

## **5. DISCUSSIÓ**



Durant molt de temps el rebuig hiperagut ha estat la primera barrera amb que s'han trobat els investigadors en plantejar-se el xenotrasplantament com a alternativa a l'escassetat d'òrgans. Amb els avenços que s'han dut a terme durant els últims anys en el camp dels fàrmacs immunosupressors i junt amb el millor coneixement dels animals transgènics, actualment, a nivell experimental, ja es pot vèncer el rebuig hiperagut en combinacions discordants i aconseguir supervivències indefinides en combinacions concordants utilitzant fàrmacs immunosupressors. Els continus avenços en el camp de la immunologia del trasplantament ens ha mostrat que cada òrgan presenta una resposta immunològica determinada i característica envers l'hoste i viceversa. A més a més s'han ampliat els coneixements de les diferències entre allotrasplantament i xenotrasplantament fet que ens pot ajudar a dissenyar una pauta immunosupressora més adequada i específica per aquesta darrera modalitat.

El model de xenotrasplantament hepàtic hámster-rata, menys estudiat que el de cor, en part per les complicacions tècniques que implica, és molt útil per a fer estudis tant de

metabolisme com de resposta immunològica a llarg termini. El fetge és un òrgan amb característiques immunològiques particulars i això fa que els processos de rebuig i tolerància també difereixin dels que es donen en altres òrgans com el cor o el ronyó. També s'han fet estudis amb la mateixa combinació concordant on queden ben reflexades les diferències en el rebuig dels diferents òrgans, així doncs Molleví et al.<sup>59</sup> descriuen les diferències en el Rebuig Tardà del Xenoempelt entre cor i fetge. Clàssicament el fetge s'ha considerat un òrgan immunològicament privilegiat per la seva resistència al rebuig mitjançat per anticossos i s'ha descrit la importància que hi té la resposta cel·lular.

El principal objectiu que ens havíem plantejat en aquesta primera part de la present tesi doctoral era aconseguir supervivències indefinides en el model de xenotrasplantament hepàtic hámster-rata amb l'administració de dosis baixes (0,2 mg/kg) de Tacrolimus. Fins al moment, altres autors<sup>154</sup> havien aconseguït supervivències indefinides utilitzant una pauta immunosupressora 2,5 vegades més elevada que l'administrada pel nostre grup. Així doncs, és possible el manteniment d'animals xenotrasplantats, en combinació concordant, de forma indefinida i en monoteràpia (a excepció dels 7 primers dies) a dosis baixes d'anticalcineurínics sense que es manifestin signes de rebuig. Un cop assolit aquest objectiu, ens vam plantejar respondre a les preguntes: a) En quin estat es troben els empelts als 100 dies posttrasplantament? b) Quines diferències presentava la immunitat cel·lular en el nostre model de xenotrasplantament envers un model similar d'al·lotrasplantament? c) Com afronten els animals xenotrasplantats el bescanvi metabòlic i més concretament la cascada de la coagulació, donat la implicació d'aquesta via metabòlica en processos de rebuig?

Així doncs, des del punt de vista immunològic conèixer quines subpoblacions limfocitàries estan intervenint en una situació de xenotrasplantament estable i com difereix aquesta resposta de l'al·loreactivitat, ens permetria aprofundir en la immunologia del xenotrasplantament. En estudis anteriors Davenport et al.<sup>228</sup> afirmen que els canvis que es poden observar en les proporcions de limfòcits en sang perifèrica són indicatius del que està passant a l'empelt. Malgrat tot, són pocs els estudis fets en aquest aspecte i encara menys els realitzats amb xenotrasplantament hepàtic. Una de les idees del primer estudi de la present tesi és veure l'evolució de les proporcions de les diferents subpoblacions de cèl·lules T, cèl·lules B i cèl·lules Natural Killer en sang perifèrica a diferents dies després del trasplantament hepàtic ortotòpic en la combinació concordant hámster-rata i comparar-ho amb la composició dels receptors d'al·loempelts. Un altre objectiu del nostre estudi és valorar les proporcions de limfòcits CD4<sup>+</sup> que expressen la molècula CD45RC ja que s'ha descrit seva implicació en processos de tolerància.

