

Nous conceptes en HLA i trasplantament d'òrgans

Jaume Martorell i Eduard Palou

Servei d'Immunologia, Hospital Clínic

Adreça per a la correspondència: Jaume Martorell i Eduard Palou. Servei d'Immunologia, Hospital Clínic. C. de Villarroel, 170. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: jmarto@clinic.ub.es, epalou@clinic.ub.es.

DOI: 10.2436/20.1501.02.149

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (electrònic): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 02/02/2014 Acceptat: 15/03/2014

Resum

En el trasplantament d'òrgans el rebuig immunitari segueix sent el principal obstacle a superar. L'al·loreconeixement que inicia aquesta resposta immunitària està determinat majoritàriament pel reconeixement com a estranyes de les molècules HLA o MHC (complex d'histocompatibilitat principal), en ser aquestes extremadament polimòrfiques. L'al·loresposta immunitària comporta l'activació inicial dels limfòcits T i la inducció posterior d'un ventall de mecanismes efectors. Aquests mecanismes que porten al rebuig poden tenir tant una base cel·lular com humoral, i el tractament amb immunosupressors és més efectiu en el cas del rebuig cel·lular. Tanmateix, el tractament crònic amb fàrmacs immunosupressors comporta uns efectes adversos importants i, per això, s'està estudiant la possibilitat d'induir tolerància específica d'antigen, que sembla un objectiu factible en un futur. Actualment, els estudis immunitaris que es fan al laboratori avaluen el grau de compatibilitat entre donant i receptor, mitjançant la tipificació HLA de tots dos, i analitzen l'al·loresposta específica, bàsicament mitjançant la detecció d'anticossos anti-HLA específics del donant.

Paraules clau: trasplantament, HLA, al·loreconeixement, rebuig.

Immunobiologia del trasplantament

Origen de l'al·loresposta: polimorfismes HLA i no-HLA

El sistema immunitari té la funció de defensar l'organisme enfront de l'agressió de virus, bacteris i paràsits. Per fer aquesta funció els limfòcits T necessiten reconèixer com a estranys els pèptids antigènics derivats dels microorganismes i desenvolupar una resposta específica. Aquesta identificació requereix que les cèl·lules expressin algun pèptid microbià a la membrana cel·lular. Les proteïnes que transporten aquests pèptids i els presenten a la membrana cel·lular són denominades molècules MHC (*major histocompatibility complex*, complex d'histocompatibilitat principal), pel seu paper crucial en el desenvolupament del rebuig de l'al·loempelt. En l'espècie humana les molècules MHC són anomenades *molècules HLA* (*human leukocyte antigen*, antigen leucocitari humà d'histocompatibilitat).

Aquestes molècules són altament polimòrfiques, és a dir, hi ha moltes variants diferents presents en els individus d'una espècie. Aquest polimorfisme confereix a l'espècie, molt possiblement, avantatges defensius enfront de les infeccions, en poder presentar de manera eficient més diversitat de pèptids antigènics. Ara bé, quan es planteja un trasplantament d'òrgans entre individus d'una mateixa espècie (al·lotrasplantament) aquest polimorfisme constitueix un problema, ja que les molècules HLA al·logèniques són reconegudes com a estranyes i les cèl·lules que les posseeixen són atacades de manera similar a com ho serien unes cèl·lules infectades. L'antigenicitat del

New concepts in HLA and organ transplantation

Summary

In organ transplantation, immune rejection is still the biggest obstacle to overcome. The allorecognition that initiates the immune response is determined to a high degree by the recognition as foreign of HLA or MHC (major histocompatibility complex) molecules, the latter being highly polymorphic. The immune alloresponse entails initial T-cell activation and subsequent induction of a variety of effector mechanisms. These mechanisms, which lead to rejection, may have either a cellular or a humoral basis, where immunosuppressive treatment is more effective in the case of cellular rejection. However, chronic treatment with immunosuppressive drugs entails major adverse effects and, therefore, the possibility of inducing antigen-specific tolerance is under study and appears to be a feasible goal in the future. Currently, the immunological studies which are being carried out in the laboratory evaluate the degree of compatibility between donor and recipient through HLA typing of both, and analyse the specific alloresponse, in essence by detecting the presence of donor-specific anti-HLA antibodies.

Key words: transplantation, HLA, allorecognition, rejection.

sistema principal d'histocompatibilitat (MHC) o, en humans, sistema HLA, està condicionada per diverses raons: 1) són molècules altament polimòrfiques; 2) s'expressen en membrana i, per tant, són accessibles als anticossos i als receptors limfocitaris en les cèl·lules vives, i 3) la seva funció fisiològica d'encaixar amb els receptors de limfòcits T (TCR) comporta que les diferències en les molècules HLA siguin fàcilment identificables pels TCR.

Els gens i antigens HLA estan classificats en dos grups principals, segons la seva homologia estructural en el DNA i la proteïna. Les molècules de HLA de classe I es caracteritzen fonamentalment per tenir una sola cadena polipeptídica i estar codificades per tres locus (A, B, C). Aquestes s'expressen en la membrana de totes les cèl·lules i la seva funció fisiològica és presentar antigens (o pèptids) intracel·lulars (per exemple, virus) als limfòcits T CD8+ citotòxics. Les molècules de HLA de classe II codifiquen proteïnes heterodímeres i, a diferència de les molècules de HLA-I, estan ancorades a la superfície cel·lular per dues cadenes (α i β). Els gens que codifiquen les molècules HLA-II es troben en tres locus fonamentalment (locus DR, DP, DQ) i s'expressen en monòcits, endoteli, cèl·lules B i cèl·lules dendrítiques. La seva funció fisiològica és presentar antigens extracel·lulars (per exemple, bacteris) en els limfòcits T CD4+ col·laboradors. Els limfòcits T també poden expressar a la seva membrana molècules HLA-II després de ser activats.

D'altra banda, en el DNA humà hi ha nombrosos polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNP). La majoria es troben en zones que no codifiquen pro-

teïnes, però els pocs que sí que ho fan presenten en general el canvi d'un sol aminoàcid, que dona lloc habitualment a dues formes d'una proteïna dins de l'espècie. Aquestes proteïnes polimòrfiques, que poden tenir o no capacitat al·loimmunogènica (HA-1, CD31, CD49b, entre d'altres), són els anomenats *antígens d'histocompatibilitat menor*. Alguns, com la GSTT1, són diana de la resposta al·logènica en el trasplantament d'òrgans.

