

Potencial de marcadores genéticos para predecir la tolerancia al injerto hepático

MARIA-CARLOTA LONDOÑO Y ALBERTO SÁNCHEZ-FUEYO

Servicio de Hepatología, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, CIBERhd, Barcelona, España.

Puntos clave

- Aproximadamente un 20% de los receptores de trasplante hepático mantienen la función del injerto en ausencia de inmunosupresión, fenómeno conocido como tolerancia operacional.
- El uso de marcadores transcripcionales de expresión genética es la estrategia más prometedora para la identificación de los pacientes operacionalmente tolerantes.
- Estudios retrospectivos han evidenciado que los pacientes tolerantes presentan un perfil transcripcional tanto en sangre como en tejido que los diferencia de los pacientes no tolerantes.
- Las vías funcionales relacionadas con los genes diferentemente expresados entre tolerantes y no tolerantes involucran a linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos *natural killer* y vías de señalización intracelular.
- Se espera que los estudios prospectivos que se están llevando a cabo actualmente permitan en el futuro desarrollar tests para predecir tolerancia.



La supervivencia del injerto a largo plazo generalmente requiere la utilización de fármacos inmunosupresores de por vida. Ello supone un aumento en el riesgo de infecciones, complicaciones metabólicas, neoplasias y toxicidad farmacológica¹⁻⁴. Por ello es esencial minimizar el uso de estos fármacos y desarrollar estrategias alternativas para inducir y mantener la tolerancia.

El hígado es un órgano privilegiado desde el punto de vista inmunológico, y ello se refleja en la ausencia de efecto deletéreo de los episodios de rechazo agudo en la supervivencia del injerto y la baja incidencia de rechazo crónico. Por dicho motivo, el hígado es el escenario ideal para realizar estrategias de minimización y/o retirada de la inmunosupresión. Actualmente no se dispone de herramientas que permitan identificar a los pacientes que pueden beneficiarse de estas estrategias. Aquí se comentan los estudios más relevantes que evalúan la utilidad de los marcadores genéticos en la identificación de este subgrupo de pacientes.

TOLERANCIA OPERACIONAL

En aproximadamente un 20% de los receptores de trasplante hepático, la función del injerto puede mantenerse indefinidamente en ausencia de fármacos inmunosupresores. Este fenómeno se conoce como tolerancia operacional y es la prueba de que la tolerancia inmunológica se puede lograr en humanos (tabla 1)⁵⁻¹³. Estudios prospectivos publicados en forma de resumen indican que la prevalencia de tolerancia operacional podría ser más alta^{14,15}. Como ya se ha mencionado, actualmente no se dispone de herramientas diagnósticas fidedignas para identificar a los pacientes potencialmente tolerantes, y por ello la mayoría de los receptores de trasplante hepático continúan recibiendo inmunosupresión indefinidamente. Sin embargo, en los últimos años se han publicado numerosos estudios que evalúan estrategias para identificar a los pacientes potencialmente tolerantes (tabla 2)¹⁶. Entre ellas, el uso de marcadores transcripcionales de expresión genética empleando chips genéticos (*microarrays*) o la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) son las más prometedoras.

BIOMARCADORES TRANSCRIPCIONALES DE TOLERANCIA OPERACIONAL EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

En 2007, Martínez-Llordella et al¹⁷ publicaron el primer estudio evaluando la utilidad de los marcadores de expresión genética en receptores de trasplante hepático. En ese estudio, se comparó a 16 receptores tolerantes con 16 no tolerantes (definidos como los pacientes que sufrieron rechazo agudo tras un intento de retirar la inmunosupresión; en el momento del estudio todos los episodios de rechazo estaban resueltos y los pacientes recibían tratamiento inmunosupresor a dosis baja) mediante análisis de *microarrays* de oligonucleótidos (Affymetrix) en ARN obtenido de células mononucleares (CMN) extraídas de sangre periférica. Se encontraron 628 genes expresados de manera diferente en uno y otro grupo (462 sobreexpresados y 166 infraexpresados [FDR < 1%]), 22 de los cuales fueron validados por RT-PCR. Entre ellos se encontraron genes que codifican para receptores de linfocitos T $\gamma\delta$ y *natural killer* (NK) y genes que participan en

Tabla 2. Técnicas estudiadas para identificar a los pacientes tolerantes

Marcadores de expresión genética	KLRF 1 y SLAMF7 Polimorfismos de TNF α Polimorfismos de interleucina 10
Función de linfocitos T	CD4+ CD25+ Foxp3+ Células Vd1+ T Vd1+/Vd2T Células <i>natural killer</i> Células CD154+
Células dendríticas	pDC/mDC
Otros	HLA-G soluble Anticuerpos específicos de donante Interleucina 17 Interleucina 23

