Utilización de marcadores transcripcionales en el diagnóstico de la tolerancia al injerto hepático

A. Sánchez-Fueyo
Servei d'Hepatologia, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona
CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), España

Resumen: *La supervivencia a largo plazo de los pacientes sometidos a un aloinjerto requiere medicación inmunosupresora de por vida, con el consiguiente riesgo de sufrir infecciones, complicaciones metabólicas, neoplasias y toxicidad farmacológica. Por ello, resulta esencial minimizar el uso de fármacos inmunosupresores y desarrollar estrategias alternativas que permitan inducir y mantener la tolerancia al trasplante. En este sentido, el aloinjerto hepático constituye un órgano inmunológicamente aventajado, tal como indican su baja incidencia de rechazos agudos o crónicos y su resistencia a las agresiones inducidas por anticuerpos. En consecuencia, el trasplante hepático constituye un escenario ideal para considerar la posible reducción o retirada de la inmunosupresión en un número determinado de pacientes. Sin embargo, en la actualidad, la identificación de dichos pacientes constituye todavía un objetivo difícilmente alcanzable, debido a la insuficiente validación de posibles métodos inmunológicos que permitan evaluar la tolerancia específica frente al donante. En este contexto, el mantenimiento de por vida de los inmunosupresores representa todavía el enfoque terapéutico común para la mayoría de los pacientes receptores de un trasplante. A pesar de la inexistencia de marcadores fiables que permitan identificar los pacientes tolerantes, algunos estudios recientes han evidenciado determinados patrones transcripcionales de tejido hepático y sangre periférica específicos de pacientes tolerantes a un trasplante hepático. Estas diferencias en los patrones de expresión podrían constituir la base para una futura prueba diagnóstica de tolerancia.*

Palabras clave: Aloinjerto – Marcadores transcripcionales – Tolerancia – Trasplante hepático.

Introducción

La supervivencia del injerto a largo plazo generalmente requiere el empleo de fármacos inmunosupresores de por vida. Ello supone un aumento en el riesgo de infecciones, complicaciones metabólicas, neoplasias y toxicidad farmacológica.[1-4] 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 ve reflejado en la ausencia de un efecto deletéreo a largo plazo sobre el injerto de los episodios de rechazo agudo y la baja incidencia de rechazo crónico. Por este motivo, el hígado constituye el escenario ideal para realizar estrategias de minimización o retirada de la inmunosupresión. En la actualidad no se dispone de herramientas que permitan identificar los pacientes que pueden beneficiarse de estas estrategias. Aquí se comentarán 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 un trasplante hepático, la función del injerto puede mantenerse de forma indefinida sin fármacos inmunosupresores. Este fenómeno se conoce como "tolerancia operacional" y es la prueba de que la tolerancia inmunitaria puede lograrse en los humanos (Tabla I).[5-13] Estudios prospectivos publicados en forma de resumen sugieren que la prevalencia de tolerancia operacional podría ser más alta.[14,15] Como ya se ha mencionado, todavía no se dispone de herramientas diagnósticas fidedignas para identificar los pacientes potencialmente tolerantes, y es por ello que la mayoría de los receptores de un trasplante hepático continúan siendo tratados con inmunosupresión de forma indefinida. Sin embargo, en los últimos años se han publicado numerosos estudios que evalúan estrategias para identificar los pacientes potencialmente tolerantes (Tabla II).[16] Entre ellas, el uso de marcadores transcripcionales de expresión genética empleando chips genéticos *(microarrays)* o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es la más promisoria.

Biomarcadores transcripcionales de tolerancia operacional en muestras de sangre periférica

En 2007, Martínez-Llordella et al.[17] publicaron el primer estudio que evaluó la utilidad de los marcadores de expresión genética en los pacientes receptores de un trasplante hepático. En este estudio se compararon 16 pacientes tolerantes con 16 no tolerantes (definidos como aquellos que desarrollaron 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 bajas) mediante análisis de *microarrays* de oligonucleótidos (Affymetrix) en RNA obtenido de células mononucleares extraídas de sangre periférica. Se encontraron 628 genes expresados de manera diferente entre los dos grupos (462 sobreexpresados y 166 infraexpresados [*False Discovery Rate,* 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 vías de señalización del receptor de interleu-

