes a la NCE.
- Isquèmia: És un factor de risc significatiu de pèrdua de l'empelt a llarg termini. Cal destacar que existeix una millor supervivència de l'empelt en pacients trasplantats amb òrgans de donant viu que amb òrgans de cadàver, fins i tot si aquest darrer tenia millor histocompatibilitat. La diferència de supervivència entre dos grups diferents només en el temps

d'isquèmia freda (superior en donant cadàver) i la mort cerebral (només per a donants cadàver) és significativa (*Salahudeen et al. 2004*).

- Funció retardada de l'empelt.
- Recaiguda a la malaltia de base.
- Edat del donant: L'edat del donant i la creatinina sèrica a l'any són bons factors predictius de la supervivència de l'empelt a llarg termini i es correlacionen amb la prevalença de la NCE. L'edat del donant suposa la pèrdua progressiva de nefrons funcionals per esclerosi glomerular. Aquesta sol ser d'un 5% a partir de la quarta dècada de vida i d'un 10 a un 30% en la vuitena dècada. Per conseqüent, els glomèruls restants es veuen sotmesos a una hiperfiltració glomerular i glomerulosclerosi que condueix al deteriorament progressiu de la funció renal.

5- Una alternativa al rebuig: la tolerància

En el camp de la immunologia, la tolerància es defineix com la no-reactivitat del sistema immunològic a un determinat grup d'antígens, mentre aquest manté una reactivitat normal a tots els altres. Per consegüent 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. Varis autors, però, han definit diversos estats de tolerància, basant-se en la seva pròpia experimentació, per a descriure'n petites variacions:

- **tolerància metastable:** sovint després del trasplantament, es tracta d'una acceptació que pot revertir en tot moment cap a rebuig agut o crònic. S'ha descrit en alguns casos després d'un inici i posterior retirada de la immunosupressió on el receptor ha patit episodis més tardius de rebuig agut o crònic (*Lafferty et al. 1986; Fechner et al. 1997; Burlingham et al. 2000; Kusaka et al. 2000*).
- **tolerància estable:** es desenvolupa de forma tardana després del trasplantament i es caracteritza per la no-reactivitat del receptor fins i tot en el cas d'injecció voluntària d'antígens del donant (*Lafferty et al. 1986*).
- **tolerància diferencial:** ocorre quan hi ha acceptació d'un òrgan i al mateix temps hi ha rebuig d'un altre òrgan del mateix donant. Aquest fet podria estar explicat per la presència d'algun antigen específic de teixit que podria provocar aquest rebuig diferencial (*Burlingham and Steinmuller 1983*).

La tolerància podria tenir varis actors, però els limfòcits T tenen un paper destacat ja que estan involucrats directament en rebuig agut i/o crònic i consegüentment, la inactivació de llur funció podria induir tolerància.

Per tant, si només tenim en compte els limfòcits T, els mecanismes de tolerància es podrien descriure com a:

- intrínsecs, referents únicament a les cèl·lules T (citotòxics o *helpers*) i per tant a apoptosi o anèrgia.

- extrínsecs, en referència a la regulació de les cèl·lules T per altres cèl·lules (DC immadures, T reguladores).

Tanmateix altres autors han descrit la tolerància com a dominant o recessiva tenint en compte que la primera seria transferible a receptors *naïves* i la segona no. La diferència entre les dues resideix en el fet que la primera seria deguda a una supressió de la reacció immune per cèl·lules supressores (entre elles les cèl·lules T reguladores) i la segona seria deguda a l'anergia o la deleció de les cèl·lules efectores (*Kyewski and Derbinski 2004*).

5.1- Educació normotolerant del sistema immunològic

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 a evitar una hiper-estimulació o bé l'estimulació crònica dels actors de la immunitat.

5.1.1- Deleció central: el sistema tímic

Existeixen dos mecanismes que formen la deleció central. Es tracta de la selecció positiva i la selecció negativa, i tenen lloc en el timus. El timus és un òrgan que involuciona al llarg de la vida de l'individu però ha estat descrit que encara segueix funcional en la setena dècada de vida de l'individu (*Auchincloss 2001*).

La selecció positiva és la primera selecció a la que estan sotmesos els limfòcits T immadurs que són doble negatius respecte als marcadors CD4 i CD8. Aquest procés permet la tria dels limfòcits que presentin CD3, TCR i els marcadors CD4 o CD8 en el primer pas de la seva maduració, per reconeixement de CMH I/II presentat per les cèl·lules epitelials corticals del timus. La resta del limfòcits mor per falta d'estimulació, el que s'anomena mort per negligència (*death by neglect*).

Seguidament, la selecció negativa serveix per a excloure els limfòcits que presentin una alta afinitat per als antígens propis presentats per les CPA. Així, aquests

limfòcits seran eliminats per apoptosi que els hi serà induïda durant el reconeixement de dits autoantígens.

5.1.2- Mecanismes perifèrics

Degut a l'absència o la representació insuficient d'alguns antígens en el timus per a provocar l'eliminació completa de cèl·lules considerades autorreactives, algunes poden escapar a aquest primer mecanisme de control.

Per això existeix una sèrie de sistemes perifèrics per a controlar la presència de cèl·lules que hagin "escapat" al sistema de control central el que es traduiria per l'existència de cèl·lules T autorreactives en sang perifèrica. Així, s'aconsegueix evitar mecanismes d'autoimmunitat i també frenar una resposta immunològica a un antígen estranger quan aquest ja ha estat eliminat. Per tant, l'existència de mecanismes de regulació perifèrics esdevé una peça fonamental en la homeòstasi del sistema immunològic (ja que una resposta mantinguda pot esdevenir crònica i una inflamació mantinguda pot ésser molt nefasta per als teixits o per a l'individu).

5.1.2.1- Anèrgia

L'anèrgia és un mecanisme de tolerància perifèrica que condueix a una inactivació funcional de cèl·lules T auto-reactives (o considerades auto-reactives). Inicialment es va descriure com un procés d'activació incomplet que succeeix quan un limfòcit T, que està en procés d'activació per una interacció del seu TCR amb un complex CMH-antígen, no ha completat la seva activació amb altres senyals de confirmació (o co-estimulació) (*Powell 2006*) (figura 9).

En un procés d'activació correcte, la cèl·lula que presenta l'antigen, ha de permetre l'activació del limfòcit mitjançant una senyal co-estimuladora que aporta la lligació de CD80-86 (B7.1 o B7.2) de la CPA amb CD28 del limfòcit. Així, l'anèrgia es produeix quan l'activació del limfòcit no es completa amb els elements co-estimuladors (*Larsen et al. 1996; Sayegh and Turka 1998*). S'ha descrit també que l'ús de la ciclosporina inhibeix la inducció d'apoptòsi (*Powell 2006*).

Actualment s'ha descrit que molècules accessòries com CTLA-4 podrien induir aquesta la falta de co-estimulació. Efectivament, CTLA-4 (o CD152) es fixaria directament a CD28 i també produiria una senyal inhibidora a la cèl·lula.

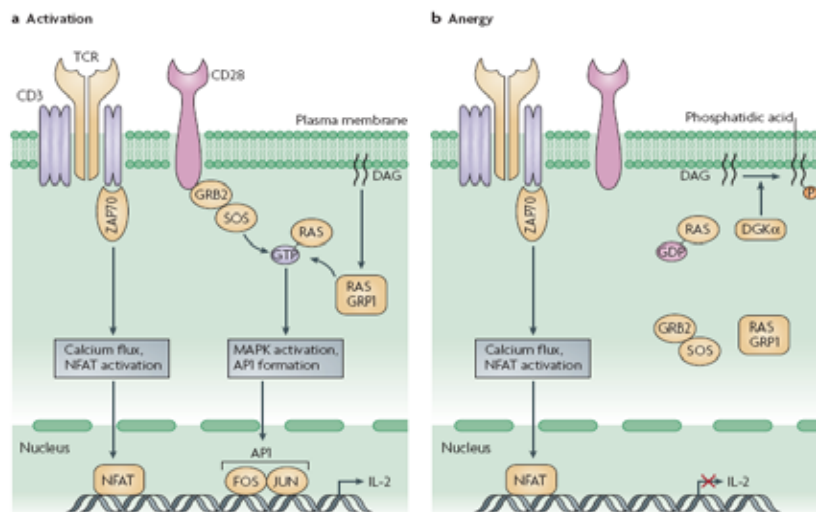


Figura 9: Comparació dels sistemes de senyalització entre una cèl·lula T (a) normalment activada i (b) anèrgica (*Fathman and Lineberry 2007*).

5.1.2.2- Deleció

Es possiblement el sistema de control més eficient per a erradicar la presència de cèl·lules T autorreactives, ja que permet l'eliminació del perill potencial sense l'amenaça constant d'una possible reactivació. La deleció perifèrica podria ser induïda en limfòcits autorreactius que rebrien una estimulació prolongada degut a la gran quantitat d'auto-antigen present, i que entrarien en apoptosi.

5.1.2.3- Supressió de l'activació

La supressió és el mecanisme associat als limfòcits T reguladors. Poden suprimir l'activitat de les cèl·lules T autorreactives i/o activades que han escapat al sistema de deleció central. La supressió de l'activació dels altres limfòcits T s'efectuaria gràcies a un contacte cèl·lula-cèl·lula (*Sakaguchi 2000; Bluestone and Abbas 2003*), el que s'anomena la tolerància mediada per cèl·lules T (*Yong et al. 2007*).

5.1.2.4- Les cèl·lules T reguladores

Aquests limfòcits T reguladors o Treg es caracteritzen en primer lloc per ser CD4 positius, es 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 i humoral, 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 (*von Herrath and Harrison 2003*). La figura 10 mostra els diferents tipus cel·lulars i llurs potencials mètodes de regulació.

Experiments en ratolins han demostrat que la timectomia abans del 3er dia de vida genera autoimmunitat però que la infusió de cèl·lules T CD4+ CD25+ podia evitar aquest tipus d’autoimmunitat (*Asano et al. 1996*) el que també es podia anomenar tolerància infecciosa.

Un subgrup de T CD4+ (entre un 5 i 10% de la població de cèl·lules T CD4+ (*Yong et al. 2007*)) co-expressen el receptor de la IL-2 anomenat CD25. Aquest tipus de T CD4+ CD25+ podrien tenir un origen tímic i serien considerades com a naturals, es a dir amb el mateix origen que les altres T CD4+ (*naturally developing Regulatory T cells*).

Aquestes cèl·lules inhibeixen, *in vitro*, la resposta de les cèl·lules T CD4+ i T CD8+ (*Field and Gao 1998; Gao et al. 1999; Sanchez-Fueyo et al. 2002*). La retirada experimental de les T CD4+CD25+ o la incorporació de IL-2 al medi poden restablir la funció proliferativa d’aquestes cèl·lules reactives. Aquesta dada ha permès la identificació de les cèl·lules Treg com a inductores d’anèrgia .

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 son aparentment similars a les Treg normalment presents en individus no trasplantats (es a dir les reguladores de la “homeòstasi” immunològica). 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.

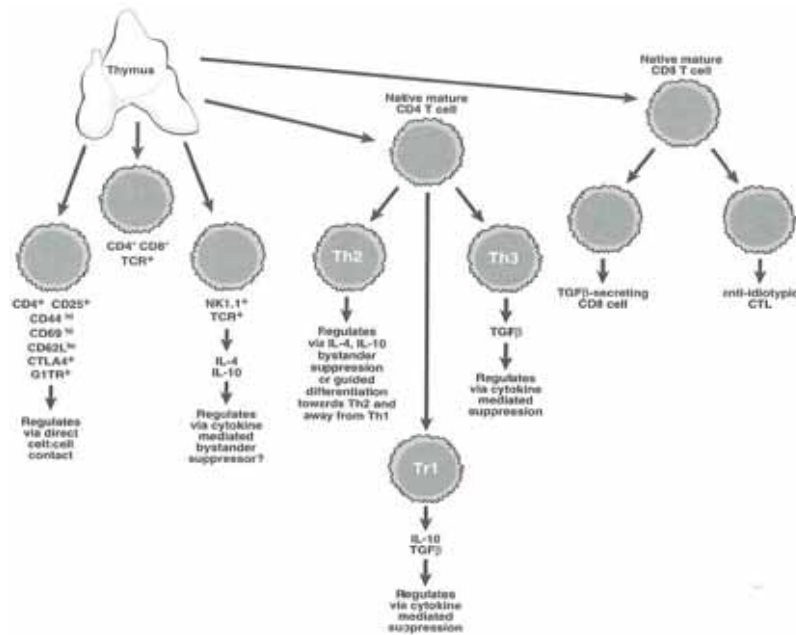


Figura 10: Diferents tipus cel·lulars T i llur potencials mètodes de regulació (Burlingham and Wilkes 2004).

Aquestes cèl·lules expressen alts nivells de CD25 de forma persistent, junt amb baixos nivells de TCR i CD4 en comparació a les T CD4⁺ naïves. Tanmateix també expressen nivells anormals de CTLA-4, GITR i també sobre-expressen CD44, CD69, ICAM (CD154).

Generalment, en citometria de flux, les cèl·lules Treg estan classificades com a CD4⁺ CD25⁺⁺ o CD25^{high}, però també es podrien identificar més clarament afegint qualsevol dels marcadors de superfície citats. Entre tots els limfòcits T CD4 positius, les Treg tenen l'expressió més alta de CD25.

Existeix però, un altre marcador intracel·lular que permet diferenciar aquests Treg, es tracta de l'expressió del factor de transcripció FoxP3 (Forkhead box P3). Experiments en ratolins, on s'obté la inactivació d'aquest gen per mutacions, mostren una aparició de malalties autoimmunes limfoproliferatives, així com els ratolins *scurfin*. Tanmateix, en humans la síndrome d'Immunodisregulació Poliendocrinopatia i Enteropatia lligada a l'X (IPEX), conté mutacions en el gen Foxp3 (Bennett et al. 2001).

5.2- Un cas diferent : El sistema hepàtic.

Immunològicament, el fetge sembla tenir un paper diferent, ja sigui a nivell de resposta intra-hepàtica o a nivell d'immunitat sistèmica. Com és el cas 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 a un temps indefinit fins i tot en total histo-incompatibilitat HLA, com ja ha estat demostrat en algunes espècies animals (*Calne et al. 1969; Kamada 1985; Qian et al. 1994; Crispe et al. 2006*), en canvi, altres trasplantaments amb les mateixes disparitats HLA ofereixen ràpidament un rebuig (*Gassel et al. 1992; Calne and Davies 1994; Farges et al. 1994; Qian et al. 1997*). 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 a nivell d'infeccions en les que el sistema immunològic (SI) és ineficient. Patògens hepatotròfics com la hepatitis B, la hepatitis C o la malària esdevenen infeccions cròniques que deterioren l'òrgan i en les que el SI no pot actuar (*Rehermann and Nascimbeni 2005*).

Generalment els trasplantaments de fetge requereixen menys immunosupressió i experimenten menys episodis de rebuig o episodis (mediats per cèl·lules T) de menor intensitat que en altres òrgans vascularitzats (*Calne 2000*). S'han dut a terme experimentacions varies en el camp de la tolerància per a evidenciar aquest paper tant 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 pot existir una predisposició tolerogènica innata per a protegir l'òrgan d'inflamacions constants i d'un conseqüent dany tissular imminent (*Crispe 2003*).

La tolerància engendrada no es deu només a una ignorància dels seus antígens, sinó que es deu a un procés actiu format per diversos mecanismes que seran descrits a continuació.

5.2.1- Alta capacitat regenerativa del fetge

Una de les propietats més característiques d'aquest òrgan és sense dubte la seva gran capacitat de regeneració. Aquesta propietat es 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 moderades de rebuig. Per tant, existeix una primera "resistència" fisiològica a un rebuig actiu però moderat.

5.2.2- Tipus de cèl·lules especialitzades

Existeixen diferents tipus de cèl·lules especialitzades en el fetge.

- **cèl·lules endotelials:** a part la seva funció com a cèl·lula endotelial, aquestes cèl·lules tenen la facultat de poder presentar antígens solubles mitjançant l'HLA de classe I, el que es coneix com a fenomen de *cross-presentation*. Es pensa que aquest mecanisme repercuteix en la creació de cèl·lules CD4+ reguladores i per tant, com a mecanisme potencialment tolerogènic (*Limmer et al. 2000*). També existeixen nombrosos espais que creen una discontinuïtat en l'endoteli, coneguts com a fenestracions, que permeten un contacte directe dels hepatòcits amb l'espai vascular.
- **hepatòcits:** involucrats en el metabolisme bioquímic, poden presentar antígens a les cèl·lules immunocompetents
- **cèl·lules de Kupffer:** són macròfags especialitzats i específics del fetge que formen el 80-90% dels macròfags totals de l'organisme. Estan directament involucrades en la resposta a infeccions, toxines, isquèmia i altres factors d'estrés (*Bilzer et al. 2006*)
- **cèl·lules dendrítiques:** En un fetge normal, el nombre de DC és 5 cops més elevat que en qualsevol altre òrgan sòlid, però la seva densitat és la més baixa (*Steptoe et al. 1999*). A més, la majoria d'aquestes DC són immadures, expressen nivells baixos de CMH II i de CD80-CD86 (*Thomson et al. 1999*), secreten IL-10 (potent acció inhibidora de

factors pro-inflamatoris i reducció de la presentació antigènica per les CPA) (*Goddard et al. 2004*) i tenen una expressió reduïda de TLR-4 (Toll-like receptor-4) (*De Creus et al. 2005*) que consegüentment augmenta el seu llindar per a ser activades. Cal destacar, però, que no totes les DC del fetge són immadures i que el fenotip i la maduresa d'aquestes DC pot variar en qualsevol moment durant la seva migració als OLS.

5.2.3- Anatomia peculiar

Degut a la seva anatomia particular, el fetge conté uns espais privilegiats anomenats sinusoides que provoquen canvis hemodinàmics aconseguint un alentiment del corrent sanguini. També, en l'espai sinusoïdal, existeixen les fenestracions, que juntament amb l'alentiment del corrent, permeten el contacte directe entre els limfòcits circulants i les cèl·lules de Kupffer o els hepatòcits .

5.2.4- Secreció de molècules solubles de CMH de classe I i II

El fetge trasplantat allibera grans quantitats de CMH solubles de classe I (HLA-Is), per això es va creure que podia ser uns dels factors que expliqués aquest poder tolerogènic.

Experimentalment, augmentant la secreció d'HLA-Is (per injecció d'hepatòcits genèticament modificats o adenovirus) en trasplantaments d'òrgans que ja estan en procés de rebuig (cor (*Graeb et al. 2002*) o fetge (*Geissler et al. 1997*)), es va aconseguir allargar la supervivència de dits òrgans.

Aquestes molècules d'HLA-Is apareixen en el receptor en el poc temps que segueix el trasplantament i es poden detectar mentre l'òrgan continuï actiu fent la seva funció, però desapareixen quan l'òrgan es rebutjat o està extret de forma experimental (*Calne et al. 1969*).

L'expressió de HLA-Is no només queda restringida als trasplantaments de fetge, també s'han detectat HLA-Is en la majoria de trasplantaments de ronyó i en la meitat del trasplantaments de cor. Però, només els HLA-Is secretats per el fetge trasplantat semblen tenir un efecte tolerogènic (*Adamashvili et al. 2005*).

Existeix també la molècula de CMH de classe II soluble (HLA-II_s). S'han fet estudis del seguiment de l'expressió d'HLA-II_s en trasplantaments de fetge, ronyó i cor però no s'ha establert cap correlació amb rebuig, infecció, secreció d'HLA-I_s, ni cap altra alteració clínica del pacient (*McDonald et al. 1994*).

5.2.5- Activació de cèl·lules T incompleta (*Tolerogenic liver DC*)

Les cèl·lules dendrítiques són cèl·lules dites professionals en quant a la presentació d'antígens a la seva superfície, el que les classifica inexorablement com el més potent dels activadors responsables de l'inici de la resposta immunològica.

Com ja descrit anteriorment, l'activació dels limfòcits requereix senyals co-estimuladores per a poder ser efectiva. Aquesta falta de co-estimulació pot succeir quan les DC són immadures i no poden proveir senyals de co-estimulació, com pot ser el cas en el fetge.

Existeix una alta probabilitat que hi hagi una migració de cèl·lules del donant en el receptor. Aquestes cèl·lules també poden ser DC o progenitors de DC i podrien migrar cap al timus del receptor, el que podria explicar la delecó central de les cèl·lules T dirigides cap al donant per selecció negativa tímica (*Duncan et al. 2002; Bonasio et al. 2006*). Aquest fenomen podria explicar la no generació de noves cèl·lules T reactivas dirigides contra el donant. No explicaria però una delecó perifèrica, ja que en rebuig ja establert el timus no tindria un paper destacat. A més, experimentalment, ratolins timectomitzats poden acceptar trasplantaments de fetge (*Kobayashi et al. 1995*). També existeix la possibilitat que en el moment del trasplantament, degut al SIR, les DC puguin migrar sense assolir l'estatut de maturació necessari i per tant que siguin cèl·lules immadures que migrin als OLS i puguin induir apoptosi (el que explicaria la reducció de la resposta al·logènica).

Degut a la peculiaritat anatòmica dels espais sinusoïdals, pot existir una primera interacció entre els limfòcits T CD8⁺ *naives* i varis tipus cel·lulars com ara les cèl·lules de Kupffer, les DC del fetge, les cèl·lules endotelials del fetge i els hepatòcits. Estudis *in vitro* mostren que el contacte entre limfòcits T CD8⁺ i hepatòcits produeix limfòcits incompetents amb una mitja vida curta que moren

per negligència, el que suggereix un mecanisme de deleció clonal perifèrica que explicaria part de la tolerància (*Sharland et al. 1999*) (figura 11).

5.2.6- Resum de les peculiaritats tolerogèniques del fetge

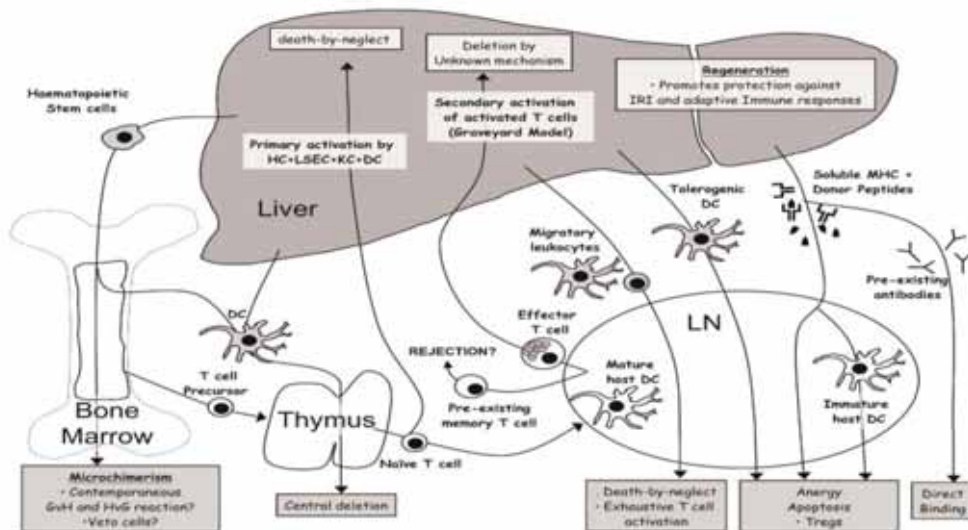


Figura 11: Resum dels possibles mecanismes d'acceptació del fetge trasplantat.

Llegenda, **GvH**: Graft versus Host, **HvG**: Host versus Graft, **HC**: Hepatic Cell, **LSEC**: Liver Sinusoidal Endothelial Cell, **KC**: Kupffer Cell, **DC**: Dendritic Cell, **LN**: Lymph Node, **IRI**: Ischemia-Reperfusion Injury. Extracte de: (*Benseler et al. 2007*)

Cal destacar, però, que la inducció de tolerància ja ha estat descrita fa molt temps però els mecanismes responsables de dita acceptació encara no han estat elucidats. El descobriment d'aquests mecanismes aportaria grans beneficis en la immunobiologia del trasplantament i una solució en front del rebuig dels òrgans i de l'acceptació del(s) antigen(s) diana en l'autoimmunitat.

5.3- Requeriments per a la tolerància central i perifèrica

Segons Starzl, (figura 12), després del trasplantament s'estableix un equilibri que pot dirigir-se cap a tres sortides que serien malaltia de l'empelt contra l'hoste, rebuig o èxit (es a dir cap resposta immunològica i per tant acceptació de l'empelt).

La resposta immunològica efectiva es basa en 4 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”, el “on”, el “durant quant temps (manteniment, cronicitat,..)” i el “factor intensitat i seqüeles clíniques”.

El fallo de la resposta immunològica podria conduir a l'èxit en el cas del trasplantament.

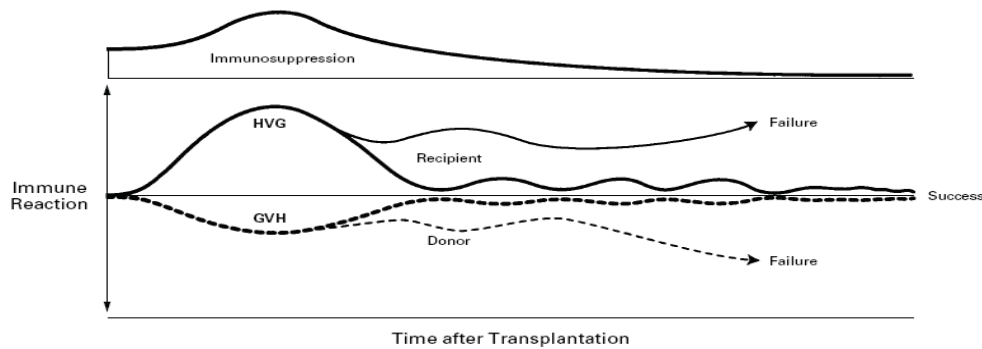


Figura 12: Possibles reaccions immunològiques post-trasplantament, segons Starzl (*Starzl and Zinkernagel 1998*), que descriu: “l'esgotament clonal recíproc després d'un trasplantament és mantingut per una estimulació de baix grau (depenent del microquimerisme) entre les dues poblacions leucocitàries”. (GVH (Graft versus Host) = empelt contra l'hoste ; HVG (Host Versus Graft) = hoste contra l'empelt).

Aquest èxit es caracteritza, però, per un empeltament complet i requereixen el compliment de 4 accions inter-relacionades que han de succeir en un curt període de temps :

- delecio clonal de la resposta immune del receptor
- delecio clonal reciproca de la possible resposta immune del donant
- manteniment de les delecions
- reduccio de la immunogenicitat que indueix l'òrgan trasplantat

Degut a la complexitat del SI, poden existir diferents possibilitats per a induir tolerància. La tolerància dita central que permet l'educació *de novo* de cèl·lules reactives i l'eliminació de cèl·lules considerades auto-reactives, i la delecio perifèrica que permet l'eliminació, el silenciament o la repressió de cèl·lules ja reactives.

La tolerància central es basa en la delecio clonal de les cèl·lules T reactives dirigides contra el donant, gràcies a la presència i actuació de cèl·lules dendrítiques derivades del donant en el timus. S'aconsegueix així que les cèl·lules alo-específiques dirigides contra el donant siguin considerades com a auto-reactives.

Aquest mètode està considerat el més segur per a la inducció de tolerància al donant, ja que es tracta el problema a la base, i per tant, la probabilitat teòrica de rebuig seria la mateixa que per a l'autoimmunitat.

Es creu que aquest mecanisme és el més probable en la majoria de models de quimerisme mixte (macro o microquimerisme), tot i que la deleció clonal seria el mecanisme més probable en models experimentals en absència de timus (*van Pel et al. 2003*).

5.4- Protocols tolerogènics

Un estat tolerogènic pot ser aconseguit i mantingut per una sèrie de mecanismes immunològics que poden actuar de forma seqüencial (*Monaco 2004*). Els protocols tolerogènics han estat basats principalment en la inducció d'aquests mecanismes:

- L'anèrgia
- La supressió.
- La deleció clonal.
- El bloqueig de la co-estimulació.
- El quimerisme (descripció en el capítol IV)

L'avantatge de la deleció central sobre l'anèrgia (provocada en perifèria), és que la tolerància provocada per anèrgia de cèl·lules T pot ser alterada (en condicions específiques com ara la infecció viral que estimula la hiper-secreció de IL-2) i per tant, revertida, mentre que la deleció central provoca la desaparició d'aquestes cèl·lules i doncs, sense cap possibilitat de reactivació d'aquestes cèl·lules (*Ramsdell and Fowlkes 1992*).

CAPÍTOL IV

QUIMERISME

1- Definicions

1.1- Mitològica

En la complicada mitologia grega, *Equidna*, una nimfa amb cara i cos de dona d'una bellesa extrema i amb cua de serp com a cames, es va unir a *Tifó* (gegant agressiu amb foc sortint dels ulls i extremitats de caps de drac al llarg del cos) i junts van engendrar (segons algunes versions de la mitologia) una descendència de 10 fills, coneguda en la majoria dels relats mitològics:

- *Kerberos*, el gos de 3 caps, cua de serp i guardià de l'inframón.
- *Orthos*, el gos de dos caps, guardià del reumat de bous vermells de *Gerió*.
- *Hidra*, drac de múltiples caps guardià del llac de *Lerna*.
- *Chimaera*, híbrid de cos i cap de lleó amb un cap de cabra i cua amb cap i coll de drac.
- *Sphinx*, híbrid amb cos de lleó, cara humana i ales, també adoptat per la mitologia egípcia (sense ales).
- *Drac de Ladon*, drac de cent caps que parlaven cadascun un llenguatge diferent.
- *Lleó de Nemea*, terrorífic lleó de grans dimensions amb facultat de parla.
- *Ethon*, àliga gegant encarregada de turmentar *Prometeo*.
- *Drac de Cólquida*, drac insomne encarregat de vetllar el *Vellocino d'Or*.
- *Truja de Cromió*, mare del *Senglar de Calydon*.

1.2- Científica

El terme de quimera o quimèric s'utilitza habitualment i de forma metafòrica, com a concepte per a 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 es 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 (*Owen 1945*) l'any 1945, que va ressaltar el fet que en vedells, els bessons no idèntics que neixen amb anastomosis vasculars entre les seves placentes, comparteixen grup sanguini. Tanmateix, Billingham (*Billingham and Reynolds 1952*) va realitzar trasplantaments de pell entre aquest tipus d'animals i va observar que els empelts sobreviuen indefinidament, fins i tot amb la presència de discrepàncies en sexe.

Més tard, el mateix grup de Medawar, Billingham i Brent (*Billingham et al. 1955*) va descriure el fenomen de tolerància immunològica adquirida (*actively acquired immunological tolerance*), injectant cèl·lules de la melsa del donant en ratolins nounats 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 el 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 per el grup de Monaco i Wood (*Monaco et al. 1975*) (i més recentment revisat (*Monaco 2002*)), al descriure l'associació entre la persistència de cèl·lules del moll de l'os del donant en el receptor i la supervivència dels empelts de pell en ratolins tractats amb sèrum anti-limfocític i injeccions de moll de l'os.

Més tard, el grup de Starzl (*Starzl et al. 1992; Starzl et al. 1993*), 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. També va definir el microquimerisme (nombre inferior a 1% de les cèl·lules del receptor en sang perifèrica) 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 histologia.

2.1- Quimerisme com a epifenomen del trasplantament

Havent prèviament definit el concepte de mort cerebral del pacient i les injúries que pateixen els òrgans (les citoquines secretades, estrès, extracció...), existeix una alta probabilitat d'infiltració de cèl·lules d'origen hemopoètic del donant en el teixit de l'òrgan trasplantat (per traumatismes inherents al trasplantament), i per consegüent, la possibilitat de co-transferrir passivament cèl·lules immunogèniques i derivades del moll de l'os del donant. La natura d'aquestes cèl·lules pot ser variable, entre elles, hi poden haver monòcits, que, al ser altament quimio-sensibles i ser els primers mobilitzats en arribar a l'origen de la inflamació, es poden diferenciar en macròfags i/o cèl·lules dendrítiques (DC). També es podria tractar de limfòcits o altres leucòcits que podrien promoure directament un rebuig o la tolerància com a resultat de la balança entre l'estimulació o la deleció clonal, o altres mecanismes pro-tolerogènics de les cèl·lules T dirigides contra antígens del donant.