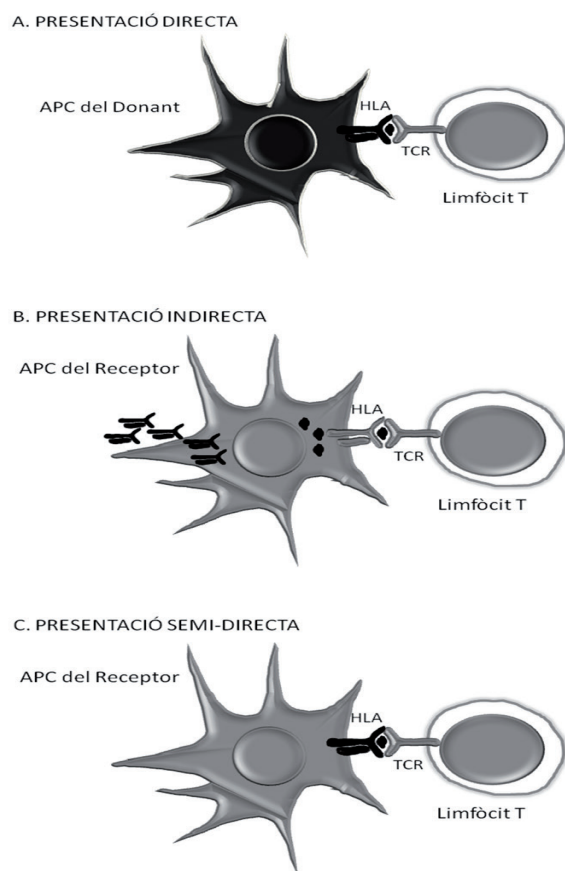
Al·loreconeixement antigènic

Els limfòcits T són les cèl·lules que iniciaran i portaran a terme l'al·loresposta immunitària. L'al·loreconeixement antigènic de molècules HLA serà fet pel limfòcit T principalment mitjançant dues vies diferents de presentació (Ali *et al.*, 2013): per via directa, els limfòcits T reconeixeran el complex HLA-pèptid exogen intacte directament en la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) del donant (vegeu la figura 1a). En canvi, per via indirecta, els limfòcits T reconeixeran al·lopèptids del donant mitjançant molècules pròpies HLA (fonamentalment HLA-II) una vegada processats i presentats per les APC del receptor (vegeu la figura 1b). En el cas dels antígens menors d'histocompatibilitat, els al·lopèptids derivats d'aquestes molècules només podran ser reconeguts per la via indirecta, en ser presentats per les APC del receptor mitjançant molècules HLA pròpies (Auchincloss i Sultan, 1996).

El tipus d'al·loreconeixement antigènic tindrà una implicació important en el tipus d'al·loresposta immunitària que es produirà seguidament. Característicament, l'al·loreconeixement antigènic per via directa és el responsable de desencadenar una al·loresposta (tant proliferativa com secretora de citocines efectores) de més vigor que la produïda per l'al·loreconeixement per via indirecta. Com que el reconeixement per via directa requereix la presència d'APC del donant, clàssicament s'ha postulat que aquesta via és la que predominaria durant el període inicial del trasplantament i seria també la responsable principal durant els episodis de rebuig agut de l'empelt. D'altra banda, com que la via indirecta depèn de les APC del receptor, aquesta estaria present durant tot el període posttrasplantament, i tindria especial rellevància a llarg termini, i és la responsable del rebuig crònic de l'empelt (Gökmen). No obstant això, treballs recents apunten que l'al·loreconeixement antigènic directe podria estar present també a llarg termini, i les cèl·lules endotelials de l'empelt, i fins i tot les APC pròpies del receptor, serien les que tindrien capacitat de presentar l'al·loantigen crònicament per via directa. Aquesta tercera via s'ha denominat *via semidirecta d'al·loreconeixement antigènic* (vegeu la figura 1c).

Activació limfocitària i mecanismes efectors

Per tal que es produeixi l'activació completa del limfòcit T i aquest iniciï l'al·loresposta immunitària efectora, el limfòcit T ha de rebre una cascada de senyals i interaccions específiques amb les APC (Wood i Goto, 2012). El primer senyal és el produït mitjançant la interacció entre les molècules de HLA de les APC i el receptor de la cèl·lula T (TCR-CD3). Aquesta interacció induirà la diferenciació funcional de dos tipus de subpoblacions limfocitàries CD4+, segons el predomini de secreció de determinades interleucines: el subtipus Th1, que característicament secretaran IL-2 i IFN- γ , sota la influència directa d'IL-12 i, en menys mesura, el subtipus Th2, que secretaran IL-4 i IL10. El predomini d'una resposta Th1 portarà envers un mecanisme efector cel·lular i, en canvi, un predomini d'al·loresposta Th2 activaria un mecanisme efector humoral, encara que inicialment semblava que aquest tipus de resposta podia derivar potencialment en un estat d'hiporesposta cel·lular. Així, els limfòcits B activats per l'antigen i ajudats per la col·laboració dels T CD4+ activats, especialment per les interleucines que secreten els Th2 (IL-4), donen lloc a la producció d'anticossos a través de cèl·lules plasmàtiques productores d'immunoglobulines i produïdes principalment al moll d'os i àrees específiques en



† Figura 1. Al·loreconeixement antigènic. a) Presentació directa. b) Presentació indirecta. c) Presentació semidirecta. En negre es representen els elements provinents del donant, mentre que en gris són els propis del receptor del trasplantament.

òrgans limfoides secundaris. Recentment, ha estat descrita una altra subpoblació limfocitària T CD4+ (Th17), que apareixeria en el context d'un ambient ric en IL-23, TGF- β i IL-6. Aquesta subpoblació limfocitària, productora de citocines proinflamàtores (IL-17, IL-22 i TNF- α) és responsable de produir diversos trastorns autoimmunitaris i podria tenir un paper important en el desenvolupament d'alguns episodis de rebuig agut en induir la granulopoesi i la seva migració cap a teixits inflamats especialment en situacions en què la resposta Th1-IFN- γ es trobaria inhibida. A més, aquesta via tindria un efecte contrari a la generació de cèl·lules T reguladores (Tregs) a causa de la presència d'IL-6.

