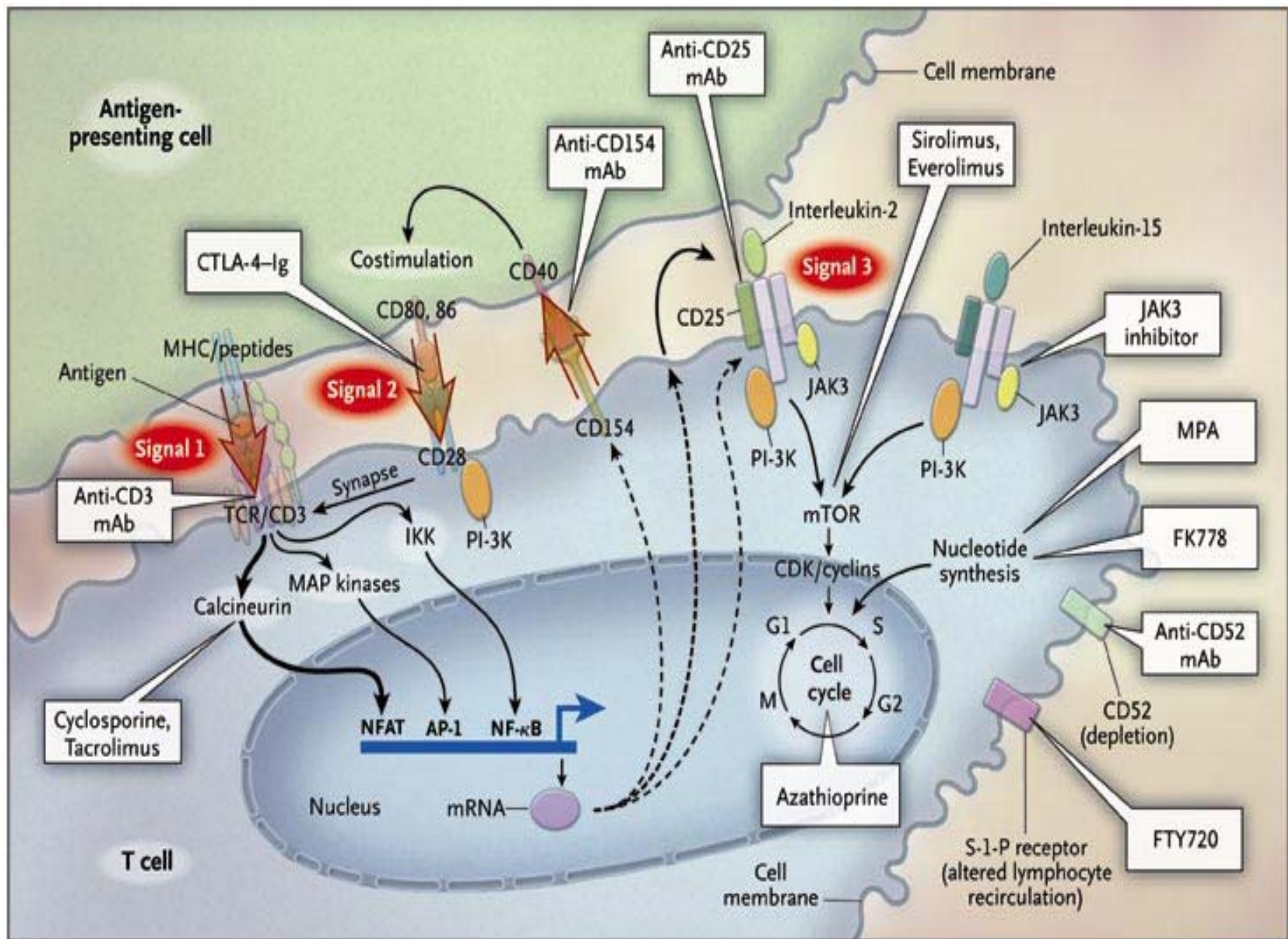


Aplicación de la Biología Molecular al trasplante de órganos y tejidos

METODOS DE MONITOREO DE LA FUNCION INMUNE CELULAR: BIOMARCADORES

MSc. Igrid García González

Laboratorio de Genética Molecular
Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”