Les proves de funció hepàtica que vàrem realitzar a tots els animals de l'estudi 1 ens indicaren una correcta funció de l'empelt. Les transaminases es mantingueren dins dels valors normals i en relació a l'albumina vam poder observar una davallada dels nivells en sèrum d'aquesta proteïna, que sense recuperar-se, es van estabilitzar. Aquest és un tret comú en tots els grups del primer l'estudi, tant en els d'al·lotrasplantament com els de xenotrasplantament. La histologia dels al·loempelts i xenoempelts reflexava l'absència de processos de rebuig en tots els grups d'aquest estudi 1. La histologia dels grups d'al·lotrasplantament mostraren, com a únic tret característic, una proliferació colangiolar que va incrementant a mesura que passa el temps. No presentaven colestasi canalicular, fet que descarta un possible problema de via biliar extrahepàtica. Aquest fenomen ja ha estat descrit per altres autors com Kamada<sup>229</sup>, que la separa de les característiques del rebuig i l'associa a problemes del model en si mateix i en descriu una regressió en relació al temps postrasplantament. Zhao et al.<sup>230</sup> també observaren aquesta característica però la relacionaren amb la no arterialització del model i també descriuen una regressió d'aquesta proliferació colangiolar associada probablement a una rearterialització espontània de l'empelt. Els nostres resultats en al·lotrasplantament podem dir que correlacionen amb aquest darrer autor però no ho fan els de xenotrasplantament donat que només veiem una lleugera proliferació colangiolar. La tècnica quirúrgica és la mateixa en ambdues combinacions i la combinació xenogènica amb la dificultat afegida d'una major fragilitat i un menor calibre de la via biliar així com la presència de càlculs biliars en els hàmmsters donants. Així doncs sembla que en aquest fenomen hi ha d'estar implicada alguna característica particular de les rates i que no comparteixen els hàmmsters.

En relació als grups de xenotrasplantament vàrem poder observar un infiltrat moderat de cèl·lules mononucleades als espais porta els primers dies després de la intervenció, que al dia 30 postrasplantament ja s'havia començat a reduir i que el dia 100 després de la intervenció eren lleus i, la majoria amb la morfologia característica de limfòcits no activats. Aquests limfòcits es caracteritzen per presentar una mida petita i amb un nucli molt marcat ja que tenen la cromatina molt condensada i queden tenyits de color blau intens amb la tinció d'hematoxilina-eosina. Així doncs tant als 7, 30 i als 100 dies postrasplantament els xenoempelts presentaven una histologia molt conservada tot i la presència d'infiltrat de cèl·lules mononucleades. Altres autors ja han citat la presència d'infiltrat limfocitàri sense que s'estigués donant una situació de rebuig, així doncs Bach et al.<sup>64</sup> també descriuen la presència d'infiltrat limfocitari que no implica dany tissular de l'empelt en xenotrasplantament cardíac heterotòpic, així com Kamada<sup>229</sup> que descriu una reversió de l'infiltrat cel·lular mononucleat en al·lotrasplantament hepàtic ortotòpic.

En les combinacions utilitzades en aquest estudi és necessària l'administració de fàrmacs immunosupressors per poder fer estudis a llarg termini. Amb aquest tractament hem aconseguit situacions estables però cal tenir en compte que tot i tenir un òrgan funcionant de manera estable, el sistema immunitari continua presentant canvis. En el grup de xenotrasplantament de 7 dies veiem un increment de la població de limfòcits T i una disminució de cèl·lules B-NK i les mostres de teixit d'aquest grup ens mostren un infiltrat limfocitari moderat als espais porta. Això ens fa pensar que el dia 7 posttrasplantament la situació de l'empelt és compromesa i més propera al que seria una situació de rebuig, amb resultats comparables als d'altres grups<sup>231,232</sup>. Aquesta situació canvia quan observem els resultats del grup 5, als 30 dies del trasplantament, on podem observar que les proporcions són molt similars a les del grup control amb immunosupressió.