En contraposició a aquestes al·lorespostes efectores, hi ha altres respostes immunitàries portades a terme per altres subtipus limfocitaris, la funció fonamental dels quals és la de contrarestar o suprimir aquestes respostes efectores. Entre les subpoblacions més reconegudes actualment es troben les Tregs, tant les provinents del timus (naturals) com les induïdes en la perifèria des de limfòcits Th0. Aquestes cèl·lules semblen crucials per induir i mantenir un estat d'hiporesposta específica de donant en determinades situacions biològiques (molt ben descrites en models animals amb rosegadors i primats no humans) i altres vegades apareixen simplement en contraposició a una resposta efectora/inflamatòria agressiva, sense tenir un paper protolerogen específic. Recentment, també s'ha descrit que els limfòcits B, sota un entorn citocínic molt específic (IL-10) i l'expressió de molècules coestimuladores com TIM-1, podrien exercir una funció supressora i, per tant, protolerògena.

El fenomen de reconeixement antigènic i l'activació limfocitària envers una via o l'altra es porta a terme fonamentalment en òrgans limfoides secundaris, dins d'àrees especialitzades, encara que sembla que també podrien produir-se directament dins de l'al·loempelt.

L'activació específica d'antigen del receptor T (TCR-CD3) (primer senyal d'activació) no és suficient per induir l'activació, diferenciació i expansió del clon corresponent. Cal un segon senyal, que serà proporcionat per diverses interaccions moleculars específiques, fetes mitjançant les anomenades *molècules de coestimulació*. Dependent del tipus predominant d'interacció entre aquests senyals es produiran senyals d'activació o bé d'inactivació limfocitària. Entre els senyals de coestimulació activadors més coneguts destaquen la unió de CD28, CD154 (CD40L) i ICOS del limfòcit T a les molècules del complex B7 (CD80 i CD86), CD40 i ICOS-L de l'APC, respectivament. Entre els senyals coestimuladors inhibitoris destaquen CTLA-4 i PD-1 en el limfòcit T amb els seus lligands en l'APC CD80/86 i PDL-1, respectivament. Aquest segon senyal només el poden proporcionar algunes cèl·lules, les anomenades *APC professionals*, encara que hi ha altres cèl·lules que també podrien coestimular el limfòcit T, com són cèl·lules endotelials i fins i tot tubulars de l'empelt renal. L'absència d'aquest segon senyal d'activació, o un predomini dels senyals coestimuladors d'inhibició, convertirà el limfòcit T en anèrgic, és a dir, incapaç de respondre a futurs estímuls, i n'induirà la mort per apoptosi.

La inducció de receptors específics per a determinades citocines i d'altres hormones a escala local, un cop rebut el senyal a través del seu TCR, provocarà l'expansió dels clons de limfòcits T, tant citotòxics com col·laboradors, específics per a l'al·loantigen. La citocina més coneguda que exerceix aquest paper és la IL-2, juntament amb el seu receptor (IL-2R). Aquest és el denominat *tercer senyal d'activació limfocitària*.

Memòria immunitària, immunitat heteròloga

Després d'una exposició inicial antigènica, els limfòcits Th0 proliferen extensament i es diferencien en limfòcits T efectors capaços d'infiltrar teixits inflamats i així eliminar els antigens que han envaït l'organisme. Posteriorment, la majoria d'aquests limfòcits T efectors patiran una mort cel·lular per apoptosi, i sobreviurà, en canvi, una subpoblació limfocitària T de memòria específica d'antigen més resistent a patir apoptosi. Aquesta resistència més gran a l'apoptosi podria ser deguda a la presència d'IL-7. En cas que aquest individu torni a entrar en contacte amb el mateix estímul antigènic (fins i tot en quantitats menors), la presència d'aquests limfòcits T de memòria específics de donant farà que la resposta immunitària sigui significativament més robusta i ràpida que la produïda després de la primera exposició. Aquesta subpoblació limfocitària de memòria té, a més, la característica de no ser tan dependent dels senyals coestimuladors (CD28 i CD154) i de ser relativament més resistent als immunosupressors convencionals (anticalcineurínics, inhibidors de m-TOR i micofenolat mofetil), dissenyats específicament per bloquejar l'activació i diferenciació dels limfòcits Th0. Per tant, la presència d'aquesta subpoblació limfocitària T de memòria específica de donant en els receptors d'un trasplantament tindrà unes conseqüències deletèries per a la supervivència de l'empelt. Clàssicament, els pacients amb més risc de presentar aquesta subpoblació limfocitària abans del trasplantament són aquells que han estat politransfusos, dones múltiples o aquells que han estat trasplantats prèviament. Tanmateix, un nombre no menyspreable de pacients sense aquests antecedents desenvolupen episodis de rebuig agut cel·lular amb presència de cèl·lules T de memòria al·loreactives específiques de donant, malgrat no haver estat *a priori* en contacte previ amb antigens del donant. El repertori de l'al·loreactivitat limfocitària T en humans no exposats prèviament a al·loantigens conté tant fenotips Th0 com de memòria. La presència d'aquestes cèl·lules de memòria suggereix que aquests limfòcits T al·loreactius han estat activats

prèviament amb certs antigens ambientals (virus o vacunes, entre d'altres) amb característiques estructurals semblants a les molècules HLA (D'Orsogna *et al.*, 2012). Aquest fenomen es coneix com a *reacció encreuada*, important mecanisme dins de la immunitat heteròloga. Per tant, l'activació de limfòcits T al·loreactius a través de la immunitat heteròloga serà una important barreira que caldrà tenir en compte en el trasplantament d'òrgans (Adams *et al.*, 2003). Així doncs, aquells pacients que tinguin en el seu repertori immunitari abans del trasplantament clons amb memòria antigènica específica enfront d'al·loantigens estaran més exposats a desenvolupar rebuig que aquells que no en tinguin.

Immunobiologia del rebuig

De la interacció de cèl·lules presentadores i limfòcits T en el gangli limfàtic resulten cèl·lules efectores capaces d'atacar l'òrgan empeltat per mecanismes tant cel·lulars com humerals. Els mecanismes cel·lulars efectors són relativament més sensibles als immunosupressors clàssics. En canvi, els mecanismes humerals apareixen només en alguns pacients i són poc sensibles a aquests immunosupressors.