MONITOREO INMUNE PRE TRASPLANTE



Caracterización inmunológica del paciente

- **Selección del donante compatible**

Tipaje HLA

Crossmach

Búsqueda de anticuerpos citotóxicos

- **Identificación de riesgo inmunológico**

Subpoblación linfocitaria



METODOS para EVALUAR respuesta inmune celular del receptor PRE y POST TRASPLANTE

1. Fenotipaje de células T

Inmunofenotipaje

Determinación de células T reguladoras: CD25FoxP3

Niveles de CD30

2. Ensayos funcionales

Evaluación de citoquinas

Ensayo Immuknow

Proliferación celular:

Actividad citolítica: Perforina, Grandzima

3. Tecnología genómica



INMUNOFENOTIPAJE

- **Marcadores de activación:** CD25, CD69, CD71, CD28, CD80, CD86, HLA-DR
- **Células T memoria**
Efectores: CD127-, CD62L-, CCR7-
Central: CD27+, CD62L+, CCR7+
- **Células B:** CD30s, anticuerpos anti HLA (NCI)
- **Linfocitos T citotóxicos (CTL)**
CD107 en células T CD8+. CD16 en células NK
Perforina intracelular o granzima

Ventajas	Desventajas
Fácil de detectar Poco volumen de muestra	Expresión no específica Altos niveles basales



LAS CITOQUINAS EN EL TRASPLANTE

- **Inmunoterapia (terapia génica)**
- **Predisposición al rechazo**
- **Detección precoz del rechazo**

Los niveles de síntesis de citoquinas están influenciados por polimorfismos asociados a sus genes.

La influencia de estos polimorfismos se ejerce:

- **Regulando la expresión génica (transcripción)**
- **Alterando en la proteína dominios de interacción**
- **Indirectamente por ser un marcador de una mutación funcional**



Algunos mediadores inmunológicos en varios tipos de trasplante y su relación con el rechazo

Polimorfismos asociados a	Trasp. Corazón	Trasp. Hígado	Trasp. Riñón	Trasp. Pulmón
TNF- α	R. Agudo $\uparrow$	R. Agudo $\uparrow$	R. Agudo $\uparrow$	
IL-10 (Th2)	R. agudo $\downarrow$	R. agudo HVC recurrente $\uparrow$	R. Agudo $\downarrow$	
INF-gamma (Th1)	R. Agudo $\uparrow$	HVC recurrente $\downarrow$	R. Agudo $\uparrow$	Fibrosis $\uparrow$
TGF- β 1		HCV recurrente $\downarrow$	R. Crónico, Fibrosis renal (ciclosporina)	R. Crónico Fibrosis

Principales polimorfismos asociados a genes de las citoquinas



Citoquina	Polimorfismo	Localización	Alelo mayor productor
TGF-β1	Codón 10 Lue/Pro Codón 25 Arg/Pro	Sec. señal Sec. señal	Leu Arg
TNF-α	-308 A/G	Región promotora	A
IL-10	-1082 A/G - 819 C/T - 592 A/C	Región promotora Región promotora Región promotora	Haplotipo GCC
INF-gamma	CA repeat (STR)	Primer intrón	Alelo 2



Citoquinas

Pacientes	TNF α -308 G/A
0901	G/A H
0902	G/A H
0903	G/G L
0904	G/G L
0905	G/A H
0906	G/G L
0907	G/G L
0908	G/G L
0909	G/G L

El polimorfismo -308: Alelos TNF1 (G/G) y TNF2 (G/A y A/A)



