

MONITOREO INMUNOLÓGICO: EL COMIENZO DE UNA NUEVA ERA EN TRASPLANTES

INMUNE MONITORING: THE START OF A NEW AGE IN TRANSPLANTATION

DR. JUAN ALBERTO FIERRO C. (1).

1. UNIDAD DE NEFROLOGÍA, DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA. CLÍNICA LAS CONDES.
cfierro@clc.cl

RESUMEN

La necesidad de ajustar la inmunosupresión en forma individualizada ha estimulado la emergencia de técnicas que permiten predecir eventos clínicos como rechazo agudo o tolerancia. Esta revisión analiza, considerando principalmente el trasplante renal, las limitantes actuales de la inmunosupresión para concluir que una terapia individualizada permitiría mejorar la sobrevida de pacientes y órganos trasplantados en el largo plazo. En segundo lugar describe los métodos diagnósticos que en forma más consistente han demostrado tener valor predictivo con importancia clínica. Entre ellos se cuentan ensayos funcionales, determinación de anticuerpos específicos y linfocitos reactivos contra el donante, así como el análisis de marcadores a nivel de proteínas o genómicos. Los avances logrados auguran el comienzo de una nueva era en trasplantes.

Palabras clave: Monitoreo inmunológico, anticuerpos.

SUMMARY

Organ transplantation is often related to higher survival and lower morbidity than conservative treatments. Nevertheless, survival and morbidity could be optimized tailoring the

immunosuppression to the particular needs of each individual patient. The requirement to optimize immunosuppression makes necessary to improve the immunologic assessment and therefore has promoted the development of new immunological diagnostic tools.

This review addresses first the need to tailor immunosuppression, and then focuses in the value of anti HLA antibodies, alloreactive T cells, phenotypic analysis of lymphocytes and cytokines, repertoire analysis and genetic approaches, as well as in vivo studies.

Further validation and standardization of these tests are needed in order to enter the routine clinical practice. Accomplishment of these goals would signal the beginning of a new era in transplantation.

Key Words: Transplantation monitoring, antibodies.

INTRODUCCIÓN

El trasplante renal se ha convertido en una terapia muy exitosa en el sentido que se relaciona tanto con una mayor sobrevida como con una mejor calidad de vida. A pesar de ello el trasplante renal tiene limitaciones, como la falta de órganos y la pérdida de injertos en el largo plazo.

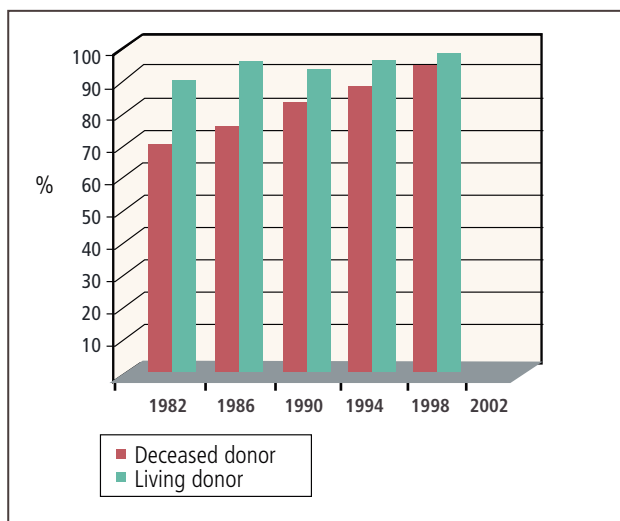
A pesar de la elevada sobrevida de injertos y pacientes en el corto plazo, la sobrevida en el largo plazo no ha mejorado en la misma medida. La pérdida de injertos en el largo plazo contribuye a aumentar la brecha entre oferta y demanda, aumentando la demanda por segundos o terceros trasplantes. Esta revisión tiene por objeto entregar una visión de las principales causas de pérdida de trasplantes renales en el largo plazo y de cómo el mejor monitoreo inmunológico puede contribuir a mejorar los resultados. Es oportuno destacar que los trasplantes de diversos órganos tienen características comunes y características que son específicas para cada órgano. De ello se deduce que los marcadores con valor diagnóstico pueden variar dependiendo del órgano trasplantado. Una revisión más detallada en referencia a marcadores de tolerancia para los diversos órganos se encuentra en el trabajo de Turka LA y Lechler RI (1).

SOBREVIDA DE INJERTOS A CORTO Y LARGO PLAZO

Diversos factores han contribuido a mejorar sustantivamente el pronóstico del trasplante renal. En la década de 1980 fue la introducción de la ciclosporina, en la década de 1990 la introducción de nuevos antivirales y antifúngicos y desde los finales de esa misma década la introducción de la rapamicina, el alemtuzumab y el rituximab. Ello se ha traducido en una sobrevida de órganos y pacientes superior al 90% en el primer año de trasplante (Figura 1).

En el mediano y largo plazo el pronóstico registra también una mejoría. Sin embargo, esta mejoría no alcanza la misma proporción que en el corto plazo (Figura 2) y contribuye substancialmente a la lista de espera (2). Este fenómeno tiene dos componentes. Por un lado, la mortalidad de pacientes con injerto funcionando y por otro lado la pérdida de función del riñón trasplantado.

FIGURA 1.

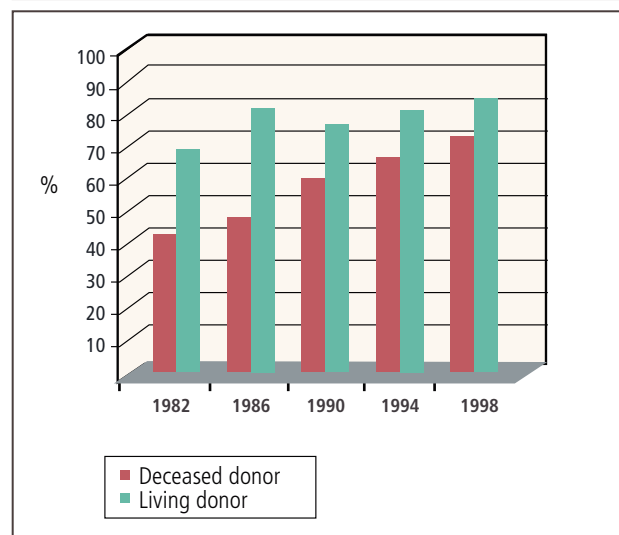


La sobrevida de trasplante renal al primer año ha mejorado en forma continua. USRDS 2005 Annual Data Report: NIH and NIDDK, Bethesda, MD, 2005.