Existeixen nombroses teories sobre l'existència del microquimerisme i sobre el seu paper respecte al rebuig de l'òrgan trasplantat. Enumerant només algunes de les principals investigacions relacionades amb el tema dels trasplantaments i de l'existència del microquimerisme, podem veure que encara existeixen molts dubtes respecte a l'origen, natura, funció i perdurància del microquimerisme.

Starzl va publicar varis articles (*Starzl et al. 1992; Starzl and Zinkernagel 1998*) on parlava de la importància del microquimerisme en els trasplantaments d'òrgans

sòlids. La seva teoria era que en els primers dies post-trasplantament, existeixen leucòcits del donant circulants (que tenen com a origen el moll de l'os del donant) i de diversos llinatges, que poden formar entre l'1 i el 20% de les cèl·lules mononuclears circulants en sang perifèrica del receptor (macroquimerisme). La quantitat de cèl·lules presents depenent de l'òrgan trasplantat, essent més elevada en trasplantament de fetge i intestí i menys elevada en trasplantaments de cor i ronyó. També va dir que entre aquests leucòcits podem trobar cèl·lules mare totipotents i cèl·lules dendrítiques que poden migrar cap als òrgans limfoides del receptor. També explicava que a les dues setmanes post-trasplantament, es poden detectar cada cop més leucòcits del donant en altres teixits no limfoides i que cap als tres mesos es poden detectar fins i tot en la pell i en el cor. Confirmava que entre les 2 i 4 setmanes post-trasplantament, es poden identificar els leucòcits del donant en sang perifèrica.

Segons la seva experimentació, el microquimerisme es un prerequisite per a l'evolució de l'acceptació de l'òrgan en determinades circumstàncies clíniques, però no és ni sinònim ni conseqüència de dita acceptació. Va proposar que el resultat del trasplantament de fetge es veu afectat per la lluita i/o l'equilibri entre 2 reaccions (*Starzl and Murase 2000*):

- la reacció de l'empelt contra l'hoste (*Graft versus Host, GvH*)
- la reacció de l'hoste contra l'empelt (*Host versus Graft, HvG*)

L'equilibri entre aquestes dues reaccions marca l'acceptació de l'òrgan i els extrems poden acabar en malaltia de l'empelt contra l'hoste (GvHD) o en rebuig.

També s'ha descrit la detecció de microquimerisme després de transfusions de sang en població civil i militar, obtenint com a resultats que el 50 % dels transfosos (amb sang sense desleucotitzar tenen microquimerisme) i que en mesos o anys pot arribar a ser entre el 2 i el 5% dels leucòcits totals del receptor (*Reed et al. 2007*) (tenint en compte la diferència que pot existir entre els protocols experimentals).

2.2- Absència de correlació amb la disminució del rebuig.

Moltes experimentacions en animals coincideixen en la presència de microquimerisme detectable en el receptor després del trasplantament. Però, alguns

autors, no van associar la presència d'aquestes cèl·lules del donant amb alguna de les formes d'hipo-resposta.

El trasplantament cardíac heterotòpic en un model murí, és un dels exemples en els que s'ha permès la identificació de cèl·lules dendrítiques del donant en la melsa del receptor, lloc on afirmen que s'ha induït una resposta immunològica de rebuig (*Kupiec-Weglinski et al. 1988; Austyn and Larsen 1990; Larsen et al. 1990*).

En el camp d'experimentacions i observacions en humans, alguns autors no han observat la presència de microquimerisme en humans en trasplantaments de ronyó de llarg termini, realitzats ara fa més de 20 anys (*Caillat-Zucman et al. 1994; Suberbielle et al. 1994; Strober et al. 2000*), i, en el cas de detecció de microquimerisme, no s'ha relacionat amb menys rebuig (*VanBuskirk et al. 2000*).

Anàlisis prospectius en trasplantaments de cor o fetge (*Hisanaga et al. 1996; Devlin et al. 1998; McDaniel et al. 1999*) han demostrat la presència de microquimerisme per als dos òrgans i fins i tot una diferència notable en la quantitat de cèl·lules del donant detectades per a cada tipus de trasplantament. Afegint els trasplantaments de ronyó (*Elwood et al. 1997; Sivasai et al. 1997*), s'han detectat pacients amb microquimerisme que han desenvolupat episodis de rebuig.

La realització d'un petit metanàlisi (*Sahota et al. 2000*), en un recull de publicacions (n=21) sobre microquimerisme i rebuig, ha descrit el microquimerisme com a un fenomen real i reproductible. També ha relacionat la presència de microquimerisme en trasplantaments de cor i ronyó amb una més gran incidència de rebuig (contràriament a trasplantaments de moll de l'os). Més recentment (*Reinsmoen et al. 1999*), s'ha associat la presència de microquimerisme a un estat hipo-reactiu en trasplantament de pulmó, però no trasplantament de cor.

2.3- Quimerisme inductor de tolerància

Donant la volta a la definició de tolerància, podria ser definida com l'habilitat del sistema immunològic per a reconèixer i destruir els patògens estranys a l'organisme mentre roman insensible i inerta en quant a la destrucció dels teixits autòlegs. Possibles explicacions de la tolerància immunològica van sorgir cap a

mitjans del segle XX, associant al quimerisme la “tolerància infecciosa” o tolerància adquirida (*Owen 1945; Anderson et al. 1951; Billingham et al. 1953*).

S’ha demostrat l’existència de limfòcits B o T amb afinitat per a autoantígens en sang perifèrica en individus sans, en altres paraules, el sistema immunològic perifèric compta amb la presència de cèl·lules viables auto-reactives (*Parry et al. 1998; Rovere-Querini et al. 2005*). Però, en aquests individus sense cap patologia autoimmunitària, aquestes cèl·lules auto-reactives existents no compleixen la seva funció. Aquest fenomen podria trobar una explicació mitjançant exemples com ara l’acceptació del fetus per part de la mare o alguns tipus de trasplantaments d’òrgans entre individus genèticament diferents, acceptats sense immunosupressió. En aquests dos casos, podríem parlar de la confrontació de dos sistemes immunològics: el majoritari (hoste o mare) i l’ultraminoritari corresponent al fetus, a l’òrgan o al teixit trasplantat.

En humans, el coneixement actual sobre la tolerància a llarg termini és limitat ja que el món dels trasplantaments és relativament recent. Podríem dir que un individu de 35 anys trasplantat d’un ronyó l’any 1965 tindria actualment 72 anys i també cal destacar que l’era de la revolució de la immunosupressió amb l’aparició de la ciclosporina data dels anys 80. Existeixen pocs casos amb seguiments tant extensos, però algunes publicacions fan referència a seguiments de més de 25 anys en humans (*Starzl et al. 1993; VanBuskirk et al. 2000*). Per aquesta raó la tolerància ha estat principalment descrita en animals.

Actualment, alguns autors (*Duncan et al. 2002; Bonasio et al. 2006; Ochando et al. 2006*) han coincidit amb la idea principal descrita per Starzl en el que fa referència a la recirculació i migració de cèl·lules del donant en el receptor. Fins i tot, han anat més lluny dient que aquestes cèl·lules tenien la possibilitat de migrar cap al timus i així provocar una tolerància central dirigida cap al donant, en el receptor de model murí.

En un model murí experimental de trasplantament de fetge, l’òrgan trasplantat contenia un nombre suficient de cèl·lules mare hematopoètiques per a poder salvar un ratolí trasplantat que havia estat letalment irradiat prèviament al trasplantament (*Taniguchi et al. 1996*), el que va demostrar la possible existència de cèl·lules mare presents en l’òrgan trasplantat i llur migració en el moll de l’os del receptor.

2.3.1- Correlació amb disminució del rebuig

Alguns autors han detectat la presència de cèl·lules del donant en el receptor i han demostrat que en trasplantaments de ronyó (*Tajik et al. 2001*) o de pulmó (*Reinsmoen et al. 1999*), els pacients amb microquimerisme no tenen rebuig i que alguns dels pacients que no presenten microquimerisme tenen episodis de rebuig.

De fet, s'ha descrit el microquimerisme com a element necessari per a la inducció de tolerància en algunes revisions (*Sykes and Sachs 1990*), experiments (*Murase et al. 1995*) i com a protocols experimentals per a induir tolerància en ratolins (*Thomson et al. 1995*) o protocols basats en la persistència de cèl·lules presentadores d'antigen del donant (*Ehl et al. 1998*).

Entrant més en la natura de les cèl·lules del donant, alguns autors (*Steinman et al. 2003*) parlen fins i tot de la doble funció de les cèl·lules dendrítiques del donant que immadures provocarien tolerància, i madures reacció al·logènica dirigida.

Altres autors (*Bonilla et al. 2006*) donen per entès el fet que el microquimerisme indueixi una hipo-resposta al·logènica i descriuen més enllà de la pregunta inicial, la resposta a si el microquimerisme és la causa o la conseqüència d'aquesta hipo-resposta.

El grup de Starzl (*Kiyomoto et al. 2006*) va aportar una prova més de la necessitat del microquimerisme per a la inducció de tolerància, demostrant que l'eliminació experimental de cèl·lules circulants del donant amb l'eliminació i posterior reconstrucció del moll de l'os "toleritzat" per moll de l'os "verge", provoca rebuig.

2.3.2- Inducció de la tolerància però no del manteniment

Segons Shirwan, alguns experiments han demostrat una millora de la supervivència de l'empelt a llarg termini amb la inducció artificial de microquimerisme, però no van demostrar la protecció contra el rebuig crònic (*Shirwan et al. 1997*), deixant clar que el rebuig crònic i el rebuig agut són dos mecanismes diferents. També van hipotetitzar que el microquimerisme era un factor necessari per a la inducció de tolerància però insuficient *per se* per a poder evitar el rebuig (agut o crònic) a llarg termini en llur model experimental (*Shirwan et al. 1996*).

Existeixen experiments que suggereixen que el quimerisme seria un element inductor de tolerància però no responsable del seu manteniment, ja que en el cas

d'eliminació experimental de les cèl·lules del donant (*Ko et al. 1999*), no apareix cap forma de rebuig. Tanmateix Shirwan (*Shirwan et al. 1996*) va al·legar que el microquimerisme és insuficient per a evitar el rebuig a llarg termini.

2.3.3- Prolongació i augment del microquimerisme per infusions de moll de l'os

En quimeres mixtes, cèl·lules hematopoètiques del donant i del receptor es col·localitzen en el timus i seleccionen (selecció negativa) tant les cèl·lules autorreactives naturals del receptor com les cèl·lules *de novo* considerades com a autorreactives i dirigides contra antígens del donant. Així el resultat obtingut és un repertori de cèl·lules T tolerant envers el receptor, i per tant no autorreactiu, i tolerant envers el donant (*Tomita et al. 1994; Manilay et al. 1998*).

Khan (*Khan et al. 1996*), assegura que el quimerisme en el timus és necessari per a la deleció central, com a mecanisme major per a assegurar una tolerància persistent. En els seu experiments, una supressió experimental del quimerisme provoca l'anul·lació de la tolerància per reaparició de cèl·lules anti-donant.

Tenint en compte que existeix un *turn-over* continu de les cèl·lules presentadores d'antigen (CPA) en el timus, podem vincular doncs la necessitat d'un flux permanent de CPA provinent del donant per a garantir la presència continua d'aquestes CPA que poden garantir la deleció d'al·lorreactivitat dirigida contra el donant.

Sykes afirma que per a garantir aquesta presència seria necessària una infusió cel·lular continua o bé un "dipòsit auto-renovable", es a dir un productor ininterromput de cèl·lules garantit per una infusió o trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques (*Sykes 2001*).

Tanmateix, i directament en pacients trasplantats, alguns autors han experimentat trasplantaments d'òrgans amb trasplantaments concomitants de moll de l'os. Un protocol realitzat en trasplantaments de fetge, ronyó, cor, pulmó i intestí (*Salgar et al. 1999*), va demostrar que una infusió de cèl·lules de moll de l'os del donant (ICMOD) no presentava risc per al receptor i garantia nivells alts de quimerisme fins i tot a llarg plaç. Tanmateix, pacients amb dues ICMOD presentaven episodis de GvHD.

Un clàssic exemple d'ICMOD en trasplantaments de ronyó a llarg termini és el realitzat per el grup de la universitat de Miami (*Garcia-Morales et al. 1997; Garcia-Morales et al. 1998*), que tenen un ampli seguiment de pacients amb ICMOD, de donant viu o de donant cadavèric.

Altres autors es sumen a la hipòtesi en trasplantaments de ronyó amb la reducció o cessació de la immunosupressió inicial (*Millan et al. 2002*), o amb teories sobre protocols tolerogènics basats en la infusió de moll de l'os (*Wekerle et al. 2003*).

2.3.4- Tolerància complerta a llarg termini amb o sense retirada de la immunosupressió

L'any 1973, es va al·legar que la presència de microquimerisme permetia el manteniment de l'acceptació dels trasplantaments de pell en model experimental de ratolí (*Lubaroff and Silvers 1973*).

El seguiment d'aquesta línia va desembocar en treballs on es descrivia l'acceptació a llarg termini dels empelts i s'experimentava sobre la retirada progressiva parcial o total de la immunosupressió, en trasplantaments de ronyó (*Cai et al. 2004*) o de fetge (*Girlanda et al. 2005*).

En seguiments a llarg termini en models animals de trasplantament cor (*Hamano et al. 1996*), es va definir el microquimerisme com a factor no essencial per al manteniment de la tolerància però que l'òrgan *per se* si és necessari, i finalment, que també pot existir un sistema memòria que manté aquest estat durant un temps no definit.

En canvi, en trasplantaments de ronyó a llarg termini en humans, es va trobar una relació amb la hipo-resposta del receptor, ja que en cultius limfocitaris mixtes les cèl·lules del donant no provocaven cap reacció en les cèl·lules del receptor (*Starzl et al. 1993*).

HIPÒTESI

La 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 donant, 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 ambigüetat respecte a la detecció de quantitats tant 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 que 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.

Hipòtesi

Tenint en compte que en trasplantaments de moll de l'os, la presència de quimera mixta s'associa a l'absència de malaltia de l'empelt contra l'hoste (o GvHD), es va hipotetitzar que la presència de cèl·lules circulants del donant en sang perifèrica del receptor post-trasplantament d'òrgan sòlid s'associaria a una menor incidència de rebuig de l'òrgan.

OBJECTIUS

Objectius de l'estudi:

- 1-** Estandardització de tècniques moleculars reproduïbles per a la detecció específica de cèl·lules del donant en un receptor post trasplantament.
- 2-** Determinació de la incidència real de microquimerisme hemopoètic en pacients trasplantats de ronyó, cor i fetge. Si existeix, determinar la subpoblació leucocitària afectada (cèl·lules mononuclears o granulòcits), establir el nombre de cèl·lules circulants en cada trasplantament i finalment, la cinètica d'establiment i del manteniment (perdurància) d'aquest microquimerisme.
- 3-** 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 post-trasplantament (variacions en la incidència d'infeccions, ...).
- 4-** Establiment d'una escala de risc de rebuig aplicable a nous trasplantaments.

PACIENTS I MÈTODES

I- PACIENTS

1- Pacients

Tots els pacients trasplantats reclutats en aquest estudi varen rebre un òrgan provinent de donant cadavèric. Els trasplantaments es van realitzar a l'Hospital Universitari de Bellvitge (l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona).

1.1- Cohort prospectiva de trasplantament renal i cardíac

Es tracta del principal grup de treball en el que es basa tot l'estudi de la recerca de la relació del microquimerisme amb l'establiment del rebuig.

Es va incloure un grup de 113 pacients per a l'estudi longitudinal, es a dir que s'inicia en el pre-trasplantament i té un seguiment de 48 mesos per a cada pacient. Aquest grup està format per:

- 84 pacients amb trasplantament renal
- 27 pacients amb trasplantament cardíac.

El primer pacient trasplantat inclòs en l'estudi és del Maig de 2001 i el darrer pacient és de Maig de 2003.

En aquest grup de pacients, s'han efectuat estudis de microquimerisme, mitjançant extracció de sang perifèrica, als 2, 6, 12 i 18 mesos després del trasplantament. Per a cada pacient, s'ha efectuat un seguiment clínic fins a 4 anys després del trasplantament.

En funció de la immunosupressió a la que estaven sotmesos, es van classificar els pacients de l'estudi prospectiu en 2 grans grups, en funció de la presència o absència d'inhibidors de la calcineurina.

El grup principal estava format per pacients amb una immunosupressió basada en inhibidors de la calcineurina. Tots aquests pacients també rebien almenys dos altres immunomoduladors com ara l'àcid micofenòlic (o micofenolat mofètil o

MMF) i corticosteroides (prednisolona o PD). Aquest grup de pacients es va classificar com a grup IC (Inhibidors de la Calcineurina).

L'altre grup era més heterogeni i, per deducció, no contenia cap inhibidor de la calcineurina en la seva pauta immunosupressora, però també rebia MMF i PD. Aquest grup es va classificar com a grup no IC.

També es va incloure un grup de 8 pacients amb trasplantament hepàtic, ja que es volia verificar la veracitat de les troballes publicades prèviament en referència a la quantitat de cèl·lules del donant que es podien trobar en el receptor. Es va efectuar una sola determinació de microquimerisme als 2 mesos i amb un seguiment clínic de dos anys.

Finalment, es va obtenir:

- Pacients amb inhibidors de la Calcineurina (IC)
 - Renals (n=73)
 - Cardíacs (n=27)

- Pacients sense inhibidors de la Calcineurina (no IC)
 - Renals (n=11)
 - Hepàtics (n=8)

1.2- Cohort no prospectiva

Aquest grup de 36 pacients es va crear per a realitzar un estudi transversal en el que s'efectuava una sola determinació del microquimerisme en el període post-trasplantament, independentment de la data del trasplantament. L'objectiu era saber de forma retrospectiva si es podia determinar la presència de quimerisme, analitzar la correlació amb la incidència de rebuig i saber fins a quina data es podia determinar en pacients ja trasplantats (sense previ estudi de microquimerisme).

Aquest grup estava format per:

- 28 pacients amb trasplantament renal (trasplantats entre 1997-2005)
 - 15 amb trasplantament renal simple
(mitjana del dia d'anàlisis 505.2 ± 128.45)
 - 10 amb trasplantament renal doble
(mitjana del dia d'anàlisis 1379.8 ± 843.62)
 - 03 amb trasplantament hepato-renal
(mitjana del dia d'anàlisis 1538.0 ± 1202.60)

- 8 pacients amb trasplantament hepàtic (trasplantats entre 2003-2004)

1.3- Grup d'estudi cinètic

Una sèrie de pacients del grup prospectiu (3 trasplantaments renals (1 renal doble i 2 renals simples) i 3 trasplantaments hepàtics) van estar estudiats de forma més detallada en el temps.

Es pretenia visualitzar la cinètica d'establiment del microquimerisme en la sang perifèrica del receptor a partir del moment on s'estableix la circulació sanguínia en l'òrgan trasplantat; el que correspon al moment on s'efectua el desclampament dels vasos que irriguen l'òrgan.

En aquest grup de pacients, es va extreure sang perifèrica a temps 0 (corresponent al pre-trasplantament, o sigui abans del desclampatge) i a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 i 180 minuts després del desclampatge durant l'acte quirúrgic. En aquest grup de pacients, també es van efectuar extraccions de sang perifèrica entre el dies 7 i 14 post-trasplantament i als dos mesos.

1.4- Grup control

Per a la optimització i la validació de les tècniques de detecció de microquimerisme, es va incloure un grup de 20 voluntaris sans, no trasplantats als que puntualment se'ls va extreure sang perifèrica (es van triar les voluntaries de sexe femeni que no havien tingut descendència).

2- Processament de les mostres de sang perifèrica

2.1- Separació de les fraccions cel·lulars

Durant l'estudi, varem disposar de mostres de sang perifèrica per a cada seguiment i per a cada pacient trasplantat. Cada mostra ens va arribar en 1 tub de 5mL amb EDTA (Ethylene diamine tetra-acetate) com a anticoagulant.

El tractament per a cada mostra va ser el següent :

- Separació de 200uL de sang perifèrica
- Separació de les cèl·lules mononuclears (CMN) i de les cèl·lules granulocítiques (G) .
- Extracció del DNA per a cada fracció obtinguda

Es varen separar prèviament els 200 uL de sang perifèrica per a poder observar, un cop els resultats obtinguts, la diferència en la sensibilitat de la detecció del microquimerisme per a les diferents fraccions. Tanmateix la fracció de cèl·lules mononuclears, que creiem que seria la que contindria més cèl·lules del donant, és va separar de les altres fraccions cel·lulars per a poder augmentar la sensibilitat de la detecció. Així, si el microquimerisme era present en aquesta fracció, el percentatge de cèl·lules del donant seria més elevat en aquesta fracció que en el total de sang perifèrica (amb totes les fraccions cel·lulars).

La separació es va basar en centrifugacions per gradients de densitat obtinguts mitjançant Ficoll[®] (GE Healthcare Bio-Sciences AB). El Ficoll és un polisacàrid neutre d'alt pes molecular capaç de preservar la integritat funcional i morfològica de les membranes i de no penetrar a l'interior de la cèl·lula. La seva densitat (1,2g/mL) ens va permetre separar les diferents fraccions cel·lulars per centrifugació. Així, es va dipositar amb molta cura la sang del pacient a sobre d'un volum (3mL) de ficoll tenint en compte de no barrejar les dues fases líquides. Els

tubs es varen centrifugar durant 15-20 minuts a 2500 g. El resultat obtingut es mostra a la figura 13.

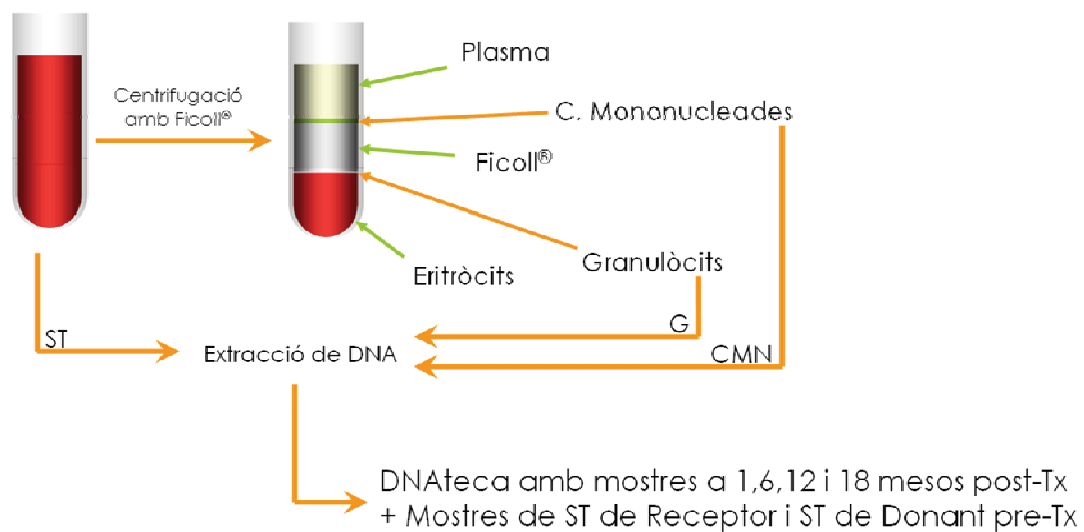


Figura 13 : Separació de les fraccions cel·lulars per centrifugació per gradient de densitat mitjançant Ficoll®.

El tub contenia 3 fases clarament visibles de plasma, ficoll i eritròcits de dalt a baix respectivament. Les cèl·lules que cercàvem estaven contingudes en les interfases, així, les CMN es situaven entre el plasma i el ficoll i les G entre el ficoll i els eritròcits (però just al damunt dels eritròcits com a una fina pel·lícula blanca). Amb cura, varem separar, en primer lloc, la fracció de CMN (fins que la interfase queda translúcida) i seguidament la fracció de G. Les cèl·lules obtingudes varen ser separades en varis al·liquotes com a mesura de seguretat. Un dels tubs va servir per a la extracció del DNA i els altres per a criopreservar a -80°C .

2.2- Extracció del DNA

Després d'obtenir les diferents fraccions, varem procedir a la extracció de DNA per a cada una d'elles. Es va utilitzar el kit comercial d'extracció de DNA QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) i seguint les instruccions del fabricant varem obtenir el DNA corresponent a cada fracció. Es van obtenir volums de 120 a 200 μL a concentracions rondant els 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Així, i per a cada seguiment de cada pacient, disposàvem de 3 tubs de DNA, un directament de sang perifèrica, el segon corresponent a la fracció de cèl·lules mononuclears i el tercer, corresponent a la fracció de cèl·lules granulocítiques creant una DNAteca criopreservada a -80°C. Tanmateix com es van criopreservar els corresponents “*pellets*” cel·lulars com a còpia de seguretat.

III- Estatut de Rebuig

3- Definició de l'estatut de rebuig agut adoptat

De forma protocol·lària, s'efectua una biòpsia de control per a poder diagnosticar de precoçment el dany histològic previ a la deterioració funcional. Poden existir algunes variants per a determinar a partir de quin grau s'estableix que hi ha rebuig en biòpsies de l'òrgan en anatomia patològica. Per a això s'han establert els criteris de Banff (ciutat Canadenca on s'ha efectuat el consens) que estableixen les regles d'avaluació i classificació de la histologia de l'empelt. Actualment, es segueixen utilitzant de forma habitual, els criteris de Banff establerts l'any 1997 (que ja tenien en compte nous criteris per a diagnosticar el rebuig agut). Cal destacar que hi ha hagut actualitzacions periòdiques d'aquesta classificació que tenien en compte altres aspectes motivats per els, cada cop més nombrosos, trasplantaments ABO incompatibles que generaven tipus de rebutjos hiperaguts que fins ara no es tenien molt en compte. Així, l'any 2003 es van publicar els nous criteris de Banff que eren una actualització dels antics criteris de 1997.

L'objectiu dels criteris de Banff és unificar el diagnòstic histològic i que aquest es pugui realitzar en qualsevol centre. La avaluació de la biòpsia segueix un procediment ben definit en el que es té en compte la mida de la mostra i la severitat de les lesions agudes i cròniques dels compartiments renals, el que permetrà la producció d'un diagnòstic histològic que serà afegit al diagnòstic clínic existent.

3.1- Renal

Les biòpsies de protocol es van realitzar en post-trasplantament als pacients amb funció renal estable, per a poder diagnosticar de forma precoç l'aparició de lesions histològiques prèvies al deteriorament de la funció renal.

Segons els criteris histopatològics estàndards de Banff (1997 i 2003), l'estatut de rebuig agut en pacients trasplantats de ronyó va ser atorgat a les biòpsies que presentaven un *score* mínim de nivell 4.1A, essent el nivell 4 característic de rebuig agut amb dany cel·lular.

Durant els tres primers mesos, un 30% dels pacients amb funció renal estable presenta canvis histològics de rebuig agut tot i mantenint una funció renal estable. Aquest fenomen, conegut com a rebuig subclínic, s'associa a una pitjor funció renal a mig termini per formació de fibrosis i pot ser previngut amb administració de bolus d'esteroides que prevenen la formació de fibrosis, mantenint així per més temps la funció renal. Varem contemplar aquest tipus de rebuig classificant-lo com a subclínic.

3.2- Cardíac

La funció de les biòpsies de protocol en trasplantament cardíac és similar a la del trasplantament renal. Es van considerar com a rebuig agut totes aquelles biòpsies que presentaven un nivell mínim de 3A que representa un rebuig multifocal moderat amb infiltrats limfocitàris inflamatoris i multifocals amb, i és el més important, dany miocític. A partir d'aquest nivell 3A, i per ordre creixent, es passaria a 3B i després a 4, essent aquest darrer un rebuig sever difús, agressiu amb presència de necrosis dels miòcits, edema, hemorràgia i vasculitis. Seguint els criteris definits per la "*International Society for Heart and Lung transplantation grading for acute cardiac rejection*" (Billingham et al. 1990).

3.3- Hepàtic

Augments anormals i injustificats de les transaminases, des la γ -GT (gamma glutamil transpeptidasa) i de la LDH (Lactat DesHidrogenasa) són indicadors clínics d'un rebuig hepàtic i criteris de realització d'una biòpsia per a la comprovació de tal efecte. Segons els criteris de Banff, el rebuig histològic es caracteritza per un nivell 2A en el que es mostra inflamació portal, un principi de canvis epitelials degeneratius en el tracte biliar i infiltració limfocitària sub-endotelial.

IV- Detecció del microquimerisme

La recerca del microquimerisme, com ja mencionat anteriorment, es pot resumir en la recerca d'una quantitat extremadament minoritària de cèl·lules d'un individu, en una immensa majoria de cèl·lules d'un altre individu.

Per això cal, en primer lloc, poder diferenciar de forma inequívoca, dues persones que serien el donant i el receptor.

El nostre estudi s'ha basat en la detecció del microquimerisme per tècniques moleculars de determinació directa. Per això, ens hem basat en la detecció dels polimorfismes genètics del complex major d'histocompatibilitat (CMH) (o HLA (*Human Leukocyte Antigen*)), dels polimorfismes basats en la diferència de repeticions en tàndem generades per els satèl·lits VNTR o STR i en la detecció de seqüències úniques no compartides relacionades al sexe.

4- El Complex Major d'Histocompatibilitat.

4.1- Sistema de tipatge de l'HLA de classe I: el mètode RSCA.

Per a poder establir un tipatge dels pacients i dels donants que es van incloure en l'estudi, varem utilitzar una tècnica basada en la PCR. La tècnica porta el nom de RSCA que són les sigles de *Reference Strand Conformation Analysis* (Arguello et al. 1998; Arguello and Madrigal 1999). Aquesta tècnica es divideix en dues parts, la primera és la PCR del locus elegit a analitzar i la segona és una hibridació amb una referència coneguda seguida de l'anàlisi de la migració de les hibridacions per electroforesis en gels d'acrilamida en un seqüenciador.

La tècnica, descrita en la *figura 14*, es caracteritza en primer lloc per la amplificació del locus HLA del gen que volem tipificar, es a dir HLA-A o -B. Anteriorment al tractament de les mostres, es realitza la PCR del mateix locus d'una mostra control, que anomenarem **referència**, prèviament tipificada o seqüenciada i homozigota per el locus que estem analitzant. Aquesta darrera PCR es duu a terme amb els mateixos *primers* que els emprats per a les mostres, però

marcats amb el **fluorocrom Cy5**. Un cop s'han realitzat, aquestes dues PCRs, procedim a la fase d'hibridació. En aquesta fase, fem una barreja en proporcions 2:1 de la PCR de la mostra a analitzar i de la referència i ho portem a 95°C durant 5 minuts, per tal de permetre la separació de tots els fragments de doble cadena que hi han en el tub. Un cop ja tenim tots els fragments separats, baixem la temperatura a 55°C a fi d'aconseguir la rehibridació de tots els fragments del mix. La baixa temperatura d'hibridació (55°C) farà que tots els fragments s'hibridin entre ells de forma aleatòria, tenint en compte que els fragments, només es diferencien per les mutacions que caracteritzen el al·lel, però que la resta del fragment és homòleg. Així, la majoria de les hibridacions es faran amb entre els dos fragments homòlegs, obtenint fragments anomenats homodúplex, però, una part dels fragments s'hibridaran entre ells a l'atzar, tot i tenint diferències en la seqüència, obtenint fragments anomenats heterodúplex, també degut a les condicions de baixa astringència de la hibridació. Així els fragments homodúplex obtinguts seran la referència hibridada amb ella mateixa i les mostres hibridades amb ells mateixes.

Al disposar de les hibridacions, ja podem analitzar els resultats en un gel d'acrilamida. Totes les hibridacions s'han fet migrar en gels d'acrilamida al 6 % realitzats amb separadors de 0,3mm i amb la possibilitat de carregar fins a 40 mostres. Les electroforesis es varen dur a terme en un seqüenciador Alf Express II de Pharmacia (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) i els resultats de les migracions es van analitzar en el programa Fragment Analyser versió 1.02 en la plataforma Windows 98 SE.