Citoquina $\text{TNF}\alpha$ -308 A/G

Paciente	Tiempo Transplante	Evolución	Genotipo	Nivel de expresión
0901	1 año	R. agudo	G/A	Alto
0902	3 años	R. crónico	G/A	Alto
0905	15 años	Aterosclerosis	G/A	Alto
0907	13 años	No rechazo	G/G	Bajo
0909	18 años	No rechazo	G/G	Bajo
0904	4 años	No rechazo	G/G	Bajo
0903	6 meses	?	G/G	Bajo
0906	1.5 años	?	G/G	Bajo
0908	2 años	?	G/G	Bajo

ELISPOT



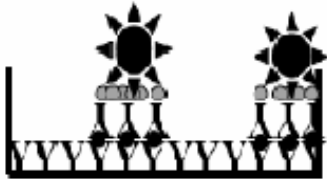
Células efectoras (●)

Placa recubierta con Ac captura (Y)



Añade Ag (●)

Incubación
Células al reconocer el Ag
liberan IFN γ (★)



Eliminar células

Se visualiza la secreción
de citoquinas (★)

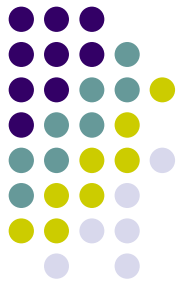


Enumerar los Spot

Un Spot = Una célula secretora
de IFN γ

Intensidad/tamaño del spot = capacidad relativa de las
células para secretar IFN γ

Cuantificación de células productores de IFN γ



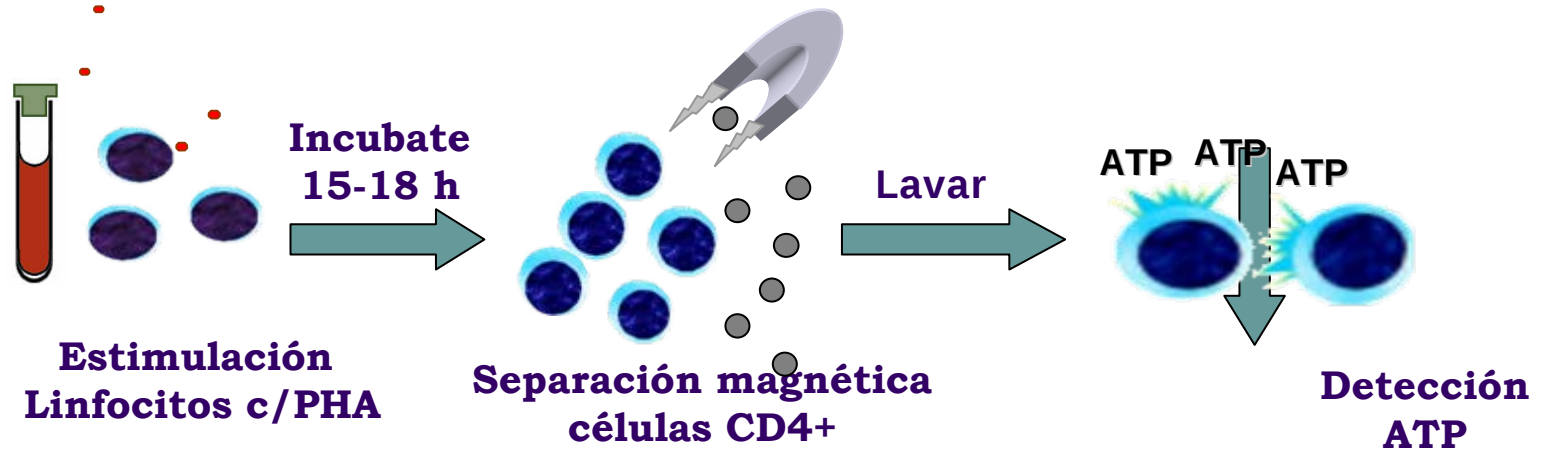
Ventajas

- Sensible 1/10⁵⁻⁶ células
- ELISA (100/10⁵⁻⁶ cél)
- Puede aplicarse para diferentes tipos celulares
- Detecta citoquinas después de un breve tiempo de exposición
- Reproducible