D'altra banda en els grups de 100 dies, tant d'alloempelts com de xenoempelts, veiem que les proporcions de les diferents subpoblacions han experimentat un canvi considerable, observant-se un increment de cèl·lules B i NK en detriment de la subpoblació de cèl·lules CD3<sup>+</sup> (pràcticament un 50% de cada subpoblació). Quan hem fixat la nostra atenció en els valors absoluts d'aquestes subpoblacions calculats a partir dels resultats dels hemogrames, hem vist que presentaven les mateixes tendències que els valors expressats en percentatges. Aquest canvi pot estar relacionat amb un apropament a un estat tolerant de l'empelt. Cal remarcar que les cèl·lules B en els empelts de llarga supervivència no semblen cèl·lules plasmàtiques, que es caracteritzen per tenir un nucli excèntric i un citoplasma abundant, i és possible que aquestes cèl·lules B vagin a l'empelt però no s'activin. La tolerància associada a l'activació de cèl·lules T sovint va seguida de la inactivació de cèl·lules T amb el conseqüent exhauriment de la resposta, aquest fet pot ser la raó de l'acumulació de cèl·lules B. A més a més la manca de resposta de les cèl·lules T per inactivació pot ser la responsable de la incapacitat de les cèl·lules B per madurar, fet que pot conduir a aquestes cèl·lules a la seva acumulació a l'empelt. Encara que la interacció de les cèl·lules B/T té lloc als nòduls limfàtics i a la melsa, les cèl·lules B es poden acumular als empelts ja que també hi és necessària la presència de cèl·lules T perquè aquestes cèl·lules hi puguin madurar<sup>233</sup>. L'especificitat i la funció d'aquestes cèl·lules B encara no han estat identificades. L'observació d'un increment de cèl·lules B està en consonància amb els resultats de Sun et al.<sup>231</sup> que descriuen un increment de cèl·lules B en rates Lewis tolerants que reben un empelt hepàtic de rates BN. Donat que els diferents grups del nostre estudi estan rebent Tacrolimus a una dosi molt baixa no podem parlar de tolerància en el sentit estricte però si ens recolzem en els resultats obtinguts per aquest mateix grup, Sun et al., l'absència d'infiltrats als espais porta i un empelt amb una morfologia pràcticament normal podem pensar que es tracta d'una situació molt propera a la tolerància i que podríem anomenar situació "protolerant". El que no podem concloure és que aquesta major proporció

de cèl·lules B que presenten en sang perifèrica estigui directament relacionada amb aquesta situació "protolerant" o bé que sigui un marcador diferencial de l'activació de les cèl·lules T. Huang et al.<sup>233</sup> suggereixen una associació de l'acúmul de cèl·lules B en empelts tolerants a una manca de cèl·lules T *helper* a l'empelt per tal d'estimular la maduració i el canvi d'isotip (*IgG shift*).

Podem desmitificar la idea de que qualsevol combinació xenogènica és més agressiva que una d'al·logènica amb el fet que en el nostre disseny inicial de l'experiment, tal i com hem comentat als resultats, havíem planificat utilitzar la combinació al·logènica DA-Lewis per al grup de 100 dies, però amb les dosis d'immunosupressors utilitzades els animals receptors no arribaven a sobreviure 100 dies, en canvi si que ho feien els xenoreceptors.

Quan avaluem la composició dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, és a dir les proporcions de limfòcits T *helper* i limfòcits citotòxics, en els grups de xenotrasplantament veiem com al dia 7 incrementen tant els valors de cèl·lules CD4<sup>+</sup> com els de cèl·lules CD8<sup>+</sup>. Als 100 dies quan les proporcions de limfòcits T i B s'han invertit, també observem que disminueixen els dos subtipus de cèl·lules T. Així doncs nosaltres podem dir que l'evolució de les subpoblacions limfocitàries en allotrasplantament i xenotrasplantament segueix la mateixa tendència però és més accentuada en la combinació concordant de xenotrasplantament.