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

Año	Autores	n	Años desde el trasplante	Éxito	Rechazo agudo/crónico
1997	Mazariegos et al.[5]	95	8,4 (1,7-25)	19%	26%/0
1998 2005	Devlin et al.[6] Girlanda et al.[7]	18	6,5 (5-10)	16,7%	28%/5,6%
2001	Takatsuki et al.[8]	26	>2	23,8%	12%/0
2005	Eason et al.[9]	18	>0,5	5,6%	61%/0
2005	Tryphonopoulus et al.[10]	104	4	19%	67%/1,9%
2006	Tissone et al.[11]	34	5,3	23,4%	76,4%/0
2007	Assy et al.[12]	26	4,6	8%	58%/0
2008	Pons et al.[13]	21	5,2 (24-127)	38%	22%/0

Tabla II. Técnicas estudiadas para identificar pacientes tolerantes.

- Marcadores de expresión genética:
  - KLRF 1 y SLAMF7
  - Polimorfismos de TNF-α
  - Polimorfismos de IL-10
- Función de los linfocitos T:
  - CD4+ CD25+ Foxp3+
  - Células Vδ1+ T
  - Vδ1+ / Vδ2T
  - Células NK
  - Células CD154+
- Células dendríticas:
  - pDC/mDC
- Otras:
  - HLA-G soluble
  - Anticuerpos específicos de donante
  - IL-17
  - IL-23

cina 2, regulación de la transcripción, procesamiento de mRNA, síntesis de proteínas, reparación del DNA y control del ciclo celular. El perfil de expresión genética se vio influenciado de forma significativa por la presencia de infección por el virus de la hepatitis C, ya que estos pacientes (50% de los tolerantes y 75% de los no tolerantes) presentaron una sobreexpresión de genes proinflamatorios.

Posteriormente Kawasaki et al.[18] realizaron un estudio similar comparando los perfiles de expresión genética en muestras obtenidas de células mononucleares extraídas de sangre periférica (Agilent cDNA *microarray*) de 11 pacientes tolerantes receptores de un trasplante hepático de donante vivo con 11 controles sanos. Se encontraron 717 genes expresados de manera diferente entre los dos grupos, muchos de los cuales participaban en respuestas inmunitarias. Diez genes fueron validados por PCR.

Un segundo estudio publicado por Martínez-Llordella et al.[19] validó los resultados antes mencionados en una cohorte más grande de pacientes. En este estudio se evaluaron 17 pacientes tolerantes y 21 no tolerantes. Tras realizar diferentes algoritmos predictivos se identificaron tres huellas genéticas con dos, seis y siete genes, respectivamente, capaces de predecir el estado de tolerancia con una alta precisión (tasa de error entre un 3% y un 6% en el grupo de estudio). Estos tres grupos de genes también permitieron 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 cual las muestras de sangre se obtienen antes de iniciar la retirada.

Pons et al.[13] evaluaron la expresión de *foxp3* (*forkhead box P3;* considerado el gen maestro de los linfocitos T reguladores) 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 mRNA 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 retirar el tratamiento.

Biomarcadores transcripcionales de tolerancia operacional en muestras de tejido hepático

En un estudio realizado por Li et al.[20] se determinó la expresión de *foxp3* en el tejido hepático y se halló que estaba aumentada en los pacientes tolerantes cuando se compararon con pacientes estables o con rechazo crónico.

Más recientemente, Bohne et al.[21] compararon el perfil de expresión genética (mediante Illumina, Affymetrix y TaqMan PCR) en

el tejido hepático de 28 pacientes tolerantes y 33 no tolerantes incluidos en un estudio prospectivo de retirada de inmunosupresión. Las muestras de tejido se obtuvieron antes de iniciar la retirada. Las diferencias entre tolerantes y no tolerantes fueron muy pequeñas, con sólo 21 genes expresados de diferente manera entre los dos grupos (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

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

Bibliografía

1. Dantal J, Soulillou 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 (OLTX) 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. Girlanda 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 intragraft 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, Weppler 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, Ramírez P, Martínez-Alarcón 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. Benítez C, Lozano JJ, Marínez-Llordella M. Use of transcriptional biomarkers to identify liver transplant recipients who can succesfully discontinue immunosuppressive therapy. Am J Transplant. 2010;10(Suppl 4):abstr. 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):abstr. 189.
16. 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.
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-Llodella M, Lozano JJ, López M, Benítez C, Miquel R, et al. Transcriptional profiling of liver grafts in spontaneous operational tolerance. 2010. [Consultado en agosto de 2010.] Disponible en: http:www.transplantation2010.org.