Tabla 1. Tolerancia operacional en el trasplante hepático: experiencia con protocolos de retirada electiva de inmunosupresión

Año	Autor	Sujetos, n	Tiempo desde TH (años)	Éxito, %	Rechazo agudo/crónico, %
1997	Mazariegos ⁵	95	8,4 (1,7-25)	19	26/0
1998	Devlin ⁶	18	6,5 (5-10)	16,7	28/5,6
2005	Girlanda ⁷				
2001	Takatsuki ⁸	26	> 2	23,8	12/0
2005	Eason ⁹	18	> 6 meses	5,6	61/0
2005	Tryphonopoulos ¹⁰	104	4	19	67/1,9
2006	Tissone ¹¹	34	5,3	23,4	76,4/0
2007	Assy ¹²	26	4,6	8	58/0
2008	Pons ¹³	21	5,2 (24-127)	38	22/0

TH: trasplante hepático.

vías de señalización del receptor de la interleucina 2, la regulación de la transcripción, el procesamiento de ARNm, la síntesis de proteínas, la reparación del ADN y el control del ciclo celular. El perfil de expresión genética estaba significativamente influido por la presencia de infección por el virus de la hepatitis C, ya que estos pacientes (el 50% de los pacientes tolerantes y el 75% de los pacientes no tolerantes) presentaron una sobreexpresión de genes proinflamatorios.

Posteriormente, Kawasaki et al¹⁸ realizaron un estudio similar comparando los perfiles de expresión genética en muestras obtenidas de CMN extraídas de sangre periférica (Agilent cDNA microarray) de 11 pacientes tolerantes receptores de trasplante hepático de donante vivo con 11 controles sanos. Se encontraron 717 expresados de manera diferente en uno y otro grupo, muchos de los cuales participaban en respuestas inmunitarias. Diez genes fueron validados por PCR.

Un segundo estudio publicado por Martínez-Llordella¹⁹ validó los resultados mencionados previamente en una cohorte de pacientes más grande. En este estudio se evaluó a 17 pacientes tolerantes y 21 no tolerantes. Tras realizar diferentes algoritmos predictivos, se identificaron tres huellas genéticas con 2, 6 y 7 genes, respectivamente, capaces de predecir el estado de tolerancia con una alta precisión (tasa de error entre el 3 y el 6% en el grupo de estudio). Estos tres grupos de genes también fueron capaces de clasificar correctamente a los pacientes como tolerantes o no tolerantes en una cohorte de validación independiente (tasa de error entre el 13 y el 17%). Asimismo, después de realizar análisis funcionales, se encontró que algunas vías de señalización relacionadas con linfocitos T $\gamma\delta$ y células NK se asociaban de forma significativa con el estado de tolerancia. Estos genes están siendo validados en un estudio prospectivo multicéntrico europeo de retirada de inmunosupresión, en el que las muestras de sangre se obtienen antes de iniciar la retirada de la inmunosupresión.

Pons et al¹³ evaluaron la expresión de *FoxP3* (*forkhead box P3*; considerado el gen maestro de las células T reguladoras) durante el proceso de retirada de la inmunosupresión en 12 receptores de trasplante hepático estables en tratamiento inmunosupresor con ciclosporina. Los autores encontraron un aumento de 3,5 veces en la expresión de ARNm de *FoxP3* antes de la retirada completa del tratamiento inmunosupresor en los pacientes tolerantes. Este aumento en la expresión de *FoxP3* se mantuvo después de la retirada del tratamiento.

BIOMARCADORES TRANSCRIPCIONALES DE TOLERANCIA OPERACIONAL EN MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO

En un estudio realizado por Li et al²⁰, se determinó la expresión de *FoxP3* en el tejido hepático. Los autores encontraron un aumento en la expresión de *FoxP3* en pacientes tolerantes cuando se los comparó con pacientes estables o con rechazo crónico.

Más recientemente, Bohne et al²¹ realizaron un estudio comparando el perfil de expresión genética (mediante Illumina, Affymetrix y TaqMan PCR) en tejido hepático de 28 pacientes tolerantes y 33 no tolerantes incluidos en un estudio prospectivo de retirada de inmunosupresión. Las muestras de tejido se ob-

tuvieron antes de iniciar la retirada de inmunosupresión. Las diferencias entre tolerantes y no tolerantes fueron muy pequeñas, con sólo 21 genes expresados de manera diferente en uno y otro grupo (FDR < 5%). Las vías funcionales más relevantes representadas en estos genes estaban relacionadas con el metabolismo del hierro y la activación de las células T.