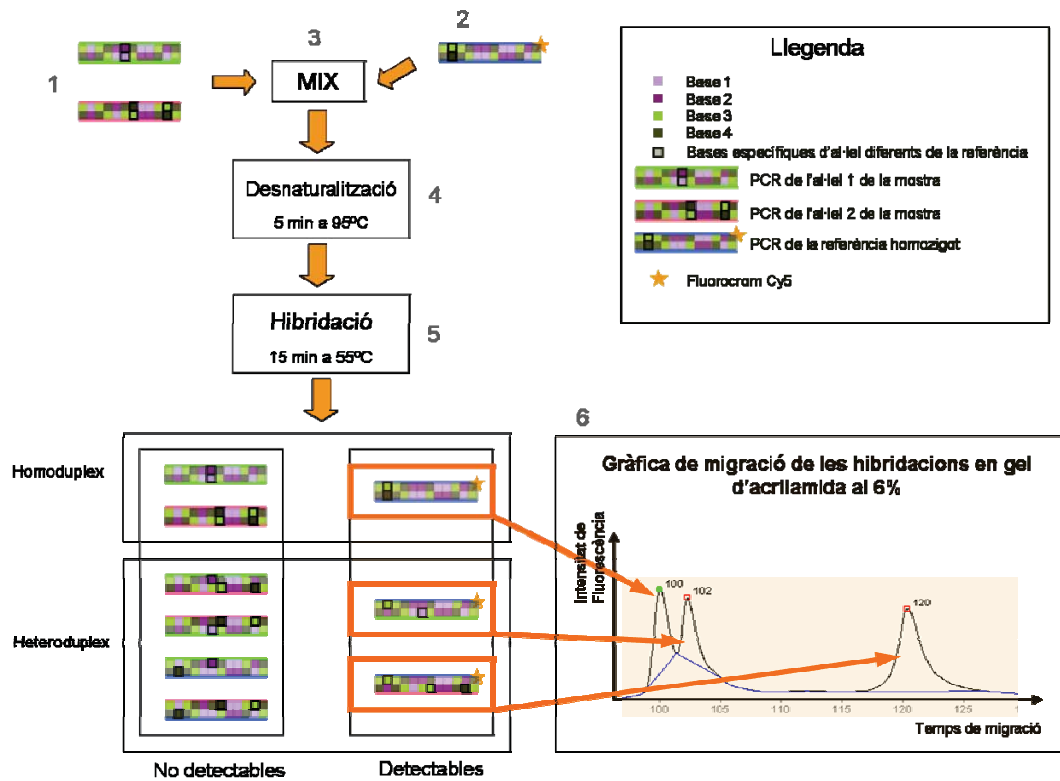


Figura 14: Explicació de la tècnica Reference Strand Conformation Analysis (RSCA).

En primer lloc realitzem la PCR de la mostra (1) i de la referència (2) i tot seguit es realitza un mix (3) amb el resultat de les dues PCR. Després es du a terme una separació de tots els fragments de doble cadena (4) a alta temperatura, seguit per una rehibridació a l'atzar de tots els fragments prèviament separats, mitjançant una estada a 55°C, que permet una hibridació de les cadenes amb baixa astringència (5). El resultat de la hibridació es fa migrar en un gel d'acrilamida al 6% en el seqüenciador automàtic AlfExpress II. El resultat de la migració es visualitza mitjançant el programa Alfwin (6).

Per a poder efectuar el tipatge de les mostres en el gel, es van incloure varis carrils incloent marcadors de patrons de migració de mostres amb tipatges coneguts, també anomenats *ladders*. Aquests estan constituïts per hibridacions de mostres d'al·lells coneguts amb la referència marcada. Un cop efectuades les hibridacions, es pot realitzar un mix de les diferents mostres hibridades per tal d'obtenir una escala de patrons de migració coneguda que compararem amb la migració de la mostra del pacient a tipificar.

Cal destacar, que dos al·lells poden migrar de forma molt similar, es a dir presentar patrons de migració no diferenciables en aquests gels d'acrilamida. Per a poder solventar aquest problema, es van realitzar sempre hibridacions de la mateixa mostra amb dues referències diferents, i seguint el mateix procediment en el cas dels *ladders*. Així, en el cas de tenir dos al·lells indiferenciables amb la primera

referència (que ens haguessin fet pensar en una mostra homozigota), aquests es diferenciarien amb la segona referència, permetent així fer la diferència entre mostres homozigotes i heterozigotes. En el cas que existeixin dos al·lells conflictius que no tinguin patrons de migració molt separats amb les dues referències, es pot repetir el procediment amb una tercera referència, que només s'utilitzaria en el cas d'aquests al·lells conflictius.

Gràcies al programa Alwin, podem obtenir en una mateixa pantalla tots els *ladders* que volem utilitzar i les mostres que volem analitzar (figura 15). Així, per similitud amb el patró de migració d'un l'al·lel ja conegut, podem tipificar la mostra com igual al marcador, es a dir amb el mateix tipatge. La conseqüent qüestió que ens varem plantejar es la següent : Existeix un risc que no disposem de l'al·lel que volem tipificar ? O dit d'una altra forma més pràctica : Es possible que l'al·lel del pacient no correspongui amb cap al·lel del *ladder* ?

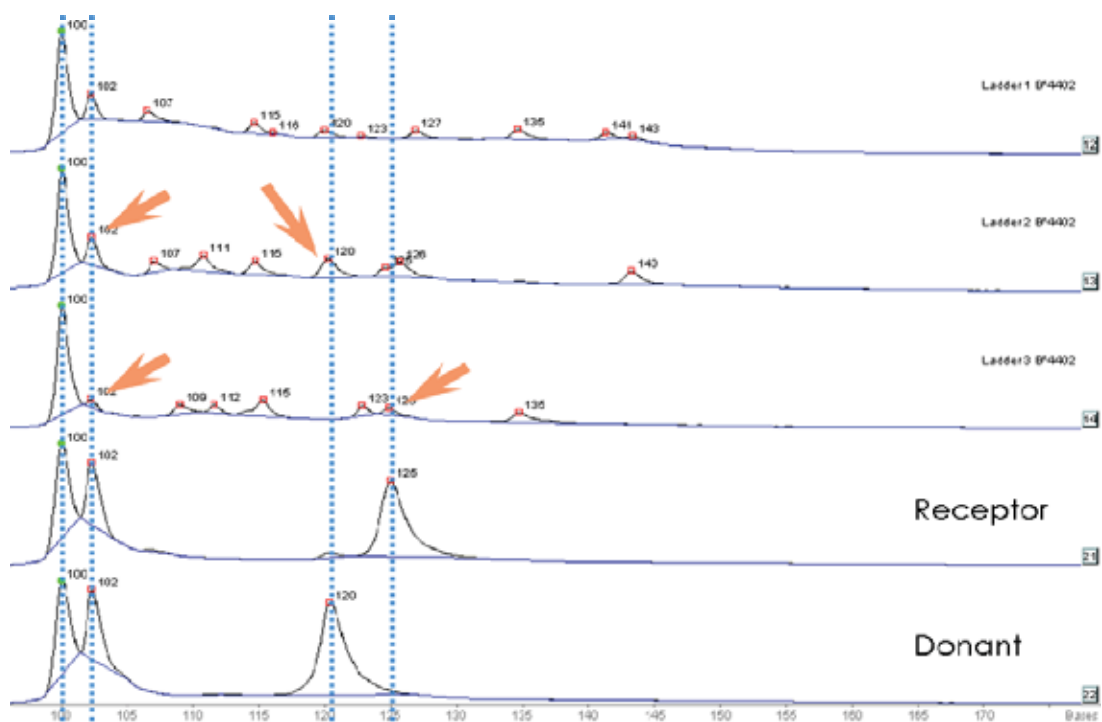


Figura 15: Exemple de tipificació de dues mostres mitjançant RSCA.

Tipatge amb la referència B*4402. Al·lel 1 del donant i del receptor : Pic 1 del ladder 1,2 i 3 que correspon a B*4403. Al·lel 2 del donant : Pic 5 del ladder 2 que correspon al B14 (B64 i B65) o B42. Al·lel 2 del receptor : Pic 6 del ladder 3 que correspon a B7. Per conseqüent, el receptor seria B07 i B*4403, i el donant seria B*4403 i B14 o B42. En els dos casos, s'ha d'efectuar la mateixa operació amb una altra referència, en aquest cas B*4201. La segona referència ens permetrà confirmar el tipatge del receptor i establir la diferència entre B14 o B42 en el donant. S'han inclòs donant i receptor en la mateixa finestra per tal d'efectuar al mateix temps l'anomenat *matching* entre les dues mostres, que ens seria molt útil per a determinar a primera vista que donant i receptor no son HI A-R idèntics

La resposta a aquesta qüestió es va plantejar al moment de decidir quines mostres havíem d'incloure en els *ladders*. Es va efectuar en estudi de poblacions, de repartició geogràfica del al·lels i de freqüències al·lèliques en general. La tria de les mostres a incloure als *ladders* va ser per consegüent : la disponibilitat de les mostres, el patró de migració de cada al·lel, la no superposició dels al·lels entre ells i la màxima representació al·lèlica possible. Així, podem tipificar els al·lels més freqüents Europeus i incloure alguns al·lels més rars per a poder assumir més del 90 % de representació al·lèlica.

4.1.1- Condicions per HLA-A

Durant els primers 2 anys de l'estudi, es varen utilitzar els *primers* següents, per a amplificar el locus HLA-A. Es van utilitzar, com a primer 5', un mix de 4 *primers* que són els *primers* 5A1 fins 5A4 per tal de poder amplificar tots els al·lels possibles del locus HLA-A, i com a primer 3' el primer 3A.

Nom	Seqüència
5A1	5'- gaa acg gcc tct gtg ggg aga agc aa-3'
5A2	5'- gaa acc gcc tct gcg ggg aga agc aa-3'
5A3	5'- gaa acg gcc tct gcg ggg aga agc aa-3'
5A4	5'- gaa acc gcc tct gtg ggg aga agc aa-3'
3A	5'-tgt tgg tcc caa ttg tct ccc ctc-3'

A partir del segon any de l'estudi, es va canviar el primer set de *primers* per un sol parell de *primers* que amplificaven directament tots els al·lels del locus HLA-A ja que estaven situats en una regió 5' comuna a tots els al·lels, per tal d'evitar problemes en la elaboració del mix amb els *primers* 5Ax utilitzats anteriorment. Aquests *primers* han estat descrits per Krausa (*Krausa and Browning 1996*).

Nom	Seqüència
CL15'	5'-ccc act cca tga ggt att tc-3'
AL#AW(3)	5'-tgg ccc ctg gta ccc gt-3'

Disposàvem del primer CL15' marcat amb el fluorocrom Cy5, que es va utilitzar per a realitzar la PCR de la mostra referència A*0101 homozigot i de la mostra A*0201 homozigot. Totes les altres PCR (mostres conegudes i mostres a analitzar) es van realitzar amb aquest mateix primer no marcat.

Condicions PCR

Condicions 1 (primer set de primers)

<i>Cicles</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Temps</i>
1 cicle	95°C	5 min
10 cicles	95°C	45seg
	65°C	1 min
25 cicles	95°C	45seg
	65°C	1 min
1 cicle	72°C	1 min
	72°C	5 min

Condicions 2 (segon set de primers)

<i>Cicles</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Temps</i>
1 cicle	96°C	5 min
	96°C	1 min
5 cicles	66°C	1 min
	72°C	1 min
	96°C	1 min
25 cicles	56°C	1 min
	72°C	1 min
1 cicle	72°C	7 min

4.1.2- Condicions per HLA-B

En el que fa referència a HLA-B, van utilitzar sempre una sèrie de *primers* en la regió 5 del gen HLA-B que amplificaven tots els al·lels HLA-B, i un sol primer en la regió 3'.

Nom	Seqüència
5B1	5'- ggg agg agc gag ggg acc gca g-3'
5B2	5'- ggg agg agc gag ggg acc cca g-3'
3B	5'-gga ggc cat ccc cgg cga cct at-3'

Seguint el mateix procediment que per HLA-A, es va dur a terme la PCR de la referència utilitzant el primer 3B marcat amb un fluorocrom, i les PCR de les mostres a analitzar, amb el mateix primer no marcat.

Condicions PCR

Les condicions utilitzades per a realitzar aquesta PCR són exactament les mateixes que les *condicions 1* per HLA-A.

4.1.3- Condicions de migració del gel de poliacrilamida per RSCA

Gel de poliacrilamida al 6%

Long Ranger® (Cambrex®)	4,8 mL
TBE 1x	8 mL
H2O	26,9 mL
Persulfat d'amoni 10%	240 uL
TEMED (N,N,N',N' tetramethylethyldiamin) (Applichem®)	24 uL

Per a la realització dels gels es van utilitzar separadors de 0,3mm i els vidres es van netejar amb dilucions d'alcohol al 70°C i seguidament es van tractar els vidres amb un mix de 1000 uL d'alcohol a 96°, 250 uL d'Acid Acètic al 10% i 3uL de Bind Silane®, per a afavorir l'adherència del gel als vidres.

Per a la migració del gel en el seqüenciador, varem utilitzar les condicions següents: voltatge de 1500 V, amperatge de 60 mA, potència de 30 W, durada de 190 minuts, temperatura de 40°C i interval d'adquisició de 2s.

4.1.4- Al·lells tipificats

Amb la referència A*0101 tenim :

Ladder 1 : A11-A31-A66-A30-A*0205-A32-A24

Ladder 2 : A03-A26-A*0201-A23

Ladder 3 : A29-A33-A*0201-A25

Amb la referència A*0201 tenim :

Ladder 1 : A*0205-A68-A26-A11-A30-25

Ladder 2 : A68-A1-A29-A23-A32

Ladder 3 : A66-A3-A32

Amb la referència B*4201 tenim els al·lells:

Ladder 1 : 0702-2705-3801-4403-1302-5201-5001-4901

Ladder 2 : 1801-3501-1501-4001-4403-5101-5702-4501

Amb la referència B*4402 tenim el al·lells:

Ladder 1 : 4403-5301-2705-0801-4001-14-1501-5501-4901-4501-5001

Ladder 2 : 4403-4701-1302-5101-14-1801-57-5601-5001

Ladder 3 : 4403-3801-5201-3501-3906-0702-4901

El punt fort de la tècnica és, sense dubte, la extrema fiabilitat i reproductibilitat d'aquesta. Ens permet fer una aproximació molecular dels gens de l'HLA, fins i tot a alta resolució, en funció de l'al·lel. Tanmateix, i per a poder solventar el problema exposat anteriorment, en el cas que no disposem de l'al·lel per a poder tipificar la mostra, aquesta pot ser directament comparada amb la mostra del donant i establir una comparació qualitativa directa, el que s'anomena un "*matching*" entre donant i receptor. Aquest *matching* és extremadament específic i sensible. Ens va permetre poder identificar si el donant i el receptor eren idèntics per al locus en quèstió.

4.2- Sistema de tipatge de l'HLA de classe II.

Per a poder determinar els diferents al·lells del locus HLA-DRB1, no es va poder fer ús de la tècnica RSCA prèviament utilitzada, ja que les diferències entre al·lells són molt importants i estan localitzades de forma diferent als polimorfismes generats en classe I, el que dificulta molt per a poder estandarditzar la tècnica RSCA per a DRB1, també cal destacar que es co-amplificaven les cadenes associades DRB3, DRB4 i DRB5. Però, i per a poder tipificar els diferents al·lells, es va recórrer a l'ús de la PCR específica de seqüència o PCR-SSP. Per a això, es

van utilitzar uns *primers* en 5' específics de la seqüència de cada al·lel. Així, cada primer en 5' amplificava un al·lel o un grup d'al·lels específics.

Es van utilitzar els *primers* descrits per Olerup (*Olerup and Zetterquist 1992*) que amplificaven específicament els al·lels DRB1-01, 03-11-13-14, 04, 07, 08-12, 09, 10 i 15-16.

Desgraciadament, no es va poder diferenciar més al·lels, ja que alguns d'ells compartien les mateixes seqüències a nivell 5', com per exemple els grups 03-11-13-14, 8-12 i 15-16 en els que no es van poder diferenciar els subgrups d'al·lels entre ells (figura 16).

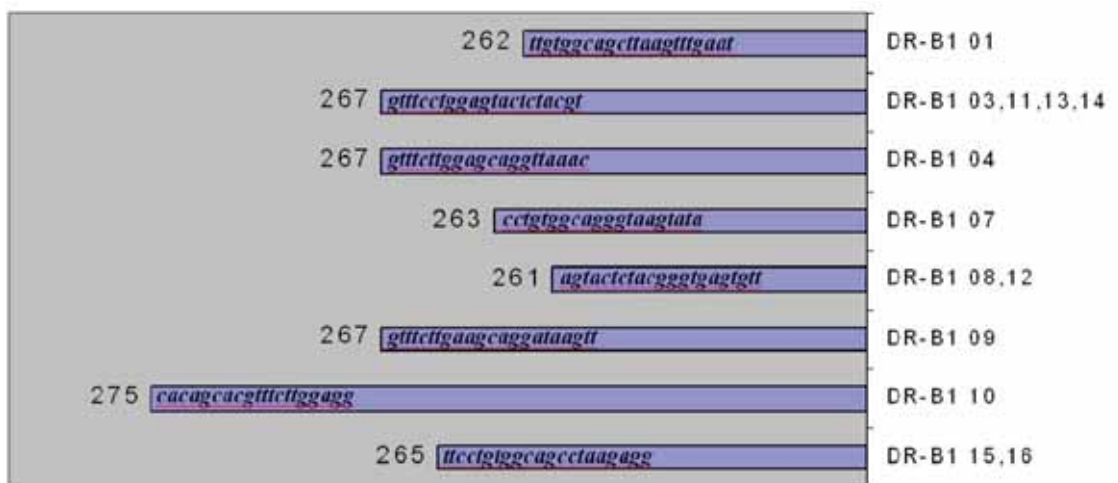
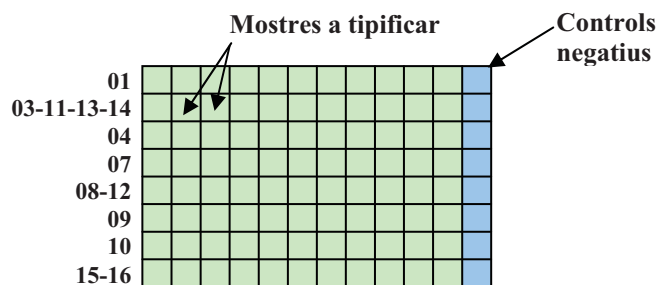


Figura 16: Tipatge de HLA-DRB1. En aquesta figura tenim representades les seqüències específiques dels diferents al·lels, així com les diferents llargades (en pb) dels fragments obtinguts.

La PCR es va posar a punt per a poder realitzar el tipatge de les mostres en 8 tubs de PCR de 200 µL, així es van poder realitzar PCRs de tipatge en formats de 96 reaccions seguint el esquema següent :



En els tubs de PCR, també es va afegir un set de *primers* que amplificaven un gen control, la *Beta-2-microglobulina* o *B2m*. Aquest gen control (que serà més àmpliament descrit en el capítol “*Quantificació del microquimerisme per PCR quantitativa a temps real*”), va ser utilitzat per a poder validar la reacció. Efectivament, sense gen control, un resultat negatiu en un pou podria significar l’absència d’amplificació degut a l’absència de l’al·lel o be degut al no funcionament de la reacció. Sabent que el gen control està igualment present en totes les mostres, aquest ha d’amplificar en tots els casos i així, en presència d’una banda en el gen control i en absència de banda específica de l’al·lel, podem descartar la no realització de la reacció.

Seguint l’esquema anterior, la lectura dels resultats de les PCR múltiplex es va visualitzar en gels d’agarosa al 3 %, per a poder atribuir els al·lells a les diferents mostres.

Així, i per tornar al quimerisme, podem dir que l’estudi de les disparitats generades per l’HLA és presentava com a una eina molt interessant per a la detecció de cèl·lules amb l’HLA del donant en la sang perifèrica del receptor.

4.3- Recerca clàssica del microquimerisme mitjançant estudi de les disparitats en el Complex Major d’Histocompatibilitat.

Després d’efectuar un tipatge de les mostres de donant i receptor de les que disposàvem, varem efectuar un llistat de disparitats ente donants i receptors en els loci HLA-A, -B i -DR.

4.3.1- Recerca de microquimerisme en HLA-A i HLA-B per RSCA

En els pacients que no compartien al·lells amb el donant es va procedir a l’anàlisi de les mostres post-trasplantament, mitjançant la tècnica RSCA. Es tracta del mateix procediment, però amb la única diferència que no només s’utilitzaven *ladders* per al tipatge de les mostres, sinó que també es va utilitzar la mostra del propi pacient en pre-trasplantament i del donant com a referència i seguretat per a

la identificació de l'aparició de pics corresponents al donant en el receptor en post-trasplantament. A diferència del tipatge, les mostres de donants, receptors i receptors post-trasplantament és varen analitzar afegint un carril de separació entremig per a evitar una possible contaminació de la mostra adjacent i així evitar un fals positiu.

Per a poder validar aquesta tècnica per a la determinació del microquimerisme en mostres de sang perifèrica, es va realitzar la recerca del llindar mínim de detecció i el corresponent calibratge per a assolir la mínima detecció possible.

Es van utilitzar mostres control prèviament tipades, es van realitzar dilucions seriades de les mostres soles i seguidament es van realitzar quimeres mixtes mitjançant dilucions de les mostres en una mostra que simula el receptor (figura 17). Gràcies a aquestes dilucions es van establir els llindars mínims de detecció per a cada al·lel que volíem detectar. També, gràcies a les quimeres mixtes, es van establir si diferents al·lells del receptor podien interferir en la detecció dels al·lells del donant.

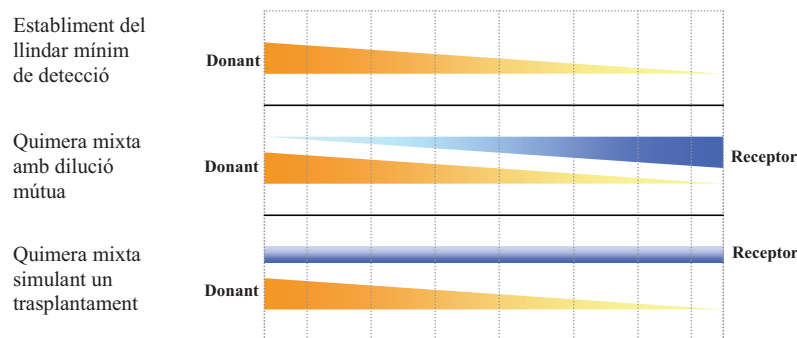


Figura 17: Dilucions de les mostres per a poder establir els llindars mínims de detecció de l'al·lel del donant sol, les interaccions entre al·lells del donant i del receptor, i la detecció de l'al·lel del donant en quimera mixta.

4.3.2- Recerca de microquimerisme mitjançant PCR-SSP per HLA-DR

Varem utilitzar en aquest cas 3 aproximacions diferents per a poder tenir un grau més alt d'eficiència en la amplificació del DNA ultra minoritari :

- PCR-SSP reacció del tipatge (la mateixa)

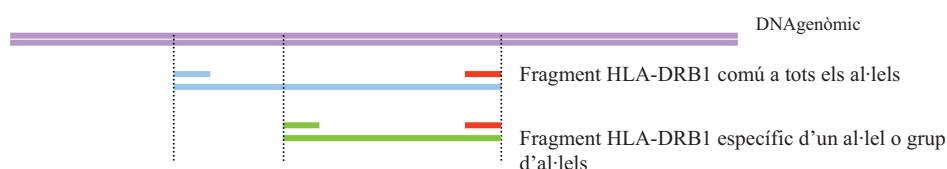
- PCR-SSP hemi-nested (1 sola reacció afegint 1 primer extern en 5')
- PCR-SSP nested (2 reaccions afegint 1 primer extern en 5')

4.3.2.1- PCR SSP

Es va realitzar la mateixa PCR que la que varem fer servir per al tipatge de les mostres i els resultats de les PCR es varen fer migrar en gels d'agarosa al 3% . També es va marcar el primer 3' amb un fluorocrom (Cy5) i el resultat de la PCR es va fer migrar en un gel de poliacrilamida al 6% en el seqüenciador automàtic Alf-Express II.

4.3.2.2- PCR SSP hemi-nested

La PCR hemi-nested (o semi-niuada) consisteix en amplificar al mateix temps un fragment més gran de DNA que permet augmentar la quantitat de DNA del locus comú i al mateix temps, amplificar el fragment SSP si està present, en una sola reacció. Així, al mateix temps s'augmenta la quantitat de *template* provinent del donant i els *primers* específics tenen més probabilitats de xocar amb el fragment del donant a amplificar.



Existeixen 2 tipus d'amplificacions teòriques :

- el fragment més llarg (blau) que correspon a una regió més gran gràcies a un primer comú a tots els al·lels (primer 5DRint)
- el fragment més curt (verd) que correspon a l'amplificació amb un primer específic de seqüència (primer SSP) i que només apareix en presència de l'al·lel que volem amplificar.

El primer específic d'al·lel (color verd, primer SSP)) es pot hibridar directament sobre el DNA genòmic corresponent (DNAG) o també sobre el fragment HLA-

DRB1 comú a tots els al·lells aconseguint augmentar els nivells de *template* corresponents al receptor i també, i és el més important, al donant.

L'avantatge teòric d'aquesta tècnica combina la solidesa de la especificitat de la PCR-SSP amb el guany de material que aporta la PCR *nested*, però en una sola etapa i així reduint el risc de contaminació i de falsos positius.

Un altre punt fort d'aquesta tècnica, és l'aparició del fragment DR comú que és tradueix per l'aparició sistemàtica d'una banda en el gel. Aquest fragment adopta per consegüent dues funcions fonamentals que ens són de molta utilitat :

- augmentar el nivell basal del DNA del donant (i del receptor)
- servir de gen control positiu d'amplificació de la PCR

La figura 18 mostra la localització i talla dels frgments considerats.

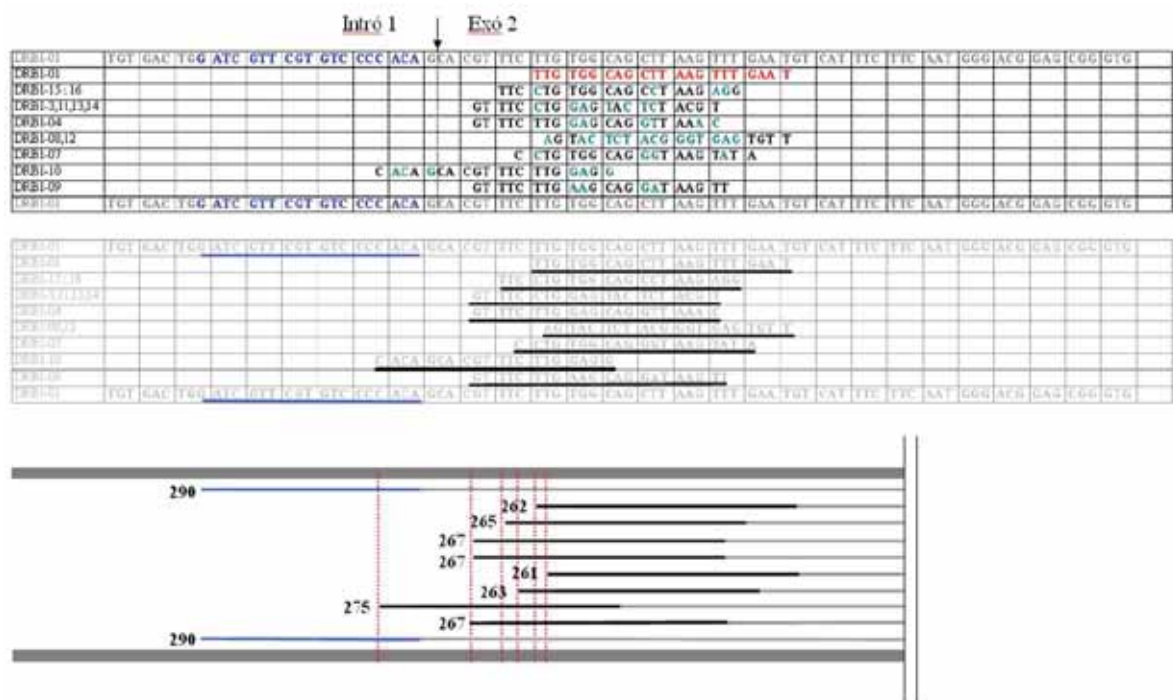


Figura 18: Esquema de la localització dels primers de la regió 5' per PCR-SSP hemi-nested o nested de HLA-DRB1.

Els primers d'Olerup et al 1999, han estat dissenyats per a poder amplificar específicament un al·lel o un grup d'al·lells i generar fragments de pes molecular diferent. El fragment blau de 290pb representa el primer extern utilitzat per a realitzar la PCR-Nested i hemi-nested i els primers de color negre representen els primers específics de seqüència. El primer 3' marcat amb el fluorocrom Cy5 no ha estat representat ja que es situa en una regió situada en 3' i no representada.

4.3.2.3- PCR-SSP nested

La PCR nested o niuada consisteix en dues reaccions. La primera reacció es va efectuar utilitzant els *primers* 5DRint i 3DR, amplificant així una part comuna a tots els al·lels, per a poder amplificar el nivell basal de *template* inicial (donant i receptor). Es visualitzava en primer lloc el resultat d'aquesta PCR per a verificar la positivitat de la reacció.

El segon pas consistia en realitzar la PCR amb el primer específic de la seqüència del donant, però utilitzant com a *template* el resultat de la primera PCR, es a dir el fragment corresponent a l'HLA-DR comú a tots els al·lels.

La tècnica requeria la duplicació de les reaccions per a poder evitar la aparició de falsos positius i falsos negatius. El punt fort d'aquesta tècnica és sense dubte l'amplificació del material de base que permetia l'amplificació del numero absolut de còpies de DNA del donant, tot i conservant en teoria una proporció en la relació donant-receptor, ja que tots els fragments inicial amplificats tenien la mateixa llargada. També és varen afegir a la reacció uns controls positius d'amplificació.

Considerant totes les tècniques descrites anteriorment, podem dir que les disparitats generades en el sistema HLA es presentaven com a una molt bona alternativa per a la detecció del microquimerisme post-trasplantament, havent prèviament obtingut el tipatge (o les disparitats entre) del donant i del receptor

5- Recerca del microquimerisme mitjançant l'estudi de disparitats en la quantitat de repeticions en tàndem situades en els satèl·lits

Abans del descobriment dels marcadors multi-al·lèlics, només existien uns marcadors anomenats SNP (**S**ingle **N**ucleotide **P**olymorfism) que són el resultat del canvi d'un sol nucleòtid en la seqüència del DNA. Originalment, només podien ser detectats per la pèrdua o el guany d'una seqüència de restricció que originaven. Per consegüent, la seva detecció era limitada i caracteritzada per RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism). Tot i la limitació de la detecció dels *primers* SNP per RFLP, aquests varen formar el primer mapa genètic humà, tenint en compte que la distribució dels RFLP era de 1 per cada 10cM de mitja (*Donis-Keller et al. 1987*). La identificació dels SNP va permetre la localització de nombrosos gens responsables de patologies genètiques com ara la fibrosis quística (*Wainwright et al. 1985*) o la malaltia de Huntington (*Gusella et al. 1983*).

Amb el pas del temps, es van identificar varis tipus de variacions, entre altres, les generades en el número de repeticions en tàndem de seqüències que es distribuïen al llarg del genoma, anomenades satèl·lits. Aquests satèl·lits poden ser de diferents tipus. Els primers en ser descoberts varen ser els mini-satèl·lits (*Bell et al. 1982*) o VNTR (**V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats) ja que contenien seqüències de 10 a 30 nucleòtids repetides de 20 a 30 vegades. Així, amplificant per PCR les regions conservades contigües a les repeticions, es podien obtenir fragments de PCR de talles molt diferents en funció del número de repeticions que el VNTR contenia.

Més endavant es va descobrir l'existència de micro-satèl·lits o STR (**S**hort **T**andem **R**epeats) que consistien en la repetició (20 o 30 cops) d'un motiu de 2 a 6 bases, en tàndem. Actualment els polimorfismes generats per els VNTR o els STR estan utilitzats de forma rutinària per a la identificació i/o discriminació d'individus en medicina forense o estudis de paternitat.

5.1- Descripció de la tècnica

Aquesta tècnica és vàlida per als dos tipus de satèl·lits que varem amplificar. Les regions en 5' i en 3' del satèl·lit estan sovint molt conservades entre individus. La tria del satèl·lit i dels *primers* per a la seva amplificació, es realitza tenint en

6- Quantificació del microquimerisme per PCR quantitativa a temps real.

Abans de parlar de la detecció del microquimerisme mitjançant el gen SRY i polimorfismes en HLA-DRB1, m'agradaria introduir prèviament, el termociclador i les tècniques que es van utilitzar per a poder arribar a una detecció molt més sensible que per PCR convencional i poder quantificar la quantitat original de DNA del donant.