DISCUSIÓN

A. González: Los progenitores hematopoyéticos, que se ha descrito que también se encuentran en el hígado, ¿podrían tener un papel en la tolerancia?

A. Sánchez-Fueyo: Se ha especulado mucho sobre si los leucocitos pasajeros presentes durante el trasplante de un injerto hepático tienen un papel en la tolerancia, pero no hay un consenso claro porque es muy difícil determinar si la presencia de células hematocríticas del donante es causa o efecto de la tolerancia. En este estudio hemos investigado los pacientes en quienes había disparidad entre el HLA2 y el antirreceptor, en los que podíamos cuantificar las células por citometría. Los resultados indican que hay una pequeña cantidad de células del donante en todos los pacientes, tanto tolerantes como no tolerantes. Pero no hemos profundizado en este aspecto del estudio.

L. Graça: Una de las poblaciones celulares que parece asociada a este fenómeno son los linfocitos NK. ¿Habéis averiguado si los linfocitos NKT también están asociados y presentes?

A. Sánchez-Fueyo: De momento sólo hemos investigado el número de células y cómo han aumentado. Ahora estamos investigando con más detalle el inmunofenotipo de estas células. En cuanto a los linfocitos NKT, no hemos encontrado diferencias en su número, pero tampoco hemos profundizado demasiado y los datos se basan en análisis muy básicos y cuantitativos.

J. Aramburu: Los pacientes son más tolerantes de manera espontánea. ¿Tienen más incidencia los fenómenos asociados con una pérdida de la función inmunitaria, que implica una mayor prevalencia a tumores? Es difícil porque han estado sometidos a una inmunodepresión. En otros casos, un sistema inmunitario muy robusto protege de la aparición de tumores, pero a su vez también se asocia a una mayor incidencia de autoinmunidad.

A. Sánchez-Fueyo: No se ha estudiado de manera estricta y es muy difícil hacerlo, porque en el estudio los pacientes se sometieron al trasplante muchos años antes. Es muy posible que el efecto sobre los tumores se mantenga durante mucho tiempo después de retirar el tratamiento. Por otro lado, sí se ha realizado un estudio con pacientes tolerantes renales a quienes se vacunó para observar el efecto de la vacunación y determinar si su respuesta era diferente a la de la población general inmunocompetente, y los resultados indican que no hay una inmu-

nosupresión general. Pero éste es el único estudio que se ha llevado a cabo.

A. Celada: ¿En vuestro estudio se incluyeron pacientes con hemocromatosis? Estos pacientes son ideales porque no experimentan rechazo.

A. Sánchez-Fueyo: En nuestra serie de 102 pacientes no había individuos con hemocromatosis. De hecho, en España, la prevalencia de esta enfermedad es baja. En este caso, los pacientes tolerantes no tienen una sobrecarga de hierro sino que los que rechazan el trasplante padecen un déficit subclínico de hierro. El efecto de la sobrecarga de hierro tiene implicaciones muy diferentes, sobre todo en la virulencia de los microorganismos, e incluso hay evidencias discutibles de que los pacientes con hemocromatosis tienen más riesgo de padecer infecciones debido a la inmunosupresión sistémica que se produce.

F. Ruiz-Cabello: ¿Habéis estudiado el papel de los linfocitos NK en los grupos de pacientes con incompatibilidad de HLA-C?

A. Sánchez-Fueyo: Nosotros no lo hemos analizado, pero sí lo evaluaron tres estudios sobre trasplante hepático. El objetivo de estos estudios era averiguar la incidencia del rechazo. El primero mostró un efecto sorprendentemente alto entre los genotipos HLA-C y KIR, el rechazo y la supervivencia del injerto. Pero en los dos estudios posteriores, con una muestra mayor, no se encontró ningún efecto. De todos modos, el objetivo de estos estudios es el rechazo, que difiere de nuestro objetivo, que es el éxito de la retirada del tratamiento inmunosupresor. Antes de incluir a nuestros pacientes en la estrategia de retirada y no retirada, los tolerantes y los no tolerantes son distinguibles, porque hemos excluido expresamente a aquellos con un alto riesgo de rechazo.