Rebuig cel·lular o produït per limfòcits T

Els limfòcits, principalment CD8+, eluïts d'òrgans rebutjats, presenten activitat citotòxica per a antigens HLA de l'empelt. Aquests limfòcits reconeixen les cèl·lules del donant mitjançant el seu TCR i les eliminen per citotoxicitat cel·lular directa (CTL) mitjançant dos mecanismes diferents: 1) la perforina, que permeabilitza la membrana cel·lular permetent l'entrada del granzim B, i 2) la interacció de FAS (CD95) amb FAS-ligand (CD178). Ambdós mecanismes activen l'apoptosi (o mort cel·lular programada) de la cèl·lula diana. Altres cèl·lules, amb receptors per a l'Fc de les immunoglobulines, també poden participar en aquesta destrucció, mitjançant l'activitat ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos) i possiblement també per l'activitat citotòxica natural o NK. Durant el procés de rebuig també es troben monòcits i limfòcits T secretors d'IL-2 i IFN- γ . L'activació i expansió clonal dels limfòcits CD8+ té lloc als ganglis limfàtics gràcies a aquestes dues citocines (IL-2 i IFN- γ) secretades majoritàriament per les cèl·lules Th1. Per tal que els limfòcits quedin retinguts a l'empelt i migrin a través de l'endoteli és necessari que aquest expressi molècules d'adhesió. Quan els limfòcits s'activen disminueix l'expressió de L-selectina, la qual cosa els permet escapar dels territoris limfàtics i recircular pels vasos sanguinis. Durant el rebuig, IFN- γ , TNF i IL-1 indueixen en l'endoteli molècules que faciliten l'adhesió, retenció i migració transendotelial dels limfòcits. Concretament ICAM-1 (CD54), lligand de LFA-1 (CD11a-CD18), V-CAM (CD106) lligand de VLA-4 (CD49d-CD29), E-selectina (CD62E), lligand de sialil-Lewis-X i CD31 (PECAM1).

Un element essencial per tal que els leucòcits migrin al parènquima renal són les quimiocines, petits pèptids que controlen la quimiotaxi, és a dir, l'atracció de neutròfils, macròfags, limfòcits T i cèl·lules NK a determinats territoris. Les quimiocines participen en diferents processos relacionats amb el trasplantament: 1) en l'acumulació de neutròfils durant la reperfusió i durant les primeres 48 h posttrasplantament; 2) en la resposta específica d'antigen, permetent i facilitant la infiltració de l'empelt dels limfòcits T, macròfags i cèl·lules NK a partir del cinquè dia (MIP-1a/ CCL3, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, fraktalina/CX3CL1) i 3), facilitant la infiltració de l'empelt per macròfags (RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2). Les quimiocines no només atrauen sinó que també activen els leucòcits. En la inhibició del rebuig s'han utilitzat amb èxit diversos blocadors de les quimiocines o dels seus receptors. Així, histològicament s'observarà infiltració tubulointerstitial per limfòcits T efectors, i es pot trobar a escala de l'endoteli vascular segons el

grau de rebuig que es presenti. No hi haurà dipòsits d'anticossos ni elements derivats de l'activació en l'empelt, com molècules derivades de l'activació de la cascada del complement (C3 i C4d).

Rebuig humoral o produït per anticossos

El rebuig hiperagut produït per anticossos és actualment poc freqüent gràcies al fet que disposem de moltes estratègies diagnòstiques per poder prevenir-lo. La presència en el receptor d'anticossos específics de donant pretrasplantament condiciona una resposta immunitària amb activació del complement, destrucció de l'endoteli i trombosi generalitzada de l'empelt en les primeres 24 h, o fins i tot minuts després del trasplantament. Aquest rebuig hiperagut és pronosticable en el laboratori mitjançant la realització d'una prova encruada o *cross-match* entre els limfòcits del donant i el sèrum del receptor.

Cada vegada és més evident que el rebuig humoral provocat per anticossos sobrevinguts, és a dir, apareguts després del trasplantament, és més freqüent del que anteriorment es creia. Potser el fet que els immunosupressors siguin cada vegada més eficaços en el control del rebuig cel·lular, i que es facin servir cada vegada més tècniques de detecció d'anticossos més sensibles, fa que el rebuig per anticossos tingui avui més incidència relativa, encara que no sempre en quedi clar el paper quan apareixen després del trasplantament, especialment en presència d'un empelt estructuralment preservat i quan els anticossos no són específics de donant. Aquest rebuig es caracteritza per la presència d'anticossos específics de donant circulants (DSA) i per la presència de polimorfonuclears i dipòsits de C4d en els capil·lars peritubulars renals (Singh *et al.*, 2009). Els dipòsits de C4d simplement constitueixen un testimoni que s'hi ha produït una activació del complement a causa de la unió antigen-anticòs. El rebuig vehiculat per anticossos específics de donant post-trasplantament és relativament insensible al tractament amb corticoides.

Tolerància específica de donant

Malgrat que les teràpies immunosupressores han contribuït a reduir dràsticament la incidència de rebuig agut dels empelts, els resultats a més llarg termini no han assolit les expectatives desitjades. L'aparició pràcticament universal de fibrosi de l'empelt i la mort del pacient per malaltia cardiovascular i neoplàsies són els principals responsables dels resultats obtinguts actualment i, paradoxalment, en tots aquests resultats els efectes adversos del tractament immunosupressor han estat un dels principals predisposants. Així doncs, es considera que la millor manera de perllongar la supervivència de l'empelt seria aconseguir eliminar de manera segura la immunosupressió, en adaptar d'alguna manera el sistema immunitari del receptor per tal d'evitar una al·loresposta enfront dels al·loantígens del donant, és a dir, induir un estat d'hiporesposta específica de donant o de tolerància (Sykes, 2007).

La demostració de tolerància d'un al·loempelt a escala experimental s'ha manifestat cada vegada amb més assiduitat en la literatura en diferents models animals. En humans la definició clínica de tolerància està determinada pel manteniment de la funció de l'empelt sense requisit immunosupressor de manera permanent. Els índexs de rebuig i supervivència clínica de l'empelt suggereixen que el fetge té més susceptibilitat a ser tolerat que altres òrgans sòlids com el ronyó, cor o pàncrees. Aquest fet sembla que està determinat pels diferents graus d'immunogenicitat que generen, a causa de la diferent densitat d'expressió de molècules HLA i la diferent capacitat presentadora de les APC residents.

La tolerància operacional es manifesta a través d'una sèrie de processos immunitaris simultanis, entre els quals s'inclouen la modulació en la freqüència dels precursors cel·lulars efectors, l'eficiència presentadora antigènica, el nivell d'activació de les cèl·lules efectores i la regulació i l'alteració en el procés de migració cel·lular. És per això que, potencialment, l'estat de

tolerància es podria assolir a través de diversos mecanismes. Una de les principals barreres a superar està condicionada per la intrínseca naturalesa de la immunitat adaptativa. Així, el fenomen derivat de la immunitat heteròloga, és a dir, la reacció encruada a antígens ambientals, en qualsevol moment tindrà capacitat d'evocar una resposta enfront d'al·loantígens i, per tant, avortar un estat d'hiporesposta específica de donant.