6.1- Sistema de funcionament del LightCycler®

Per a poder realitzar aquest tipus de determinació, es va utilitzar el termociclador LightCycler v2.0 (Roche®), junt amb el programa d'anàlisi dels resultats LightCycler software v4.05.

Aquest sistema funciona mitjançant una injecció d'aire fred o calent directament a una cambra on estant situades les mostres, assegurant assegura la homogeneïtat de la temperatura a totes les mostres, al mateix temps (figura 21).

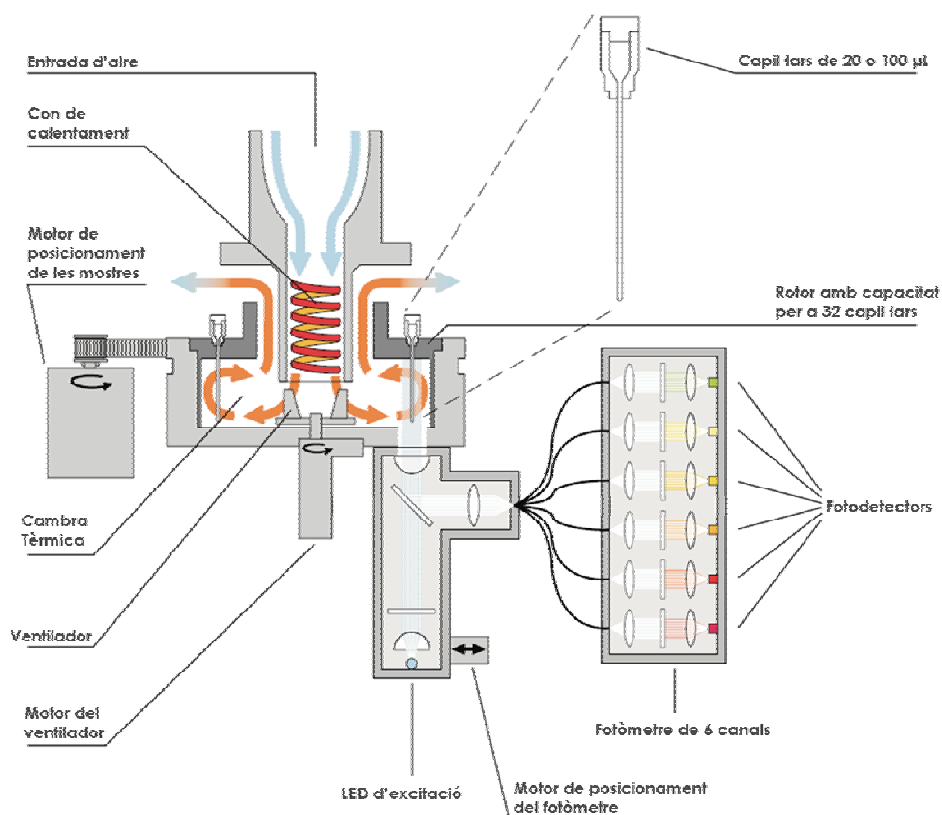


Figura 21: Esquema de funcionament del LightCycler v2.0

En aquesta cambra, hi té accés, mitjançant un vidre transparent, la llum que provoca l'excitació del fluorocroms. Mitjançant un vidre dicroic, la fluorescència emesa per la mostra excitada, va redirigida a una unitat de fotòmetre que analitza per separat les diferents longituds d'ona (figura 22).

Aquest termociclador permet l'utilització de 6 fluorocroms diferents, però nosaltres vam treballar només amb el sistema Sybr Green.

El Sybr Green es un agent intercalant que, com el seu nom ho indica, s'intercala en qualsevol cadena de DNA quan aquest està en forma de doble cadena. El canvi de conformació que adquireix la pròpia molècula de Sybr Green permet emetre una fluorescència a 520 nm en quan es veu excitada per una llum a 494 nm (que és la mateixa excitació i emissió que la fluoresceïna)

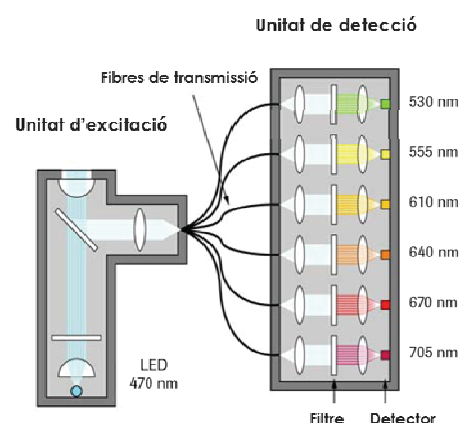


Figura 22: Sistema de detecció de la fluorescència emesa per la mostra, després de ser excitada per la llum emesa per la LED d'excitació.

La llum emesa pel LightCycler que es a 470 nm, ja es suficient per a excitar el Sybr Green, la visualització de la fluorescència d'excitació es va fer en el canal 1 a 530 nm que també pot captar els 520 nm del Sybr Green.

L'ús de capil·lars de vidre per a la realització de les reaccions ens permet una transmissió de la temperatura més ràpida que el polipropilè dels tubs de PCR convencional, també degut a la relació superfície/volum que permet una ràpida conducció de la temperatura al mix de la reacció. La transmissió de la temperatura directament mitjançant aire escalfat o refredat és molt més ràpida i s'aconsegueixen rampes de temperatura de fins a 20°C per segon, contràriament a la PCR convencional on la temperatura prové de l'escalfament o el refredament d'una placa metàl·lica, amb rampes de 2 a 4°C per segon en refredament. Aquestes dues característiques ens permeten obtenir un cicle complert de PCR 10 cops més ràpid que en PCR convencional i, en mitjana, temps de 50 segons per cicle

(desnaturalització, *annealing* i extensió), assolint reaccions de, al menys, 40 cicles en menys de 60 minuts.

L'utilització de la polimerasa termo-activada i el temps de la realització d'un cicle, permeten que la polimerasa sigui activa fins i tot a 60 cicles. Així, ens permet realitzar més cicles que en PCR convencional, i en el nostre cas, ens permetran detectar quantitats més reduïdes de DNA diana a cada reacció.

Aquest petit parèntesi aporta una justificació sobre l'ús del termociclador a temps real per a la detecció de quantitats molt reduïdes de DNA del donant en el receptor.

Per a poder efectuar una quantificació en aquest tipus de PCR, cal tenir en ment algunes nocions bàsiques sobre la PCR. Utilitzem la fórmula següent, per a la fase exponencial de la amplificació :

$$T_n = T_0(E)^n \quad (1)$$

On la variable T_n representa la quantitat d'amplicó al cicle n , T_0 és la quantitat inicial de *template* i E és la eficiència de la reacció. La eficiència màxima en una reacció es de 2, el que representa que cada producte de PCR es duplica a cada cicle, i el valor mínim de la eficiència és 1, el que correspon a multiplicar per 1 el producte a cada cicle, es a dir no amplificar.

Si volem tenir una senyal perceptible per a nosaltres sobre la amplificació d'una regió, caldria, per exemple, una senyal mínima de 10^{10} còpies d'amplicó per a produir una senyal suficient per a ser captada per l'aparell i per a poder sobresortir del soroll de fons. La fórmula (1) ens permet dir que si introduïm 10^6 còpies de *template* inicials i la eficiència global teòrica és de 1.9, hauríem de començar a detectar una senyal d'amplificació al cicle 14. Si partim de 10^3 còpies de *template* inicials, la senyal no ens arribarà fins al cicle 25. Aquesta és la base de la PCR quantitativa a temps real, en la que ens basem.

Però existeixen factors que limiten la fórmula (1), inherents a la pròpia tècnica de PCR, com ara la rehibridació més efectiva dels amplicons respecte als *primers*, productes col·laterals de la PCR que competeixen directament amb els *primers* i la degradació progressiva de l'enzim. El rendiment de la PCR pot variar en funció de la quantitat de *template* inicial. A molt altes concentracions en DNA, la PCR sol

ser molt menys efectiva ja que existeixen nombrosos xocs moleculars que dificulten l'adhesió dels *primers*. Això, en teoria també passa a molt baixes concentracions de DNA, ja que la probabilitat de xoc entre dues molècules és més baixa, o fins i tot improbable. A concentracions dites normals (no molt altes i no molt baixes) en DNA, la PCR serà funcional, i seguirà una normativa, i per tant com més DNA hi hagi, més probabilitats de xoc entre *primers* i *template*.

Cada PCR té el seu propi rendiment, degut al disseny dels *primers*, a la conformació terciària de la zona a amplificar i altres factors, i cal afegir que en cada PCR el rendiment de la mateixa varia en funció del cicle, es a dir en funció de la quantitat de producte (amplicó) obtinguda. El que es calcula en cada PCR, es el rendiment global de la mateixa, que es la mitja dels rendiments de cada instant.

En una PCR idèntica on la única variant és la quantitat inicial de *template*, la reacció produirà un nivell detectable d'amplicons en un numero de cicles diferent. Així, per a una PCR on la quantitat de *template* és més alta, obtindrem més ràpidament l'amplificació.

Per a poder efectuar una quantificació el més real possible, s'ha definit el punt d'inflexió primari, o *crossing point* (Cp) que és el punt a partir del que el numero d'amplicons de la PCR és el mateix per a cada reacció, previ a la fase exponencial, i ajustat al tipus de màquina que fem servir. En aquest cas el programa del LightCycler afecta automàticament un valor, que pot ser modificat en qualsevol moment (tècnica automàtica de Cp o tècnica manual de *Fit points* que també permet obtenir un Cp)

En primer lloc, per a efectuar una quantificació, cal establir una corba estàndard, amb una mostra perfectament quantificada, on les T_0 són conegudes per a cada PCR. Si admitem que un numero de còpies de l'amplicó al un Cp és K, la fórmula (1) esdevé :

$$K = T_0(E)^{Cp} \quad (2)$$

Així, la dada T_0 es pot saber al moment de posar el *template* (concentració inicial de *template* per a cada mostra coneguda per a establir la corba estàndard) i el Cp és la interrogant. Així podem obtenir :

$$\log K = \log T_0 + C_p \times \log E \quad (3)$$

per consegüent :

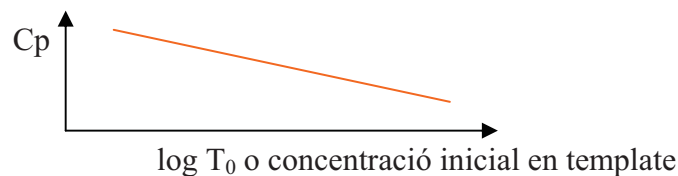
$$C_p = -(1/\log E) \times \log T_0 + (\log K / \log E) \quad (4)$$

I aquesta darrera fórmula és de tipus :

$$y = ax + b \quad (5)$$

que correspon a la equació de la corba estàndard amb “y” corresponent a C_p i “x” corresponent a $\log T_0$.

Així, realitzant la corba estàndard per dilucions seriades de la mateixa mostra perfectament quantificada, podem obtenir una corba estàndard de tipus :



Amb aquesta corba estàndard, podem transformar cada C_p (que ens dona el programa per a cada mostra) en la concentració inicial de *template*, que ens és desconeguda per a les mostres diana.

6.2- Detecció i quantificació del microquimerisme per Q-PCR del gen SRY

Com a control positiu per a realitzar aquesta corba estàndard, es va utilitzar una mostra control corresponent a la detecció del gen SRY en el DNA d'un individu masculí. Es va realitzar una PCR de la mostra control per tal de poder establir un lligam entre les mostres introduïdes inicialment en la PCR, i el número de còpies detectades per PCR. Es va partir d'una mostra a 66 ng / μ L a partir de la que es van efectuar una sèrie de dilucions seriades de factor 10, obtenint així les diferents T_0 . Es van poder obtenir dilucions fins a un factor 10^4 , a partir de la solució mare (taula 3).

Taula 3: Dilucions i equivalents genòmics

<i>Factor de Dilució</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>10²</i>	<i>10³</i>	<i>10⁴</i>	<i>10⁵</i>
Nom mostra	N	N/10	N/10e2	N/10e3	N/10e4	N/10e5
Equivalent pg	66.10 ⁴	66.10 ³	6 600	660	66	6,6
Equivalent genòmic	100 000	10 000	1 000	100	10	1
Equivalent genètic SRY	100 000	10 000	1 000	100	10	1
Equivalent genètic B2m	200 000	20 000	2 000	200	20	2

Les mostres dels pacients trasplantats van ser considerades com a desconegudes i doncs per defecte com a potencialment iguals o inferiors a la mostra N/10e4, per tant, es van efectuar pentuplicats per a cada PCR. Cada PCR es va estructurar de la forma següent :

<i>Capil·lar</i>	<i>Mostra</i>	<i>Quantificació</i>
1-	Negatiu	Negatiu
2-	DNA control Negatiu per SRY	Negatiu
3-	DNA control Negatiu per SRY	Negatiu
4-	DNA control Positiu per SRY	Valor T ₀
5-	DNA control Positiu per SRY	Valor T ₀
6-	DNA control Positiu per SRY	Positiu
7-	Mostres	?
...
32-	Mostres	?

El DNA control Negatiu de SRY que es va afegir era DNA corresponent a una persona de sexe femení que no presentava cap copia de SRY en sang perifèrica i que no havia tingut cap fill, per tal d'evitar el microquimerisme fetal, òbviament, el resultat esperat i obtingut era negatiu.

El control Positiu de SRY era el mateix control que es va servir per a la realització de la corba estàndard, control que estava a una concentració coneguda. El valor T₀ servia per a correlacionar aquesta reacció global (o *Run*) corresponent al mix realitzat, amb la reacció perfectament quantificada de la corba estàndard. La mostra control positiu és la que realitzava el pont entre les dues reaccions. Així, es podia normalitzar el *Run* actual al *Run* de la corba estàndard per a permetre la quantificació de cada una.

Totes les PCR de les mostres control es van realitzar per duplicat per a establir un valor mig per a cada Cp. Però a la mostra control nº 6, (la mateixa mostra que per als capil·lars 4 i 5), no se li va atribuir cap valor T_0 i així era quantificada com una mostra qualsevol, el que ens va permetre un control addicional sobre la quantificació de la mateixa reacció.

A nivell pràctic, es va realitzar una corba estàndard (figura 23) amb tots els punts obtinguts de les dilucions seriades de la mostra control positiu de SRY. La peculiaritat del programa d'anàlisi del LightCycler es que ens permet obtenir corbes de tipus $y=ax+b$ però també permet la obtenció de punts d'inflexió de la corba.

Efectivament, cal destacar que per a dilucions de factor 10 i per a una reacció amb un rendiment molt

proper a 2, la diferència de nombre de cicles entre dues mostres seria de 3 aproximadament. Aquesta afirmació, però, només és vàlida mentre que la corba estàndard mantingui la linearitat de tipus $y=ax+b$.

A molt petites concentracions en *template*, la probabilitat de xoc es més reduïda i per tant, el rendiment de la PCR és veu afectat considerablement, alterant per consegüent en numero de cicles al que la mostra hauria de ser detectada. El mateix succeeix per a mostres molt concentrades en *template*, el Cp tampoc segueix la linearitat esperada de la fórmula $y=ax+b$. Així, el programa ens permet obtenir corbes amb segments linears i amb segments no linears (amb fórmules més complexes que el tipus $y=ax+b$).

En el nostre cas, podem veure com a baixes concentracions, el Cp apareix més aviat que el que estava previst (a poc menys de 3 cicles de dilució anterior). En el nostre cas, voldria dir que el rendiment de la PCR a baixes concentracions és més

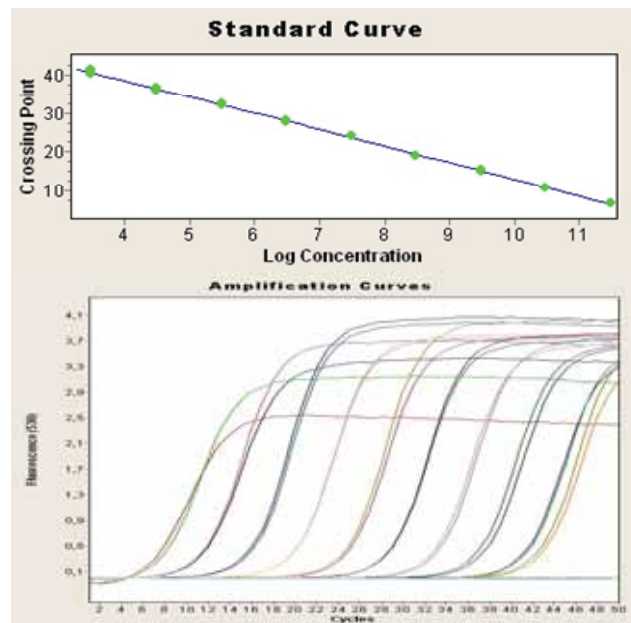


Figura 23: Corbes d'amplificació corresponents a tota la reacció de PCR. Mostres en dilucions seriades de factor 10 per a la realització d'una corba estàndard.

alt que el rendiment a més altes concentracions, es a dir que tendeix més a apropar-se de 2.

La corba de punts de fusió o corba de melting ens va permetre verificar el que estàvem amplificant (figura 24), i que no tinguéssim contaminacions o generació de fragments extra (*primer-dimer*) que ens donessin falsos Cp. Aquesta corba de fusió s'obté fent una deshibridació total

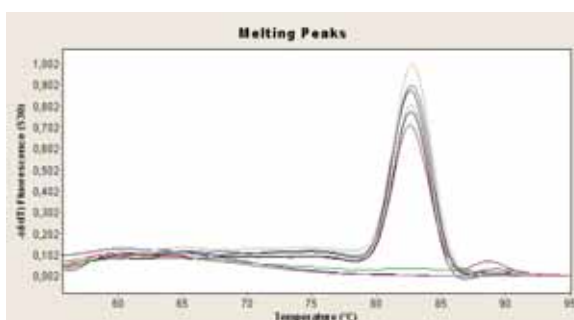


Figura 24: Corba de punts de fusió o corba de melting point. Representació gràfica de la derivada de la variació de la fluorescència en el temps, en funció de la temperatura. El pic representa la màxima pendent en la disminució la temperatura.

de les mostres a 96°C, rehibridant-les tot seguit a l'atzar a temperatures de 60°C. Després es realitza una pujada de la temperatura progressiva 0,1°C/s fins a 96°C amb punts de lectura a cada 0,1°C (uns 360 punts de lectura). Així, cada fragment diferent tindrà un punt de fusió individual, que correspon a la temperatura a la que el 50% dels fragments es deshibriden. Aconseguint màxima estabilitat els fragments que s'han hibridat amb el seu homòleg complementari idèntic.

Aquesta estabilitat termodinàmica depèn de cada fragment, del contingut en GC, de la llargada, de la complementarietat de la hibridació i del contingut en sals de la mostra. El mateix programa ens permet transformar la disminució de la fluorescència en pics de melting (més fàcilment analitzables) mitjançant la derivada de la disminució de la fluorescència en el temps, en funció de la temperatura : (-dF/dT).

L'estabilitat empírica descrita per a cada parell de bases seria :



Existeixen tests que permeten predir la temperatura de melting de cada fragment i així un fragment amb 0 % de GC tindrà una temperatura de fusió 41°C inferior a la d'un fragment amb 100 % de GC, i un producte de primer-dimer tindrà una temperatura de melting 12°C per sota de un producte de 1000 pb (*Analytical biochemistry* 245, 154-160 (1997), Kirk M Ririe). Gràcies a aquestes corbes de melting, i a diferència d'un gel d'agarosa convencional, podem diferenciar entre dos fragments de mateixa llargada però de diferent contingut en GC.

Per a tornar a l'estudi de SRY, cada PCR de les mostres diana, es va verificar la veracitat dels resultats mitjançant aquest tipus de corba de melting.

També es van efectuar PCR de les mateixes mostres però amb els *primers* corresponents a la Beta-2-microglobulina (B2m). La B2m és un gen control que existeix en totes les cèl·lules i que està constitutivament expressat. En el nostre cas, la expressió careixia d'importància, varem utilitzar és el numero de còpies del gen en cada cèl·lula. S'hagués pogut utilitzar qualsevol gen que estigui conservat en tots els individus i que tingui dues còpies en cada cèl·lula, sense alteracions en el numero de còpies.

Seguint el mateix protocol que per SRY, es van realitzar corbes estàndard per a la B2m i es van utilitzar com a controls les mateixes mostres control positiva i negativa que per SRY.

Amb l'estudi del gen control es va obtenir la quantificació de totes les còpies de B2m que corresponien a les dues còpies del gen (per cèl·lula) presents en la reacció. Així, la B2m ens permetia disposar de la quantitat total de cèl·lules presents (donant + receptor) introduïdes en la reacció.

Es va calcular la relació entre B2m i SRY i es van trobar valors molt propers a 2 (agafant com a referència B2m o SRY), es a dir que els valors detectats per B2m eren aproximadament 2 cops superiors als valors detectats per SRY, en una mostra 100% positiva per SRY (DNA control masculí). Així obteníem un factor de correcció k aplicable a cada mostra per a corregir les concentracions de SRY:

$$2.04(\pm 0.6)[SRY] = [B2m] \quad (6)$$

Per a poder saber la proporció de cèl·lules SRY positives en un entorn global caracteritzat per B2m, es va realitzar la *ratio* (o normalització) dividint la quantitat de cèl·lules SRY positives, per la quantitat total de cèl·lules detectades. Tenint en compte el nombre de rèpliques efectuades per a cada mostra, la formula resultant era:

$$\kappa(\Sigma\bar{X}[SRY])/\Sigma\bar{X}[B2m] \quad (7)$$

Teòricament, s'hauria de restar el nombre de còpies de SRY al nombre de còpies de B2m global, per a saber precisament la proporció de SRY en el global de cèl·lules del receptor, però, tenint en compte que el microquimerisme és 4 o 5 log més petit que el nombre de cèl·lules del receptor, era un valor menyspreable.

En el cas de la detecció de SRY genòmic, sabem que una sola cèl·lula d'origen masculí ens permetrà la detecció d'una còpia SRY, i per tant la normalització amb B2m seria, en aquest cas, inútil. Però dita normalització ens permet verificar i expressar el numero global de cèl·lules que contenen SRY dins el conjunt global de cèl·lules (que contenen B2m). Ja que no era el mateix 10 còpies de SRY en 10^6 còpies de B2M que 10 còpies de SRY en 10^5 còpies de B2m.

Seguint aquesta tècnica, es va poder assolir la quantificació de totes les mostres de trasplantaments d'òrgans d'origen masculí en receptores de sexe femení.

6.3- Detecció i quantificació del microquimerisme per Q-PCR basada en polimorfismes de HLA-DRB1.

Seguint el mateix procediment emprat per a la quantificació de SRY, es va realitzar la quantificació dels diferents al·lels no compartits de HLA-DRB1 del donant, mitjançant els *primers* específics de seqüència descrits anteriorment.

La idea d'utilitzar la tècnica de la PCR hemi-nested aplicada al LightCycler es va veure dificultada degut a l'utilització del Sybr Green ja que la generació del fragment DR comú hagués emmascarat l'aparició més tardana del fragment SSP. Per això es va optar per a la utilització directa de la PCR SSP sense amplificació prèvia del fragment 5DR comú. Tanmateix, l'utilització d'una prèvia amplificació del fragment comú (tècnica nested), presentava l'inconvenient de tenir un gran numero de fragments de doble cadena, el que va originar una fluorescència basal extremadament alta, que influïa negativament en la detecció de l'amplificació del fragment SSP. Així va decidir suprimir l'utilització de qualsevol amplificació prèvia del fragment 5DR comú.

Degut a l'extrema sensibilitat del LightCycler, la detecció de tots els fragments SSP en un context diferent de DR dominant, ens va aportar interferències en la detecció del DNA minoritari. Degut a aquest fenomen, la detecció del DNA del donant no presentava la mateixa sensibilitat en funció del DNA dominant que simulava el receptor (Taula 4).

Taula 4: Detecció mínima del DNA minoritari (en pg) en funció del DNA dominant (sempre a 50 ng)

↓ DNA minoritari	↓ DNA Dominant							
	01	03-11-13-14	04	07	08-12	09	10	15-16
01	xx	100	10	10	50	10	10	10
03-11-13-14	75	xx	50	75	100	50	100	50
04	20	60	xx	20	20	20	20	20
07	50	60	50	xx	50	50	50	50
08-12	40	100	40	60	Xx	40	40	40
09	20	20	20	20	20	xx	20	20
10	10	40	10	10	10	10	xx	10
15-16	10	100	50	100	50	20	20	xx

7- Estudi preliminar de factors tolerogènics perifèrics residents en el receptor

En la cohort de pacients prospectius, es va efectuar un estudi paral·lel en alguns dels pacients trasplantats per a poder identificar la presència o l'absència de possibles elements cel·lulars tolerogènics adquirits en sang perifèrica que podrien haver induït una tolerància i/o que perdurin en els pacients.

7.1- Estudi molecular de la presència de Treg per FOXP3

Per a determinar si existeix alguna associació amb una més alta expressió del gen FOXP3 (i per consegüent a una més alta presència de cèl·lules Treg en sang perifèrica) i la presència o absència de microquimerisme i/o de rebuig, es van analitzar les mostres de pacients en el moment del seguiment M2. Per això, es va:

- Realitzar un estudi de l'expressió del gen Foxp3 als dos mesos post-trasplantament, utilitzant les mateixes mostres en les que es va determinar la presència de microquimerisme en M2.
- Establir si existeix una correlació entre la presència de microquimerisme i/o de rebuig i una variació en l'expressió del gen Foxp3.

Es van incloure a l'atzar, 45 dels pacients amb trasplantament renal estudiats per a la presència de microquimerisme i de rebuig.

També es va determinar l'expressió de FoxP3 en els trasplantaments amb el seguiment de la cinètica d'establiment del microquimerisme.

7.2- Citometria de Flux

Es van incloure un total de 55 mostres per a aquest estudi transversal. Més detalladament, es van analitzar un total de 36 pacients amb trasplantaments de ronyó (n=22), cor (n=6) i fetge (n=8). Juntament, i per a normalitzar els resultats, es va analitzar una sèrie de 20 controls sans no trasplantats.

Varem disposar de la sang perifèrica dels pacients trasplantats i prèviament analitzats per rebuig i per la presència de microquimerisme. En aquests pacients, es va efectuar un estudi transversal, es a dir sense tenir en compte la data de trasplantament.

Per a realitzar la citometria de flux, varem utilitzar el citòmetre *FACSCalibur* i els anticossos marcats, tots dos provinents de l'empresa *BD Biosciences* (San José, Califòrnia). Per a cada mostra es van adquirir un mínim de 4000 events, i l'anàlisi es va dur a terme emprant el programa *CELLQuest* (BD Biosciences).

Per a poder visualitzar diferències entre els diferents grups de pacients junt amb els controls sans no trasplantats, varem analitzar els components cel·lulars més habituals en la sang perifèrica dels pacients:

- CD3 marcatge de tots els limfòcits T

- CD19 marcatge de tots els limfòcits B
- CD4 marcatge dels limfòcits CD4+ (junt amb CD3)
- CD8 marcatge dels limfòcits CD4+ (junt amb CD3)
- També varem obtenir la raó CD4/CD8
- CD2, CD56, CD2-CD56 marcatge de les cèl·lules NK

També varem efectuar anàlisis més selectius per a diferenciar 3 tipus de cèl·lules determinades:

- Co-marcatge amb anticossos anti CD4, CD25 i CD28
- Co-marcatge amb anticossos anti CD4, CD152 i HLA-DRB1
- Co-marcatge amb anticossos anti CD19, CD152 i HLA-DRB1

Es va estudiar l'existència d'alguna variació significativa d'un d'aquests elements en comparació a una població de controls sans no trasplantats i respecte a la presència o la absència de microquimerisme o la presència o la absència de RAPB.

VIII- Estadística

- 8- Establiment del numero de rèpliques: aplicació estadística del test de distribució binomial

Estadísticament parlant, la distribució binomial és una distribució de probabilitat discreta del numero d'esdeveniments en una seqüència de n experiments independents, que tenen una probabilitat θ d'ocórrer.

Abans de començar els experiments, s'ha de verificar que el nostre experiment compleix algunes premisses com ara:

- El experiment consisteix en una seqüència de n intents, havent fixat n abans de l'experiment.
- Els intents són idèntics, i cada un d'ells pot acabar en dos possibles resultats que anomenarem èxit (S) o fracàs (F) ($p(S)+p(F)=1$).
- Les proves són independents, i per tant, el resultat de qualsevol prova no té cap repercussió sobre el resultat d'una altra prova.

Així, la distribució de la probabilitat seria:

$$b(x; n, \theta) = \binom{n}{x} \theta^x (1 - \theta)^{n-x}$$

Aquesta fórmula és certa per a $x = 0, 1, 2, \dots, n$

Aplicant aquesta fórmula a tot un seguit d'intents n i per tota una sèrie d'experiments amb diferents probabilitats d'èxit inicial θ (1 de 2 (1/2) o 1 de 3 (1/3) o 1 de 4 (1/4) ...) varem obtenir la taula 5 amb la corresponent representació gràfica (figura 25).

# PCR correctes	P(PCR_CORRECTA)											
	1	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/7	1/8	1/9	1/10	1/11	1/12
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0,5	0,33333333	0,25	0,2	0,16666667	0,14285714	0,125	0,11111111	0,1	0,09090909	0,08333333
2	1	0,75	0,55555556	0,4375	0,36	0,30555556	0,26530612	0,234375	0,20987654	0,19	0,17355372	0,15972222
3	1	0,875	0,7037037	0,578125	0,488	0,4212863	0,37026239	0,33007813	0,29768004	0,271	0,2468852	0,22974537
4	1	0,9375	0,80240914	0,68359375	0,5904	0,51774681	0,46022461	0,41381836	0,37570492	0,3439	0,31698654	0,29393326
5	1	0,96875	0,86831276	0,78269531	0,67232	0,59812243	0,53733563	0,48708106	0,44507104	0,40951	0,37907868	0,35277215
6	1	0,984375	0,9122085	0,82202148	0,737856	0,66510202	0,60343054	0,55120468	0,50672982	0,468559	0,43552607	0,40670781
7	1	0,9921875	0,94147234	0,86651611	0,7902946	0,72091835	0,66008322	0,6073041	0,56153761	0,5217031	0,48684188	0,45614882
8	1	0,99608375	0,96088156	0,89988708	0,82222784	0,76743196	0,70864265	0,65639108	0,61025666	0,56953279	0,53349262	0,50148975
9	1	0,99904688	0,97398771	0,92491531	0,86578227	0,8061933	0,7502653	0,6993422	0,65356058	0,61257951	0,57590238	0,54301394
10	1	0,99902344	0,98265847	0,94389848	0,89262582	0,83849442	0,78594168	0,73692442	0,69205385	0,65132156	0,61445871	0,58109611
11	1	0,99951172	0,98843888	0,95775486	0,91410065	0,86541201	0,81652144	0,76980887	0,72627009	0,6861894	0,6495061	0,61600477
12	1	0,99975686	0,99220265	0,96832365	0,93128052	0,88784335	0,84273267	0,79858276	0,75668453	0,71757046	0,68136918	0,64800437
13	1	0,99987793	0,99488177	0,97624274	0,94502442	0,90653612	0,86519943	0,82375992	0,78371958	0,74581342	0,71033562	0,67733734
14	1	0,99993896	0,99657451	0,98218205	0,95801953	0,92211343	0,88445865	0,84578993	0,80775074	0,77123206	0,73668875	0,7042256
15	1	0,99996948	0,99771634	0,98863654	0,96481563	0,93509453	0,90096265	0,86506619	0,82911177	0,79410887	0,76060795	0,72887374
16	1	0,99998474	0,99847756	0,9899774	0,9718525	0,94591211	0,91511101	0,88193291	0,84809935	0,81488798	0,78237086	0,75148758
17	1	0,99999237	0,99889504	0,99248305	0,977482	0,95492676	0,92723801	0,8968913	0,8649772	0,83322818	0,80215533	0,77217863
18	1	0,99999619	0,99923336	0,99436229	0,9818956	0,96243896	0,93763258	0,90980489	0,87987873	0,84990536	0,82014121	0,79116374
19	1	0,99999809	0,99954891	0,99577172	0,98558948	0,96869914	0,94654221	0,92080428	0,89331532	0,86491483	0,83649201	0,80856878
20	1	0,99999905	0,9996827	0,99682879	0,98947078	0,97391595	0,95417904	0,93078124	0,90516917	0,87842335	0,85135837	0,82451953
21	1	0,99999952	0,99979951	0,99762159	0,99077863	0,97826329	0,96072489	0,93944734	0,91570593	0,89058101	0,86486943	0,8391429
22	1	0,99999976	0,99986634	0,99821619	0,9926213	0,98188607	0,96633562	0,94701204	0,92507194	0,90152291	0,87715403	0,85254766
23	1	0,99999988	0,9999109	0,99866214	0,99409704	0,98490506	0,97114462	0,95363554	0,93339728	0,91137062	0,88832184	0,86483536
24	1	0,99999994	0,9999406	0,99899661	0,99527763	0,98742088	0,97526689	0,9594311	0,94078758	0,92023356	0,8984744	0,87609906
25	1	0,99999997	0,9999604	0,99924746	0,99622211	0,9895174	0,97880027	0,96450221	0,94737563	0,9282102	0,907704	0,88642415
26	1	0,99999999	0,9999736	0,99943559	0,99697768	0,9912645	0,98182861	0,96893943	0,95322278	0,9358918	0,91609455	0,89588881
27	1	0,99999999	0,9999824	0,99957669	0,99758215	0,99272042	0,98442469	0,972822	0,95842025	0,94185026	0,92372232	0,90456474
28	1	1	0,99998827	0,99968252	0,99806572	0,98393388	0,9664913	0,94621925	0,92304022	0,89766524	0,87065665	0,84215786
29	1	1	0,99999216	0,99978189	0,99945257	0,99494474	0,98855862	0,97919185	0,96714886	0,95288871	0,93696059	0,91980787
30	1	1	0,99999478	0,99982142	0,99876208	0,99578728	0,99019164	0,98179287	0,97079721	0,95760884	0,94269145	0,92649055

Taula 5: Distribució binomial.