Anteriorment ja hem esmentat la presència de cèl·lules B i l'absència de cèl·lules plasmàtiques al parènquima hepàtic dels grups de xenotrasplantament, que es mantingué constant en tots tres grups, a diferència del que observàvem en sang perifèrica. Per a la resta de subpoblacions, hem observat un augment progressiu i paral·lel dels limfòcits CD45RC<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> i uns valors estabilitzats de CD4<sup>+</sup> en el parènquima dels xenoempelts. Curiosament es produeix una disminució progressiva dels tipus cel·lulars citats en els espais porta. De fet, en la nostra experiència no hem observat un paral·lisme entre els canvis que tenen lloc en sang perifèrica i les subpoblacions limfocitàries infiltrants del parènquima al menys en el nostre estat on l'empelt no mostra signes de rebuig, potser degut al baix nombre de cèl·lules infiltrants. Tal vegada, en una situació de rebuig podríem establir una correlació entre les observacions de sang perifèrica i teixit.

Tot i tenir una proporció important de cèl·lules B, que incrementa amb el pas del temps després del trasplantament, no podem deixar de banda el paper que tenen les cèl·lules T en els processos de rebuig i tolerància, especialment les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que són les que han estat més estudiades fins al moment. Dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> en diferenciem dos tipus, depenent de si s'expressa o no la isoforma CD45RC. El gen de l'antígen comú leucocitari, CD45, pot presentar fins a 6 isoformes diferents com a resultat del splicing alternatiu del RNA missatger <sup>234</sup>. La població de cèl·lules Th1 presenta la isoforma CD45 RC<sup>+</sup> i la Th2 són negatives per aquesta

isoforma. La no expressió de la isoforma CD45 RC dona nom a les cèl·lules T memòria (CD4<sup>+</sup> CD45 RC<sup>-</sup>), sembla que no és una característica constant si no que en absència de d'antigen recuperen l'expressió del gen CD45 RC (CD4<sup>+</sup> CD45 RC<sup>+</sup>), cèl·lules T *naive*<sup>235</sup>.

Cadascuna d'aquestes subpoblacions, CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>+</sup> (Th1) i CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-</sup> (Th2), alliberen un perfil de citoquines determinat<sup>236</sup>. La subpoblació Th1 produeix IL-2 i INF $\gamma$ , citoquines relacionades en estudis d'al·lotrasplantament amb el rebuig mentre que les Th2 produeixen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 <sup>237,238</sup>, citoquines que se'ls atribueix un paper decisiu en estudis de tolerància realitzats en models d'al·lotrasplantament<sup>239</sup>. En els nostres resultats dels grups d'al·lotrasplantament veiem que, als 100 dies, la població de limfòcits CD4<sup>+</sup> Th2 ha passat a ser la més abundant, s'han invertit les proporcions de limfòcits CD4<sup>+</sup>Th1 i Th2. Donat que la immunosupressió que estem administrant és molt baixa i que tenim una situació on dominen cèl·lules que alliberen citoquines que afavoreixen la tolerància i que inhibeixen la funció de les cèl·lules CD4<sup>+</sup>Th1<sup>236</sup>, podem dir, un cop més, que en aquesta combinació al·logènica tenim una situació d'acceptació indefinida de l'òrgan.