La principal causa de mortalidad es enfermedad cardiovascular, seguido de enfermedades infecciosas y neoplasias (Figura 3) lo que guarda relación con efectos colaterales del tratamiento inmunosupresor.

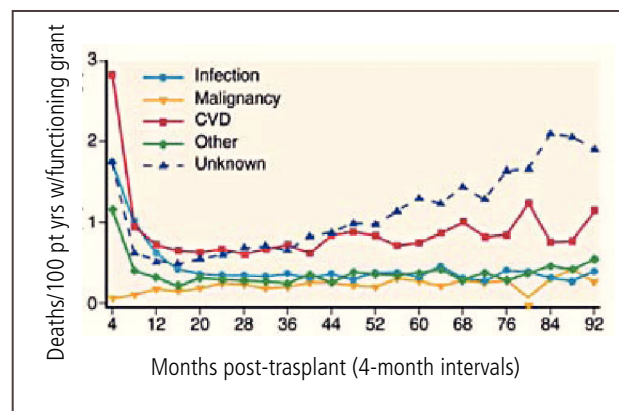
Los medicamentos anticalcineurínicos (ciclosporina, tacrolimus) han significado un enorme progreso en la reducción de los episodios de rechazo agudo. Sin embargo también se relacionan con una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular, neoplasias, infecciones y

FIGURA 2. SOBREVIDA AJUSTADA DEL TRASPLANTE RENAL A LOS 5 AÑOS.



USRDS 2005 Annual Data Report: NIH and NIDDK, Bethesda, MD, 2005.

FIGURA 3. CAUSAS DE MORTALIDAD CON INJERTO FUNCIONANTE, EN FUNCIÓN DEL TIEMPO TRANSCURRIDO DESPUÉS DEL TRASPLANTE



USRDS 2005 Annual Data Report: NIH and NIDDK, Bethesda, MD, 2005.

disfunción del injerto en el largo plazo (3). Los esteroides se utilizan actualmente en dosis muy bajas o se suspenden del todo por su perfil de efectos colaterales. Los inhibidores de la proliferación (azatioprina, micofenolato mofetil o sódico) y los inhibidores mTOR (rapamicina o sirolimus y everolimus) tienen también efectos colaterales significativos que pueden limitar tanto la esperanza de vida como la vida media del trasplante. Por lo tanto, el óptimo sería tener elementos de laboratorio que permitan modular la inmunosupresión en forma individual para evitar tanto fenómenos de rechazo inmunológico como sus efectos colaterales.

Las causas específicas de pérdida del injerto se señalan en la Tabla 1. Entre ellas, la más frecuente es la "nefropatía crónica del injerto". Esta corresponde al cuadro histológico de atrofia tubular, fibrosis intersticial y obsolescencia glomerular. Sus causas son complejas y no se encuentran plenamente esclarecidas (4). Juegan un rol muy importante la edad del donante y del receptor, la causa del fallecimiento, la isquemia fría, la compatibilidad, la ocurrencia de rechazo agudo, la intensidad de características de la inmunosupresión. También juegan un rol importante otros fenómenos como la posible existencia de hipertensión arterial, dislipidemia y, diabetes mellitus. Cualquiera sean las causas, cuando la nefropatía crónica del injerto es detectada por elementos clínicos, ya es irreversible. De allí emanan los esfuerzos dirigidos a prevenir la nefropatía crónica del injerto y a encontrar elementos clínicos y de laboratorio que permitan predecir su aparición en el futuro.

TABLA 1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA DISFUNCIÓN DEL RIÑÓN TRASPLANTADO

1- Nefrotóxicos
2- Nefropatía crónica del injerto
-Daño túbulo-intersticial esclerosante inespecífico
-Rechazo celular crónico
-Rechazo humoral crónico
-Nefrotoxicidad por anticalcineurínicos
-Glomerulopatía del trasplante
3- Rechazo agudo tardío y recurrente
-Falta de adherencia
-Latrogénico/inmunológico
4- Infecciones:
-Nefropatía por virus poliooma
-Pielonefritis recurrente/reflujo vésico-ureteral
5- Glomerulonefritis: recurrencia y de novo
6- Obstrucción del flujo urinario
7- Estenosis de arteria renal

INSTRUMENTOS TRADICIONALES PARA LA EVALUACIÓN FUNCIONAL DEL TRASPLANTE

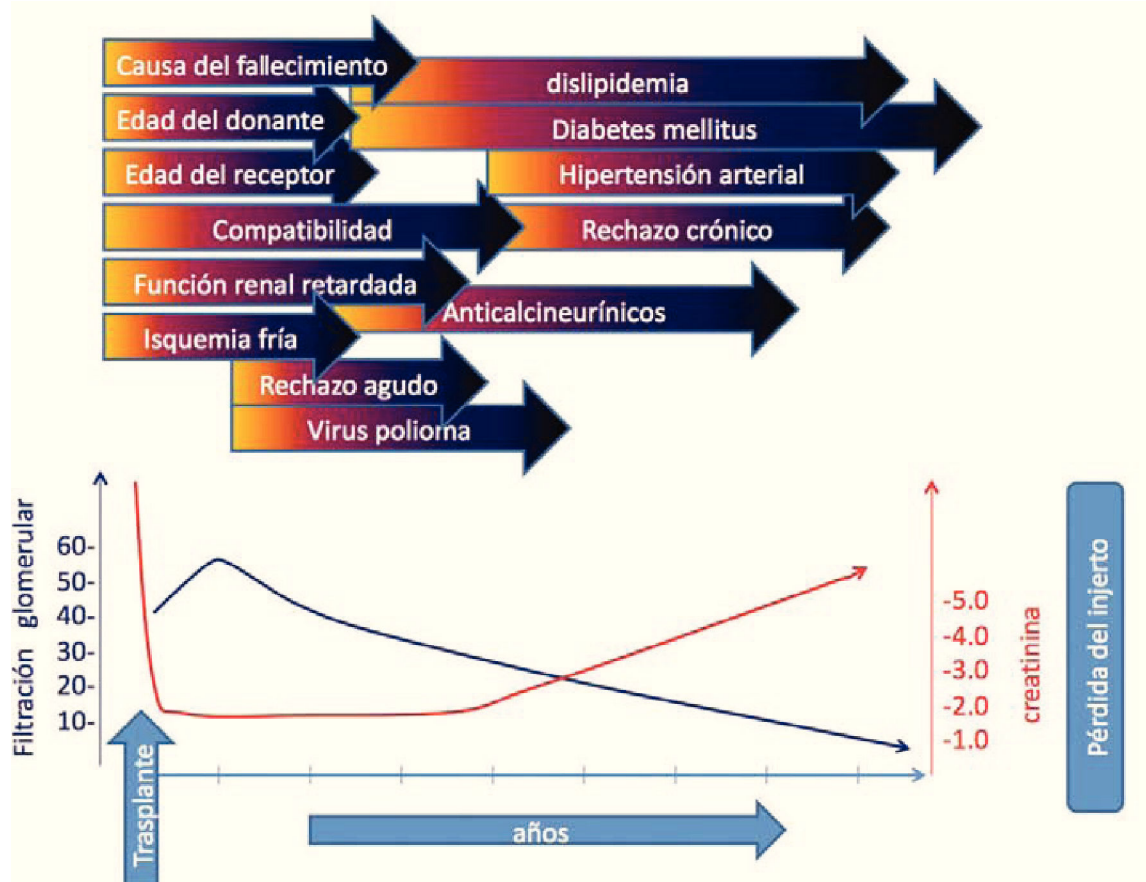
Los instrumentos tradicionales no invasivos como la creatinina o la medición de la filtración glomerular son claramente elementos tardíos, que solamente reflejan el daño ya producido. Los estudios de correlación entre biopsias realizadas regularmente en un protocolo de estudio y la filtración glomerular medida por la creatinina plasmática y métodos cintigráficos ilustran claramente esta afirmación. En el estudio del grupo de Sydney (5) la filtración glomerular alcanza su mejor nivel a los 6 meses con 60 ml/min. Luego, esta hiperfiltración inicial inicia un descenso en paralelo con alteraciones histológicas. Estas consisten en fibrosis intersticial, atrofia tubular, hialinosis arteriolar. Si existe rechazo subclínico este sólo puede observarse en biopsias de protocolo. En este estudio la creatinina sólo registra un alza clínicamente evidente cuando la filtración glomerular alcanza valores de 30 ml/min. (Figura 4). En ese momento en la histología ya se observan alteraciones avanzadas, que incluyen la obsolescencia glomerular. Desde ese momento en adelante, la progresión hacia la insuficiencia renal es una realidad inevitable.