Les columnes representen les probabilitats d'èxit inicial θ , les línies representen el número de PCR a realitzar n , i cada casella conté la probabilitat resultant d'èxit $p(S) = 1 - p(F) = b(x; n, \theta)$ per a tenir almenys un esdeveniment positiu.

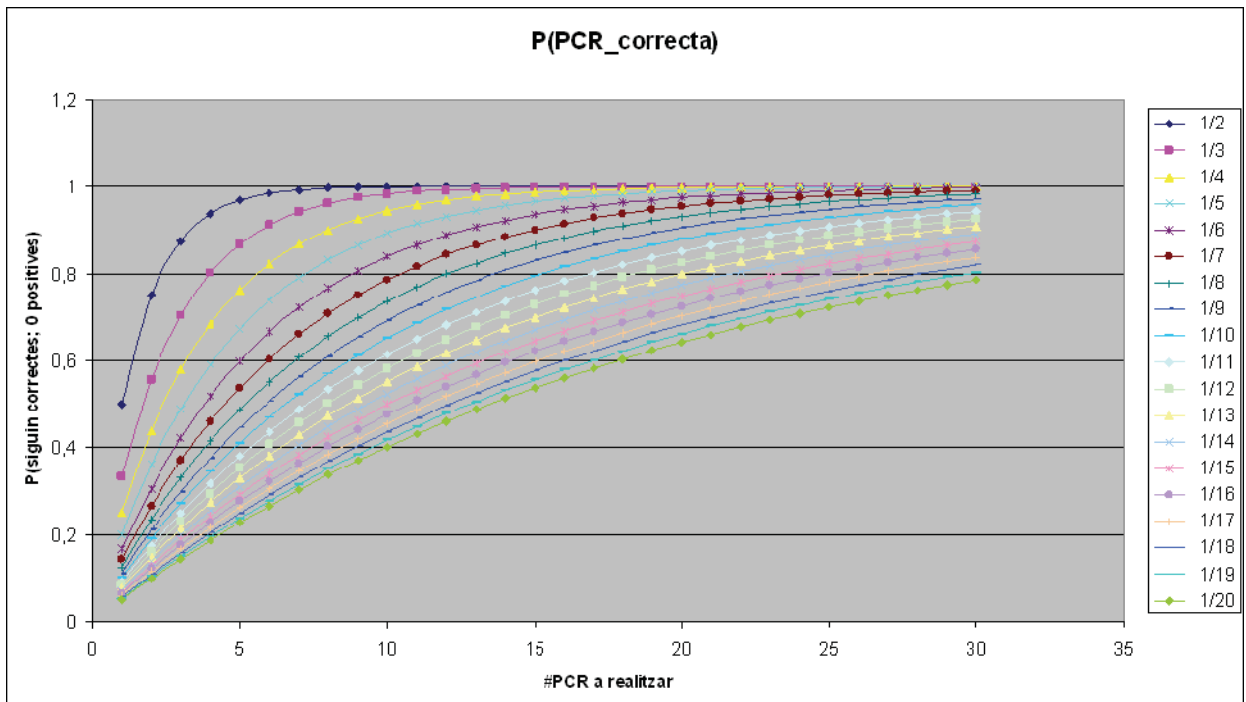


Figura 25: Representació gràfica de la probabilitat d'èxit en funció de la distribució binomial.

Els diferents colors representen la probabilitat inicial d'èxit θ obtingut per a cada dilució. En l'eix X tenim representada la quantitat de repeticions necessàries n , i en l'eix Y tenim la probabilitat d'èxit $p(S) = 1 - p(F) = b(x; n, \theta)$ per a obtenir almenys un esdeveniment positiu.

Així, un cop realitzades les distribucions de probabilitats en funció de l'èxit inicial, varem poder determinar:

- una probabilitat acceptable per a la detecció de microquimerisme en una mostra que contingués com a mínim la concentració determinada en la dilució extrema $N/10^x$ del control positiu amb la probabilitat θ d'èxit inicial.
- un numero raonable de rèpliques a realitzar de la mateixa mostra per a assegurar la detecció del microquimerisme.

Com a exemple, en la detecció de la seqüència genòmica SRY (normalment absent en dones) en dones que han experimentat un trasplantament d'un òrgan provinent d'un donant de sexe masculí, ens varem basar en les dades següents:

- dilució: $N/10^6$ corresponent a 0,6 pg de DNA provinent de sexe masculí en una quimera mixta amb una quantitat constant de DNA d'origen femení de 200 ng.
- probabilitat d'èxit de detecció de SRY en aquesta quimera mixta amb la dilució corresponent a $N/10^6$: almenys 1 PCR positiva per 3 PCR realitzades.
- probabilitat arbitrària, raonable i acceptable de detecció de SRY en dilucions $N/10^6$ o mostres equivalents: superior a 86% (segons el test, la probabilitat més propera és almenys un 86,83 %)
- corresponent numero de PCR rèpliques de la mateixa mostra a realitzar per a complir els requisits anteriors: 5.

9- Anàlisi de dades: tests emprats

Per a verificar que les diferències entre els resultats obtinguts eren estadísticament significatives i vàlides, varem utilitzar:

- Corbes de supervivència creades mitjançant el mètode de Kaplan-Meier i avaluació estadística de les seves diferències mitjançant el test de Log-Rank
- T-test per a la comparació de mitjanes de dues variables quantitatives

- Test d'Anova per comparar l'homogeneïtat de la variança entre més de dues variables quantitatives
 - Test de Fischer per a verificar l'associació de dues variables qualitatives en taules creuades de 2 per 2
 - Test de Chi-quadrat per a taules superiors a 2 per 2
- 10- Validació de la proporcionalitat de risc de les variables en un test multivariant emprant el model de regressió de Cox.

Totes les variables incloses en un test multivariant emprant el model de regressió de Cox varen ser testades per a poder validar el compliment dels requisits de proporcionalitat (*Grambsch 1995*) en el risc.

Per a validar dita proporcionalitat, varem emprarel test d'assumpció de riscos proporcionals descrits per Grambsch et al. (*Grambsch and Therneau 1994; Grambsch 1995*) que ens va retornar el valor de la proporcionalitat per a cada variable inclosa en el test, valor que havia de ser superior a 0.05 per a garantir dita proporcionalitat.

10.1- Exemple

<u>Var. continua de temps</u>	Temps fins a rebuig
<u>Event</u>	Rebuig agut
<u>Variables</u>	Presència de microquimerisme al mes 2 (M2) (si/ no)
	Incompatibilitat HLA-DRB1 (2 al·lels idèntics, 1 al·lel idèntic, 0 al·lels idèntics)
	Incompatibilitat Rh (compatibles, +reb -, - reb +)
	Incompatibilitat en sexe (identitat en sexe, home rep dona, dona rep home)

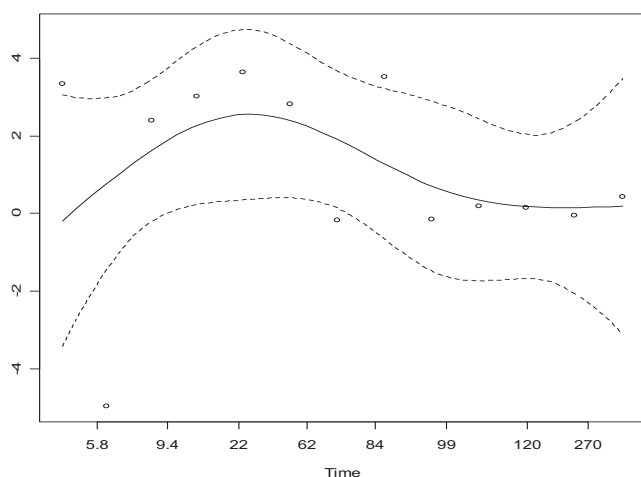
Sintaxis introduïda en R

```
cox.zph(coxph(Surv(Variabletemps,Event)~factor(var1)+as.numeric(var2)+as.numeric(var3) +as.numeric(var4) , fitxer))
```

Resultats obtinguts

Variables	rho	chisq	p	
<i>factor(quims1tr)No</i>	-0.561	3.7960	0.0514	Podem veure com es manté la proporcionalitat en les diferents variables ja que els valors de les p obtingudes són tots superiors a 0.05.
<i>as.numeric(hla_dr)</i>	-0.156	0.4045	0.5248	
<i>as.numeric(pts_sex)</i>	0.409	1.7721	0.1831	
<i>as.numeric(pts_rh_i)</i>	0.056	0.0378	0.8458	
<i>GLOBAL</i>	NA	5.8541	0.2103	

Representació gràfica de la proporcionalitat global



Es pot apreciar que les corbes resultants (ratlles discontinues) guarden proporcionalitat amb la corba central (continua) que és el coeficient que modela el risc al llarg del temps.

10.2- Validació de la veracitat del test multivariant

També es va verificar la veracitat del test mitjançant el test de versemblança per al model de Cox (*likelihood function*). Tenint en compte que en el test multivariant de Cox es va utilitzar el mètode d'anàlisi pas a pas i endarrere de Wald (backward Wald), es va verificar a cada pas que la *p* resultant del test de versemblança fos inferior a 0.05.

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 sense 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.

Existeixen nombroses explicacions i teories per a intentar explicar aquest fenomen. La seva presència ha estat dubtosa fins a l'aparició de la biologia molecular que sembla unificar algunes de les experimentacions realitzades en ratolins, primats o 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 a temps diferents, amb equipaments diferents i per a moltes, amb conclusions diferents i fins i tot contradictòries.

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

Els resultats del present estudi seran presentats en forma d'articles i 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. Degut a la falta de consens actual en l'homogeneïtzació de les tècniques moleculars per a la determinació de l'existència del microquimerisme, varem creure que era fonamental centrar la primera part de l'estudi en la validació d'aquestes tècniques, el 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, 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 a 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 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.

RESULTATS - SECCIÓ I

“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

Aquest primer treball permet demostrar que la tècnica RSCA pot ser emprada per a la comparació de dues mostres entre elles, en el cas de no disposar de marcadors de tipatge molecular.

Aquí, concretament, es descriu la tècnica aplicada a la comparació directa de les mostres del donant i del receptor prèvia a un trasplantament de moll de l'os. El locus comparat és HLA-DPB1. També es demostra la validesa de la tècnica i la seva possible aplicabilitat en el món dels trasplantaments.

Per extensió a aquest treball, varem assumir la seva aplicabilitat per a la recerca de compatibilitats en els locus HLA-A i -B. Així, la detecció de microquimerisme es va poder realitzar en alguns casos mitjançant la comparació de les mostres pre-trasplantament i post-trasplantament del mateix receptor, juntament amb el donant.

“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

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

Basant-nos en les diferències genètiques que existeixen entre individus, varem establir un procés en 4 fases per a identificar les cèl·lules del donant.

- 1- **Discriminació.** Identificar les tècniques que permetin discriminar al donant del receptor, es 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 el més petita possible, establir el llindar mínim de detecció.
- 4- **Reproductibilitat.** Poder reproduir els resultats en el màxim nombre de casos possibles. Establir si es possible el grau de veracitat de la tècnica.

En aquest estudi varem 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, ...).

RESULTATS - SECCIÓ II

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

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

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

Un cop establertes les bases de la detecció del microquimerisme, la següent fase era sense dubte la verificació de la presència de les cèl·lules del donant en la sang perifèrica del pacient trasplantat. 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 als 30 dies post-trasplantament.

En ambdós tipus de trasplantaments, es va poder veure una tendència cap a una menor incidència de rebuig en presència de microquimerisme als 30 dies post-trasplantament. La incidència de rebuig analitzada va tenir en compte qualsevol tipus de rebuig que podia patir el pacient, incloent rebuig provat per biòpsia i/o per detecció clínica, de tipus agut o crònic.

El baix numero de pacients i l'anàlisi global dels episodis de rebuig no varen permetre obtenir dades estadísticament significatives, però, van mostrar la tendència a la disminució de rebuig en presència de cèl·lules del donant.

“Early haematopoietic microchimerism predicts clinical outcome after kidney transplantation”

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

Transplantation. 2007 Nov 15;84(9):1103-1111.

Gràcies a totes les tècniques prèviament descrites i a la inclusió d'un més gran nombre de pacients en el nostre estudi, varem continuar l'anàlisi de la correlació del microquimerisme amb l'establiment del rebuig, però aquest cop, centrats en els trasplantaments de ronyó (n=84).

Varem demostrar la presència de microquimerisme en més de la meitat dels pacients als dos mesos post-trasplantament i que finalment esdevenia indetectable en la majoria d'aquests pacients més enllà dels 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), evitant en aquest interpretacions que poguessin conduir a l'aparició de falsos positius. Varem constatar que la presència de microquimerisme es relacionava clarament amb l'absència d'episodis de RAPB. Tanmateix, i per generalitzar, varem contrastar la presència de qualsevol tipus de rebuig (RAPB i rebuig clínic) amb la presència de microquimerisme, trobant unes tendències molt similars.

No es va establir cap relació entre la presència de microquimerisme i la incidència de pèrdua de 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 aquest 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 als 7-14 dies era predictiva de la determinació al segon mes post-trasplantament.

En aquest treball, i de forma preliminar, varem 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.

RESULTATS - SECCIÓ III

“Microchimerism and rejection after solid organ transplantation: is there a tolerogenic remain?”

Pujal JM, Mestre M, Grinyó JM.

En elaboració.

Estudi sobre la recerca de reminiscències tolerogèniques en els pacients trasplantats de ronyó i de cor després d'haver establert la incidència de microquimerisme i de rebuig. La idea central d'aquest estudi era cercar, en els diferents tipus de trasplantaments, algunes alteracions que hagin sorgit degut a la presència del microquimerisme i/o d'almenys un episodi de rebuig.

Així, descrivim una absència d'alteració funcional en els diferents òrgans deguda a la presència de cèl·lules del donant. Tanmateix, descrivim la recerca de l'existència de cèl·lules Treg en el moment de la determinació del microquimerisme (en M2) en pacients trasplantats de ronyó. També es descriuen els resultats de la recerca de cèl·lules tolerogèniques en un tall transversal en el temps en pacients trasplantats de ronyó, cor i fetge.

Els resultats obtinguts mostren que la presència de microquimerisme no sembla alterar la funcionalitat dels òrgans trasplantats. També podem veure que en el sistema immunològic perifèric, la presència de microquimerisme no altera de forma significativa la presència de cèl·lules tolerogèniques i/o citotòxiques. Cal destacar, però, que aquest "equilibri" cel·lular es veu desorganitzat en presència d'un episodi anterior de rebuig.

MICROCHIMERISM AND REJECTION AFTER SOLID ORGAN TRANSPLANTATION: ARE THERE TOLEROGENIC REMAINS?

Pujal JM. ¹, Manito N. ², Fabregat J. ³, Ramos E. ³, Mestre M. ⁴, Grinyó JM. ⁵

- 1- Translational Research Unit - Institut Català d'Oncologia - Hospital Duran i Reynals - L'Hospitalet de Llobregat - Barcelona - Spain
- 2- Cardiology Unit - Hospital Universitari de Bellvitge - L'Hospitalet de Llobregat - Barcelona - Spain
- 3- Liver Transplant Unit - Department of Surgery - Hospital Universitari de Bellvitge - L'Hospitalet de Llobregat - Barcelona - Spain
- 4- Immunology Unit - Hospital Universitari de Bellvitge - L'Hospitalet de Llobregat - Barcelona - Spain
- 5- Nephrology Unit - Hospital Universitari de Bellvitge - L'Hospitalet de Llobregat - Barcelona - Spain

Corresponding author: Pujal JM

Translational Research Laboratory
Hospital Duran i Reynals
Institut Català d'Oncologia (3rd floor)
Autovia Castelldefels, sn, Km 2,7
08907 L'Hospitalet de Llobregat
Barcelona (Spain)
Email: jmpujal@idibell.org

Abstract

Introduction: Circulating donor cells have been detected several months after solid organ transplantation and their presence has been associated with a lower incidence of rejection. In this study we have analysed the presence of donor cells and verified its association with a lower incidence of rejection in kidney, heart and liver transplanted recipients. However, the main objective of this study was to determine the presence of tolerogenic elements remaining in the peripheral blood of these recipients and to correlate it with microchimerism or rejection.

Methods: Microchimerism presence was detected by PCR and rejection-positive status was assigned to biopsy-proven recipients. Treg cell presence was determined via FoxP3 expression at the same time as microchimerism determination. Flow cytometry was carried out in recipients two to four years after transplantation.

Results: Microchimerism was detected in almost the half of kidney and heart recipients and the majority of liver recipients. Its presence was associated with a lower incidence of rejection in kidney or liver and showed a clear tendency in heart recipients. FoxP3 expression did not show any significant variation when compared to microchimerism or to rejection groups, but showed a clear increase, similar to kinetic microchimerism establishment. Flow cytometry neither did reveal any significant variation within microchimerism groups but showed significant changes when analysing rejection groups.

Conclusion: We could verify that transplanted recipients display significant changes when compared to non-transplanted controls. Also, after confirming that microchimerism is correlated to a lower incidence of rejection, its presence seems not to induce detectable acquired changes in cell composition in peripheral blood after 4 years. Rejection provokes detectable and acquired changes in cell subset fractions.

Introduction

Donor cell presence in peripheral blood of solid organ transplanted recipients has been correlated to lower rejection incidence¹⁻¹². These donor cells seem to migrate within host to privileged emplacements that could guarantee their survival^{13,14}.

Treg cells¹⁵⁻¹⁹, dendritic cells²⁰⁻²⁵ and immature antigen presentation or lack of co-stimulatory signals²⁶⁻²⁹ are often co-mentioned concerning tolerance achievement. Since microchimerism has been linked with specific T CD8+ cell depletion or hyporesponse^{30,31} and newly specific Treg formation^{30,32,33}, we wanted to determine whether, in microchimerism positive recipients, such mechanisms and cells were identifiable by flow cytometry.

For this purpose we studied liver, kidney or heart transplanted recipients and determined their microchimerism status at 2, 6, 12 and 18 months, also providing donor-cell detection decline data. We, then, investigated the presence of tolerogenic cells such as CD4+CD25^{high} Treg cells and analysed together with microchimerism and rejection, several months after transplantation.

This preliminary study, which is a basic approach, was performed to determine whether microchimerism is involved in any acquired fluctuation concerning the nature of cell subsets and its sub-fractions.

Patients and methods

Patients

127 transplanted patients were included (kidney (n=84), heart (n=27) or liver (n=16), all from cadaveric donor, in *Hospital Universitari de Bellvitge* (Barcelona, Spain), included from March 2001 to December 2003. Rejection and clinical follow-up of each recipient were carried up for 4 years post-transplant.

Acute rejection and failure status

Concerning all organ, rejection status was ascribed only to biopsy proven recipients and classified as mild, moderate or severe according to 2001 Banff standard histo-pathologic criteria. As previously defined for kidney recipients³⁴, biopsy proven acute rejection (BPAR) positive status was attributed to biopsies displaying at least a 4.1A Banff level. All heart recipients presenting at least a 3A right ventricle rejection grade were considered as rejection positive, showing cell mediated myocardic injury. In liver transplants, abnormal transaminase, lactate deshydrogenase and gamma-glutamyl-transpetpidase levels suggesting biopsy were considered for rejection, proved by a 2A histo-pathologic score in biopsy. In each group, all recipients presenting at least one acute rejection episode were classified in rejection positive group.

Molecular microchimerism detection

Microchimerism detection was carried up by means of molecular techniques described previously³⁴. Also, microchimerism status was attributed to each recipient following the same criteria at months 2 (M2), 6 (M6) or 12 (M12). Concerning the visualisation of microchimerism-kinetic establishment, we also used the same previously described timing for kidney but also for liver recipients.

FoxP3 expression

The analysis of variances in FoxP3 expression was carried out on 45 kidney recipients using the same microchimerism-tested M2 follow-up samples to detect any variation in Treg cell amount. cDNA retrotranscription was performed using “First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR AMV” kit (Roche Applied Science). FoxP3 forward primer was 5'-actggggtctctcctcaa-3' and reverse primer was 5'-cgtggaaggtgcagagtag-3'. Normalization was performed adopting the housekeeping gene GAPDH using forward primer 5'-ggtatcgtggaaggactcatgac-3', and reverse primer 5'-atgccagtgagcttcccgcttcagc-3'. FoxP3 and GAPDH fragments were cloned in a 3956bp pCR4-TOPO plasmid using TOPO TA cloning kit (Invitrogen Life Technologies), and FoxP3 quantification was realised in Light Cycler v2.0 thermocycler using Light Cycler Software v4.0.023.

Transversal Cytometric Flow Analysis

Fifty-six randomly chosen blood samples of kidney (n=22), heart (n=6) or liver (n=8) recipients and 20 healthy non transplanted controls were analysed by Flow Cytometry in a FACSCalibur instrument with CELLQuest software (BD Biosciences) with a minimum of 4000 events acquisition analysis for each sample.

Blood extraction was realised with no specific time point (mean day 1118,7 SD 468,7) after transplantation, in order to visualize any acquired tolerogenic state. We performed this study using triple immunostaining method for each sample and for different cell subsets like CD28(FITC)-CD25(PE)-CD4(PerCP), HLA-DR(FITC)-CD152(PE)-CD4(PerCP) and HLA-DR(FITC)-CD152(PE)-CD19(PerCP) (all from Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) each one by using a first FL3-FSC gate. CD25^{high} cells were distinguished upon a Mean Intensity channel of Fluorescence (MIF) value $\geq 2.10^2$ at the CD25 axis and defined as Treg cells. For FACS multiple testing, all p values were adjusted following False Discovery Rate (FDR) at 5%.

Results

Microchimerism detection

As shown in Table 1, experimental molecular microchimerism determinations demonstrate that 51.9% of heart transplanted recipients displayed microchimerism at the second month (M2), descending to 22.2% and 14.8% on the 6th (M6) and 12th (M12) months respectively. These results showed that microchimerism is a dynamic phenomenon and its persistence seems to be altered within time. While heart and renal (for renal transplantation, refer to our previously published data³⁴) transplanted recipients seem to display similar microchimerism incidence, almost all liver transplanted recipients showed microchimerism. We found that 87.5 % of prospective recipients (n=8) (mean day $32,5 \pm 25.6$) and 50 % of retrospective recipients (n=8) analysed at mean day 292.6 ± 154.3 displayed microchimerism.

All microchimerism positive recipients showed donor cells in PBMC fraction. Even if microchimerism became undetectable in renal or heart transplantation within the end of the first year, liver recipients showed a most frequent microchimerism incidence on M6 follow-up at mean level of $1e-5$ donor per recipient cell (DPRC).

Rejection and microchimerism at M2

Concerning heart transplanted recipients, microchimerism was found in 14 recipients and only two of them did a 3A rejection episode while in absence of microchimerism (n=13) six cardiac recipients underwent this BPAR episode. Cumulative incidence plot curves in a four years follow-up rejection analysis showed 15,4% and 42% of rejection incidence with and without microchimerism respectively (p:0.058). This difference was not statistically significant but showed a clear tendency. Also, no correlation could be established between microchimerism and neither severity nor day of rejection. These results seem to correlate our already published data concerning microchimerism and rejection in kidney transplantation³⁴.

Concerning liver transplantation, BPAR incidence in both groups was significantly lower compared to other organ transplantation as only 1 recipient did a rejection episode at day 150 after transplantation, quickly resolved by a prednisone bolus administration.

Alteration of other clinical variables

Creatinine clearance follow-up of kidney recipients did not show any variation, when only considering microchimerism status. Additionally, acute or chronic rejection episodes and also graft failure could be clearly observed within creatinine levels variations (figure 1).

As concerns heart transplantation, no correlation could be established between post-transplant cardiac allograft vasculopathy (CAV) and microchimerism presence as the incidence of CAV in our study reached 6% (n=2 diagnosed at days 388 and 899 after transplantation), although these

two recipients didn't display microchimerism. Furthermore, we did not find any correlation between microchimerism and graft failure or between microchimerism and time of failure.

Longitudinal study of FoxP3 expression in renal transplantation

Analysis of FoxP3 expression in M2 microchimerism-positive recipients did not show any difference with microchimerism-negative recipients (p:0.308). Although pre-transplant FoxP3 expression did differ from M2 post-transplant analysis, comparison of pre-to-post transplant variations (pre-transplant value / post-transplant value) between microchimerism positive and negative recipients did not show any significant fluctuation (p:0.354)

Kinetic study

The onset of donor cell circulation within recipient's blood was visualised along with the variations in FoxP3 expression (figure 2). A double-kidney female recipient receiving two male organs was studied for kinetic and quantitative circulation of donor cells just after declamping and showed kinetic curves of circulating donor cells reaching maximum levels within the first 30 minutes after declamping. Microchimerism levels at 150 minutes after declamping were reached at levels rounding 5×10^{-4} DPCR (0.05%), decreasing to similar microchimerism M2 levels (mean 1×10^{-5} DPCR) as soon as 7 days after transplantation (between 7 to 14 days) and kept microchimerism-detectable levels on M2 follow-up. FoxP3 expression levels correlate to microchimerism levels since we can observe two peaks corresponding to each organ declamping.

Also, kinetic growth of FoxP3 expression suggesting newly Treg appearance may argue in favour of donor's cell more than newly recipient Treg formation, since FoxP3 expression leading to Treg formation is in this case too short. Subsequently, these data may suggest that FoxP3 variation may be linked with microchimerism appearance since new Treg cells in recipient may be from the donor.

Also a liver female recipient receiving a male organ was time course analysed and showed a +3Log difference after declamping compared to the smaller mass organs, reaching macrochimerism levels (range 3×10^{-1} to 1×10^{-1} DPCR) up to 150 minutes after declamping (figure 2B). A seven days later determination showed microchimerism levels (1×10^{-5} DPCR) similar to liver M2 follow-up. These kinetic data indicates a correlation between 7 to 14 days and M2 microchimerism status. Also microchimerism quantitative levels seem to correlate between those determination time-points.

Flow Cytometry and rejection

Heart

We did not find any significant differences in cell subset fractions between microchimerism groups. No differences were found within CD3+, CD4+, CD8+, CD2+CD56+ or CD19+ cells neither in CD4+CD28+CD25^{high}, CD4+HLA-DR+CD152+ or CD19+HLA-DR+DR152+ subsets.

The analysis of the CD4+CD28+ cell fraction showed a difference between microchimerism-positive recipients which exhibit lower levels (47% of lymphocytes) and no microchimerism patients, which were similar to controls (72.5% and 75% respectively) (p:0.047) (figure 3A), but all showed similar rates of CD4+ T cells. This difference could account for a lower degree in CD28 membrane expression. We thus analysed the subsets within the CD4+ cell group and we found differences between microchimerism positive and negative groups concerning CD28- cells (38.0% vs 2.3% and p:0.022) (figure 3B), CD28+ cells (62.0% vs 97.7% and p:0.022), but also concerning CD4-CD28- cells (63.4% vs 58.5% and p:0.035).

It is worth mentioning that we found a difference (not reaching statistical significance) in the rate of Treg cells (3.5% vs 2.5% in microchimerism positive and negative groups respectively) and a higher degree of CD25 membrane expression on Treg cells, between microchimerism positive and negative patients (data not shown).

Interestingly, heart recipients who did a rejection episode showed similar amounts of CD19+DR+CD152+ cells as no rejection recipients. However, there was a considerable difference in membrane CD152 expression levels per cell (CD19+DR+CD152+) between the two groups as rejection group reached Y-MIF-CD152 levels 1Log lower (mean 59) than no rejection group (mean 552) (p:0.017), showing higher expression of CTLA-4 in B lymphocytes surface in heart recipients who did not underwent a rejection episode. Also, HLA-DR surface expression level remained similar in both groups, but could not be verified by a CTLA-4 or HLA-DR pre-transplant analysis.

Kidney

As concerns microchimerism status, analysis of blood-cell composition did not reveal any significant difference. Regarding donor age, we found that recipients receiving a kidney above 50 years old showed lower ratio of CD4+CD28+CD25^{high} cells (2.33%) than younger donor (below 50 years) kidney recipients (3.86%) (T-test p:0.038).

As concerns rejection and regardless of microchimerism, recipients with a previous rejection episode had higher CD4+CD28+CD25^{high} Treg cell ratio (rounding 4.5%) than no rejection group that rounded 2% (p:0.015) (figure 3C), but mean CD25 expression level per cell (MIF) remained similar in both groups. Also, BPAR recipients showed higher CD8+ cell ratio (45.3%) than no BPAR recipients (33.7%) (p:0.017) (figure 3D)

Kidney recipients showed higher CD19+HLA-DR+CD152+ cell ratio in patients with a previous BPAR episode (72.0% vs 30.3% p:0.041) and they also displayed lower DR expression

levels in CD19+HLA-DR+CD152- cell fraction in BPAR recipients (MIF 183.3 vs 558 and p:0.006).

This transversal time-independent FACS study didn't allow us to find any difference between recipients concerning their microchimerism status, but many acquired differences concerning rejection.

Conclusion

Is microchimerism detectable after all solid organ transplantations? Is this phenomenon associated with a lower incidence of rejection? Is microchimerism responsible of the creation of allogeneic specific Treg cells? Are there detectable tolerogenic elements in peripheral blood of recipients with microchimerism? All these questions have been asked by many investigators but the proposed answers have generated more questions that are still unclear.

Microchimerism is undoubtedly somehow involved in induction of the acceptance of the graft after solid organ transplantation^{7,8,30,35-37}. It can be due to active processes of deletion of alloreactive cells or passive processes of ignorance, or all together, but ultimately leading to tolerance.

We have shown that microchimerism can be detected after kidney, heart or liver transplantation, and that circulating donor cell amount is higher in hepatic transplantation, probably due to a higher rate of cell capture in more voluminous organs. We also demonstrate that microchimerism trends to disappear after the first year, confirming that it is a dynamic phenomenon. Heart transplanted recipients displayed a trend towards a lower incidence rate of BPAR, confirming the results obtained in kidney transplanted recipients³⁴. Because it is well documented that liver is clearly involved in an induction of a tolerogenic state in transplanted recipients³⁸⁻⁴⁰, liver transplanted recipients analysed for microchimerism detection, allowed the confirmation of higher rate of microchimerism positive recipients, larger amount of detected cells and also higher prolongation within time.

The unsolved question about whether microchimerism leads to tolerance or tolerance allows the presence of the foreign cells could not be solved in this study, but several authors argue in favour of microchimerism as an inductor specific T cell hypo-reactivity^{31,32,36,41,42}.

In our basic study we planned to experimentally detected fluctuations in cell composition within peripheral blood of solid organ transplanted recipients. This basic approach represents a preliminary study which is a direct consequence of a recently published analysis concerning microchimerism and rejection³⁴.

It is well known that some kidney transplanted recipients can spontaneously develop tolerance (also called SPOT) following immunosuppression withdrawal⁴³. These recipients display Treg cell amounts similar to non-SPOT recipients and non-transplanted voluntaries, and also similar suppressive activity in vitro. Furthermore, we have founded similar Treg amounts in microchimerism positive and negative groups even if microchimerism positive recipients have significantly lower rates of rejection incidence.