En xenotrasplantament hi ha molt pocs estudis fets en relació a les conseqüències que tenen les alteracions de les subpoblacions de limfòcits CD4<sup>+</sup>Th1 i Th2 i les citoquines que alliberen. Bach et al.<sup>64</sup> van realitzar estudis de xenotrasplantament cardíac heterotòpic on van descriure que els òrgans acomodats presentaven un infiltrat mononuclear dens i un perfil de citoquines propi de limfòcits CD4<sup>+</sup> Th2 mentre que els òrgans rebutjats a més a més de l'infiltrat limfocitàri el perfil d'interleuquines era propi de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> Th1. Aquests resultats es contradiuen parcialment amb els que descriuen Brouard et al.<sup>65</sup> que en el mateix model de trasplantament cardíac heterotòpic hámster-rata, troben nivells baixos de IL-4 i absència de canvi cap a una subpoblació CD4<sup>+</sup> Th2 i suggereixen que la resposta amb cèl·lules CD4<sup>+</sup> Th2 en aquest model pot representar una correlació enlloc d'una relació causal. El nombre d'estudis d'aspectes immunològics en xenotrasplantament hepàtic és reduït i encara en trobem menys analitzant aquest tipus de respostes en models de llarga supervivència. A més a més, sabem que el fetge, en relació als processos de tolerància, hi té un paper particular per les seves característiques. En el nostre estudi veiem un canvi als 100 dies de la proporció de cèl·lules Th1-Th2. Mentre el dia 7 i 30 veiem un clar predomini de cèl·lules CD4<sup>+</sup> Th1, als 100 dies tot i no haver-se invertit les proporcions, com passa al grup d'al·lotrasplantament, veiem com les proporcions de les dues subpoblacions són molt semblants. Així doncs tal i com hem esmentat, podem dir que aquests empelts s'estan acostant a una situació d'acceptació indefinida de l'òrgan, propera al concepte de tolerància, i que podem associar a aquest increment destacat de la població de cèl·lules CD4<sup>+</sup> Th2.

D'aquesta part de l'estudi en podem extreure que és possible aconseguir llargues supervivències en combinacions xenogèniques utilitzant dosis baixes d'immunosupressió sense que es manifestin alteracions histològiques de rebuig i amb una correcta funció de l'empelt. Els canvis que es poden observar tant en les proporcions com en el nombre total de limfòcits de cada subpoblació en sang perifèrica són indicatius del que està passant a l'empelt. En la nostra experiència aconseguint un estat d'acceptació indefinida de l'empelt de l'empelt, no hem observat paral·lisme entre els canvis que tenen lloc en sang perifèrica i les subpoblacions limfocitàries infiltrants al parènquima hepàtic, potser com a conseqüència del baix nombre de cèl·lules infiltrants. Tal vegada, en una situació de rebuig podríem establir una correlació entre les observacions en sang perifèrica i en teixit tant en animals receptors d'un al·loempelt com d'un xenoempelt. Hi ha un predomini de cèl·lules B OX-33<sup>+</sup> en sang perifèrica, aquest fet s'esdevé més marcat a mesura que augmenta el temps postrasplantament. A més a més també hi ha un increment de cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-</sup>, cèl·lules Th2, les quals suprimeixen la immunitat mitjançada per cèl·lules i es veuen involucrades en processos de tolerància i acomodació. Probablement, la persistent administració de dosis molt baixes d'immunosupressió afavoreix l'activació d'un mínim nombre de cèl·lules T reguladores, essencials per a que s'arribi a un procés d'acceptació indefinida de l'empelt. Huang et al.<sup>233</sup> han observat que es necessària la secreció d'uns nivells baixos d'IL-2 per tal d'induir l'acceptació de l'empelt, així doncs han descrit que altes dosis d'immunosupressió poden inhibir l'acceptació de l'òrgan trasplantat. Per tant associem tant l'increment de cèl·lules B com de limfòcits CD4<sup>+</sup>Th2 a una situació que nosaltres definim com a "protolerant".