Desventajas

- Requiere equipamiento y sistemas automatizados

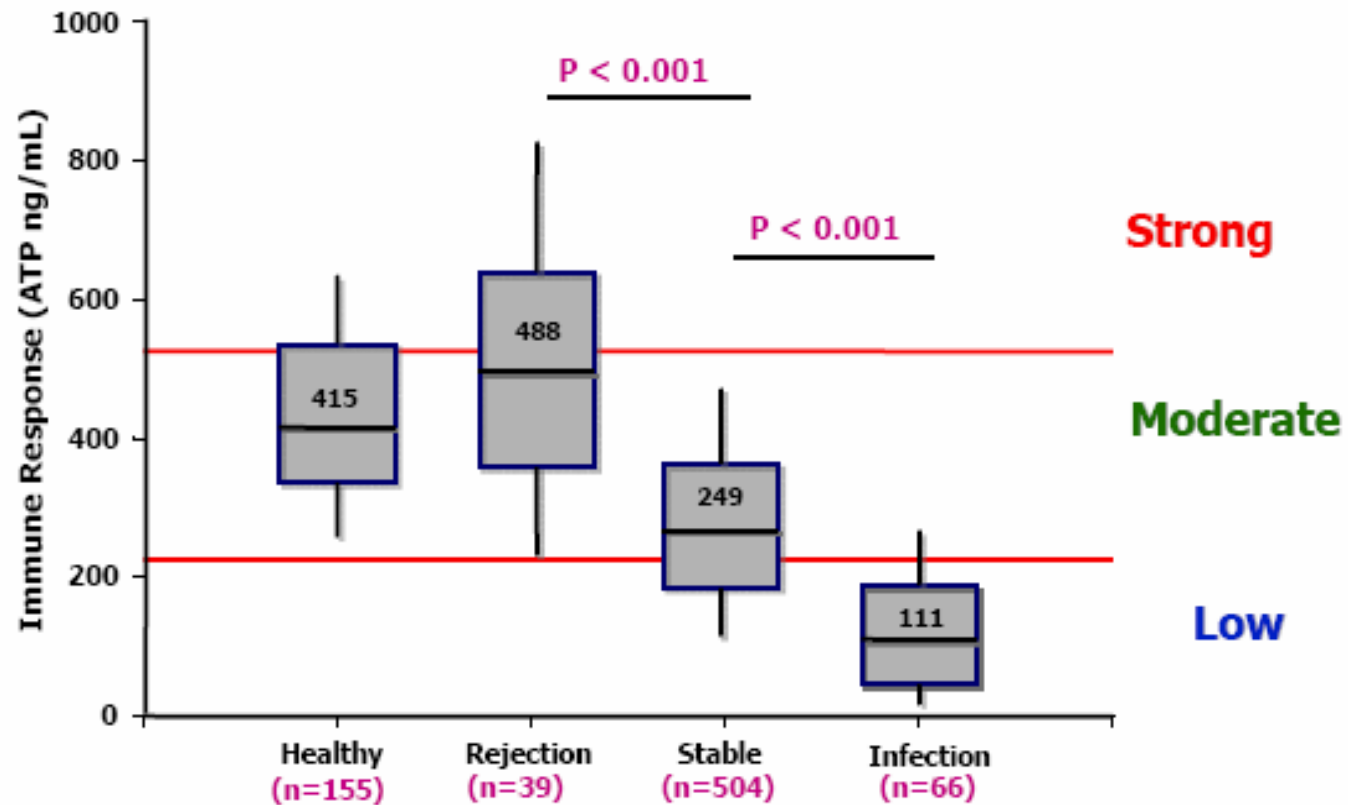
ENSAYOS FUNCIONALES

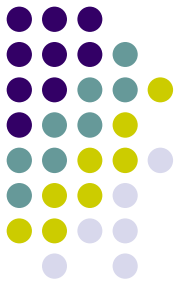


ImmuKnowTM



Luminómetro





NUEVAS TECNOLOGÍAS GENÓMICAS

RT-PCR EN TIEMPO REAL

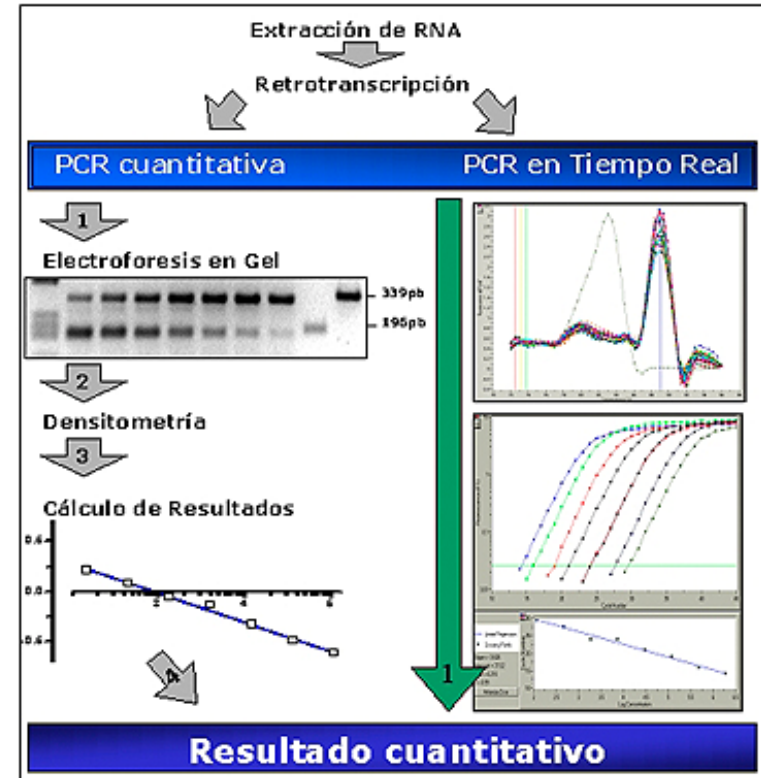


Determina los niveles de expresión de genes asociados con el rechazo agudo y crónico.

Identifican genes cuya abundancia relativa de RNA se modifica bajo diferentes condiciones biológicas. La alteración en la expresión es un marcador del proceso patológico subyacente.

RT-PCR en tiempo real o cinética

- **Reducción del tiempo de análisis.**