Although, this preliminary study did not reveal any significative differences concerning microchimerism status, we could observe significative variations in T CD8+ cells and in B cell subsets when only taking into account a previous rejection episode, confirming the existence of a possible memory system in recipients with a previous rejection episode.

As many authors have proposed^{44,45}, we think that donor thymic cell migration could explain why microchimerism leads to an allogeneic hypo-response thus involving fewer rejection episodes. This fact can also explain the absence of fluctuations in cell composition within peripheral blood. Even though there are several clues towards hypo-response directed by anergy-inducing cells as we found less CD28 expression in CD4⁺ cell population. These data only suggest a direction that must be confirmed with more extensive cohorts of transplanted recipients.

Bibliography

1. Golshayan D, Buhler L, Lechler RI, Pascual M. From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. *Transpl Int* 2007;**20**(1):12-24.
2. Rothstein DM, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev* 2003;**196**:85-108.
3. Delis S, Ciancio G, Burke GW, 3rd, Garcia-Morales R, Miller J. Donor bone marrow transplantation: chimerism and tolerance. *Transpl Immunol* 2004;**13**(2):105-15.
4. Claas F. Chimerism as a tool to induce clinical transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004;**16**(5):578-83.
5. Wood K, Sachs DH. Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect. *Immunol Today* 1996;**17**(12):584-7; discussion 588.
6. Salgar SK, Shapiro R, Dodson F, et al. Infusion of donor leukocytes to induce tolerance in organ allograft recipients. *J Leukoc Biol* 1999;**66**(2):310-4.
7. Ko S, Deiwick A, Dinkel A, Wonigeit K, Schlitt HJ. Functional relevance of donor-derived hematopoietic microchimerism only for induction but not for maintenance of allograft acceptance. *Transplant Proc* 1999;**31**(1-2):920-1.
8. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992;**339**(8809):1579-82.
9. Billingham RE, Reynolds J. Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. *Br J Plast Surg* 1952;**5**(1):25-36.
10. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Acquired tolerance of skin homografts. *Ann N Y Acad Sci* 1955;**59**(3):409-16.
11. Devlin J, Doherty D, Thomson L, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology* 1998;**27**(4):926-33.
12. Hisanaga M, Hundrieser J, Boker K, et al. Development, stability, and clinical correlations of allogeneic microchimerism after solid organ transplantation. *Transplantation* 1996;**61**(1):40-5.
13. Demetris AJ, Murase N, Fujisaki S, Fung JJ, Rao AS, Starzl TE. Hematolymphoid cell trafficking, microchimerism, and GVH reactions after liver, bone marrow, and heart transplantation. *Transplant Proc* 1993;**25**(6):3337-44.
14. Nemlander A, Soots A, von Willebrand E, Husberg B, Hayry P. Redistribution of renal allograft-responding leukocytes during rejection. II. Kinetics and specificity. *J Exp Med* 1982;**156**(4):1087-100.
15. Qin S, Cobbold SP, Pope H, et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993;**259**(5097):974-7.
16. Steiner D, Brunicki N, Blazar BR, Bachar-Lustig E, Reisner Y. Tolerance induction by third-party "off-the-shelf" CD4+CD25+ Treg cells. *Exp Hematol* 2006;**34**(1):66-71.
17. Kurtz J, Wekerle T, Sykes M. Tolerance in mixed chimerism - a role for regulatory cells? *Trends Immunol* 2004;**25**(10):518-23.
18. Field EH, Gao Q. CD4 regulatory cells in immune tolerance. *J Lab Clin Med* 1998;**132**(2):91-6.
19. Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L. Role and mechanisms of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2007;**17**(2):120-9.
20. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998;**338**(25):1813-21.
21. Barratt-Boyes SM, Thomson AW. Dendritic cells: tools and targets for transplant tolerance. *Am J Transplant* 2005;**5**(12):2807-13.
22. Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 2004;**4**(1):24-34.
23. Bertolino P, McCaughan GW, Bowen DG. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol* 2002;**80**(1):84-92.
24. De Creus A, Abe M, Lau AH, Hackstein H, Raimondi G, Thomson AW. Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol* 2005;**174**(4):2037-45.
25. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002;**80**(5):477-83.
26. Ito T, Ueno T, Clarkson MR, et al. Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 2005;**174**(11):6648-56.
27. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;**381**(6581):434-8.

28. Lakkis FG, Konieczny BT, Saleem S, et al. Blocking the CD28-B7 T cell costimulation pathway induces long term cardiac allograft acceptance in the absence of IL-4. *J Immunol* 1997;**158**(5):2443-8.
29. Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* 1999;**60**(7):562-7.
30. Burlingham WJ, Grailer AP, Fechner JH, Jr., et al. Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* 1995;**59**(8):1147-55.
31. Bonilla WV, Geuking MB, Aichele P, Ludewig B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Microchimerism maintains deletion of the donor cell-specific CD8+ T cell repertoire. *J Clin Invest* 2006;**116**(1):156-62.
32. Thomson AW, Lu L, Murase N, Demetris AJ, Rao AS, Starzl TE. Microchimerism, dendritic cell progenitors and transplantation tolerance. *Stem Cells* 1995;**13**(6):622-39.
33. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;**346**(1):5-15.
34. Pujal JM, Grinyo JM, Gil-Vernet S, et al. Early Hematopoietic Microchimerism Predicts Clinical Outcome After Kidney Transplantation. *Transplantation* 2007;**84**(9):1103-1111.
35. Millan MT, Shizuru JA, Hoffmann P, et al. Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation* 2002;**73**(9):1386-91.
36. Kiyomoto T, Toyokawa H, Nakao A, et al. The difficulty of eliminating donor leukocyte microchimerism in rat recipients bearing established organ allografts. *Transplantation* 2006;**81**(3):438-44.
37. Shirwan H, Wu GD, Barwari L, Liu A, Cramer DV. Induction of allograft nonresponsiveness after intrathymic inoculation with donor class I allopeptides. II. Evidence for persistent chronic rejection despite high levels of donor microchimerism. *Transplantation* 1997;**64**(12):1671-6.
38. Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, John B, Sampson B, Wuensch S. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev* 2006;**213**:101-18.
39. Wick MJ, Leithauser F, Reimann J. The hepatic immune system. *Crit Rev Immunol* 2002;**22**(1):47-103.
40. Calne RY. Immunological tolerance--the liver effect. *Immunol Rev* 2000;**174**:280-2.
41. Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E, et al. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J Exp Med* 2004;**199**(7):1017-23.
42. Adams DH, Hutchinson IV. Microchimerism and graft tolerance: cause or effect? *Lancet* 1997;**349**(9062):1336-7.
43. Ashton-Chess J, Giral M, Brouard S, Souillou JP. Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation* 2007;**84**(10):1215-9.
44. Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH, von Andrian UH. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 2006;**7**(10):1092-100.
45. Duncan SR, Capetanakis NG, Lawson BR, Theofilopoulos AN. Thymic dendritic cells traffic to thymic of allogeneic recipients and prolong graft survival. *J Clin Invest* 2002;**109**(6):755-64.

Table 1: Comparative demographic data of transplanted recipients.

Transplanted Group	N	Recipient Age	Donor Age	Recipient Sex frequency	HLA-A mismatch (0/1/2)	HLA-B Mismatch (0/1/2)	Microchimerism incidence after transplantation % (day of determination \pm sd)			BPAR	Rejection day (mean)	Exitus (n)	Tumor (n)
		<i>n</i>	<i>mean \pm s.d.</i>	<i>mean \pm s.d.</i>	<i>Female / Male</i>	<i>%</i>	<i>%</i>	<i>M2</i>	<i>M6</i>	<i>M12</i>	<i>%</i>	<i>Mean \pm s.d.</i>	<i>n</i>
CI Heart	27	55.9 \pm 7.7	35.0 \pm 11.9	25.9 / 74.1	0 28.6 71.4	6.3 56.3 37.5	51.9 % (57.5 \pm 25.9)	22.2 % (176.6 \pm 87.3)	14.8 % (331.4 \pm 160.2)	29.6 %	692.9 \pm 439.0	1	1
Prospective Liver	8	48.5 \pm 12.7	46.8 \pm 12.8	100 / 0	na	na	87.5 % (32.5 \pm 25.6)	--	--	0 %	--	0	0
Retrospective Liver	8	58.6 \pm 7.6	54.3 \pm 12.0	100 / 0	na	na	50.0 % (292.6 \pm 154.3)	--	--	n = 1	158	0	0

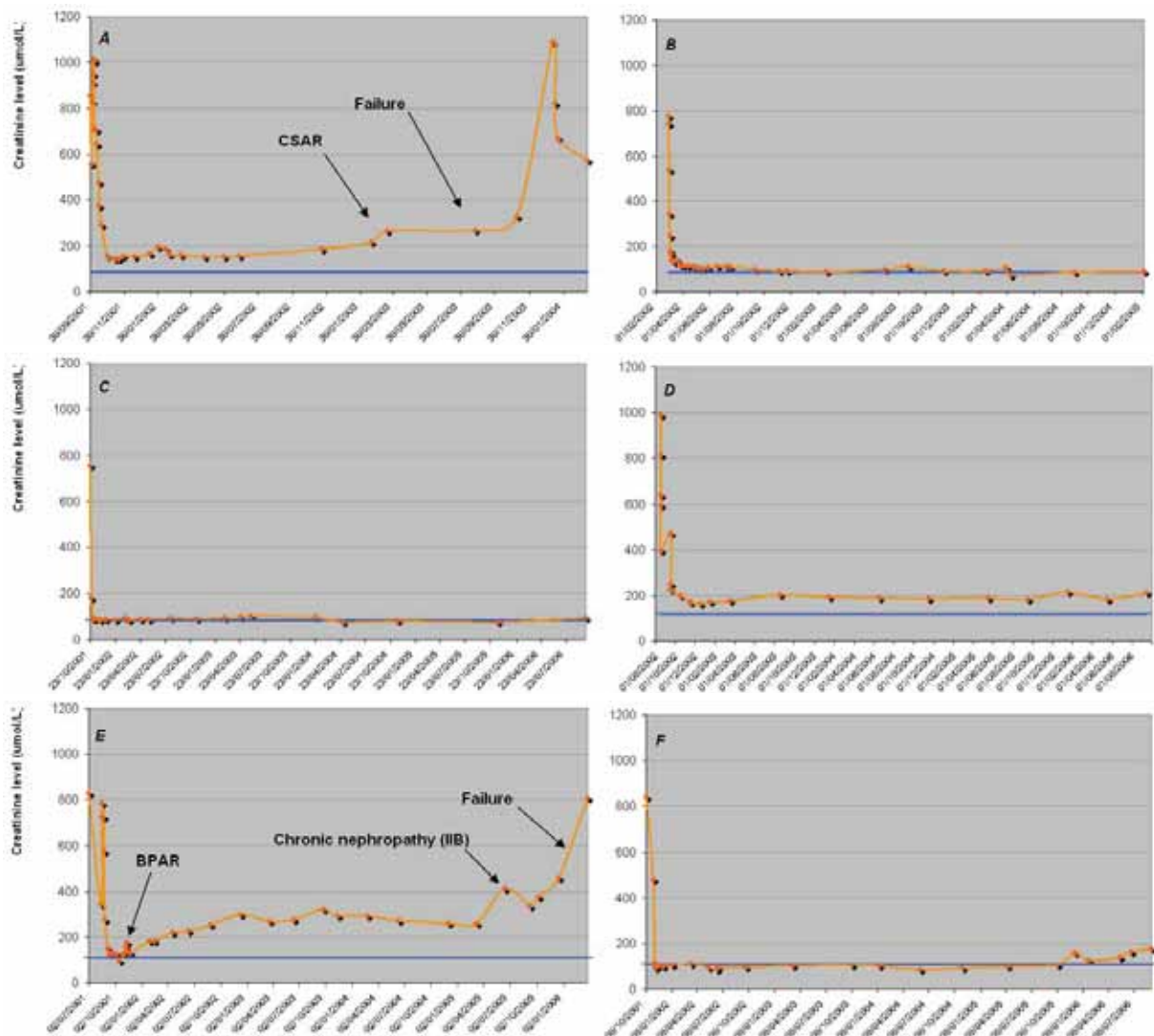
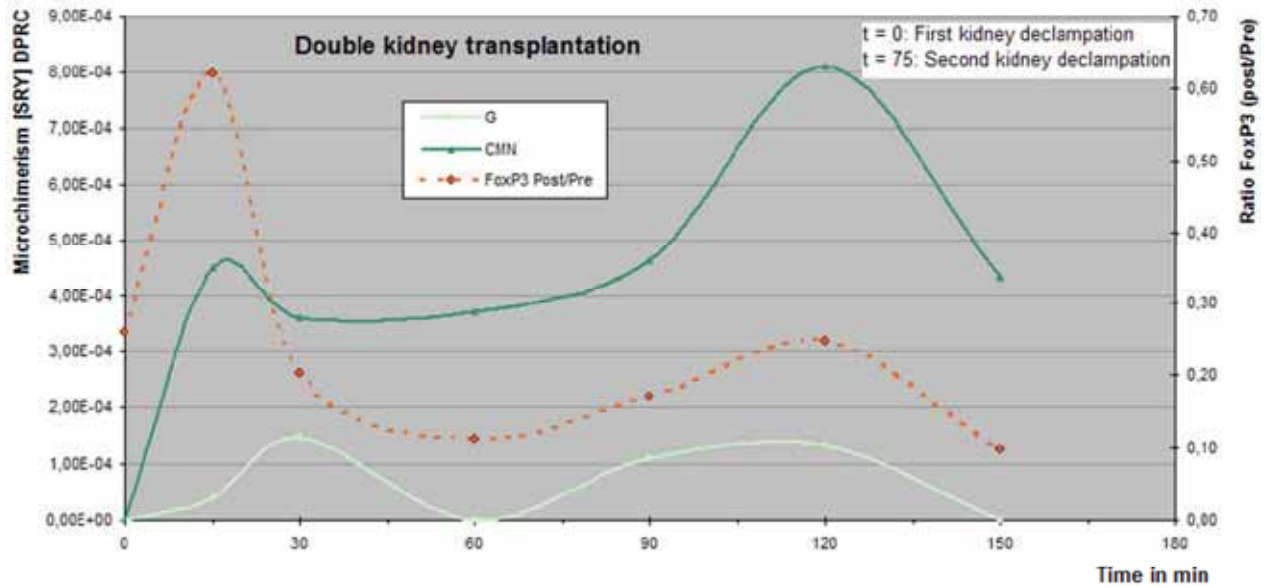


Figure 1: Graphical representation of creatinine levels in kidney transplanted recipients with or without rejection and/or M2-microchimerism.

Recipient A was microchimerism positive but underwent a clinically suspected acute rejection (CSAR) episode and a graft failure. Recipients B and D displayed M2 microchimerism and no biopsy-proven acute rejection (BPAR) episodes. Recipient C did not show microchimerism at M2 but showed donor cells at M6 and M12 and did not present BPAR. Recipient E did not show M2 microchimerism and underwent a BPAR episode, chronic nephropathy stage IIB and finally graft failure. Recipient F did not present microchimerism nor rejection. This graphical representation of creatinine-clearance evolution in some kidney transplanted recipients shows that microchimerism does not alter kidney function as visualised by creatinine levels.

2A



2B

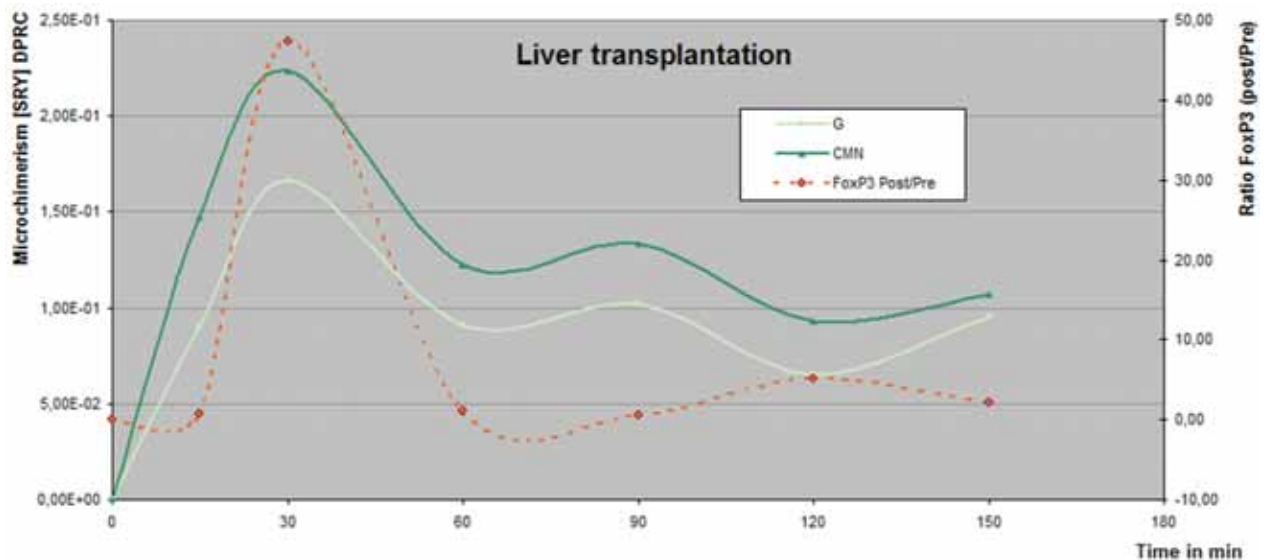


Figure 2 : Kinetic curves of donor cell migration in two transplanted recipients within 150 minutes after reestablishment of blood flow pressure in donor organ compared with FoxP3 expression, both in peripheral blood.

2A: Double kidney transplantation. Mononuclear cell (MNC) evolution (▲ triangles) showed clearly two separated peaks corresponding to the declampation of the two kidneys. Donor MNC amounts decrease to F1 levels at 7-14 days analysis (not shown). Donor granulocytes (G) (■ squares) showed similar pattern but diminished faster and became undetectable at 60 minutes after both organ declampation.

2B: Liver transplantation gave larger amounts of cells (rounding 1-e01) than kidney, donor cells could be detected at higher levels even after 150 minutes, descending progressively to F1 levels at 7-14 days analysis (not shown). Donor MNC (▲) and G (■) progression were similar during the first 150 minutes following declampation, although 7-14 day analysis still revealed detectable MNC and also G donor cells at similar levels. Donor G amounts decreased faster at 1 to 3 log lower than MNC levels within 14 to 60 days after transplantation, and became progressively undetectable (not shown).

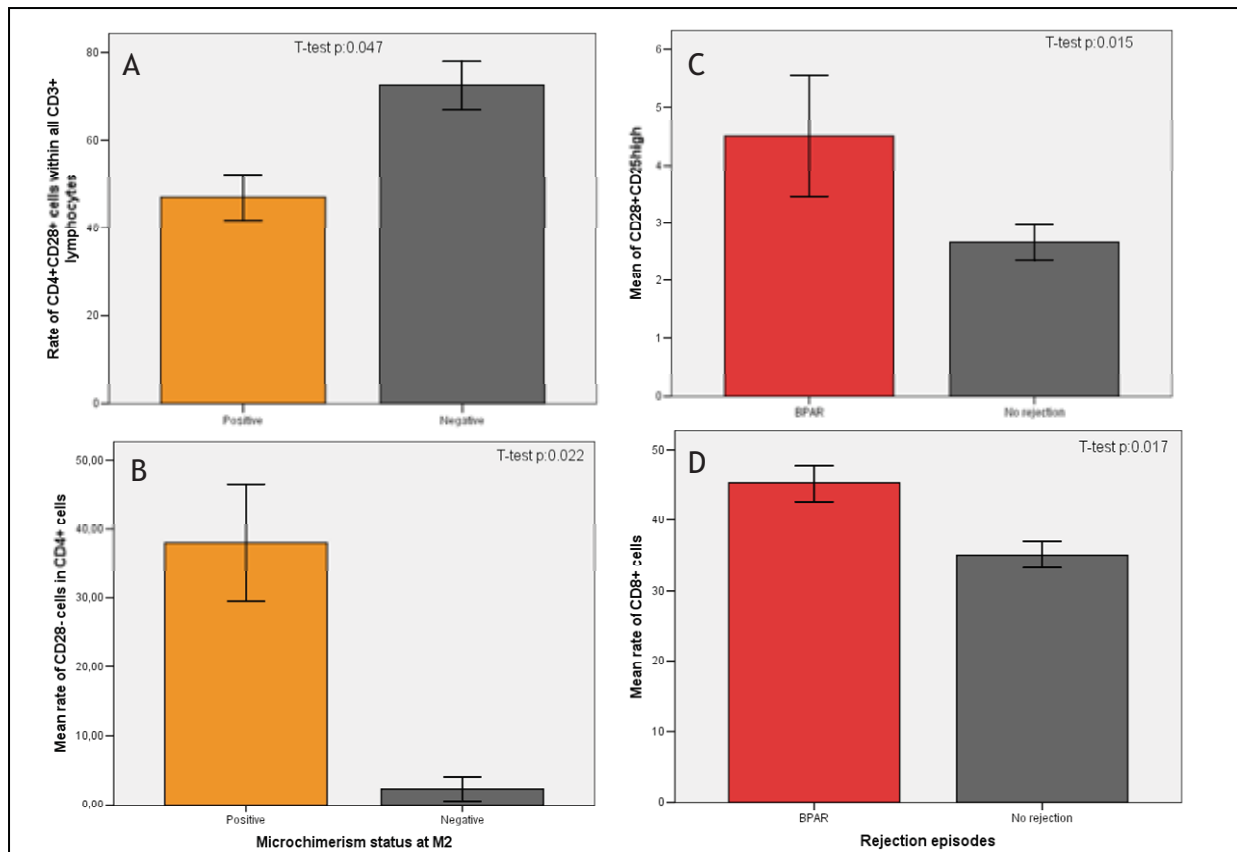


Figure 3: Cell subsets analysis by flow cytometry: concerning microchimerism after heart (A,B) or rejection after kidney (C,D) transplantation.

- A) The analysis of the CD4+CD28+ cell fraction showed a difference between microchimerism-positive recipients which exhibit lower levels (47%) and no microchimerism patients, which were similar to controls (72.5% and 75% respectively, controls not shown here) (p:0.047), but all showed similar rates of CD4+ T cells (not shown).
- B) Analysis of CD28- cells in the CD4+ fraction showed significant differences between microchimerism positive (38.0%) and negative (2.3%) groups (p:0.022)
- C) Number of CD4+CD25^{high} cells in kidney transplantation were higher in rejection positive (4.5%) recipients than in no-rejection recipients (2.7%) after kidney transplantation (p:0.015).
- D) Also, concerning rejection, analysis of kidney transplanted recipients displayed significant differences in the T CD8+ cell fraction with higher amount in BPAR positive recipients (45.3%) than in no rejection recipients (33.7%) (p:0.017).

DISCUSSION

COMPENDI DELS RESULTATS OBTINGUTS

I JUXTAPOSICIÓ AMB LA LITERATURA

Existeix el microquimerisme ?

Per a respondre a la qüestió plantejada, varem resoldre en investigar abans els fonaments de la detecció, es a dir, l'aspecte tècnic. Així, un cop establertes les bases de la determinació de la presència de les cèl·lules del donant, podríem investigar llur presència en l'organisme hoste.

Tècniques de detecció

La detecció del microquimerisme es basa principalment en la detecció de polimorfismes entre individus que, inicialment, van començar a ser utilitzats en medicina forense per a la identificació cadavèrica o de paternitat. Entenem per microquimerisme la presència de quantitats ultra minoritàries de cèl·lules estrangeres a l'organisme hoste circulants en la sang d'aquest individu. Conseqüentment, la primera qüestió que havíem de resoldre en aquest estudi era determinar quins mètodes ens permetrien identificar la presència d'aquestes cèl·lules forasteres en l'organisme de l'individu trasplantat.

Varem seguir quatre línies principals que varem emprar en totes les tècniques de detecció molecular basades en PCR. En primer lloc havíem de realitzar un cribatge inter-individual per a poder visualitzar els polimorfismes de cada individu i identificar els que no eren compartits; és el que vam anomenar **discriminació** del donant. Aquest punt el varem resoldre mitjançant l'estudi de bases de dades que contenien els satèl·lits que varem fer servir. Varem triar els micro-satèl·lits que més variabilitat presentaven en el numero de repeticions en tàndem de la seva seqüència. També ens varem basar en les diferències evidents que podien existir entre al·lels no compartits del complex major d'histocompatibilitat o HLA. Una altra diferència entre donant i receptor que varem

explotar era la disparitat de gènere existent entre els dos actors i específicament, volíem detectar un gen (SRY) contingut només en el cromosoma Y de l'home, i per tant, detectar aquest gen normalment absent en receptors de sexe femení.

En segon lloc, havíem de poder detectar específicament aquesta diferència, tenint en compte que estava inclosa en l'entorn del receptor; es el que varem designar com **especificitat**. Arribats a aquest punt, varem simular trasplantaments i quimeres artificials barrejant diverses fonts de material genètic procedent d'individus control sans i no trasplantats.

Així, per a l'estudi de satèl·lits, varem analitzar en primer lloc i per separat les dues fonts genètiques que simularien donant i receptor. Un cop identificat el patró de mobilitat corresponent al donant, es va efectuar el mateix anàlisi en quimera mixta per a identificar cadascun dels implicats. Referent a l'HLA, després d'efectuar el tipatge de cada individu, l'objectiu va ser amplificar específicament l'al·lel no compartit corresponent al donant. En els trasplantaments on el donant era de sexe masculí i el receptor era de sexe femení, l'objectiu era amplificar DNA masculí en un entorn de DNA femení.

Un cop ja podíem efectuar la detecció del donant sense falsos positius, el que sorgia a continuació era determinar fins a quin punt es podia observar la presència del donant en un entorn dominat per material del receptor, es a dir, determinar el llindar mínim de detecció del material genètic del donant o definir la **sensibilitat** de cada tècnica. Així, i seguint el mateix procediment descrit anteriorment, es van crear quimeres mixtes amb diferents concentracions de material del donant, simulant els graus de quimerisme, partint del macroquimerisme fins a arribar al microquimerisme. Es van fixar tots els llindars mínims de detecció per a cada tècnica, obtenint més sensibilitat en les tècniques de detecció per PCR quantitativa a temps real (QPCR-SRY i QPCR-SSP-HLA-DRB1) i menys sensibilitat per a les tècniques clàssiques (STR i VNTR i PCR-SSP-HLA-DRB1) amb detecció en gels d'agarosa i d'acrilamida.

La quarta línia que varem seguir, va sorgir directament de la tercera, és a dir de la recerca de la sensibilitat per a cada tècnica. Varem constatar que a dilucions extremes del DNA del donant, la detecció no seguia un patró constant sinó que seguia un model

estadístic. Dit d'una altra forma, a dilucions extremes d'aquest DNA, no totes les PCR sortien positives. Seguint un model estadístic de distribució binomial, varem poder establir (per a cada tècnica de PCR emprada), el nombre de repeticions de la mateixa mostra que havíem de realitzar per a assegurar la detecció mínima i específica del material genètic del donant, en el màxim nombre de casos possible. Així, en aquest punt, varem determinar la fiabilitat de cada tècnica, el que varem anomenar **reproductibilitat**. Com a exemple descrit en els resultats, i fent referència a la tècnica de detecció de SRY per PCR quantitativa a temps real, varem establir que podíem detectar en més d'un 96% dels casos, fins a 1 cèl·lula del donant en 10^5 cèl·lules del receptor, però per això havíem de realitzar 5 rèpliques (5 PCR) de la mateixa mostra. Tanmateix, augmentant la sensibilitat, reduïem la fiabilitat de detecció. Així varem poder detectar fins a 1 cèl·lula del donant en 10^6 cèl·lules del receptor efectuant 5 rèpliques del mateix individu. No obstant, en aquest cas, el test només ens assegurava una fiabilitat de detecció en poc més del 86% dels casos.

Els mètodes de detecció optimitzats per a la identificació específica del microquimerisme eren una part crítica per al desenvolupament de l'estudi, ja que serien el fonament de la resta del treball. El que també preteníem era estandarditzar un ventall de tècniques moleculars reproduïbles per a que altres estudis puguin partir de les mateixes bases i així poder comparar els resultats que en sorgeixin. Cal destacar que existeixen nombrosos articles publicats anteriorment i que descriuen mètodes per a la detecció del quimerisme (*Scharf et al. 1995; Frankel et al. 1996; Spriewald et al. 1998; Reed et al. 2001; Alizadeh et al. 2002; Garavito et al. 2002; Hochberg et al. 2003; Maas et al. 2003; Lambert et al. 2004; Buno et al. 2005; Bai et al. 2006; Kristt et al. 2007; Pezzoli et al. 2007*). Però, la majoria d'aquests articles es basen en la detecció del macroquimerisme que apareix després d'un trasplantament de moll de l'os. Per tant, i d'acord amb articles publicats anteriorment (*Spriewald et al. 1998; Reed et al. 2001*), la detecció del microquimerisme és essencialment una qüestió de tècnica.

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 a expressar-ho de forma més grollera, ja teníem més eines per a 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 pròpies tècniques, i entre altres, a les dilucions i al nombre de rèpliques necessàries a la seva identificació. Conseqüentment, es 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 (*Zhong et al. 2006; Piper et al. 2007*), o inclús 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 llur 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.

Detecció del microquimerisme en trasplantaments d'òrgans sòlids

El plantejament experimental es va definir per a permetre una determinació de la presència de microquimerisme en els individus trasplantats i la seva posterior correlació amb la incidència d'establiment del rebuig agut.

Amb aquest objectiu, la primera monitorització del microquimerisme es va realitzar en una data compresa entre el primer i el segon mes post-trasplantament per a permetre, així, la coincidència amb les proves rutinàries del pacient trasplantat.

Tanmateix, preteníem determinar en el primer anàlisi, la presència de cèl·lules del donant prèvia a l'establiment d'un possible episodi de rebuig. Efectivament, en el nostre estudi, el dia mig del rebuig agut ens va situar als 6 mesos post-trasplantament (199 dies \pm 68), tot i que alguns pacients van patir un episodi de rebuig anterior als dos mesos.

El que ens plantejàvem a continuació era la visualització de l'evolució a llarg termini del microquimerisme, per això els intervals d'extracció de sang varen ser 2, 6, 12 i 18

mesos, tenint en compte que més enllà de 18 mesos, pocs autors havien trobat microquimerisme (*Shirwan et al. 1997; Ko et al. 1999; Sahota et al. 2000*).

Inicialment, la separació dels subtipus cel·lulars en cèl·lules mononucleades (CMN) i granulòcits (G) per gradients de densitat va permetre augmentar considerablement la sensibilitat, en comparació a la detecció directa en sang perifèrica. Varem confirmar que les cèl·lules detectades es trobaven en tots els casos en la fracció CMN i en pocs casos en la fracció G. Un estudi de citometria de flux (no mostrat en els resultats) va permetre determinar que existia una contaminació evident de CMN en la fracció G, el que va evocar que possiblement els casos en els que detectàvem microquimerisme en G serien deguts a contaminació per CMN. Aquesta teoria també es recolza en la vida mitja de cada fracció cel·lular. Tenint en compte que generalment és més llarga en la fracció CMN que en la fracció de G (*Galbraith et al. 1965*), i donat que el primer anàlisi es va efectuar al voltant del segon mes post-trasplantament, podríem dir que, quan parlem de microquimerisme, parlem bàsicament de CMN i principalment, de la sèrie limfoide, tot i que no es podria descartar algun rastre d'origen mieloide.

La detecció de microquimerisme en més de la meitat dels trasplantaments de ronyó i de cor als dos mesos post-trasplantament, va permetre en primer lloc validar les tècniques en el context clínic. Tanmateix, podíem 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 i com s'havia publicat prèviament (*Calne and Davies 1994; Domiati-Saad et al. 2005; Benseler et al. 2007*), 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 es conegut que, entre altres factors, el renovament cel·lular del fetge podria contribuir a magnificar aquesta diferència (*Starzl and Lakkis 2006; Benseler et al. 2007*).

Varem 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, varem mostrar que el microquimerisme no existia moments previs al trasplantament i que, posteriorment al desclampatge de l'òrgan, aquest apareixia i evolucionava durant les 3 primeres hores. Evolució que mantenia els nivells constants entre el setè dia i el segon mes post-trasplantament. Essent el segon mes, el punt a partir del que comença 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 posta 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*, essent també més elevat en trasplantaments de fetge que en cor o ronyó.