La ecotomografía doppler del riñón trasplantado puede prestar cierta ayuda en el monitoreo. Por un lado es útil para diagnosticar colecciones y obstrucción del flujo urinario. Por otro lado se ha visto que índices de resistencia mayores a 0.8 se correlacionan con un pronóstico más limitado (6). Ello permite identificar pacientes con riesgo muy elevado de pérdida del injerto. Sin embargo, el examen carece de la sensibilidad necesaria para detectar una nefropatía inicial, leve o moderada.

La biopsia renal constituye actualmente el método de referencia para monitorizar la evolución del trasplante. La utilización de agujas automáticas más finas y el apoyo in situ de la ecotomografía han permitido bajar la frecuencia de complicaciones mayores (transfusiones de sangre o intervenciones) en pacientes trasplantados a menos del 1% (7, 8). Por esa razón la biopsia renal se ha convertido en un método prácticamente de rutina en el seguimiento de los pacientes trasplantados. Se trata sin embargo de un método invasivo que tiene morbilidad y costos relacionados. Por último, a pesar de ser el mejor método disponible todavía está lejos de ser perfecto. Entre sus limitantes se cuenta el requerimiento de alta especialización para la interpretación correcta de los resultados. Por otro lado aún cuando la información morfológica es bastante detallada, la información referida a la funcionalidad es limitada.

De lo señalado se desprende la necesidad de disponer de métodos de seguimiento de naturaleza no invasiva que permitan evaluar funcionalmente los diversos aspectos de la respuesta biológica del riñón trasplantado, incluyendo la capacidad de predecir ciertas patologías, antes que ocurran cambios histológicos irreversibles. Estos métodos deben ser capaces de indagar en la condición del sistema inmune previo al trasplante, así como en la interacción del donante y el receptor en forma de ensayos funcionales (9).

FIGURA 4.



En la parte superior se señalan los principales factores incidentes en la disfunción crónica del trasplante renal graficados en función de su tiempo de aparición. En la parte inferior se observa que el alza de creatinina es un marcador tardío en relación a la disminución de la filtración glomerular. Información extraída de los trabajos de Chapman JR, Nankivell BJ et al.

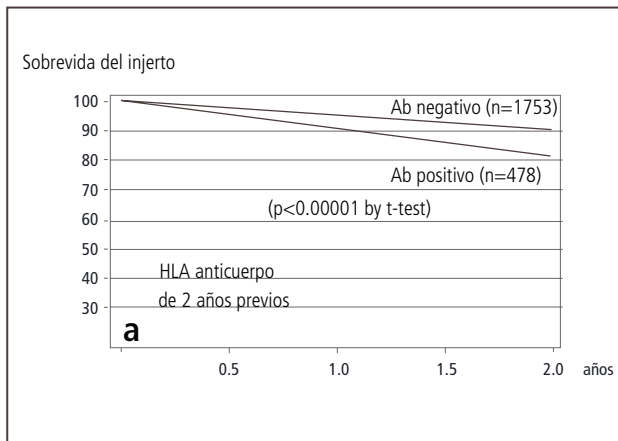
DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI HLA

Peter Morris describió la formación de anticuerpos en pacientes trasplantados en el año 1969 (10). Paul Terasaki fue el primero (11) en estudiar el problema en forma dirigida al realizar mediciones seriadas de anticuerpos durante ocho años en la evolución de 139 pacientes trasplantados renales. 29 de esos pacientes evolucionaron hacia un "rechazo crónico" en ese período. En todos estos pacientes se demostró la formación de anticuerpos anti HLA ya sea preexistentes o de novo. Cuando se analizan los datos en forma retrospectiva en todos los pacientes que perdieron el injerto ($n=14$) se detectó la aparición de anticuerpos previo a la pérdida. Un estudio prospectivo, multicéntrico en 2.231 pacientes (12) ha venido luego a confirmar el valor predictivo de la detección de anticuerpos en la evolución post trasplante (Figura 5).

En pacientes hipersensibilizados (es decir aquellos que presentan anticuerpos anti donante antes del trasplante) se ha estudiado la relación

entre la presencia de anticuerpos anti HLA y la incidencia de rechazo agudo (13). El estudio realizado en 70 pacientes permite extraer las siguientes conclusiones. Por una parte, la presencia niveles elevados de anticuerpos donante-específicos se correlaciona con una mayor incidencia de rechazo humoral agudo. Por otra parte los niveles permanecen bajos en los pacientes que no hacen rechazo humoral agudo, mientras que cuando suben (alrededor del día 10 post trasplante) se observa una elevada incidencia de rechazo humoral (92%).