Malgrat haver vist en la part de l'estudi que acabem de comentar que és possible aconseguir supervivències llargues d'animals receptors de xenoempelts hepàtics que es troben en una situació protolerant amb dosis baixes de fàrmac immunosupressor, és sabut que a més a més de superar les barreres immunològiques hi ha molts altres problemes relacionats amb el xenotrasplantament, encara que es tracti de trasplantament entre espècies properes filogenèticament. Més de 2500 productes espècie-específics són excretats pel fetge i per tant cal tenir present que si una o més d'aquestes proteïnes perden la seva funció els passos de senyalització s'interrompen i les cèl·lules pateixen un dany irreversible<sup>109</sup>. Així doncs un altre punt molt important són les incompatibilitats metabòliques, especialment quan l'òrgan implicat és el fetge, clau en moltes vies metabòliques de l'organisme. El model que nosaltres utilitzem és molt útil per fer aquest tipus d'estudis donat que permet conèixer els canvis que es donen a nivell metabòlic a llarg termini i sense respostes immunològiques agressives que podrien enmascarar altres paràmetres. Sembla que en el món científic hi ha un acord envers la idea que el fetge, si el xenotrasplantament clínic arriba ser una realitat, serà l'últim òrgan a ser xenotrasplantat amb èxit, malgrat la seva immunotolerància. Així doncs, paral·lèlament a

l'estudi de les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica i amb els mateixos animals vam realitzar un estudi dels canvis que experimentava l'*status* hemostàtic en receptors de llarga supervivència d'un xenoempelt hepàtic tot comparant-los amb al·loempelts sotmesos al mateix tractament immunosupressor.

La idea d'escollir la cascada de la coagulació, d'entre els múltiples processos en els quals el fetge hi té un paper clau perquè hi desenvolupa una funció directa o hi exerceix un control de manera indirecta, va ser perquè és un procés on hi ha molts factors implicats, la majoria de síntesi hepàtica, i tots ells han d'estar en un perfecte equilibri perquè funcioni adequadament. A més a més és una cascada que sovint és veu implicada en els processos de rebuig.

Fins al moment s'han realitzat estudis, gairebé tots *in vitro*, que descriuen les incompatibilitats que presentaria, el model que podria ser una realitat clínica, porc-humà en relació al sistema de la coagulació. Un dels estudis més destacats que s'ha dut a terme en aquest camp és el que van realitzar Ramírez et al. amb el model porc-primat utilitzant porcs transgènics h-DAF i on van observar que babuins receptors d'aquests empelts hepàtics mantenien una coagulació suficient fins al dia vuit postrasplantament<sup>240</sup>; els factors de la coagulació eren substituïts pels de nova síntesi pel fetge transgènic porcí i s'aconseguien nivells normals. Tot i que aquest model és molt més semblant al que podria ser una realitat clínica no permet realitzar estudis a llarg termini.

El fetge és un òrgan que participa i coordina molts processos metabòlics i ha estat extensament estudiat des del punt de vista fisiològic, però hi ha molt pocs estudis sobre les conseqüències del xenotrasplantament hepàtic en receptors de llarga supervivència. Amb el nostre estudi hem intentat incrementar els coneixements en aquest tema.

Com ja hem citat anteriorment en tots els grups d'estudi l'empelt funcionava correctament i no s'evidenciaven signes de rebuig. Així doncs observàrem que els resultats de les proves de funció hepàtica, tot i que alguna determinació de transaminases fos lleugerament superior en cap cas eren indicadores de disfunció hepàtica. D'altra banda ens trobàrem amb nivells més baixos d'albumina, però el fet de que fossin estables al llarg dels 100 dies ens demostrà un bon funcionament de l'òrgan. Tal i com hem explicat anteriorment, histològicament no presentaven cap característica compatible amb un rebuig, l'únic signe rellevant que presentaven els empelts va ser la proliferació colangiolar dels receptors d'al·loempelts.