- **Disminuye el riesgo de contaminaciones.**

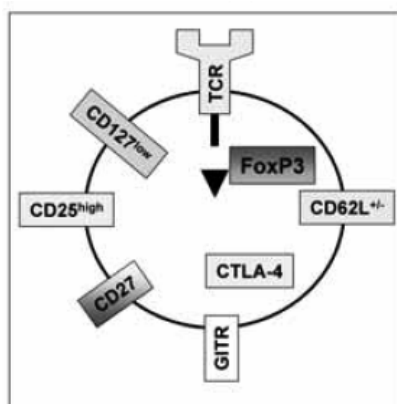


UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO

RT-PCR en tiempo real



Urinary *FOXP3* Messenger RNA and Renal-Allograft Rejection



n=83

Rechazo agudo: 36

Nefropatía crónica del injerto: 18

Biopsia normal: 29

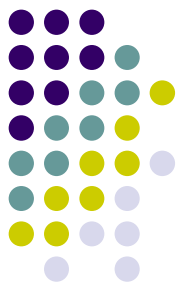
Medida	Rechazo agudo	NCI	Biopsia normal
Radio de RNAm de FoxP3	3,8+0,5	1,3+0,7	1,6+0,4

1. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353:2342-2351.
2. Matthews K. *FOXP3* mRNA in the urine of renal allograft recipients predicts outcome of acute rejection. *Nature Clinical Practice Nephrology* 2006;2:122-123