Sin embargo la evaluación de anticuerpos anti HLA tiene limitaciones. Se ha visto que en algunos pacientes los anticuerpos anti HLA pueden persistir por años sin deterioro aparente de la función renal y que pueden estar presentes en pacientes que cursan con tolerancia operacional (14). Una segunda limitante es la gran variabilidad de las técnicas y falta de estandarización entre los diferentes laboratorios. Las técnicas principales de determinación de anticuerpos anti donante son el cross-

FIGURA 5.

Los pacientes que desarrollan anticuerpos anti HLA tienen una menor supervivencia. Las diferencias se acentúan en función del tiempo transcurrido desde el trasplante. Terasaki PI, Ozawa M.
 Valor predictivo de Ac HLA y creatinina sérica en rechazo crónico: resultados de estudio prospectivo de 2 años.

match por linfocitotoxicidad y el cross-match por citometría de flujo. Las principales técnicas de determinación de anticuerpos anti HLA específicos son el ELISA, la citometría de flujo y el sistema xMAP-Luminex. Recientemente la técnica xMAP-Luminex ha sido adaptada también para la realización de crossmatch.

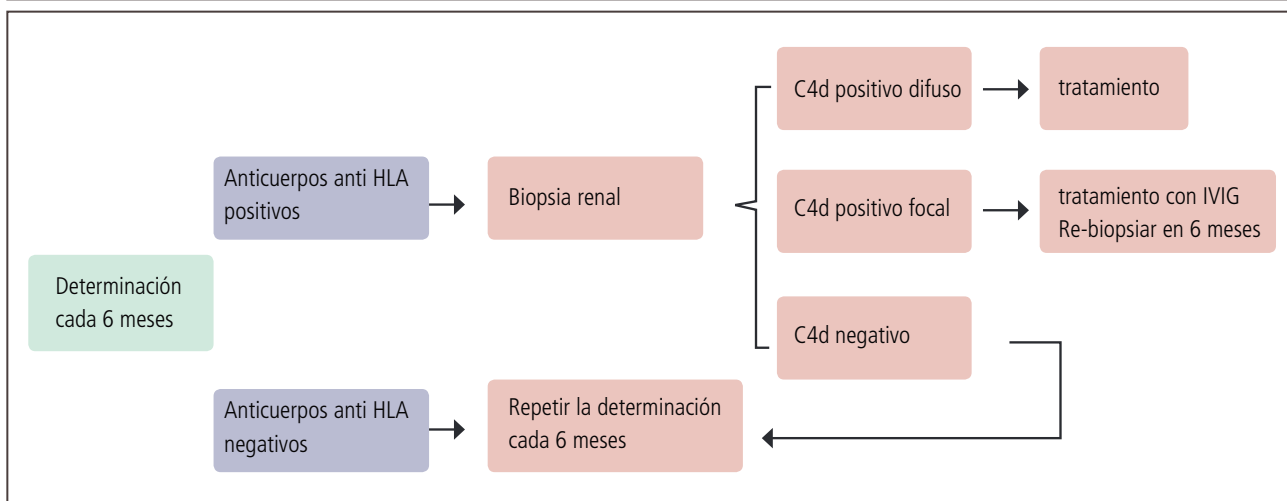
En la práctica, la determinación de anticuerpos anti HLA es un instrumento que permite identificar -tanto antes del trasplante como durante su evolución- aquellos pacientes de mayor riesgo inmunológico, lo que tiene consecuencias terapéuticas. Entre estas no disminuir la inmunosupresión, motivar un estudio histopatológico y eventualmente realizar un tratamiento destinado a disminuir la formación de anticuerpos. Por esa razón se propone realizar esta determinación en forma rutinaria en períodos regulares (Figura 6).

OTROS INSTRUMENTOS EMERGENTES PARA LA EVALUACIÓN FUNCIONAL DEL TRASPLANTE

Determinación de linfocitos T (LT) Aloreactivos

El sistema inmune adaptable reconoce antígenos presentados en el marco del MHC propio. En ese contexto la detección de antígenos presentados por MHC extraño constituye una excepción a la regla y una paradoja en el funcionamiento del sistema inmune. Se estima que la frecuencia de linfocitos T periféricos que reconocen antígenos del donante varía entre el 1 y el 10% dependiendo de los métodos utilizados. Utilizando diversas técnicas se ha comprobado que la cantidad de estos linfocitos "aloreactivos" se correlaciona con la presencia de rechazo en la evolución post trasplante (15) y que las terapias de inducción con anticuerpos benefician especialmente a los pacientes con una frecuencia elevada de LT aloreactivos. Las técnicas más comúnmente empleadas con esta finalidad son las siguientes:

El **cultivo mixto linfocitario**, en su forma más tradicional pone en contacto células del donante irradiadas con células del receptor midien-

FIGURA 6. ALGORITMO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI HLA Y SUS CONDUCTAS DERIVADAS EN PACIENTES CON FUNCIÓN RENAL ESTABLE

Durante el primer año de evolución o si la función renal es fluctuante la determinación debería ser hecha en forma mas frecuente. Clínica Las Condes 2009 (Mayo).
 IVIG: Inmunoglobulinas intravenosas en dosis de 2 grs por kilo de peso, dosis máxima 140 grs.

do la proliferación celular por medio de la incorporación de timidina marcada radioactivamente. Este ensayo creó inicialmente grandes expectativas, sin embargo tiene limitaciones, como el hecho que permite observar sólo la presentación directa y no la presentación indirecta, que en el concepto actual constituye el principal mecanismo de pérdida de injertos en el largo plazo.

El **análisis de dilución limitante** estima la frecuencia de precursores aloreactivos por medio de diluciones seriadas de células respondedoras en contacto con células del donante. El ensayo se mide en términos de producción de citoquinas, de proliferación o citotoxicidad. Utilizando esta metodología se ha observado que un aumento en el número de precursores de LT citotóxicos anticipa un episodio de rechazo agudo durante el primer año de evolución (16). Sus principales limitantes son su laboriosidad y dificultades en la reproducibilidad de los resultados.