Recentment, diversos treballs col·laboratius han estudiat les característiques moleculars diferencials entre pacients trasplantats renals tolerants respecte a pacients en tractament immunosupressor crònic amb funció de l'empelt estable i pacients amb rebuig crònic immunitari, i han mostrat una sobreexpressió de gens específics associats al limfòcit B, així com un augment d'aquesta població, especialment de la subpoblació *B naive*, circulant en sang perifèrica (Kenneth *et al.*, 2010). A més, en la pràctica majoria dels pacients tolerants es detecta en sang perifèrica un nivell d'hiporesposta específica cel·lular de donant. De manera interessant, aquesta particular signatura genètica en pacients trasplantats renals tolerants no sembla superposable a la dels pacients tolerants trasplantats de fetge, en els quals els gens associats a la subpoblació NK i al metabolisme del ferro sembla que tenen un paper diferenciador respecte a aquells pacients que rebutgen l'empelt després de la retirada de la immunosupressió. Actualment s'estan portant a terme estudis multicèntrics, col·laboratius, prospectius i aleatoritzats per intentar definir biomarcadors de tolerància operacional que permetin discriminar aquells pacients en tractament immunosupressor en els quals es pugui retirar o disminuir al màxim el tractament de manera electiva amb seguretat (Sawitzki, 2009).

Les estratègies per induir la tolerància es basen a desviar el balanç entre les cèl·lules immunitàries efectores i les cèl·lules immunitàries reguladores amb l'objectiu d'assolir un predomini de les segones. Això es pot aconseguir ja sigui eliminant o suprimint les cèl·lules efectores, o bé induint la generació o transferint directament les cèl·lules reguladores. Una manera efectiva d'eliminar les cèl·lules efectores al·loreactives és la depleció dels limfòcits T utilitzant fàrmacs immunosupressors, però si bé aquesta estratègia aconsegueix prevenir el rebuig agut, és necessària una teràpia de manteniment per evitar l'al·loresposta a partir dels limfòcits de memòria.

Algunes estratègies s'han centrat a intentar facilitar l'anergia cel·lular mitjançant el bloqueig del segon senyal d'activació limfocitària o de coestimulació. Tal com s'ha exposat anteriorment, després del contacte antigènic, i en absència de segon senyal coestimulador, el limfòcit T pateix un procés d'anergia o apoptosi. El bloqueig de les molècules coestimuladores que comprenen el complex CD28/CTLA4-CD80/CD86 i el CD40-CD40 lligand ha estat provat en treballs experimentals.

Altres estratègies que van adquirint cada vegada més importància són les que es basen a intentar potenciar l'expansió de cèl·lules T reguladores (Jiang *et al.*, 2006). Aquestes cèl·lules són limfòcits, essencialment CD4+ CD25+, que expressen el factor de transcripció Foxp3 i que tenen capacitat supressora de l'al·loresposta específica de donant. Rellevants treballs experimentals mostren com la transferència adoptiva d'aquesta subpoblació limfocitària pot prevenir el desenvolupament tant del rebuig agut com del rebuig crònic de l'empelt.

Finalment, l'estratègia per induir tolerància amb més èxit fins ara consisteix en la creació de quimeres mixtes al·logèniques mitjançant l'administració de progenitors hemopoètics (Kawai *et al.*, 2008). Inicialment, els assaigs clínics pretenien assolir un quimerisme complet fent un trasplantament de progenitors hemopoètics amb condicionament mieloablatiu per aconseguir un reemplaçament total del sistema hemopoètic del receptor. Tanmateix, aquesta aproximació no és acceptable en la majoria de població candidata a trasplantament d'òrgan sòlid per la significativa comorbilitat associada. Estudis posteriors han observat que el quimerisme mixt que s'assoleix en fer un

condicionament d'intensitat reduïda, no mieloablatiu, és suficient per establir tolerància específica de donant en induir la delecio central de limfòcits T i B al·loreactius.

Estudis immunitaris del receptor i del donant en el trasplantament

Compatibilitat HLA entre donant i receptor

En els inicis del coneixement del sistema HLA es va creure que la identitat d'antígens HLA entre donant i receptor evitaria el rebuig dels empelts, de la mateixa manera que la identitat dels grups sanguinis ABO permetia la transfusió sanguínia. Tanmateix, el sistema HLA ha resultat tan extraordinàriament polimòrfic que la identitat total entre donant i receptor és molt difícil d'aconseguir. Ara bé, importants estudis de compatibilitat HLA entre donant i receptor i evolució dels empelts renals a llarg termini han derivat en una sèrie de conclusions. Primer, els receptors amb anticossos, especialment els hipersensibilitzats, es beneficien d'òrgans amb antígens HLA compatibles en cert grau, ja que la compatibilitat augmenta les possibilitats que no tinguin anticossos específics contra el donant. Això fa necessari programes d'intercanvi d'òrgans per a aquests pacients. Segon, els malalts trasplantats amb identitat en els antígens HLA-DR tenen una supervivència a cinc anys superior entre un 5-10 % a la dels trasplantats sense identitat DR. Les anàlisis multivariant indiquen que la probabilitat de perdre l'empelt és un 24 % superior en els trasplantaments fets sense cap compatibilitat DR respecte dels fets amb dues compatibilitats. Molts autors consideren que aquestes diferències no justifiquen grans organitzacions d'intercanvi d'òrgans però sí que són un factor per tenir en compte en la selecció dels receptors. En altres tipus de trasplantament, com el de cor o pulmons, també s'observen relacions semblants entre compatibilitat HLA i resultats del trasplantament al llarg dels anys. En canvi, en el trasplantament de fetge no s'observa aquest impacte de la compatibilitat en els seus resultats.