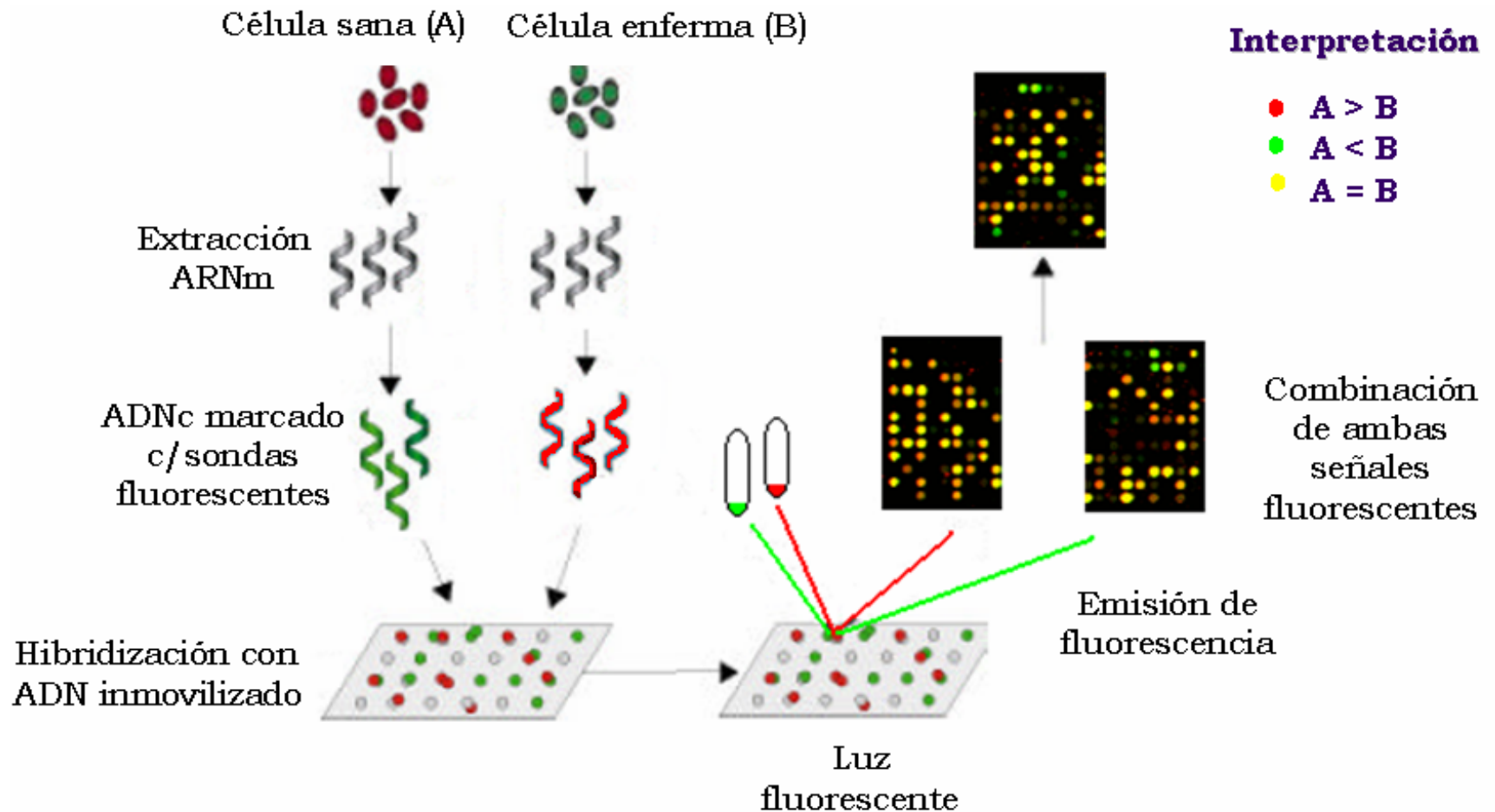


Microensayos o Microarray

- **Analiza miles de genes simultáneamente por fluorescencia**
- **Estudia mutaciones de uno o varios genes al mismo tiempo.**
- **Evalúan la expresión génica en un tejido, la expresión de marcadores relacionados con una enfermedad, el polimorfismo de genes, etc.**
- **Perfiles de expresión génica (PEG): Análisis alteraciones del nivel de expresión de genes en una determinada situación patológica o fisiológica e identifica de forma rápida el o los genes implicados.**
- **Predecir el riesgo de rechazo**
- **Desarrollar un Test molecular: GENES DE TOLERANCIA**