La técnica de **ELISPOT** (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot) en su forma más clásica, consiste en poner en contacto células presentadoras del donante (generalmente irradiadas) con respondedoras del receptor en una placa que permite la captura y detección de citoquinas en el lugar en que es secretada. Ello permite la detección a nivel de células individuales, lo que le da una extraordinaria sensibilidad. Esta técnica se utilizó primero para evaluar la presentación directa (17) y luego la presentación indirecta (18). Estudios prospectivos demostraron que la detección de LT productores de interferon gama antes del trasplante constituye un factor de riesgo de rechazo en los primeros meses de evolución (19) que se correlaciona a su vez con la función renal en el corto (20) y largo plazo (21). Por las razones señaladas se ha propuesto su utilización como un análogo del crossmatch para evaluar la reactividad celular antes del trasplante (22). Especialmente interesante podría ser la monitorización de la reactividad de subpoblaciones linfocitarias. Se ha evaluado la respuesta de PBMC comparando antes y después de depletar LT reguladores (CD4+, CD25high), observando en algunos pacientes que la presencia de esta subpoblación disminuye la producción de interferón gama por LT efectores expuestos a presentación indirecta. Esta reacción fue observada en 40 % de los pacientes que no habían experimentado nunca un episodio de rechazo (23).

Experimentos en modelo animal sugieren que la activación seguida de agotamiento y delección de linfocitos T CD8+ aloreactivos constituye un predictor de aceptabilidad y tolerancia (24). Especialmente, LT reactivos en presentación indirecta podrían tener gran importancia en la evolución del trasplante (25).

EL ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE LOS RECEPTORES DE LINFOCITOS T (TCR)

Se basa en la demostración que pacientes que han perdido el injerto renal por rechazo crónico tienen linfocitos infiltrantes cuyo TCR tiene un repertorio fuertemente alterado (26), sugiriendo que un número

limitado de determinantes antigénicas son críticas para estimular el sistema inmune del receptor y provocar una disfunción crónica y pérdida del injerto.

Un fenómeno similar de alteración en el repertorio de TCR, junto a una falta de producción de ciertas citoquinas se observa en pacientes tolerantes al injerto (27).

No existen aún pruebas consistentes que el estudio del repertorio de TCR en forma aislada (por tipificación espectral) constituya un buen instrumento para predecir eventos clínicos. Sin embargo, la utilización de esta técnica puede ser útil en el marco de estudios genómicos complejos. Utilizando estos instrumentos la empresa TcLand, localizada en Nantes ha desarrollado un "Kidney Score" de aceptación o rechazo y ofrece este servicio a pacientes trasplantados (<http://www.tcland-biotech.com/>).

CD30 SOLUBLE (TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY, MEMBER 8)

CD30 es una molécula de superficie perteneciente a la familia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral TNF que se sobre expresa y libera a la circulación luego de la activación de LT. Tanto LT activados de memoria como efectores contribuyen a su concentración circulante (28). Se ha observado una buena correlación entre los niveles de CD30 soluble pre trasplante con la posibilidad de rechazo o pérdida de injerto (29, 30), sin embargo existen también reportes en contrario (31, 32). Existe información en el sentido que su elevación podría ser predictiva de bronquiolitis obliterante en trasplante pulmonar (33). Por tratarse de un marcador inespecífico cuya elevación es característica de infecciones (34) y otros fenómenos como el embarazo (35), es posible que otras variables oscurezcan su valor.

CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS CIRCULANTES

La concentración plasmática de ciertas citoquinas así como la detección de sus mensajeros (36) han sido evaluadas con resultados contradictorios respecto de su posible valor predictivo de disfunción del injerto en trasplante renal o hepático. Se han publicado estudios que asignan un valor predictivo positivo para rechazo a los valores elevados de IL-6 (37) o al balance de TGF beta y PDGF-BB (38). Otros estudios entregan resultados distintos (39). Seguramente su corta vida media, su influencia potencial por múltiples factores no relacionados al trasplante, su distancia al sitio del injerto y sus funciones reverberantes hacen que sus valores sean demasiado fluctuantes y complejos para revelar las interacciones estables entre el huésped y el órgano trasplantado. Una estrategia alternativa es el seguimiento de ciertas citoquinas en los productos del órgano trasplantado. Así por ejemplo, la expresión del mRNA de IL23 e IL17 se encuentra elevada en células de secreción bronquial en pacientes trasplantados de pulmón que cursan con bronquiolitis obliterante (40).

EI ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS constituye un nuevo recurso para monitorizar el sistema inmune del paciente trasplantado. Gracias al conocimiento de marcadores característicos de los diversos grupos celulares su análisis puede realizarse en sangre por medio de citometría de flujo y en tejido por inmunohistoquímica. La subpoblación de linfocitos T reguladores que expresan el factor de transcripción Foxp3 es fácilmente identificable y su análisis ha permitido la introducción de nuevos conceptos en la inmunología del trasplante. En especial, su presencia se encuentra relacionada tanto a tolerancia (41) como a rechazo (42) hacia el órgano trasplantado. En ese sentido existe experiencia publicada que evalúa la presencia de linfocitos T reguladores en relación a LT totales (43), así como LT efectores y de memoria (44).

La detección de diversos tipos de células dendríticas puede constituir también un elemento valioso de monitoreo inmunológico. Se ha observado que aquellos pacientes tolerantes que no tienen inmunosupresión o tienen inmunosupresión mínima tienen una mayor proporción de células dendríticas plasmocitoides (45). Más tarde, el mismo grupo ha demostrado que la razón de PD-L1 (programmed death ligand-1)/CD86 se relaciona con LT reguladores Foxp3+ (46). Un fenómeno que apunta en la misma dirección se observa en pacientes trasplantados de pulmón. En estos pacientes se ha observado que la presencia de bronquiolitis obliterante se asocia a la presencia de células dendríticas más maduras, a una menor cantidad de LT reguladores y a una mayor expresión de CTLA-4 en los LT. Para interpretar adecuadamente la información referida a LT reguladores, debe considerarse que estas células también pueden aumentar en el órgano trasplantado durante los fenómenos de rechazo (47).

La determinación de LT de memoria central y efectores también tiene el potencial para correlacionarse con eventos clínicos como se ha observado en casos aislados tratados con alemtuzumab (48). En otra serie clínica más extensa se ha observado que la incidencia de rechazo agudo al retirar los anticalcineurínicos se correlaciona con una mayor proporción de LT de memoria versus LT reguladores antes de la suspensión (49).

EI ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA incluye diversas técnicas para identificar secuencias específicas del DNA o RNA que a su vez se correlacionan con ciertas funciones del sistema inmune. Para ello utiliza las técnicas de microarray, PCR (Reacción de Polimerasa en Cadena) en tiempo real y recientemente se ha agregado el complejo sistema DASL (DNA-mediated Annealing, Selection, extension and Ligation) (50). El microarray permite el análisis simultáneo de hasta miles de genes en forma no sesgada, mientras que el análisis y cuantificación dirigida de algunos de ellos es dominio del PCR. El sistema DASL permite el análisis de expresión de ciertos genes en tejido fijado en formalina. Para ello "reconstruye" el mRNA alterado y parcialmente degradado (http://www.illumina.com/downloads/WGDASLAssay_Datasheet.pdf).