Actualment les tècniques de tipificació HLA es basen principalment en tècniques de biologia molecular (Dunn, 2011). Els polimorfismes de les molècules de l'HLA estan codificats i són també detectables en el DNA. Les tècniques més utilitzades actualment són: 1) la PCR-SSO reversa (*sequence specific oligonucleotides*) es basa en l'amplificació específica d'un locus HLA en presència d'un encebador marcat per un cromogen i la hibridació del producte d'aquesta amplificació amb un conjunt de microesferes (*bead arrays*), cadascuna de les quals té una sonda amb seqüències complementàries a seqüències específiques d'al·lel; a una temperatura determinada cada al·lel s'uneix a la seva sonda i només a aquella, i permet així la identificació de l'al·lel present en el DNA problema; 2) la PCR-SSP (*sequence specific primers*) es basa en la utilització d'encebadors complementaris a seqüències específiques d'un determinat al·lel; si la mostra posseeix aquesta seqüència es produirà una reacció de PCR, evidenciable per electroforesi en gel d'agarosa, i 3) la SBT (*sequence based typing*), que implica una seqüenciació dels exons on es troben preponderantment els polimorfismes. La detecció d'un doble pic en una posició nucleotídica indica que algun dels dos al·lells problema posseeix un polimorfisme en aquella posició. Un programa informàtic identifica les possibles combinacions d'al·lells que corresponen als nucleòtids identificats en cadascuna de les posicions. Algunes vegades se segueixen utilitzant les tècniques serològiques clàssiques de microlimfocitotoxicitat. En aquest cas s'enfronten anticossos que reconeixen un dels al·lells del sistema HLA en presència de complement de conill i els limfòcits problema i a continuació es detecta la mortalitat produïda mitjançant un colorant que només penetra en les cèl·lules la membrana de les quals ha estat permeabilitzada pel complement. Cal també destacar que l'arribada de noves tecnologies que permeten l'anàlisi

massiva d'informació genètica, com la ultraseqüenciació (o NGS, *next generation sequencing*), sens dubte canviarà en un futur proper les tècniques usades per a la tipificació HLA.

Estudi de l'al·loresposta immunitària mitjançada per anticossos

Aproximadament una de cada quatre persones que entren en contacte amb cèl·lules al·logèniques per transfusió o embaràs desenvolupen anticossos contra antígens HLA. Aquests anticossos estan presents en 3/4 dels malalts trasplantats que han perdut el seu ronyó i retornen a la llista d'espera per a retrasplantament. Per detectar la presència d'anticossos anti-HLA en el sèrum dels candidats a receptor es poden utilitzar diverses tècniques (Fuggle i Martin, 2008): 1) citotoxicitat dependent de complement (CDC), en la qual s'enfronta el sèrum del pacient en llista d'espera amb un conjunt de cèl·lules vives de diferents individus amb HLA conegut mitjançant la tècnica de microlimfocitotoxicitat. Aquesta tècnica permet detectar anticossos activadors de complement (principalment IgM, IgG1, IgG3), i 2) tècniques de fase sòlida, que utilitzen antígens HLA purificats units a una superfície de plàstic. Històricament s'han utilitzat plaques d'ELISA, però actualment s'usen conjunts de microesferes de poliestirè (*o bead arrays*), més coneguts per la marca comercial de l'instrument que els llegeix, Luminex. Els al·loanticossos que s'uneixen a les molècules HLA s'evidencien habitualment amb una anti-IgG marcada, en el cas del Luminex un fluorocrom detectable en un citòmetre de flux adaptat. Les tècniques de fase sòlida habituals detecten al·loanticossos IgG tant si són activadores de complement (IgG1, IgG3) com si no l'activen (freqüentment IgG2, IgG4). Els *bead arrays* es comercialitzen en tres formats distints: un de cribratge (*screening*), en el qual cada microesfera conté molècules HLA I o II de múltiples individus. Permet identificar l'existència o no d'al·loanticossos anti-HLA-I o HLA-II però no en permet determinar l'especificitat. Un segon format utilitza microesferes unides a un sol al·lel HLA. És l'anomenat *antigen aïllat* (*o single antigen*), que permet identificar directament l'especificitat dels al·loanticossos i fa possible la identificació dels «antígens acceptables», és a dir, aquells al·lells contra els quals el receptor no té al·loanticossos, fins i tot en pacients hipersensibilitzats. Un tercer format menys utilitzat, per la seva capacitat de resolució menor, fa servir microesferes amb els dos al·lells HLA de cada locus d'un mateix individu. Hi ha variants de la tècnica estàndard que permeten identificar al·loanticossos IgM o únicament aquells anticossos activadors de complement.

Les tècniques de citotoxicitat i fase sòlida difereixen en la seva sensibilitat però també en el ventall d'anticossos detectats, IgM, IgG1 i IgG3 en el cas de la citotoxicitat o IgG1, IgG3, IgG2 i IgG4 en el cas de la fase sòlida. Més sensibilitat no implica necessàriament més valor de pronòstic per a un mateix esdeveniment. La fase sòlida ofereix un valor semiquantitatiu, MFI (*mean fluorescence intensity*), encara que les línies de tall quantitatives i qualitatives (tipus d'anticòs) que pronostiquen cada esdeveniment estan en fase de definició. La combinació d'ambdues tècniques, citotoxicitat i fase sòlida, és molt útil per a: 1) diferenciar els al·loanticossos anti-HLA dels autoanticossos limfocitotòxics; 2) pronosticar els donants amb possible *cross-match* negatiu en pacients hipersensibilitzats, i 3) detectar nivells baixos d'al·loanticossos que no necessàriament pronostiquen un rebuig hiperagut, però sí més incidència d'episodis de rebuig (agut o crònic) en el posttrasplantament (Gebel *et al.*, 2003; Tait *et al.*, 2013).

Cada vegada hi ha més evidència que els anticossos anti-HLA tenen més especificitat pels epítops que constitueixen la molècula concreta de HLA que no pas per l'antigen en si, per la qual cosa el reconeixement d'aquests epítops serà de gran ajuda per establir «*mismatches* acceptables», especialment en pacients sensibilitzats. Així, anticossos dirigits contra epítops molt freqüents

són generalment els responsables de l'ampli repertori al·loreactiu en pacients hipersensibilitzats. D'aquesta manera, la interpretació dels patrons d'al·loreactivitat dels anticossos possiblement hauria d'estar basada en la relació estructural molecular establerta entre l'antigen i l'anticòs específic concret. Derivat d'aquest concepte, ha sorgit el denominat *HLAMatchmaker*, un algoritme teòric que considera que cada antigen HLA representa una col·lecció de grups d'aminoàcids amb capacitat funcional immunogènica per produir anticossos anti-HLA específics. El refinament i la posada a punt podria ser de gran utilitat per a la pràctica clínica habitual.