Influència del microquimerisme en el rebuig

En un context experimental i clínic, existeix abundant literatura que correlaciona el quimerisme amb l'acceptació de l'empelt i amb una hiporesposta cel·lular T (*Anderson et al. 1951; Lubaroff and Silvers 1973; Starzl et al. 1992; Starzl et al. 1993; Bunce et al. 1995; Wood and Sachs 1996; Ehl et al. 1998; Buhler et al. 2002; Millan et al. 2002; Monaco 2002; Claas 2004; Cosimi and Sachs 2004; Monaco 2004*).

Podem veure una progressió en les descripcions d'alguns autors, que descriuen la presència de microquimerisme en l'acceptació de trasplantaments de pell en models murins (*Anderson et al. 1951; Lubaroff and Silvers 1973; Ehl et al. 1998; Ko et al. 1999*) i en un context més clínic, l'acceptació de l'empelt en un trasplantament de ronyó o de fetge fins i tot després d'haver retirat la immunosupressió (*Starzl et al. 1992; Wood and Sachs 1996; Buhler et al. 2002; Millan et al. 2002; Cosimi and Sachs 2004*).

Segons explica Monaco (*Monaco 2002*), Anderson i Matzinger van definir el microquimerisme com “una espasa de doble tall” (*double-edged sword*) depenent del grau de maduresa immunològica de l’hoste i de les disparitats implicades, així:

- en receptors immunològicament madurs, el microquimerisme provocaria immunitat i rebuig.
- en receptors immunològicament immadurs, el microquimerisme provocaria tolerància a les cèl·lules del donant i als antígens expressats per aquestes cèl·lules. No obstant aquesta tolerància no es donaria en el cas dels antígens específics expressats directament per l’òrgan però no per les CPA.

El resultat obtingut en el nostre estudi suggerien una disminució de la incidència de rebuig en presència d’aquestes cèl·lules del donant. Tenint en compte que ens trobàvem en presència d’individus considerats immunològicament madurs, ens estaríem confrontant a aquesta darrera definició.

Efectivament, en trasplantaments de ronyó, es va correlacionar directament la presència de microquimerisme amb una disminució de la incidència de rebuig. Tanmateix, els trasplantaments de cor varen evocar una tendència similar, però, segurament degut al baix nombre de casos ($n=27$), el resultat no era significatiu estadísticament parlant. Degut a la gran quantitat de pacients amb presència de microquimerisme en trasplantaments de fetge i la presència d’un únic individu amb un episodi de rebuig, la correlació era òbvia si només es tenia en compte el factor microquimerisme.

Evidentment, l’anàlisi més exhaustiu va ser dut a terme en els pacients trasplantats de ronyó ja que disposàvem d’un més alt nombre de casos a analitzar.

Sorprenentment, i tenint només en compte la immunosupressió basada en inhibidors de la calcineurina, varem constatar que dels pacients amb microquimerisme, cap va presentar ni un sol episodi de RAPB durant la durada de l’estudi, es a dir 4 anys. Així, l’anàlisi amb tots els tipus d’immunosupressió analitzats conjuntament va aportar resultats en la mateixa línia, però en aquest cas, varem veure aparèixer dos casos de rebuig en pacients amb microquimerisme.

Els resultats obtinguts varen suggerir que el microquimerisme era un factor clarament involucrat en l'absència de rebuig en un anàlisi univariant, juntament amb la quantitat d'al·lels 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, essent dos fenòmens distints i independents i la presència d'un no comprometia la presència de l'altre, en ambdós sentits.

Tanmateix, la presència de rebuig no estava relacionada amb cap altra de les variables estudiada, ja sigui presència d'al·lels HLA de classe I no compartits, grau de PRA, diferència de grup Rh, diferència en el sexe. Referent al tema edats de receptor i donant, varem observar que la edat del receptor no va influir en la aparició del rebuig, però en canvi, la edat del donant influïa en l'aparició del RAPB. Aquesta darrera dada serà discutida en el sub-capítol següent en el que també discutim les possibles causes del microquimerisme.

Pensem que cal destacar el fet que els pacients amb detecció positiva de microquimerisme en el primer seguiment (al segon mes post-trasplantament) no varen presentar cap tipus de rebuig al llarg dels 4 anys del seguiment clínic. Per tant, la presència de microquimerisme esdevenia un **factor pronòstic** per a l'establiment del rebuig a mig termini, avalats també per l'alt factor de protecció que significava la presència de microquimerisme envers l'aparició del RAPB en un test multivariant.

Tanmateix, respecte a l'evolució del microquimerisme, i després de tenir en compte la progressió cap a la seva exhaustió, varem constatar que el manteniment o la persistència d'aquest no varen alterar la incidència de RAPB. Així, posem de manifest que la presència de microquimerisme, sobretot en els inicis del període post-trasplantament, seria un factor important per a l'establiment d'aquest estat "tolerogènic"

Què causa la presència del microquimerisme?

Referent a l'origen del microquimerisme, no hem pogut establir perquè en alguns pacients detectem cèl·lules del donant i en d'altres no. La única diferència que hem destacat en el nostre estudi, és que proporcionalment, un percentatge més elevat de pacients que van rebre un òrgan procedent d'un donant de més de 50 anys, presentaven microquimerisme. Expressat diferentment, una proporció anormalment baixa de pacients que rebien un òrgan de més de 50 anys no presentava microquimerisme. Podria ser que la matriu extracel·lular del grup de pacients amb edats superiors als 50 anys contingui algunes diferències significatives en la composició de l'estructura de la matriu pròpiament dita, degudes a la senescència d'aquesta (*Labat-Robert 2004*). Fet que podria repercutir en la lligació de les cèl·lules a la base, i que per tant, puguin alliberar-se amb més facilitat. Tanmateix podríem dir que aquesta "laxitud" matricial podria permetre amb més facilitat la infiltració de les cèl·lules en els teixits (sense haver de requerir més altes concentracions en factors d'activació per a la infiltració tissular) abans de l'extracció (mort cerebral) i alhora facilitar el seu posterior alliberament, el que suposaria una més alta probabilitat d'alliberament de cèl·lules. Alhora hem observat que els pacients amb un òrgan trasplantat de menys de 50 anys presentaven una incidència més elevada de rebuig. Una explicació que s'afegiria a l'anterior, podria ser una presentació antigènica en la membrana més eficient en cèl·lules "més joves", el que repercutiria en una més elevada representació de l'antigen i conseqüentment una més alta probabilitat de rebuig.

Creiem també que els esdeveniments pre-trasplantament poden ser factors involucrats en la posterior presència de microquimerisme, ja sigui, entre altres, el temps de mort cerebral, la intensitat de la SIR o la preservació de l'òrgan. Tanmateix la recirculació de la sang en l'òrgan, en el moment del desclampatge, permet la recirculació de cèl·lules del donant al corrent sanguini, el que pot suposar que algunes cèl·lules no estiguin infiltrades en l'òrgan i que estiguin simplement capturades en els vasos.

Tot i haver formulat algunes hipòtesis que no poden ser verificades per aquest estudi, no hem trobat cap altra explicació satisfactòria per a aquests esdeveniments. Per tant, el nostre estudi no ha permès respondre a la pregunta de que causa la presència de microquimerisme i no podem dir perquè alguns pacients en tenen i d'altres no.

Altres conseqüències del microquimerisme.

Alguns autors han demostrat que el microquimerisme existeix després d'un trasplantament experimental de cor i que aquest pot arribar fins a nivells de macroquimerisme (*Bayes-Genis et al. 2007*), es a dir entre el 0.04% i el 10%.

Aquest darrer demostra la presència de cèl·lules del fetus (microquimerisme fetal) en el cor, i anant més enllà, afirma que aquestes cèl·lules del fetus poden diferenciar-se en cèl·lules del miocardi i colonitzar el cor de l'hoste, i en aquest cas, de la mare.

En el que seria el **microquimerisme invers**, alguns autors (*Quaini et al. 2002*) han demostrat que els òrgans trasplantats poden ser "reparats" per cèl·lules provinents de l'hoste i amb facultats pluripotents de diferenciació. Així han demostrat la presència de miòcits del receptor (mascle) en un cor trasplantat d'origen femení. Nogensmenys, afirmen que aquestes cèl·lules podrien formar nous capil·lars i arterioles, el que corroboraria les afirmacions d'altres autors que han descrit repoblament de l'endoteli per cèl·lules amb característiques del receptor (*Lagaaij et al. 2001*), el que podria perllongar en alguns casos la vida de l'òrgan trasplantat repoblant les zones malmeses.

Rebuig crònic i fracàs.

Una de les qüestions en suspens que volíem provar de resoldre era determinar quines altres alteracions podia induir la presència de microquimerisme.

Degut al fet que el rebuig agut i el rebuig crònic són dues conseqüències fisiològiques amb mecanismes, causes i *tempos* diferents, la hipòtesi de la presència de microquimerisme com a inhibidora del mecanisme de rebuig agut, no podria validar-se en el context de rebuig crònic.

En trasplantaments de ronyó, la presència de microquimerisme ha estat relacionada amb la disminució de la incidència de RAPB, però no es va relacionar amb nefropatia crònica ni amb fracàs renal.

S'ha descrit que la nefropatia crònica (NEC) de l'empelt és un fenomen multi-causal (*Nankivell et al. 2003; Nankivell et al. 2004*) que pot ser la conseqüència de danys deguts a isquèmia, immunosupressió crònica, episodis anteriors de rebuig subclínic o de

rebuig agut sever. La presència d'episodis subclínic de rebuig crònic mantingut al llarg del temps poden també participar en la seva aparició. Tenint en compte que no només factors d'origen immunològic poden estar involucrats en aquesta patologia i si pensem que el microquimerisme té una relació directa amb el RAPB d'origen exclusivament immunològic, seria lògic pensar que la correlació amb el microquimerisme podria veure's diluïda per moltes altres variables que no s'han tingut en compte. Efectivament, el nostre estudi ha revelat absència de correlació del microquimerisme amb la NCE de l'empelt. Tanmateix varem observar que el microquimerisme continuava presentant una correlació amb la disminució de la incidència de RAPB fins i tot amb presència o absència d'episodis més tardans de NEC. L'estudi multivariant va confirmar els resultats de Nankivell (*Nankivell et al. 2003*) i varem trobar que episodis anteriors de RAPB o rebuig clínic promovien l'aparició de NEC.

Òbviament la recerca de la correlació amb el fracàs de l'empelt també es veia compromesa degut a l'elevat nombre de factors que hi poden influir. El fracàs de l'empelt no és més que la conseqüència final de múltiples agressions que finalment han acabat per dificultar i impossibilitar de forma irreversible la funció de l'òrgan. Tal i com es podia esperar, el nostre estudi no va demostrar cap mena de lligam significativament estadístic entre la presència de les cèl·lules del donant i el fracàs de l'òrgan, ja sigui en trasplantament renal o fins i tot en trasplantament cardíac. Addicionalment, varem observar que episodis anteriors de RAPB o NCE augmentaven considerablement el risc de patir un fracàs.

L'estudi del nombre d'infeccions post-trasplantament en el receptor no va permetre definir cap tipus de diferència entre els pacients amb microquimerisme o sense. Fet que permetia recolzar la teoria d'una tolerància envers el donant. Tolerància que per definició és específica per als antígens del donant però insensible a altres tipus d'infeccions que pugui patir el receptor, deixant clar que aquest té les mateixes probabilitats de patir una infecció que un receptor sense tolerància vers el donant.

Restava ara a definir si l'òrgan trasplantat patia algun tipus d'alteració funcional en presència de microquimerisme. En trasplantaments de ronyó, els receptors amb microquimerisme no presentaven alteracions en els valors de creatinina sèrica i aquests

només mostraren diferències en el cas de patir un RAPB, NCE de l'empelt, algun tipus de rebuig clínic (no RAPB) o fracàs. En trasplantaments de fetge, no varem observar cap alteració en els valors de transaminases ni γ -GT, deduint que el microquimerisme no alterava la funcionalitat del fetge. Tampoc varem observar diferències en l'aclariment de creatinina en aquests pacients amb els ronyons sans. Així ens varem permetre extrapolar i generalitzar que la presència de microquimerisme no provocava canvis funcionals en l'òrgan trasplantat i també es va descartar interaccions amb altres òrgans no trasplantats.

Amb aquestes verificacions funcionals varem poder descartar que la presència de microquimerisme suposés en algun sentit una "molèstia" per al benestar del pacient o si més no, un destorb per al correcte funcionament de l'òrgan trasplantat, el que podria suposar una reducció de la vida del nou òrgan.

Pacients amb acceptació espontània de l'òrgan

Existeixen casos publicats de pacients trasplantats de ronyó que presenten una tolerància espontània envers l'òrgan trasplantat després de la retirada de la immunosupressió, el que descriuen com SPOT (*SPontaneous Operational Tolerance*) (*Ashton-Chess et al. 2007*). Aquests casos són una minoria i cal destacar que han desenvolupat tolerància després d'haver estat sotmesos durant anys a un tractament immunosupressor. Fet que transformava aquest tipus de pacients en candidats d'elecció per a l'estudi *in vivo* de la tolerància. El que no es pot preveure, però, és quins grups de pacients poden presentar tolerància espontània; tot i que s'ha descrit que en alguns grups de pacients s'han detectat, per *microarrays*, una sèrie de gens que sobresurten i permetrien llur caracterització. No hem tingut, en el nostre estudi, cap cas que presentés aquest quadre clínic, cas en el que hagués estat de gran interès fer un estudi sobre el microquimerisme.

Tot i que no hem trobat una presència més elevada de cèl·lules T reguladores en els pacients amb microquimerisme en el nostre estudi, no podem descartar l'existència qualitativa de cèl·lules tolerogèniques específiques d'antígens del donant.

En aquest punt, coincidim amb alguns autors com ara Louis (*Louis et al. 2006*) que han descrit que pacients amb SPOT i sense immunosupressió no presentaven cap diferència significativa en el nombre de cèl·lules circulants T CD4⁺CD25^{hi} respecte als pacients amb immunosupressió i fins i tot respecte a voluntaris sans no trasplantats. Aquest fet suggereix que la tolerància podria no ser el resultat d'un nombre més elevat de cèl·lules Treg. Tanmateix alguns autors també descarten que la tolerància sigui deguda a un increment en la supressió d'aquestes cèl·lules Treg. Assajos sobre la capacitat supressiva d'aquestes cèl·lules mostren similar activitat entre pacients amb tolerància espontània, pacients amb immunosupressió i funció estable de l'empelt, i en pacients amb rebuig crònic (*Braudeau et al. 2007*).

La cerca de factors adquirits en el receptor que poguessin sostenir la disminució de la incidència de rebuig no va donar cap fruit si només teníem en compte la presència del microquimerisme. Aquests dos grups de pacients no varen mostrar cap diferència significativa en les proporcions dels diferents subtipus cel·lulars analitzats. No obstant, la presència d'un episodi de rebuig semblava deixar un rastre en el receptor, una memòria cel·lular. Es lògic pensar, però, que un estudi més aprofundit sobre la composició cel·lular i la migració de les cèl·lules del donant en l'hoste podria aportar més coneixements i definir amb més detall el que podria succeir *in vivo*.

La tolerància

La tolerància immunològica és un estat en el que el sistema immunològic no respon envers uns certs antígens específics. Tanmateix podem dir que la majoria dels individus presenten tolerància vers els seus propis antígens, tolerància d'origen central i/o perifèrica. Així qualsevol alteració en el sistema tolerogènic propi podria permetre la instauració d'autoimmunitat.

Perquè perseguim la tolerància? Molts autors ho qualifiquen com la recerca del Sant Grial. Aconseguir un estat de tolerància envers l'òrgan del donant en el pacient trasplantat permetria:

- abreujar o eradicar les repercussions de la cronicitat de la immunosupressió. Ja siguin les toxicitats relacionades amb els fàrmacs o l'elevat risc de patir infeccions o neoplàsies.
- evitar l'aparició de rebuig crònic, inexistent en un estat de tolerància complet i establert. Actualment, la immunosupressió no ha aconseguit frenar completament el rebuig crònic i per tant no ha canviat significativament els estats de pèrdua tardana de l'empelt en els darrers 25 anys (Sykes 2007).
- a més llarg termini, permetre el xenotrasplantament. El que reduiria de forma considerable les llistes d'espera. Però aquest darrer punt seria més difícil d'obtenir degut al fet que les barreres immunològiques inter-espècie són més immunogèniques que en els al·lotrasplantaments.

La tolerància més perseguida és la generada en les cèl·lules T. Però també cal tenir en compte que molts dels mecanismes de rebuig crònic poden estar mediat per les cèl·lules B. Aconseguir la tolerància T, però, aportaria també un cert grau de tolerància B degut, entre altres, a una falta d'estímul.

Tenint en compte que la selecció negativa en el timus està generada per CPA d'origen hematopoètic, es creu que el trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques seria l'acte que més ens aproparia a aquest estat de tolerància central. A més, si tenim en compte que actualment existeixen protocols de trasplantaments simultanis de moll de l'os que es duen a terme sense GvHD i en els que el condicionament no-mieloablatiu (d'intensitat reduïda) es relativament suau, l'estat de tolerància induït amb aquest sistema seria el més complet i per tant el rebuig tindria una incidència similar a la de l'autoimmunitat.

Tanmateix aquest sistema de selecció central induït perduraria en el temps ja que la producció continua de cèl·lules hematopoètiques cap al timus estaria assegurada. L'únic requisit seria, en aquest cas, assegurar l'empeltament d'una quantitat suficient de progenitors que garantis el continu *turn-over* de CPA al timus però que, al mateix temps, evités reaccions de l'empelt contra l'hoste.

Tal i com s'ha descrit anteriorment, si es verifica la hipòtesi que el microquimerisme és inductor d'un estat hipo-reactiu o tolerogènic, cal plantejar-se la inducció artificial de cèl·lules del donant i solventar la qüestió de com mantenir la seva permanència al llarg del temps (veure figura 26).

Un estudi recent (*Guo et al. 2008*) ha permès identificar un mètode per a garantir l'empelt ràpid de les cèl·lules del moll de l'os del donant en el receptor (estudi en ratolins). Aquest treball ha demostrat que la injecció de les cèl·lules del moll de l'os del donant directament a la cavitat del moll de l'os del receptor permet l'empelt de més cèl·lules del donant fins i tot en absència d'irradiació (o baixes dosis d'irradiació) de l'hoste. Simultàniament al receptor també se li va practicar un trasplantament de cor.

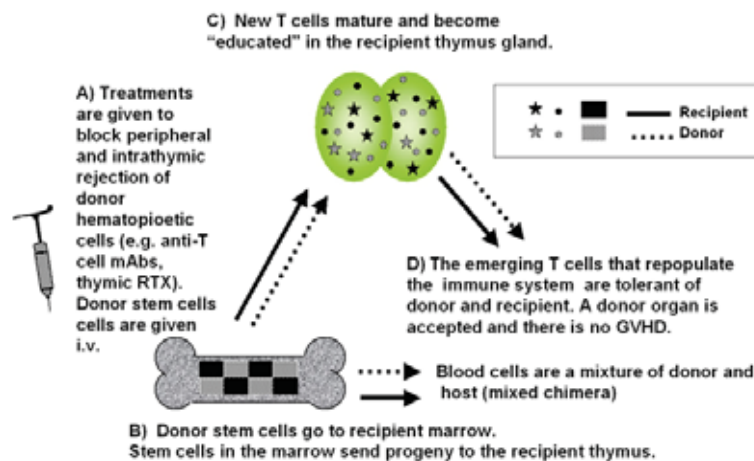


Figura 26: Esquema explicatiu dels mecanismes que succeeixen en un protocol tolerogènic d'infusions de moll de l'os del donant concomitant al trasplantament de l'òrgan segons Sykes (*Sykes 2007*).

Aquest estudi descriu el mètode que assegura un empelt ràpid de les cèl·lules del moll de l'os del donant (sense condicionaments mieloablatius més agressius i amb quantitats més baixes de cèl·lules) i que permet obtenir un grau de macroquimerisme més alt i perllongat en el temps. Tanmateix van mostrar que no hi havia presència d'episodis de rebuig, ni malaltia de l'empelt contra l'hoste, i sobretot, sense manteniment de la immunosupressió en el període post-trasplantament.

Microquimerisme indispensable per a assolir un estat tolerogènic inicial.

El que sembla estar clar, és que el microquimerisme té un paper en els inicis del període post-trasplantament. De fet, molts articles que descriuen el microquimerisme com a epifenomen del trasplantament es basen en la supervivència de l'empelt i la incidència de rebuig (barrejant crònic i agut) a llarg termini.

Així, alguns investigadors han demostrat que el quimerisme és essencial per a la inducció de tolerància ja que en llur experimentació, cap primat sense prèvia inducció temporal de macroquimerisme havia adquirit tolerància (*Kawai et al. 2000*).

Pensem que la presència de microquimerisme és important en els primers mesos post-trasplantament perquè:

- l'òrgan es fràgil i la seva funcionalitat es veu molt sovint compromesa per els nombrosos atacs, molts d'ells subclínic (i molts no visibles en histologia) del sistema immunològic
- per l'estrès infligit en l'extracció, la conservació i el trasplantament o la síndrome d'isquèmia-reperfusió. Una de les conseqüències és que es pot expressar més antígens mitjançant el sistema HLA, fet que provoca major vulnerabilitat als atacs per reconeixement antigènic. Tanmateix, les cèl·lules estressades poden alliberar més citoquines al medi i afavorir un entorn pro-inflamatori, el que pot atraure i dirigir amb més facilitat cèl·lules immunocompetents per quimiotactisme.
- la immunosupressió és més forta en els inicis del període post-trasplantament i pot ser un cofactor important per a la permissibilitat del SI o la neoformació de factors tolerogènics (creació de cèl·lules reguladores perifèriques o centrals, admissió de cèl·lules presentadores d'antígens en l'espai tímica, mecanismes perifèrics de deleció clonal o anèrgia, ...)
- també existeixen nombrosos processos inflamatoris en el receptor que podrien comprometre l'equilibri immunològic de l'empelt degut entre altres a l'acte quirúrgic del propi trasplantament (trauma quirúrgic).

Pensem que el microquimerisme pot ser responsable de la inducció d'una hiporesposta inicial contra els antígens del donant, però que l'òrgan podria també ser un presentador continu d'antígens. En altres casos, la desaparició natural del microquimerisme podria ser la causa del canvi en la balança tolerància-rebuig i així permetre la funció normalitzada del SI, és a dir el rebuig dels antígens estranys.

Si el microquimerisme també fos responsable de la formació de cèl·lules tolerogèniques (com ara les cèl·lules T reguladores), la desaparició progressiva del microquimerisme no causaria la desaparició concomitant d'aquestes cèl·lules reguladores (moltes d'elles de llarga vida per garantir l'efecte memòria), però aquestes també tindrien tendència a desaparèixer progressivament (degut al no manteniment de l'estímul) i per tant, deixar d'inhibir la resposta immunològica. Aquest fet podria explicar la presència de microquimerisme en un primer temps i la seva posterior desaparició. També podria explicar l'absència de rebuig durant un lapse de temps indeterminat i la possible aparició d'episodis de rebuig molt més tardans, alguns dels que es podrien confondre i/o superposar amb episodis de rebuig crònic.

Els mecanismes perifèrics com ara la inducció d'anèrgia, l'acció de les cèl·lules veto o la deleció perifèrica formen part en el fenomen d'iniciació i el manteniment de la tolerància en quimeres mixtes (*Wekerle et al. 2003*). Per a poder preveure el grau d'estabilitat de la tolerància fins i tot durant una infecció viral (associada a la inducció d'un entorn pro-inflamatori), cal definir quins mecanismes estan involucrats en la creació d'un estat tolerant, i també, si les cèl·lules del donant contribueixen a la inducció d'aquest estat.

Com ja citat anteriorment, el mateix òrgan pot també contribuir al manteniment de dita tolerància perifèrica mitjançant, entre altres, el manteniment de la presentació d'antígens (*Karim et al. 2002*). Aquesta important participació de l'òrgan *per se* podria explicar la persistència de la tolerància al donant a més llarg termini, sobretot en els casos en els que el microquimerisme esdevé indetectable, és a dir a nivells inferiors al llindar mínim de detecció o inexistent. Nogensmenys, l'experimentació en murins ha permès identificar la presència del que anomenarem “**microquimerisme invers**”, es a dir la presència de cèl·lules T del receptor en l'òrgan trasplantat. Aquests autors (*Gassel*

et al. 2001) hipotetitzen que l'òrgan mantindria una certa activació T que permetria la perdurància de l'estat de tolerància, mantingut aquest cop per l'òrgan.

Si més no, tampoc es podria descartar l'existència d'un microquimerisme tímic "resident", el qual explicaria la seva no detecció en sang perifèrica i la possible continuació de la tolerància, en aquest cas d'origen central (*Adler and Turka 2002*).

Però, per això caldria demostrar dues possibilitats: l'existència de cèl·lules persistents residents en el timus i insensibles al renovament cel·lular o, per altra banda, el co-empelt d'una quantitat molt reduïda de cèl·lules mare hematopoètiques. Aquest darrer, en el moll de l'os, hauria de permetre la producció d'una font continua de cèl·lules del donant, però insuficient com per a permetre la seva identificació com a microquimerisme (podríem parlar aleshores del **nanoquimerisme**). Així, la presència de cèl·lules "formadores" del donant estaria representada (en ultra minoria) en l'espai tímic i es podria garantir l'educació *de novo* d'una nova generació cel·lular T en el context del donant.

Trasplantaments experimentals realitzats per el grup de Starzl (*Kiyomoto et al. 2006*) de cor, fetge i moll de l'os en ratolins han permès quantitativament parlant, més detecció de microquimerisme en els trasplantaments de fetge, moll de l'os i en darrer lloc, cor. El que confirmaria, en el nostre cas, les diferències quantitatives de microquimerisme trobades entre fetge i cor o ronyó.

Més enllà, aquests autors varen observar que el microquimerisme induïa una falta de rebuig en aquests ratolins. Experimentalment, l'eliminació d'aquest microquimerisme per irradiació total (TBI) i la reconstrucció del moll de l'os per trasplantament singènic permet recuperar el rebuig a l'òrgan. Resultat que conforta la hipòtesi de la implicació del microquimerisme en la reducció del rebuig i que tractarem a continuació.

Tanmateix, suggereixen que la migració dels leucòcits del donant ocorre de forma similar a la d'ICMOD o de microorganismes no citopàtics (*Nemlander et al. 1982; Larsen et al. 1990; Demetris et al. 1991; Demetris et al. 1993; Murase et al. 1993*). Inicialment la migració dels leucòcits és dirigida cap als òrgans limfoides de l'hoste (*Murase et al. 1993*). Es creu que després de dies o setmanes, les cèl·lules del donant que han escapat a la destrucció per el SI de l'hoste migren cap a les nínxols no-limfoides relativament inaccessibles als mecanismes de destrucció cel·lulars i humorals

(Demetris et al. 1993; Terakura et al. 1998), o tornen altre cop cap a l'òrgan (Sakamoto et al. 1999; Ichikawa et al. 2000; Gassel et al. 2001). En aquesta localització privilegiada aquestes cèl·lules podrien tenir un avantatge en la supervivència, similar al dels microorganismes residuals després d'una infecció (Starzl and Zinkernagel 1998). Aquestes darreres afirmacions podrien en part respondre a la pregunta de com una minoria de cèl·lules provinents del donant poden sobreviure en un entorn que els hi és hostil.

Si és pretén que la disminució del rebuig és deguda a la presència de cèl·lules DC del donant, alguns autors confirmen (Thomson et al. 1995) que el fetge és ric en DC i que aquestes es podrien obtenir per expansió *ex-vivo* de progenitors de moll de l'os. Tanmateix afirmen que l'administració de DC deficients en mecanismes de coestimulació permeten prologar la supervivència de l'empelt en trasplantaments experimentals de cor o pàncrees en ratolins. En la mateixa línia, altres autors (Steinman et al. 2003) confirmen que les DC immadures indueixen tolerància i que les DC madures immunitat. Corroborant així algunes de les explicacions sobre l'aspecte tolerogènic del fetge.

Pensem que el balanç final entre resposta immunològica normal (rebuig) i la hiporesposta (per ignorància passiva o tolerància activa) resideix en la **natura de les cèl·lules trasplantades junt amb l'òrgan** i del tractament immunosupressor induït en els primers moments post-trasplantament (condicionament i manteniment), es a dir el tractament a l'hora del primer contacte amb els antígens estrangers o a l'hora del contacte entre els dos sistemes immunològics i la seva cronicitat al llarg del temps.

Microquimerisme responsable de la deleció del repertori específic T CD8+.

El que actualment encara queda obscur és si el microquimerisme és responsable de la hiporesposta cel·lular T o si és una mera conseqüència d'aquest estat tolerant (Wood and Sachs 1996; Adams and Hutchinson 1997; Monaco 2002; Claas 2004; Monaco 2004).

L'acceptació de l'empelt i la hiporesposta T han estat descrites per alguns autors (*Walker and Abbas 2002; Wood and Sakaguchi 2003; Redmond et al. 2005*) i es poden resumir en dos grans grups:

- Grup dominant. Mecanismes extrínsecs a les cèl·lules T (cèl·lules T reguladores i presentació antigènica per cèl·lules dendrítiques immadures)
- Grup recessiu. Mecanismes intrínsecs a les cèl·lules T (ignorància per manca de reconeixement dels antígens, anèrgia o deleció). També cal destacar que la deleció clonal ha estat descrita sobretot per a explicar el fenomen d'hiporesposta en el fetus a partir de la segona meitat del segle XX.

El grup de Redmond (*Redmond et al. 2005*), en experimentacions en ratolins, ha provat de demostrar perquè els limfòcits T CD8 poden dirigir-se cap a la via de la deleció clonal o cap a la via de l'anèrgia. Ha demostrat que la quantitat d'antigen present en la primera activació del limfòcit no afectava significativament en la quantitat de cèl·lules que sobreviuen a l'activació, però aquesta concentració d'antigen determinava el destí d'aquestes cèl·lules. Així, dosis altes d'antigen van causar la insensibilització d'aquestes cèl·lules a més estímuls, es a dir anèrgia i conseqüentment absència d'activació i posterior deleció.

Contràriament, el tractament amb dosis baixes d'antígens no va induir anèrgia ja que aquest cop les cèl·lules van patir una deleció clonal. Per tant, aquest grup va demostrar que el subministrament de baixes dosis d'antígens de forma repetida i continuada seria el mètode més efectiu per a purgar el repertori de cèl·lules T CD8 específiques per a aquest antigen.

També, alguns autors (*Hernandez et al. 2001*) afirmen que la presentació creuada (o *cross-presentation*) d'un antigen extern per cèl·lules dendrítiques a cèl·lules T CD8 *naïves* podria induir una proliferació localitzada seguida d'una deleció clonal, per tant, sense obtenció de cèl·lules T CD8 actives.

En la mateixa línia, autors com ara Heath (*Heath and Carbone 2001*) consideren que la presentació creuada d'autoantígens per cèl·lules dendrítiques en el nòdul limfàtic i en condicions no inflamatòries provoca la deleció dels limfòcits T CD8 específics dels

antígens presentats. Es creu que aquesta delecio pot ser provocada per “esgotament” de les cèl·lules T en presència d’una font continua d’antigen.

Alguns autors com ara Bonilla (*Bonilla et al. 2006*) van provar d’aportar una resposta a la qüestió plantejada. Van demostrar que el microquimerisme mantenia l’estat d’hiporesposta T citotòxica, ja que provocava la delecio del repertori T específic del donant. Cal tenir en compte que la supressió experimental del microquimerisme va restaurar la resposta de rebuig. Així, junt amb altres autors (*Kurtz et al. 2004*), van provar de demostrar que el microquimerisme era la causa d’aquell estat hipo-reactiu .

Aquests resultats confirmen la importància de la presència del microquimerisme com a inductor d’un estat hipo-reactiu i també confirmarien la seva importància en els estadis inicials del trasplantament. Però, cal destacar, que la majoria dels nostres pacients “perdien” el microquimerisme més enllà dels 18 mesos i malgrat l’absència de detecció de cèl·lules del donant no varen tenir cap episodi de rebuig més tardà. Arribats a aquest punt podem dir que els nivells de microquimerisme podien ser massa baixos per a ser detectats, o be, que el microquimerisme queda resident en localitzacions fixes i per tant indetectable en sang perifèrica. No s’ha de negligir el paper de l’òrgan durant tot el procés i sobretot en aquest cas de no detecció de microquimerisme.