R. Pujol: ¿Es cierto que los estudios que se realizaron hace algunos años en el Massachusetts General Hospital sobre trasplante de hígado junto con trasplante de médula ósea no se han podido volver a reproducir, o que de vez en cuando dan muy malos resultados?

A. Sánchez-Fueyo: En realidad se da el segundo caso. Ya en el primer artículo que publicaron, uno de los cinco pacientes del estudio perdió el injerto de riñón que le trasplantaron, mientras que los otros cuatro sobrevivieron y mantuvieron la supervivencia prolongada del injerto sin inmunosupresión. La idea de los National Institutes of Health (NIH) era financiar un estudio con varios centros norteamericanos para replicar estos estudios. El Massachusetts General Hospital realizó más intervenciones de este tipo, pero con una incidencia muy alta de rechazo agudo, por lo que el programa se ha suspendido. No sabemos hasta qué punto esto obliga a modificar la estrategia o demuestra que no es válida, pero sí que ha sido un jarro de agua fría sobre la comunidad científica.

J. Aramburu: Hace unos cuantos años se realizaron estudios sobre el tratamiento de receptores de trasplantes con anticuerpos anti-CD28 para aquellos casos en que no existía compatibilidad de HLA y se intentaba evitar el rechazo. La idea de estos estudios era eliminar el bajo porcentaje de linfocitos alorreactivos, y los resultados iniciales fueron muy prometedores. ¿Sabes si estos estudios o esta idea se han continuado?

A. Sánchez-Fueyo: Resulta muy efectiva la coestimulación con CTLA4 en roedores, ya que una sola dosis de CTLA4-Ig 2 días después del trasplante induce tolerancia a los injertos cardiacos. El fármaco ya ha llegado a la clínica, y se usa para mantener la inmunosupresión (no para inducir tolerancia). En cuanto al trasplante renal, hay un estudio realizado por la Universidad de California en San Francisco y financiado por los NIH en el cual se combinan CTLA4-Ig y rapamicina. Esta última es muy tolerogénica en estudios preclínicos, aunque en clínica aún no está

muy claro. Los resultados del estudio fueron razonablemente buenos y se pudo reducir de manera considerable la dosis de rapamicina, pero los receptores rechazaron abandonar el fármaco por completo, y el estudio no pudo continuarse y no se demostró si había tolerancia. No está claro si el efecto en la clínica es tolerogénico o no. Además, hubo problemas de tromboembolias relacionadas con el uso de anti-CD40 ligando en monos. Todos estos hechos han dificultado que este tipo de fármacos llegue a emplearse en clínica.

L. Graça: Parece muy difícil identificar un único biomarcador, y además los mejores biomarcadores son los que se usan en combinación con otros y nunca solos. La discriminación es posible gracias a la firma biológica generada por varios biomarcadores, como se ha descrito en el lupus. ¿Crees que esto es específico de este modelo o puede ser común para todas las enfermedades inmunitarias? Es decir, probablemente las tentativas de identificar biomarcadores únicos fracasarán y se optará por identificar patrones de biomarcadores.

A. Sánchez-Fueyo: Creo que es probable que acabemos usando una combinación que incluya biomarcadores biológicos y clínicos. De hecho, si comparamos la capacidad predictiva de las variables clínicas (edad, tiempo, etc.) y de la expresión genética en sangre, son muy similares. Por lo tanto, una combinación de estos dos tipos de variables, que no son colineales sino independientes, podría ser muy útil. Además, cuando se realizan estudios con *microarrays* con muestras pequeñas, aunque se utilicen estrategias de validación cruzada interna robustas y cohortes independientes, siempre se corre el riesgo de que el algoritmo tienda a encontrar los genes que mejor describen la cohorte. Por ello, creo que es un tema interesante, pero obliga a realizar estudios de validación con muchos pacientes.