Anticossos contra antígens no-HLA

Malgrat que el trasplantament entre pacients HLA-idèntics (per als locus A, B i DR) és el que millor resultats presenta, i aquests requereixen ineludiblement una certa immunosupressió per evitar l'aparició de rebuig de l'empelt, l'aparició més tardana de disfunció progressiva i irreversible de l'empelt en aquest grup de pacients suggereix que l'al·loreactivitat immunitària que pateixen és deguda a una altra font al·loantigènica distinta de la del sistema HLA pròpiament dita (Sigdel i Sarwal, 2013). De fet, han estat descrits altres antígens diana responsables de generar al·loanticossos: els antígens MICA (*major-histocompatibility-complex class I-related chain A*) codificats en la mateixa regió cromosòmica que l'HLA, són antígens glicoproteics polimòrfics de superfície amb funcions relacionades amb la immunitat innata. Aquests antígens estan expressats en cèl·lules endotelials activades, fibroblasts, dendrítiques i epitelials en determinades condicions d'activació, però no en limfòcits de sang perifèrica. La presència d'anticossos contra aquests antígens s'ha associat a més risc de rebuig i pitjor supervivència de l'empelt, si bé el fet que apareguin molt freqüentment associats a al·loanticossos anti-HLA fa difícil d'avaluar-ne el valor pronòstic real, especialment en pacients amb bona compatibilitat HLA.

S'han descrit també anticossos dirigits contra altres antígens diferents a l'HLA, expressats en cèl·lules precursors endotelials. Aquests antígens amb capacitat immunogènica no han estat encara caracteritzats molecularment, i per tant són un tema de debat, ja que aquestes cèl·lules també coexpressen molècules de HLA (tant de classe I com II). La presència d'aquests anticossos pretrasplantament en absència de sensibilització anti-HLA s'ha associat tant a un increment del risc de rebuig agut com de pitjor evolució funcional de l'empelt després del trasplantament. De manera interessant, els patrons histològics segons la classificació de Banff del 2007 del rebuig en aquests pacients són tant humerals (C4d+) com cel·lulars, i això suggereix potser un paper concomitant de la resposta cel·lular en aquest context.

Finalment, en el curs del rebuig s'ha observat la producció d'autoanticossos contra diferents autoantígens no polimòrfics (com α -tubulina, col·lagen, receptor de l'angiotensina, vimentina...) i cada cop hi ha més evidències que aquests autoanticossos podrien tenir un paper en el procés de rebuig. Resta encara per aclarir si aquests autoanticossos poden causar directament dany tissular i ser així causa de la pèrdua de l'empelt.

Prova encreuada o *cross-match*

La prova encreuada o *cross-match* permet detectar la presència, en el sèrum del receptor, d'anticossos dirigits contra les cèl·lules d'un determinat donant. Es pot fer mitjançant tècniques de citotoxicitat dependent de complement (CDC) o per citometria de flux. Actualment la determinació d'al·loanticossos mitjançant «antigen aïllat» permet identificar *a priori* les incompatibilitats acceptables, i coneixent la tipificació del donant es pot fer una predicció de reactivitat o *cross-match* virtual.

En les tècniques de microlimfocitotoxicitat, si el receptor té anticossos preformats contra antígens del donant es produeix una reacció antigen-anticòs amb activació del complement i una lesió de la membrana cel·lular que

permet l'entrada a la cèl·lula de colorants vitals. En aquest cas es diu que el *cross-match* és positiu. La diferenciació entre anticossos IgG i IgM es pot fer destruint els anticossos IgM amb tractament amb ditiotreitòl (DTT).

La tècnica de citometria de flux permet detectar també anticossos no fixadors de complement i diferenciar si l'anticòs és IgG o IgM. En la citometria de flux es fa una primera incubació de les cèl·lules del donant amb el sèrum del receptor i una segona amb un anticòs anti-IgG o anti-IgM marcat amb una substància fluorescent. És important fer un doble marcatge amb CD3 i CD19 (o CD20) per diferenciar els limfòcits T (que expressen HLA-I) dels B (que expressen HLA-I + HLA-II) i així identificar contra quina classe d'antigen HLA està dirigit l'anticòs. Els al·loanticossos específics de donant que només són detectables per citometria de flux, però no per citotoxicitat, no sempre estan associats a rebuig hiperagut en els primers trasplantaments, tot i que indiquen un risc addicional de pèrdua de l'empelt en el primer any del 10 % respecte dels totalment negatius. En els retrasplantaments aquest risc addicional de pèrdua de l'empelt és del 30 %. Per aquest motiu és molt important establir uns llindars clars de positivitat per a les proves de citometria. Habitualment s'utilitza el canvi en el canal mitjà de fluorescència (SMCF, *shift mean channel fluorescence*) entre un control negatiu i el sèrum problema.

Como ja s'ha dit, el «*cross-match* virtual» implica la determinació d'al·loanticossos per tècniques d'antigen aïllat, que permeten identificar contra quins al·lells HLA té anticossos un receptor i contra quins no. Coneixent els al·lells presents en el donant és possible inferir la reactivitat sense fer un test real (vegeu la figura 2). Aquesta anàlisi és extraordinàriament útil per seleccionar aquells pacients amb alta probabilitat de donar *cross-match* per citotoxicitat negatiu entre un grup de pacients amb al·loanticossos, és a dir, té un alt valor predictiu negatiu. Tanmateix, en ser les tècniques de fase sòlida més sensibles, el seu valor predictiu positiu és menor. En trasplantament de donant viu és possible trobar una parella donant-receptor amb *cross-match*: citotoxicitat negativa, citometria negativa, virtual positiva. Aquests casos han de valorar-se individualment, tenint molt present els antecedents immunitaris i el grau d'urgència per rebre el trasplantament, atès que és difícil establir realment l'increment de risc de rebutjar l'empelt, potser no de manera immediata, però sí a mitjà/llarg termini.

El *cross-match*, a més de fer-lo amb el sèrum actual, es fa també amb els sèrums històrics amb la intenció de fer un seguiment de possibles cèl·lules B de memòria, que en el seu dia van ser productores d'anticossos i que actualment no en produeixen, però que es podrien reestimar de nou per la presència de l'antigen. El significat pronòstic d'un *cross-match* previ positiu i actual negatiu ha estat motiu de controvèrsia. En la nostra experiència, si l'antiguitat del darrer sèrum positiu és superior als dos anys i el PRA (*panel reacting antibody*) màxim és inferior al 75 %, la supervivència de l'empelt no es veu compromesa. En el cas que el PRA màxim superi el 75 %, la supervivència a dos anys dels empelts fets amb *cross-match* previ positiu i actual negatiu és un 15-20 % inferior als fets amb *cross-match* previ negatiu i actual negatiu.