La principal ventaja del microarray es el análisis simultáneo de gran cantidad de genes, incluso aquellos aparentemente no relacionados con los procesos inmunológicos. Ello equivale a identificar el RNA mensajero de proteínas que no han sido buscadas en forma dirigida. Luego es posible identificarlas y cuantificarlas con la ayuda de PCR, lo que se puede realizar tanto en sangre como en tejido. Ambas técnicas tienen una correlación adecuada (51).

El trasplante hepático ha permitido identificar pacientes en los que la inmunosupresión ha sido suspendida sin efectos negativos para el órgano trasplantado. En esos pacientes se han identificado en sangre periférica los RNA mensajeros de proteínas cuya expresión se manifiesta en forma de patrones característicos (52).

En trasplante renal esa búsqueda se ha iniciado exitosamente tanto en modelos murinos (53) como humanos (54). Recientemente se ha identificado en forma consistente en sangre periférica un set de 343 genes que permite clasificar correctamente a > 80 % de los pacientes (55, 56).

Al restringir el análisis a ciertos grupos celulares se pueden observar fenómenos específicos como la sobreexpresión de transcritos de linfocitos B, células plasmáticas e inmunoglobulinas a lo largo del tiempo (57) o los transcriptomas de LT efectores de memoria y citotóxicos (58).

La misma metodología ha permitido evaluar la expresión génica en relación a rechazo en orina o secreción bronquial, lo que constituye un examen no invasivo y por lo tanto exento de riesgos (59). Ello es especialmente valioso cuando se requiere un monitoreo continuo, como es el diagnóstico de rechazo agudo durante un episodio de necrosis tubular (60).

QUIMERISMO

El estudio de la presencia de células del donante en el receptor constituye un tema central en el trasplante de médula ósea. En trasplante de órganos sólidos se ha detectado la presencia de quimerismo en un número substancial de los pacientes (61, 62). El valor clínico de la presencia de quimerismo ha sido extensamente discutido en la literatura. Existen reportes que plantean que la presencia de quimerismo se correlaciona y sobre todo favorece la inducción de tolerancia (63), sin embargo ello no es sinónimo de un buen predictor del curso clínico del trasplante. Mientras algunos reportes informan su detección como un buen indicador de aceptación del órgano trasplantado (64) otros observan resultados variables (65), faltos de valor predictivo (66) o dependientes del órgano trasplantado (67). Actualmente no se considera la detección de microquimerismo un instrumento útil en el seguimiento de pacientes trasplantados bajo inmunosupresión estándar y su valor podría estar más bien relacionado a los mecanismos posibles de inducción de tolerancia.

La reacción de **HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA TRANSVIVO**

representa otro posible predictor de rechazo o aceptación del injerto. Este tipo de análisis se realiza rutinariamente para evaluar la respuesta inmune frente a antígenos como la tuberculosis. En el caso de pacientes trasplantados se utilizan células de sangre periférica del receptor junto a antígenos del donante obtenidos por sonicación celular y la reacción se observa utilizando ratones portadores de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (68). El estudio por lo tanto constituye un ensayo funcional en el que participan todos los tipos celulares de la sangre periférica del receptor, las proteínas sonicadas del donante y un medio (oreja o pie del animal) con capacidad para secretar citoquinas, reclutar células accesorias y aumentar la permeabilidad vascular. Ello le confiere características que lo distinguen de las reacciones de cultivo mixto linfocitario y le agrega similitud a la situación del trasplante. En contraposición su evaluación es subjetiva y sujeta a factores incontrolables como la variación interindividual de los ratones. Los estudios publicados permiten identificar pacientes hiporespondedores en los cuales se ha retirado la inmunosupresión (69, 70). Sin embargo, en estudios clínicos más amplios no se ha podido demostrar el valor predictivo de este examen (71). Su importancia principal es que ha permitido observar detalladamente fenómenos relacionados a la patogenia de la aceptación y rechazo (72).

La REACTIVIDAD DE LT LUEGO DE ACTIVACIÓN POLICLONAL medida por la producción de ATP es un ensayo funcional que entrega una medida de la inmunoreactividad inespecífica y por esa vía un estimado del nivel global de inmunosupresión. La activación de LT puede realizarse con PHA y su activación puede ser medida por la expresión de marcadores de superficie como CD69 (73) o la concentración de ATP. La última técnica, con el nombre de ImmuKnow ha alcanzado cierto desarrollo luego de su aprobación por la FDA (<http://www.cylex.net/products.html>).

En principio, sangre entera es incubada con PHA por 15-18 hrs. Se separan LT CD4+ por método inmunomagnético, se lisan las células y se mide el ATP liberado utilizando luciferasa como trazador. La lectura se realiza en un luminómetro comercial. Un estudio multicéntrico ha permitido establecer valores normales así como valores predictivos de infección o de rechazo (74). Existe información reciente en el sentido que sus resultados se correlacionan con la aparición de rechazo agudo precoz (75).

CONCLUSIONES

Los métodos tradicionales de vigilancia de la función del trasplante renal no permiten la detección temprana de una respuesta inmune de rechazo, especialmente crónico. Los niveles de creatinina se elevan tardíamente, en general cuando existen alteraciones histológicas irreversibles. Ello hace necesario la incorporación de nuevas tecnologías que permitan monitorizar tanto la respuesta inmune como los efectos biológicos de la terapia inmunosupresora.

Los últimos dos años han registrado avances importantes para monitorizar en mejor forma la respuesta inmune en pacientes trasplantados. Especialmente la detección de anticuerpos anti HLA se está introduciendo rápidamente en la práctica clínica. Otros métodos todavía experimentales permiten tener información más detallada tanto de la respuesta inmune celular como humoral. Para ello hacen uso tanto de modelos funcionales como de detección de proteínas o expresión génica de ciertos marcadores. La tarea del momento se centra en la necesidad de validar los mejores marcadores. La utilización de estas nuevas herramientas pavimenta el camino para una medicación ajustada a las necesidades individuales de cada paciente. De esa forma las nuevas formas de monitoreo representan el inicio de una nueva era en trasplantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Turka LA, Lechler RI. Towards the identification of biomarkers of transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jul;9(7):521-6.
2. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B: Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant*. 2004; 4:378-383.
3. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Feb;4(2):481-508.
4. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-2333.
5. Chapman JR, O'Connell PhJ, Nankivell BJ. Chronic allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3015-3026.
6. Radermacher J, Mengel M, Ellis S, Stucht S, Hiss M, Schwarz A, et al. H. The renal arterial resistance index and renal allograft survival. *N Engl J Med*. 2003 Jul 10;349(2):115-24.
7. Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am J Transplant*. 2005 Aug;5(8):1992-6.
8. Furness PN et al Protocol biopsy of the stable renal transplant: A multicenter study of methods and complications rates. *Transplantation* 2003; 76: 969-973.