CONCLUSIONES

Se ha comunicado tolerancia operacional en aproximadamente un 20% de los receptores de trasplante hepático, aunque podría ser más prevalente en periodos tardíos del trasplante. Aunque no existen marcadores fidedignos que identifiquen a los pacientes tolerantes, algunos estudios han encontrado que los pacientes tolerantes presentan un perfil de expresión genética tanto en sangre periférica como en tejido hepático que los diferencia de los pacientes no tolerantes. La diferencia en los patrones de expresión podría constituir la base del desarrollo de test de tolerancia.

BIBLIOGRAFÍA



1. Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med*. 2005;352:1371-3.
2. Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, et al. End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation*. 2001;72:1934-9.
3. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*. 1999;397:530-4.
4. Romagnoli J, Citterio F, Violi P, Cadeddu F, Nanni G, Castagneto M. Post-transplant diabetes mellitus: a case-control analysis of the risk factors. *Transpl Int*. 2005;18:309-12.
5. Mazariegos GV, Reyes J, Marino IR, Demetris AJ, Flynn B, Irish W, et al. Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1997;63:243-9.
6. Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27:926-33.
7. Giralda R, Rela M, Williams R, O'Grady JG, Heaton ND. Long-term outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37:1708-9.
8. Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Sakamoto S, Hayashi M, Ueda M, et al. Analysis of alloreactivity and intra-graft cytokine profiles in living donor liver transplant recipients with graft acceptance. *Transpl Immunol*. 2001;8:279-86.
9. Eason JD, Cohen AJ, Nair S, Alcantera T, Loss GE. Tolerance: is it worth the risk? *Transplantation*. 2005;79:1157-9.
10. Tryphonopoulos P, Tzakis AG, Weppeler D, Garcia-Morales R, Kato T, Madariaga JR, et al. The role of donor bone marrow infusions in withdrawal of immunosuppression in adult liver allotransplantation. *Am J Transplant*. 2005;5:608-13.
11. Tisone G, Orlando G, Cardillo A, Palmieri G, Manzia TM, Baiocchi L, et al. Complete weaning off immunosuppression in HCV liver transplant recipients is feasible and favourably impacts on the progression of disease recurrence. *J Hepatol*. 2006;44:702-9.
12. Assy N, Adams PC, Myers P, Simon V, Minuk GY, Wall W, et al. Randomized controlled trial of total immunosuppression withdrawal in liver transplant recipients: role of ursodeoxycholic acid. *Transplantation*. 2007;83:1571-6.
13. Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramirez P, Martínez-Alarcon L, Sanchez-Bueno F, et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation*. 2008;86:1370-8.
14. Benitez C, Lozano JJ, Martínez-Llordella M. Use of transcriptional biomarkers to identify liver transplant recipients who can successfully discontinue immunosuppressive therapy. *Am J Transplant*. 2010;10 Suppl 4:Abstract 517.
15. Feng S, Ekong U, Lobritto S. ITN029ST: Immunosuppression Withdrawal in Pediatric Recipients of Parental Living Donor Liver Transplants: preliminary results of a pilot study. *Am J Transplant*. 2009;9 Suppl 2:Abstract 189.
16. Castellana A, Thomson AW, Nayyar N, De Vera M, Mazariegos GV. Monitoring the operationally tolerant liver allograft recipient. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:28-34.

17. Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007;7:309-19.
18. Kawasaki M, Iwasaki M, Koshiba T, Fujino M, Hara Y, Kitazawa Y, et al. Gene expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant living-donor liver transplant recipients. *Int Surg.* 2007;92:276-86.
19. 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;118:2845-57.
20. Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, et al. The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation.* 2008;86:1837-43.
21. Bohne F, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, López M, Benitez C, Miquel R, et al. Transcriptional profiling of liver grafts in spontaneous operational tolerance [citado Ago 2010]. Disponible en: <http://www.transplantation2010.org>

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Lerut J, Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6:1774-80.

Revisión de las definiciones de tolerancia y diferentes experiencias en el trasplante hepático.

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;118:2845-57.

Tras aplicar diferentes algoritmos bioinformáticos, los autores encuentran tres huellas genéticas capaces de identificar a los pacientes tolerantes.

Castellaneta A, Thomson AW, Nayyar N, de Vera M, Mazariegos GV. Monitoring the operationally tolerant liver allograft recipient. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15:28-34.

Revisión de diferentes técnicas empleadas para identificar a pacientes tolerantes.

Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology.* 2011;140:51-64.e2

Excelente revisión sobre los mecanismos inmunológicos de la tolerancia y utilidad de biomarcadores para identificar a pacientes tolerantes en diferentes trasplantes de órgano sólido.