MICROARRAY DE ADN





MICROARRAY DE ADN

**Cohorte de 17 pacientes con trasplante renal
Biopsia: 6 y 12 meses.**

Objetivo del estudio:

Determinar qué genes expresados en la biopsia a los 6 meses poseían valor pronóstico de NCIR al año.

Resultados:

- 65 (12 000 genes investigados (plataforma GeneChip de Affymetrix) clasificaron los pacientes correctamente en NCIR.**
- 10 genes predictores de aparición de NCIR en el 88%**
- Altos niveles de ARN mensajero para TGF- β protege para el desarrollo de NCI**

Scherer A y col. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. Transplantation 2003; 75:1323-1330.

Europe research on transplantation tolerance: indices of tolerance reprogramming the immune system for the establishment of tolerance (RISET) and transplantation research integration in Europe (TRIE) K. Wood, M. Goldman



BUSQUEDA DE MARCADORES DE TOLERANCIA AL TRASPANTE

- 1. Conteo de linfocitos**
- 2. Ensayo ImmuKnow**
- 3. Niveles de CD30s**
- 4. Determinación de Ac contra el donante**
- 5. Determination de células T reg circulantes**
- 6. Ensayo ELISPO: IFN γ**
- 7. Estudio de expresión génica y rechazo: Microarray**

**Estudio Multicéntrico e Internacional
(Reino Unido, Alemania, Bélgica, Francia, Italia, Canadá, EUA)**

Grupo de Pacientes

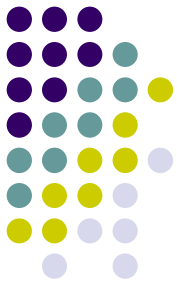


Paciente	Condición	Función renal	Creatinina
Tolerantes	Sin IS	Estable >1 año	<160 umol/ L
Bajo Respondedores	Prednisoma (10 mg/día)	Estable >1 año	<160 umol/ L
Estable	ICN	Estable >1 año	<160 umol/ L
Menos estables	Triple terapia	Estable >1 año	<160 umol/ L
Rechazo crónico	IS adecuada	Nefropatía	Elevada. Depósito de complemento, infiltración



RESULTADOS

Ensayos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Conteo de linfocitos	NS				
Immukow	Mod.	Mod.	Mod-Alta	Alta	↓ Alta
Niveles de CD30s	↓	↓	↓	↑	↑
Ac contra el donante específicos	No	No	No	No	Si
Celulas Treg circulantes	↑ CD4 act ↓ CD25+	↑ CD4 act ↓ CD25+	↓ CD4 act ↓ CD25+	↓ ↓ CD4 act ↓ CD25+	↓ ↓ ↓
ELISPOT TNF γ	No Prolif.	No Prolif	Mod Prolif	Prolif	Prolif.
Microarray	15				



CONCLUSIONES

Incluyendo 15 genes significativos
Porcentaje de células CD25,
Conteo de células T y B
Radio de frecuencia de IFN γ



COMBINACIÓN DE BIOMARCADORES

Permite clasificar pacientes en grupos de riesgo



Capacidad diagnóstica de BIOMARCADORES.

FUTURO DE LOS ESTUDIOS GENÓMICOS



Buscar BIOMARCADORES MOLECULARES que indiquen TOLERANCIA al trasplante

- **Aumentar la sobrevida del trasplante.**
- **Reducir los problemas asociados al rechazo crónico.**
- **Minimizar la inmunosupresión y hacerla individualizada.**

Ensayos de laboratorios: Test de vigilancia

CUANTITATIVOS, ESPECÍFICOS; REPRODUCIBLES Y VIABLES.