9. Sawitzki B, Pascher A, Babel N, Reinke P, Volk HD. Can we use biomarkers and functional assays to implement personalized therapies in transplantation? *Transplantation*. 2009 Jun 15;87(11):1595-601.
10. Morris PJ, Mickey MR, Singal DP, et al. Serotyping for homotransplantation, XXII: specificity of cytotoxic antibodies developing after renal transplantation. *Br Med J*. 1969; 1: 758.
11. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, Tsai A, Lei HY. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*. 2002 Oct 27;74(8):1192-4.
12. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation*. 2005 Nov 15;80(9):1194-7.
13. Burns JM, Cornell LD, Perry DK, Pollinger HS, Gloor JM, Kremers WK, et al. Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2008 Dec;8(12):2684-94.
14. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 1017.
15. van der Mast BJ, van Besouw NM, de Kuiper P, Vaessen LM, Gregoor PJ, IJzermans JN, van Gelder T, Claas FH, Weimar W. Pretransplant donor-specific helper T cell reactivity as a tool for tailoring the individual need for immunosuppression. *Transplantation*. 2001 Sep 15;72(5):873-80.
16. Mestre M, Massip E, Bas J, Alsina J, Romeu A, Castela AM, Buendia E, et al. Longitudinal study of the frequency of cytotoxic T cell precursors in kidney allograft recipients. *Clin Exp Immunol*. 1996 Apr;104(1):108-14.
17. Merville P, Pouteil-Noble C, Wijdenes J, Potaux L, Touraine JL, Banchereau J. Detection of single cells secreting IFN-gamma, IL-6, and IL-10 in irreversibly rejected human kidney allografts, and their modulation by IL-2 and IL-4. *Transplantation*. 1993 Mar;55(3):639-46.
18. Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jan;13(1):252-9.
19. Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schönmann C, Tullius SG, et al. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation*. 2004 Dec 15;78(11):1640-6.
20. Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2003 Jul;3(7):878-84.
21. Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, Schoenemann C, Boenisch O, Sefrin A, et al. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Jul;19(7):1419-29.
22. Augustine JJ, Siu DS, Clemente MJ, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE. Pre-transplant IFN-gamma ELISPOTs are associated with post-transplant renal function in African American renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005 Aug;5(8):1971-5.
23. Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun;14(6):1643-51.
24. Steger U, Denecke C, Sawitzki B, Karim M, Jones ND, Wood KJ. Exhaustive differentiation of alloreactive CD8+ T cells: critical for determination of graft acceptance or rejection. *Transplantation*. 2008 May 15;85(9):1339-47.
25. Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Chronic graft loss. Immunological and non-immunological factors. *Contrib Nephrol*. 2005;146:54-64.
26. Gagne K, Brouard S, Giral M, Seville F, Moreau A, Guillet M, et al. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1553-63.
27. Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):330-40.
28. Saini D, Ramachandran S, Nataraju A, Benshoff N, Liu W, Desai N, et al. Activated effector and memory T cells contribute to circulating sCD30: potential marker for islet allograft rejection. *Am J Transplant*. 2008 Sep;8(9):1798-808.
29. Wang D, Wu GJ, Wu WZ, Yang SL, Chen JH, Wang H, et al. Pre- and post-transplant monitoring of soluble CD30 levels as predictor of acute renal allograft rejection. *Transpl Immunol*. 2007 Jun;17(4):278-82.
30. Heinemann FM, Rebmann V, Witzke O, Philipp T, Broelsch CE, Grosse-Wilde H. Association of elevated pretransplant sCD30 levels with graft loss in 206 patients treated with modern immunosuppressive therapies after renal transplantation. *Transplantation*. 2007 Mar 27;83(6):706-11.
31. Kovac J, Arnol M, Vidan-Jeras B, Bren AF, Kandus A. Does pretransplant soluble CD30 serum concentration affect deceased-donor kidney graft function 3 years after transplantation? *Transplant Proc*. 2008 Jun;40(5):1357-61.
32. Giannoli C, Bonnet MC, Perrat G, Houillon A, Reydet S, Pouteil-Noble C, Villar E, et al. High pretransplantation soluble CD30 levels: impact in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2007 Oct;39(8):2574-5.
33. Golocheikine AS, Saini D, Ramachandran S, Trulock EP, Patterson A, Mohanakumar T. Soluble CD30 levels as a diagnostic marker for bronchiolitis obliterans syndrome following human lung transplantation. *Transpl Immunol*. 2008 Jan;18(3):260-3. Epub 2007 Sep 11.
34. Bharat A, Narayanan K, Golocheikine A, Steward N, Crippin J, Lisker-Melman M, et al. Elevated soluble CD30 characterizes patients with hepatitis C virus-induced liver allograft cirrhosis. *Transplantation*. 2007 Dec 27;84(12):1704-7.
35. Kusanovic JP, Romero R, Hassan SS, Gotsch F, Edwin S, Chaiworapongsa T, et al. Maternal serum soluble CD30 is increased in normal pregnancy, but decreased in preeclampsia and small for gestational age pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2007 Dec;20(12):867-78.
36. Brabcova I, Petrsek J, Hribova P, Hyklova K, Bartosova K, Lacha J, et al. Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation. *Transplantation*. 2007 Oct 27;84(8):1037-44.
37. Berber I, Yiğit B, İyitmangil G, Tellioglu G, Özgezer T, Güle S, et al. Evaluation of pretransplant serum cytokine levels in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2008 Jan-Feb; 40(1):92-3.
38. Pozzetto U, Abeni D, Citterio F, Castagneto M, Capogrossi MC, Facchiano A. Balance of transforming growth factor-beta1 and platelet-derived growth factor-BB is associated with kidney allograft rejection. *Ann Clin Biochem*. 2008 Mar;45(Pt 2):213-4.
39. Kita Y, Iwaki Y, Noguchi K, Griffith BP, Tzakis AG, Todo S, et al. Daily serum interleukin-6 monitoring in multiple organ transplantation with or without liver allografts. *Transplant Proc*. 1996 Jun;28(3):1229-34.
40. Vanaudenaerde BM, De Vleeschauwer SI, Vos R, Meyts I, Bullens DM,

Reynders et al. The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2008 Sep;8(9):1911-20.

41. Bestard O, Cruzado JM, Mestre M, Caldés A, Bas J, Carrera M, et al. Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4901-9.

42. Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, Sis B, Einecke G, Mengel M, et al. FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant*. 2008 Jul;8(7):1423-33.

43. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón et al. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Oct;19(10):2020-6.

44. Kreijveld E, Koenen HJ, van Cranenbroek B, van Rijssen E, Joosten I, Hilbrands LB. Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS ONE*. 2008 Jul 16;3(7):e2711.

45. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):314-22.

46. Tokita D, Mazariegos GV, Zahorchak AF, Chien N, Abe M, Raimondi G, et al. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation*. 2008 Feb 15;85(3):369-77.

47. Stenard F, Nguyen C, Cox K, Kambham N, Umetsu DT, Krams SM, et al. et al. Decreases in circulating CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) cells and increases in intragraft FOXP3(+) cells accompany allograft rejection in pediatric liver allograft recipients. *Pediatr Transplant*. 2008 Mar 10.

48. Trzonkowski P, Zilvetti M, Friend P, Wood KJ. Recipient memory-like lymphocytes remain unresponsive to graft antigens after CAMPATH-1H induction with reduced maintenance immunosuppression. *Transplantation*. 2006 Nov 27;82(10):1342-51.

49. Kreijveld E, Koenen HJ, van Cranenbroek B, van Rijssen E, Joosten I, Hilbrands LB. Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS ONE*. 2008 Jul 16;3(7):e2711.

50. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene Expression in Fixed Tissues and Outcome in Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2008 Oct 15.

51. Allanach K, Mengel M, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Mueller T, et al. Comparing microarray versus RT-PCR assessment of renal allograft biopsies: similar performance despite different dynamic ranges. *Am J Transplant*. 2008 May;8(5):1006-15.

52. Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest*. 2008 Aug;118(8):2845-57.

53. Sawitzki B, Bushell A, Steger U, Jones N, Risch K, Siepert A, et al. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant*. 2007 May;7(5):1091-102.

54. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with

operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15448-53.

55. Braud C, Baeten D, Giral M, Pallier A, Ashton-Chess J, Braudeau C, et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *J Cell Biochem*. 2008 Apr 15;103(6):1681-92.

56. Sivozhlezov V, Braud C, Giacomelli L, Pechkova E, Giral M, Soullillou JP, et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplants recipients. Part II. Non-statistical gene microarray analysis. *J Cell Biochem*. 2008 Apr 15;103(6):1693-706.

57. Einecke G, Reeve J, Mengel M, Sis B, Bunnag S, Mueller TF, Halloran PF. Expression of B cell and immunoglobulin transcripts is a feature of inflammation in late allografts. *Am J Transplant*. 2008 Jul;8(7):1434-43.

58. Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K, Mengel M, Sis B, Mueller TF, Halloran PF. The transcriptome of human cytotoxic T cells: measuring the burden of CTL-associated transcripts in human kidney transplants. *Am J Transplant*. 2008 Mar;8(3):637-46.

59. Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation*. 2008 Jul 27;86(2):192-9.

60. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ, Gonçalves LF, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int*. 2008 Apr;73(7):877-84.

61. Starzl T. E., Demetris A. J., Trucco M., Murase N., Ricordi C., Ildstad S., et al. (1993) *Hepatology* 17:, 1127-1152.

62. Elwood ET, Larsen CP, Maurer DH, Routenberg KL, Neylan JF, Whelchel JD, et al. Microchimerism and rejection in clinical transplantation. *Lancet*. 1997 May 10;349(9062):1358-60.

63. Starzl TE. Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14607-14.

64. Fu YW, Wang WG, Zhou HL, Cai L. Presence of donor-and-recipient-derived DNA microchimerism in the cell-free blood samples of renal transplantation recipients associates with the acceptance of transplanted kidneys. *Asian J Androl*. 2006 Jul;8(4):477-82.

65. Hisanaga M, Hundrieser J, Böker K, Uthoff K, Raddatz G, Wahlers T, et al. Development, stability, and clinical correlations of allogeneic microchimerism after solid organ transplantation. *Transplantation*. 1996 Jan 15;61(1):40-5.

66. Norris S, Lawler M, McCann S, Hegarty J, O'Farrelly C. Donor type microchimerism is an infrequent event following liver transplantation and is not associated with graft acceptance. *Hepatology*. 1997 Oct;26(4):848-52.

67. Reinsmoen NL, Jackson A, McSherry C, Ninova D, Wiesner RH, Kondo M, et al. Organ-specific patterns of donor antigen-specific hyporeactivity and peripheral blood allogeneic microchimerism in lung, kidney, and liver transplant recipients. *Transplantation*. 1995 Dec 27;60(12):1546-54.

68. Carrodeguas L, Orosz CG, Waldman WJ, Sedmak DD, Adams PW, Van-Buskirk AM. Trans vivo analysis of human delayed-type hypersensitivity reactivity. *Hum Immunol* 1999; 60: 640.

69. Carrodeguas L, Orosz CG, Waldman WJ, et al. Trans vivo analysis of human delayed-type hypersensitivity reactivity. *Hum Immunol* 1999; 60: 640.

70. Jankowska-Gan E, Rhein T, Haynes LD, et al. Human liver allograft acceptance and the tolerance assay. II. Donor HLA-A, -B but not DR antigens are able to

trigger regulation of DTH. Hum Immunol 2002; 63: 862. Hum Immunol. 2007 Jun;68(6):514-22. Epub 2007 Mar 28.

71. Pelletier RP, Bickerstaff AA, Adams PW, Orosz CG. Evaluation of immune regulation in transplant patients using the trans vivo delayed type hypersensitivity assay. Hum Immunol. 2007 Jun;68(6):514-22. Epub 2007 Mar 28.

72. Warnecke G, Chapman SJ, Bushell A, Hernandez-Fuentes M, Wood KJ. Dependency of the trans vivo delayed type hypersensitivity response on the action of regulatory T cells: implications for monitoring transplant tolerance. Transplantation. 2007 Aug 15;84(3):392-9.

73. Lindsey WB, Lowdell MW, Marti GE, Abbasi F, Zenger V, King KM, et al. CD69 expression as an index of T-cell function: assay standardization, validation and use in monitoring immune recovery. Cytotherapy. 2007;9(2):123-32.

74. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. Transplantation. 2006 Sep 15;82(5):663-8.

75. Reinsmoen NL, Cornett KM, Kloehn R, Burnette AD, McHugh L, Flewellen BK, et al. Pretransplant donor-specific and non-specific immune parameters associated with early acute rejection. Transplantation. 2008 Feb 15;85(3):462-70.

El autor declara no tener conflictos de interés, en relación a este artículo.