En algunes malalties autoimmunitàries hi ha autoanticossos limfocitotòxics que no pronostiquen un rebuig hiperagut. Aquests autoanticossos no van dirigits contra antígens HLA. Són majoritàriament IgM (encara que no sempre) i poden eliminar-se incubant el sèrum amb DTT. Avui dia són fàcilment identificables, ja que els autoanticossos resulten negatius per a tècniques de fase sòlida. Més complicat resulta definir la coexistència d'ambdós, al·loanticossos i autoanticossos, simultàniament. En aquest cas la valoració conjunta de totes les tècniques, incloent-hi el *cross-match* per citometria, és fonamental. Tractaments previs amb anticossos antilimfocitaris o amb anticossos anti-CD3 poden donar falsos positius en la prova de *cross-match*. En aquests casos caldrà utilitzar el sèrum previ al tractament o bé fer la prova encreuada per citometria de flux. L'ús de microesferes recobertes d'antígens HLA

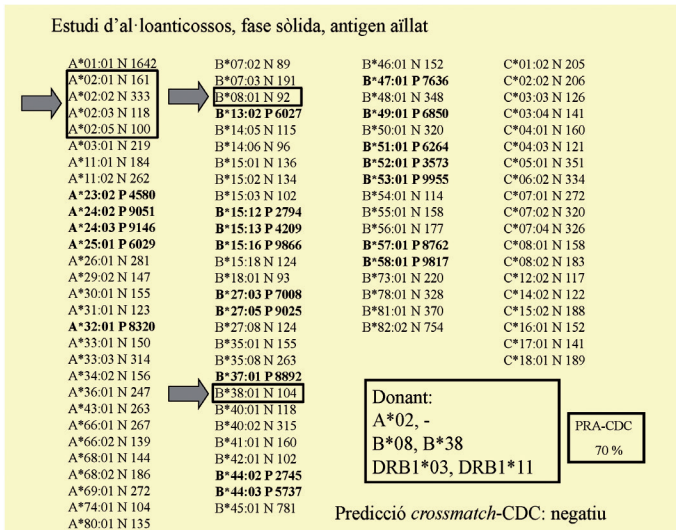


Figura 2. Prova encreuada (cross-match) virtual. A partir de l'estudi de l'especificitat d'anticossos anti-HLA presents en el receptor, mitjançant l'anàlisi d'antigen aïllat en fase sòlida, i de la tipificació HLA del donant, es pot predir el resultat de la prova encreuada. A la figura es pot observar la llista dels antígens analitzats en la prova d'antigen aïllat en fase sòlida amb el seu resultat (N, negatiu; P, positiu) i el valor de fluorescència (MFI, mean fluorescence intensity). També es mostra la tipificació HLA del donant i, d'acord amb aquesta, es marquen amb una fletxa i un requadre aquells antígens que, en aquesta parella donant-receptor, donen informació de la possible presència d'anticossos específics de donant.

purificats per confirmar la presència d'anticossos específics contra l'HLA del donant pot ser d'ajuda en aquests casos.

Bibliografia

ADAMS, A. B. [et al.] (2003). «Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance». *J. Clin. Invest.*, 111: 1887.

ALI, J. M. [et al.] (2013). «Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance». *Transplantation*, 96 (8): 681-688.

AUCHINCLOSS, H. Jr.; SULTAN, H. (1996). «Antigen processing and presentation in transplantation». *Curr. Opin. Immunol.*, 8 (5): 681-687.

D'ORSOGNA, L. J. [et al.] (2012). «TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition». *Immunogenetics*, 64: 77-85.

DUNN, P. P. J. (2011). «Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal». *Intern. J. Immunogenetics*, 38: 463-473.

FUGGLE, S. V.; MARTIN, S. (2008). «Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients». *Transplantation*, 86 (3): 384-390.

GEBEL, H. M. [et al.] (2003). «Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. Risk». *Am. J. Transplant.*, 3: 1488-1500.

GÖKMEN, M. R. [et al.] (2008). «The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation». *Curr. Opin. Immunol.*, 20 (5): 568-574.

JIANG, S. [et al.] (2006). «Regulatory T cells and transplantation tolerance». *Hum. Immunol.*, 67: 765-776.

Estudi de l'alloresposta immunitària cel·lular

Actualment, en la pràctica clínica habitual, l'estudi del risc immunitari d'un pacient està basat principalment en el monitoratge del mecanisme efector humoral, sense valorar-se la resposta efectora cel·lular o mitjançada pel limfòcit T efector. No obstant això, són cada vegada més les proves en la literatura que mostren com la presència de limfòcits T de memòria/efectors específics de donant circulants en sang perifèrica pretrasplantament són un bon marcador biològic per establir el risc d'un pacient per desenvolupar episodis de rebuig agut cel·lular posttrasplantament. A més, el monitoratge d'aquesta subpoblació cel·lular, tant en el període inicial com tardà després del trasplantament, ha mostrat una bona correlació amb una pitjor evolució de la funció de l'empelt i més incidència de rebuig crònic de l'empelt. Són diverses les tècniques utilitzades per monitorar la presència de cèl·lules T al·loreactives circulants. Entre les que més sensibilitat i reproductibilitat han mostrat es troba la tècnica d'ELISPOT IFN- γ . Es tracta d'una tècnica que permet no només identificar la presència de cèl·lules T de memòria/efectors específics de donant circulants, sinó que, a més, permet conèixer el grau d'alloreactivitat específica de donant mitjançant la freqüència de secreció d'aquesta citocina per cada cèl·lula de memòria/efectora estimulada en el cultiu mixt de curta duració. Actualment hi ha en marxa estudis multicèntrics, prospectius i aleatoritzats per valorar l'ús d'aquesta tècnica com a guia per individualitzar el tractament immunosupressor en pacients trasplantats renals. Un altre test diagnòstic que també s'ha postulat útil per valorar el grau d'alloreactivitat cel·lular és l'ImmuKnow, que es basa en l'avaluació de la resposta limfocitària T mitjançant la quantificació del grau de secreció d'ATP del limfòcit T en ser estimulat polyclonalment. Si bé hi ha diferents treballs que han associat el seu resultat amb un increment del risc de rebuig cel·lular o amb l'aparició d'infeccions oportunistes, no sembla que tinguin una bona reproductibilitat ni validesa general.