Existeixen 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 poden alterar llur 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 a no alterar el sistema estudiat amb altres factors. Aquesta experimentació, però, 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, dit coneixement continua creixent ja que s'obtenen a diari noves dades sobre els diferents mecanismes per a poder, en última instància, instaurar la tolerància entre el donant i el receptor. Per a això, tots els factors que contribueixin a qualsevol nivell del rebuig al·logènic han de ser identificats i considerats en un objectiu terapèutic. Fet que no inclou l'actual sistema de tractament que consisteix en aturar la reacció immunològica, i que hauria d'apuntar a alterar específicament aquests mecanismes immunològics de forma al·lo-específica a favor del receptor.

Així doncs, en base als 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 a identificar pacients amb menor risc de rebuig, i, en base a 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 limfoproliferatius post-trasplantament. Queda oberta la porta per les estratègies d'immuno-modul·lació amb cèl·lules hematopoètiques del donant per a forçar la presència de microquimerisme, iniciatives que han estat dutes a terme en humans recentment (*Kawai et al. 2008*).

CONCLUSIONS

- La presència de microquimerisme hematopoètic pot ser provada mitjançant una bateria d'assajos moleculars alguns dels que permeten la seva quantificació fins a 1 cèl·lula entre 10^6 amb garantia de fiabilitat.
- El microquimerisme existeix després d'un trasplantament de ronyó, de cor o de fetge i és proporcional a la massa de l'òrgan trasplantat. Tanmateix el nombre de cèl·lules detectades s'esvaeix al llarg del temps fins a ser indetectables en la majoria dels casos al cap de 18 mesos.
- La presència de cèl·lules circulants del donant al segon mes post-trasplantament està directament relacionada amb la disminució de la incidència de rebuig agut provat per biòpsia en trasplantaments de ronyó.
- El microquimerisme no altera la funció dels òrgans trasplantats ni la d'altres òrgans de l'hoste i no està relacionat amb malaltia de l'empelt contra l'hoste en el nostre estudi.
- La nefropatia crònica o la pèrdua de l'empelt en trasplantaments renals no es relacionen amb la presència de microquimerisme.
- La monitorització del microquimerisme pot ser de gran utilitat per a permetre la classificació dels pacients trasplantats en funció del risc de rebuig.

BIBLIOGRAFIA

- Adamashvili, I., R. E. Kelley, et al. (2005). "Soluble HLA: patterns of expression in normal subjects, autoimmune diseases, and transplant recipients." Rheumatol Int **25**(7): 491-500.
- Adams, D. H. and I. V. Hutchinson (1997). "Microchimerism and graft tolerance: cause or effect?" Lancet **349**(9062): 1336-7.
- Adler, S. H. and L. A. Turka (2002). "Immunotherapy as a means to induce transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **14**(5): 660-5.
- Alizadeh, M., M. Bernard, et al. (2002). "Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction." Blood **99**(12): 4618-25.
- Anderson, D., M. E. Billingham, et al. (1951). "The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle." Heredity(5): 379.
- Arguello, J. R., A. M. Little, et al. (1998). "High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA)." Tissue Antigens **52**(1): 57-66.
- Arguello, J. R. and J. A. Madrigal (1999). "HLA typing by Reference Strand Mediated Conformation Analysis (RSCA)." Rev Immunogenet **1**(2): 209-19.
- Asano, M., M. Toda, et al. (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." J Exp Med **184**(2): 387-96.
- Ashton-Chess, J., M. Giral, et al. (2007). "Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation." Transplantation **84**(10): 1215-9.
- Auchincloss, H., Jr. (2001). "In search of the elusive Holy Grail: the mechanisms and prospects for achieving clinical transplantation tolerance." Am J Transplant **1**(1): 6-12.
- Austyn, J. M. and C. P. Larsen (1990). "Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation." Transplantation **49**(1): 1-7.
- Bai, L., Y. M. Deng, et al. (2006). "A SYBR green-based real-time PCR method for detection of haemopoietic chimerism in allogeneic haemopoietic stem cell transplant recipients." Eur J Haematol **77**(5): 425-31.
- Baldwin, W. M., 3rd, S. K. Pruitt, et al. (1995). "Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection." Transplantation **59**(6): 797-808.
- Bayes-Genis, A., S. Roura, et al. (2007). "Chimerism and microchimerism of the human heart: evidence for cardiac regeneration." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4** Suppl 1(S1): S40-S45.
- Bell, G. I., M. J. Selby, et al. (1982). "The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences." Nature **295**(5844): 31-5.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-1.
- Benseler, V., G. W. McCaughan, et al. (2007). "The liver: a special case in transplantation tolerance." Semin Liver Dis **27**(2): 194-213.
- Billingham, M. E., N. R. Cary, et al. (1990). "A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection:

- Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation." J Heart Transplant **9**(6): 587-93.
- Billingham, R. E., L. Brent, et al. (1953). "Activity acquired tolerance of foreign cells." Nature **172**(4379): 603-6.
- Billingham, R. E., L. Brent, et al. (1955). "Acquired tolerance of skin homografts." Ann N Y Acad Sci **59**(3): 409-16.
- Billingham, R. E. and J. Reynolds (1952). "Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions." Br J Plast Surg **5**(1): 25-36.
- Bilzer, M., F. Roggel, et al. (2006). "Role of Kupffer cells in host defense and liver disease." Liver Int **26**(10): 1175-86.
- Bluestone, J. A. and A. K. Abbas (2003). "Natural versus adaptive regulatory T cells." Nat Rev Immunol **3**(3): 253-7.
- Bonasio, R., M. L. Scimone, et al. (2006). "Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus." Nat Immunol **7**(10): 1092-100.
- Bonilla, W. V., M. B. Geuking, et al. (2006). "Microchimerism maintains deletion of the donor cell-specific CD8+ T cell repertoire." J Clin Invest **116**(1): 156-62.
- Braudeau, C., M. Racape, et al. (2007). "Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome." Transpl Int **20**(10): 845-55.
- Briscoe, D. M. and M. H. Sayegh (2002). "A rendezvous before rejection: where do T cells meet transplant antigens?" Nat Med **8**(3): 220-2.
- Bromley, S. K., S. Y. Thomas, et al. (2005). "Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics." Nat Immunol **6**(9): 895-901.
- Buhler, L. H., T. R. Spitzer, et al. (2002). "Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease." Transplantation **74**(10): 1405-9.
- Bunce, M., C. M. O'Neill, et al. (1995). "Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)." Tissue Antigens **46**(5): 355-67.
- Buno, I., P. Nava, et al. (2005). "A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation." Haematologica **90**(10): 1373-9.
- Burlingham, W. J., E. Jankowska-Gan, et al. (2000). "Loss of tolerance to a maternal kidney transplant is selective for HLA class II: evidence from trans-vivo DTH and alloantibody analysis." Hum Immunol **61**(12): 1395-402.
- Burlingham, W. J. and D. Steinmuller (1983). "Cell-mediated cytotoxicity to nonmajor histocompatibility complex alloantigens on mouse epidermal cells. V. Contribution of bone marrow-derived cells to Epa-1 antigen expression." Transplantation **35**(2): 130-5.
- Burlingham, W. J. and D. S. Wilkes (2004). "Immunobiology of Organ Transplantation."
- Caballero, A., N. Fernandez, et al. (2006). "Tolerogenic response: allorecognition pathways." Transpl Immunol **17**(1): 3-6.
- Cai, J., J. Lee, et al. (2004). "Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance." J Exp Med **199**(7): 1017-23.

- Caillat-Zucman, S., C. Legendre, et al. (1994). "Microchimerism frequency two to thirty years after cadaveric kidney transplantation." Hum Immunol **41**(1): 91-5.
- Calne, R. and H. Davies (1994). "Organ graft tolerance: the liver effect." Lancet **343**(8889): 67-8.
- Calne, R. Y. (2000). "Immunological tolerance--the liver effect." Immunol Rev **174**: 280-2.
- Calne, R. Y., R. A. Sells, et al. (1969). "Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts." Nature **223**(5205): 472-6.
- Claas, F. (2004). "Chimerism as a tool to induce clinical transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **16**(5): 578-83.
- Cosimi, A. B. and D. H. Sachs (2004). "Mixed chimerism and transplantation tolerance." Transplantation **77**(6): 943-6.
- Cotts, W. G. and M. R. Johnson (2001). "The challenge of rejection and cardiac allograft vasculopathy." Heart Fail Rev **6**(3): 227-40.
- Crispe, I. N. (2003). "Hepatic T cells and liver tolerance." Nat Rev Immunol **3**(1): 51-62.
- Crispe, I. N., M. Giannandrea, et al. (2006). "Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance." Immunol Rev **213**: 101-18.
- De Creus, A., M. Abe, et al. (2005). "Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin." J Immunol **174**(4): 2037-45.
- Demetris, A. J., N. Murase, et al. (1993). "Hematolymphoid cell trafficking, microchimerism, and GVH reactions after liver, bone marrow, and heart transplantation." Transplant Proc **25**(6): 3337-44.
- Demetris, A. J., S. Qian, et al. (1991). "Early events in liver allograft rejection. Delineation of sites of simultaneous intra-graft and recipient lymphoid tissue sensitization." Am J Pathol **138**(3): 609-18.
- Devlin, J., D. Doherty, et al. (1998). "Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation." Hepatology **27**(4): 926-33.
- Domati-Saad, R., G. B. Klintmalm, et al. (2005). "Acute graft versus host disease after liver transplantation: patterns of lymphocyte chimerism." Am J Transplant **5**(12): 2968-73.
- Donis-Keller, H., P. Green, et al. (1987). "A genetic linkage map of the human genome." Cell **51**(2): 319-37.
- Duncan, S. R., N. G. Capetanakis, et al. (2002). "Thymic dendritic cells traffic to thymic of allogeneic recipients and prolong graft survival." J Clin Invest **109**(6): 755-64.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-8.
- Ehl, S., P. Aichele, et al. (1998). "Antigen persistence and time of T-cell tolerization determine the efficacy of tolerization protocols for prevention of skin graft rejection." Nat Med **4**(9): 1015-9.
- Elwood, E. T., C. P. Larsen, et al. (1997). "Microchimerism and rejection in clinical transplantation." Lancet **349**(9062): 1358-60.
- Farges, O., P. J. Morris, et al. (1994). "Spontaneous acceptance of liver allografts in the rat. Analysis of the immune response." Transplantation **57**(2): 171-7.
- Fathman, C. G. and N. B. Lineberry (2007). "Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy." Nat Rev Immunol **7**(8): 599-609.
- Fechner, J. H., Jr., D. J. Vargo, et al. (1997). "Split tolerance induced by immunotoxin in a rhesus kidney allograft model." Transplantation **63**(9): 1339-45.

- Fedoseyeva, E. V., F. Zhang, et al. (1999). "De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process." J Immunol **162**(11): 6836-42.
- Field, E. H. and Q. Gao (1998). "CD4 regulatory cells in immune tolerance." J Lab Clin Med **132**(2): 91-6.
- Frankel, W., A. Chan, et al. (1996). "Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation by short tandem repeats." Am J Hematol **52**(4): 281-7.
- Galbraith, P. R., L. S. Valberg, et al. (1965). "Patterns Of Granulocyte Kinetics In Health, Infection And In Carcinoma." Blood **25**: 683-92.
- Gao, Q., T. M. Rouse, et al. (1999). "CD4+CD25+ cells regulate CD8 cell anergy in neonatal tolerant mice." Transplantation **68**(12): 1891-7.
- Garavito, G., D. Klein, et al. (2002). "Real-time sequence-specific primer polymerase chain reaction amplification of HLA class II alleles: a novel approach to analyze microchimerism." Transplantation **73**(5): 822-5.
- Garcia-Morales, R., M. Carreno, et al. (1998). "Continuing observations on the regulatory effects of donor-specific bone marrow cell infusions and chimerism in kidney transplant recipients." Transplantation **65**(7): 956-65.
- Garcia-Morales, R., M. Carreno, et al. (1997). "The effects of chimeric cells following donor bone marrow infusions as detected by PCR-flow assays in kidney transplant recipients." J Clin Invest **99**(5): 1118-29.
- Gassel, H. J., I. V. Hutchinson, et al. (1992). "The role of T suppressor cells in the maintenance of spontaneously accepted orthotopic rat liver allografts." Transplantation **54**(6): 1048-53.
- Gassel, H. J., C. Otto, et al. (2001). "Persistence of stable intragraft cell chimerism in rat liver allografts after drug-induced tolerance." Transplantation **71**(12): 1848-52.
- Geissler, E. K., W. J. Korzun, et al. (1997). "Secreted donor-MHC class I antigen prolongs liver allograft survival and inhibits recipient anti-donor cytotoxic T lymphocyte responses." Transplantation **64**(5): 782-6.
- Ghobrial, R. M., J. Gornbein, et al. (2002). "Pretransplant model to predict posttransplant survival in liver transplant patients." Ann Surg **236**(3): 315-22; discussion 322-3.
- Girlanda, R., M. Rela, et al. (2005). "Long-term outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation." Transplant Proc **37**(4): 1708-9.
- Goddard, S., J. Youster, et al. (2004). "Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin." Am J Pathol **164**(2): 511-9.
- Graeb, C., M. Justl, et al. (2002). "Use of an adenoviral vector to express soluble donor-major histocompatibility complex molecules capable of suppressing the immune response in rat transplant recipients." Hum Immunol **63**(10): 844-52.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, et al. (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." Science **285**(5425): 221-7.
- Grambsch, P. M. (1995). "Goodness-of-fit and diagnostics for proportional hazards regression models." Cancer Treat Res **75**: 95-112.
- Grambsch, P. M. and T. Therneau (1994). "Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals." Biometrika **81**: 515-26.
- Guo, K., M. Inaba, et al. (2008). "Long-Term Donor-Specific Tolerance in Rat Cardiac Allografts by Intrabone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells." Transplantation **85**(1): 93-101.

- Gusella, J. F., N. S. Wexler, et al. (1983). "A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease." Nature **306**(5940): 234-8.
- Gutierrez-Dalmau, A. and J. M. Campistol (2007). "Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: a systematic review." Drugs **67**(8): 1167-98.
- Hamano, K., M. A. Rawsthorne, et al. (1996). "Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor microchimerism is essential for maintenance of tolerance to alloantigen in vivo in anti-CD4 treated recipients." Transplantation **62**(6): 856-60.
- Hancock, W. W. (2002). "Chemokines and transplant immunobiology." J Am Soc Nephrol **13**(3): 821-4.
- Hancock, W. W., W. Gao, et al. (2000). "Chemokines and their receptors in allograft rejection." Curr Opin Immunol **12**(5): 511-6.
- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **19**: 47-64.
- Hernandez, J., S. Aung, et al. (2001). "Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen." J Exp Med **194**(6): 707-17.
- Hisanaga, M., J. Hundrieser, et al. (1996). "Development, stability, and clinical correlations of allogeneic microchimerism after solid organ transplantation." Transplantation **61**(1): 40-5.
- Hochberg, E. P., D. B. Miklos, et al. (2003). "A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation." Blood **101**(1): 363-9.
- Hornick, P. and R. Lechler (1997). "Direct and indirect pathways of alloantigen recognition: relevance to acute and chronic allograft rejection." Nephrol Dial Transplant **12**(9): 1806-10.
- Hricik, D. E., W. Y. Almawi, et al. (1994). "Trends in the use of glucocorticoids in renal transplantation." Transplantation **57**(7): 979-89.
- Ichikawa, N., A. J. Demetris, et al. (2000). "Donor and recipient leukocytes in organ allografts of recipients with variable donor-specific tolerance: with particular reference to chronic rejection." Liver Transpl **6**(6): 686-702.
- Kamada, N. (1985). "The immunology of experimental liver transplantation in the rat." Immunology **55**(3): 369-89.
- Karim, M., U. Steger, et al. (2002). "The role of the graft in establishing tolerance." Front Biosci **7**: e129-54.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, et al. (2008). "HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression." N Engl J Med **358**(4): 353-61.
- Kawai, T., S. L. Wee, et al. (2000). "Association of natural killer cell depletion with induction of mixed chimerism and allograft tolerance in non-human primates." Transplantation **70**(2): 368-74.
- Khan, A., Y. Tomita, et al. (1996). "Thymic dependence of loss of tolerance in mixed allogeneic bone marrow chimeras after depletion of donor antigen. Peripheral mechanisms do not contribute to maintenance of tolerance." Transplantation **62**(3): 380-7.
- Kiyomoto, T., H. Toyokawa, et al. (2006). "The difficulty of eliminating donor leukocyte microchimerism in rat recipients bearing established organ allografts." Transplantation **81**(3): 438-44.

- Ko, S., A. Deiwick, et al. (1999). "Functional relevance of donor-derived hematopoietic microchimerism only for induction but not for maintenance of allograft acceptance." *Transplant Proc* **31**(1-2): 920-1.
- Kobayashi, E., N. Kamada, et al. (1995). "Migration of donor cells into the thymus is not essential for induction and maintenance of systemic tolerance after liver transplantation in the rat." *Immunology* **84**(2): 333-6.
- Krausa, P. and M. J. Browning (1996). "A comprehensive PCR-SSP typing system for identification of HLA-A locus alleles." *Tissue Antigens* **47**(3): 237-44.
- Krieger, N. R., D. P. Yin, et al. (1996). "CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection." *J Exp Med* **184**(5): 2013-8.
- Kristt, D., J. Stein, et al. (2007). "Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility." *Bone Marrow Transplant* **39**(5): 255-68.
- Kupiec-Weglinski, J. W., J. M. Austyn, et al. (1988). "Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues." *J Exp Med* **167**(2): 632-45.
- Kurtz, J., T. Wekerle, et al. (2004). "Tolerance in mixed chimerism - a role for regulatory cells?" *Trends Immunol* **25**(10): 518-23.
- Kusaka, M., J. Pratschke, et al. (2000). "Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death." *Transplantation* **69**(3): 405-10.
- Kusaka, S., A. P. Grailer, et al. (2000). "Clonotype analysis of human alloreactive T cells: a novel approach to studying peripheral tolerance in a transplant recipient." *J Immunol* **164**(4): 2240-7.
- Kyewski, B. and J. Derbinski (2004). "Self-representation in the thymus: an extended view." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 688-98.
- Labat-Robert, J. (2004). "Cell-matrix interactions in aging: role of receptors and matricryptins." *Ageing Res Rev* **3**(2): 233-47.
- Lafferty, K. J., S. K. Babcock, et al. (1986). "Prevention of rejection by treatment of the graft: an overview." *Prog Clin Biol Res* **224**: 87-117.
- Lagaaij, E. L., G. F. Cramer-Knijenburg, et al. (2001). "Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection." *Lancet* **357**(9249): 33-7.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, et al. (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." *Nat Med* **6**(6): 686-8.
- Lambert, N. C., T. D. Erickson, et al. (2004). "Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time polymerase chain reaction: studies of healthy women and women with scleroderma." *Arthritis Rheum* **50**(3): 906-14.
- Larsen, C. P., E. T. Elwood, et al. (1996). "Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways." *Nature* **381**(6581): 434-8.
- Larsen, C. P., P. J. Morris, et al. (1990). "Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection." *J Exp Med* **171**(1): 307-14.
- Libby, P., S. J. Swanson, et al. (1992). "Immunopathology of coronary arteriosclerosis in transplanted hearts." *J Heart Lung Transplant* **11**(3 Pt 2): S5-6.
- Limmer, A., J. Ohl, et al. (2000). "Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance." *Nat Med* **6**(12): 1348-54.

- Louis, S., C. Braudeau, et al. (2006). "Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance." *Transplantation* **81**(3): 398-407.
- Lubaroff, D. M. and W. K. Silvers (1973). "Importance of chimerism in maintaining tolerance of skin allografts in mice." *J Immunol* **111**(1): 65-71.
- Maas, F., N. Schaap, et al. (2003). "Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms." *Leukemia* **17**(3): 630-3.
- Manilay, J. O., D. A. Pearson, et al. (1998). "Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a nonmyeloablative conditioning regimen." *Transplantation* **66**(1): 96-102.
- Marelli-Berg, F. M., A. Weetman, et al. (1997). "Antigen presentation by epithelial cells induces anergic immunoregulatory CD45RO⁺ T cells and deletion of CD45RA⁺ T cells." *J Immunol* **159**(12): 5853-61.
- McDaniel, H. B., M. Yang, et al. (1999). "Prospective study of microchimerism in transplant recipients." *Clin Transplant* **13**(2): 187-92.
- McDonald, J. C., I. Adamashvili, et al. (1994). "Soluble HLA class II concentrations in normal individuals and transplant recipients. Comparison with soluble HLA class I concentrations." *Transplantation* **58**(11): 1268-72.
- Mertes, P. (1996). "Physiology of Brain Death (Transplantation biology: Cellular and molecular aspects)."
- Millan, M. T., J. A. Shizuru, et al. (2002). "Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation." *Transplantation* **73**(9): 1386-91.
- Monaco, A. P. (2002). "Tolerance and chimerism: separate and unequal concepts." *Transplant Proc* **34**(6): 1991-7.
- Monaco, A. P. (2004). "Prospects and strategies for clinical tolerance." *Transplant Proc* **36**(1): 227-31.
- Monaco, A. P., A. Liegeois, et al. (1975). "Advances in Nephrology." p.135.
- Murase, N., A. J. Demetris, et al. (1993). "Graft-versus-host disease after brown Norway-to-Lewis and Lewis-to-Brown Norway rat intestinal transplantation under FK506." *Transplantation* **55**(1): 1-7.
- Murase, N., T. E. Starzl, et al. (1995). "Variable chimerism, graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to brown Norway rats." *Transplantation* **60**(2): 158-71.
- Nankivell, B. J., R. J. Borrows, et al. (2003). "The natural history of chronic allograft nephropathy." *N Engl J Med* **349**(24): 2326-33.
- Nankivell, B. J., R. J. Borrows, et al. (2004). "Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation." *Transplantation* **78**(2): 242-9.
- Nel, A. E. (2002). "T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse." *J Allergy Clin Immunol* **109**(5): 758-70.
- Nel, A. E. and N. Slaughter (2002). "T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy." *J Allergy Clin Immunol* **109**(6): 901-15.
- Nemlander, A., A. Soots, et al. (1982). "Redistribution of renal allograft-responding leukocytes during rejection. II. Kinetics and specificity." *J Exp Med* **156**(4): 1087-100.

- Ochando, J. C., C. Homma, et al. (2006). "Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts." *Nat Immunol* **7**(6): 652-62.
- Olerup, O. and H. Zetterquist (1992). "HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation." *Tissue Antigens* **39**(5): 225-35.
- Owen, R. D. (1945). "Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins." *Science* **102**: 400.
- Parry, S. L., F. C. Hall, et al. (1998). "Autoreactivity versus autoaggression: a different perspective on human autoantigens." *Curr Opin Immunol* **10**(6): 663-8.
- Pazderka, F., J. Enns, et al. (1996). "The functional consequences of partial calcineurin inhibition in human peripheral blood mononuclear leucocytes." *Transpl Immunol* **4**(1): 23-31.
- Peters, D. H., A. Fitton, et al. (1993). "Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation." *Drugs* **46**(4): 746-94.
- Pezzoli, N., M. Silvy, et al. (2007). "Quantification of mixed chimerism by real time PCR on whole blood-impregnated FTA cards." *Leuk Res* **31**(9): 1175-83.
- Piper, K. P., A. McLarnon, et al. (2007). "Functional HY-specific CD8+ T cells are found in a high proportion of women following pregnancy with a male fetus." *Biol Reprod* **76**(1): 96-101.
- Powell, J. D. (2006). "The induction and maintenance of T cell anergy." *Clin Immunol* **120**(3): 239-46.
- Qian, S., A. J. Demetris, et al. (1994). "Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism." *Hepatology* **19**(4): 916-24.
- Qian, S., L. Lu, et al. (1997). "Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction." *J Immunol* **158**(10): 4654-61.
- Quaini, F., K. Urbanek, et al. (2002). "Chimerism of the transplanted heart." *N Engl J Med* **346**(1): 5-15.
- Radovancevic, B., D. C. McGiffin, et al. (2001). "A multi-institutional study of cardiac retransplantation: incidence, risk factors for mortality, and outcome." *J Heart Lung Transplant* **20**(2): 181.
- Ramsdell, F. and B. J. Fowlkes (1992). "Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen." *Science* **257**(5073): 1130-4.
- Redmond, W. L., B. C. Marincek, et al. (2005). "Distinct requirements for deletion versus anergy during CD8 T cell peripheral tolerance in vivo." *J Immunol* **174**(4): 2046-53.
- Reed, W., T. H. Lee, et al. (2007). "Transfusion-associated microchimerism: a new complication of blood transfusions in severely injured patients." *Semin Hematol* **44**(1): 24-31.
- Reed, W. F., T. L. Lee, et al. (2001). "Detection of microchimerism by PCR is a function of amplification strategy." *Transfusion* **41**(1): 39-44.
- Rehermann, B. and M. Nascimbeni (2005). "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection." *Nat Rev Immunol* **5**(3): 215-29.
- Reinsmoen, N. L., A. Jackson, et al. (1999). "Peripheral blood allogeneic microchimerism in lung and cardiac allograft recipients." *J Leukoc Biol* **66**(2): 306-9.

- Rovere-Querini, P., A. A. Manfredi, et al. (2005). "Environmental adjuvants, apoptosis and the censorship over autoimmunity." Autoimmun Rev **4**(8): 555-60.
- Sahota, A., S. Gao, et al. (2000). "Microchimerism and rejection: a meta-analysis." Clin Transplant **14**(4 Pt 1): 345-50.
- Sakaguchi, S. (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." Cell **101**(5): 455-8.
- Sakamoto, T., Q. Ye, et al. (1999). "Donor hematopoietic progenitor cells in nonmyeloablated rat recipients of allogeneic bone marrow and liver grafts." Transplantation **67**(6): 833-40.
- Salahudeen, A. K., N. Haider, et al. (2004). "Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts." Kidney Int **65**(2): 713-8.
- Salgar, S. K., R. Shapiro, et al. (1999). "Infusion of donor leukocytes to induce tolerance in organ allograft recipients." J Leukoc Biol **66**(2): 310-4.
- Sanchez-Fueyo, A., M. Weber, et al. (2002). "Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance." J Immunol **168**(5): 2274-81.
- Sayegh, M. H. and L. A. Turka (1998). "The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection." N Engl J Med **338**(25): 1813-21.
- Sayegh, M. H., B. Watschinger, et al. (1994). "Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides." Transplantation **57**(9): 1295-302.
- Scharf, S. J., A. G. Smith, et al. (1995). "Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers." Blood **85**(7): 1954-63.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Sharland, A., Y. Yan, et al. (1999). "Evidence that apoptosis of activated T cells occurs in spontaneous tolerance of liver allografts and is blocked by manipulations which break tolerance." Transplantation **68**(11): 1736-45.
- Shirwan, H., H. K. Wang, et al. (1996). "Pretransplant injection of allograft recipients with donor blood or lymphocytes permits allograft tolerance without the presence of persistent donor microchimerism." Transplantation **61**(9): 1382-6.
- Shirwan, H., G. D. Wu, et al. (1997). "Induction of allograft nonresponsiveness after intrathymic inoculation with donor class I allopeptides. II. Evidence for persistent chronic rejection despite high levels of donor microchimerism." Transplantation **64**(12): 1671-6.
- Sivasai, K. S., Y. G. Alevy, et al. (1997). "Peripheral blood microchimerism in human liver and renal transplant recipients: rejection despite donor-specific chimerism." Transplantation **64**(3): 427-32.
- Skorecki, K. L., W. P. Rutledge, et al. (1992). "Acute cyclosporine nephrotoxicity--prototype for a renal membrane signalling disorder." Kidney Int **42**(1): 1-10.
- Spriewald, B. M., R. Wassmuth, et al. (1998). "Microchimerism after liver transplantation: prevalence and methodological aspects of detection." Transplantation **66**(1): 77-83.
- Starzl, T. E., A. J. Demetris, et al. (1992). "Cell migration, chimerism, and graft acceptance." Lancet **339**(8809): 1579-82.
- Starzl, T. E., A. J. Demetris, et al. (1993). Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. Hepatology. **17**: 1127-52.
- Starzl, T. E., A. J. Demetris, et al. (1993). "Chimerism and donor-specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation." Transplantation **55**(6): 1272-7.

- Starzl, T. E. and F. G. Lakkis (2006). "The unfinished legacy of liver transplantation: emphasis on immunology." *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S151-63.
- Starzl, T. E. and N. Murase (2000). "Microchimerism, macrochimerism, and tolerance." *Clin Transplant* **14**(4 Pt 1): 351-4.
- Starzl, T. E. and R. M. Zinkernagel (1998). "Antigen localization and migration in immunity and tolerance." *N Engl J Med* **339**(26): 1905-13.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **21**: 685-711.
- Steptoe, R. J., W. Li, et al. (1999). "Trafficking of APC from liver allografts of Flt3L-treated donors: augmentation of potent allostimulatory cells in recipient lymphoid tissue is associated with a switch from tolerance to rejection." *Transpl Immunol* **7**(1): 51-7.
- Strober, S., C. Benike, et al. (2000). "Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity." *Transplantation* **69**(8): 1549-54.
- Suberbielle, C., S. Caillat-Zucman, et al. (1994). "Peripheral microchimerism in long-term cadaveric-kidney allograft recipients." *Lancet* **343**(8911): 1468-9.
- Sykes, M. (2001). "Mixed chimerism and transplant tolerance." *Immunity* **14**(4): 417-24.
- Sykes, M. (2007). "Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation." *J Intern Med* **262**(3): 288-310.
- Sykes, M. (2007). "Mechanisms of tolerance induced via mixed chimerism." *Front Biosci* **12**: 2922-34.
- Sykes, M. and D. H. Sachs (1990). "Bone marrow transplantation as a means of inducing tolerance." *Semin Immunol* **2**(6): 401-17.
- Tajik, N., D. Singal, et al. (2001). "Prospective study of microchimerism in renal allograft recipients: association between HLA-DR matching, microchimerism and acute rejection." *Clin Transplant* **15**(3): 192-8.
- Takada, M., K. C. Nadeau, et al. (1998). "Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat." *Transplantation* **65**(12): 1533-42.
- Taniguchi, H., T. Toyoshima, et al. (1996). "Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver." *Nat Med* **2**(2): 198-203.
- Terakura, M., N. Murase, et al. (1998). "Lymphoid/nonlymphoid compartmentalization of donor leukocyte chimerism in rat recipients of heart allografts, with or without adjunct bone marrow." *Transplantation* **66**(3): 350-7.
- Thomson, A. W., M. L. Drakes, et al. (1999). "Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation." *J Leukoc Biol* **66**(2): 322-30.
- Thomson, A. W., L. Lu, et al. (1995). "Microchimerism, dendritic cell progenitors and transplantation tolerance." *Stem Cells* **13**(6): 622-39.
- Tomita, Y., A. Khan, et al. (1994). "Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen." *J Immunol* **153**(3): 1087-98.
- van Pel, M., D. W. van Breugel, et al. (2003). "Donor-specific tolerance in a murine model: the result of extra-thymic T cell deletion?" *Transpl Immunol* **11**(3-4): 375-84.
- VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, et al. (2000). "Human allograft acceptance is associated with immune regulation." *J Clin Invest* **106**(1): 145-55.
- von Herrath, M. G. and L. C. Harrison (2003). "Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity." *Nat Rev Immunol* **3**(3): 223-32.

- Wainwright, B. J., P. J. Scambler, et al. (1985). "Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22." Nature **318**(6044): 384-5.
- Walker, L. S. and A. K. Abbas (2002). "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery." Nat Rev Immunol **2**(1): 11-9.
- Weiss, S., K. Kotsch, et al. (2007). "Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation." Am J Transplant **7**(6): 1584-93.
- Wekerle, T., P. Blaha, et al. (2003). "Mechanisms of tolerance induction through the transplantation of donor hematopoietic stem cells: central versus peripheral tolerance." Transplantation **75**(9 Suppl): 21S-25S.
- Wood, K. and D. H. Sachs (1996). "Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect." Immunol Today **17**(12): 584-7; discussion 588.
- Wood, K. J. and S. Sakaguchi (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." Nat Rev Immunol **3**(3): 199-210.
- Yong, Z., L. Chang, et al. (2007). "Role and mechanisms of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance." Transpl Immunol **17**(2): 120-9.
- Zheng, X. X., A. Sanchez-Fueyo, et al. (2003). "Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance." Immunity **19**(4): 503-14.
- Zhong, X. Y., W. Holzgreve, et al. (2006). "Direct quantification of fetal cells in maternal blood by real-time PCR." Prenat Diagn **26**(9): 850-4.