En relació als paràmetres que ens donen una idea general del funcionament de la cascada de la coagulació, temps de protrombina i el temps de tromboplastina parcial

activada, els nostres resultats revelen una alteració de la via extrínseca com es demostra amb l'allargament del temps de protrombina en les rates allotrasplantades. Aquest allargament s'associa a una davallada del factor V fet que podria suggerir un cert grau de disfunció hepàtica tot i que no la podem confirmar amb els valors obtinguts amb els altres paràmetres valorats. Aquesta particularitat no s'ha observat a les rates xenotrasplantades, que mostren el contrari, una reducció del temps de protrombina essent així nivells equivalents als del hàmmster donant. D'altra banda els valors obtinguts de TTPA no són indicadors d'una alteració de la via intrínseca i a més a més hem pogut observar que s'adopten valors similars als de l'espècie donant en cadascuna de les dues modalitats de trasplantament que hem dut a terme. En els grups de xenotrasplantament, de fet, el que nosaltres hem observat són nivells lleugerament superiors als dies 7 i 30 postrasplantament que podrien associar-se a un cert grau de desregulació buscant els nivells que duen a l'equilibri.

Quan centrem la nostra atenció en els inhibidors de la coagulació, dels quals l'antitrombina n'és el principal representant, la interpretació dels resultats obtinguts semblen suggerir que s'adopten valors d'aquest paràmetre similars als que presenta l'espècie donant, conseqüència de l'origen hepàtic d'aquesta proteïna. Malgrat observar diferències significatives en relació a les rates control, les rates xenotrasplantades no semblen presentar alteracions relacionades amb el risc trombòtic que en principi podríem esperar conseqüència d'aquesta disparitat de resultats.

Probablement el resultat més interessant i que crida l'atenció d'aquest estudi són els valors obtinguts de la determinació de la proteïna C, ja que aquesta proteïna és indetectable en el plasma de les rates control i sempre és present al de hàmmster. Per tant podem entendre la manca de proteïna C que hem observat en tots els animals allotrasplantats així com els nivells creixents que s'observen als animals receptors d'un xenoempelt que al dia 30 postrasplantament presentaven nivells similars als dels hàmmsters control i que hem vist que es mantenen del mateix ordre com a mínim fins als 100 dies després del trasplantament, dia del sacrifici dels animals del grup 9.

Tant la forma activa com la inactiva de la proteïna C s'uneixen al seu receptor, EPCR de l'anglès: Endothelial Protein C Receptor, aquest incrementa l'activació de la proteïna C. Tanmateix la dissociació del seu receptor és necessària perquè realitzi les seves funcions anticoagulants, les quals les duu a terme un cop s'uneix amb la proteïna S, un cofactor depenent de vitamina K necessari per a l'activació de la proteïna C. Proteolíticament inactiven els factor V i VIII<sup>241</sup>. Encara que la síntesi d'aquest cofactor no és exclusivament hepàtica<sup>242</sup>, nosaltres pensem que la principal font de proteïna S és el fetge, ja que les quantitats d'aquesta proteïna detectades en rates trasplantades amb un empelt de rata

Brown Norway són similars als observats en rates BN normals ja que hem vist que tenen nivells més alts que les rates Lewis control. La presència de Proteïna S lliure en les rates en absència de proteïna C qüestiona el paper de la proteïna S en aquest animal. En humans s'ha evidenciat que l'activitat antitrombòtica de la proteïna S no és exclusivament com a cofactor de la proteïna C activada, sinó que també posseeix un efecte directe disminuint l'activació de la protrombina, és a dir, la formació no dependent de proteïna C del complex protrombinasa<sup>243</sup>. Aquest podria ser el paper de la proteïna S en la rata. Tot i que en éssers humans és sabut que la proteïna C activada és necessària per controlar la cascada de la coagulació, en rates control no detectem aquesta proteïna. Així doncs, nosaltres pensem que en rates ha d'existir un mecanisme alternatiu perquè tant en rates normals com les al·lotrasplantades no observem anormalitats trombòtiques. A més a més nosaltres pensem que la proteïna C d'origen de hámster no indueix alteracions hemostàtiques encara que no coneixem quin paper juga en les rates xenotrasplantades i més tenint en compte que les rates és probable que no expressin el receptor d'aquesta proteïna: EPCR.

La conversió de protrombina a trombina activa és un pas clau de la cascada de la coagulació. La trombina actua sobre diferents substrats fisiològics (fibrinògen, proteïna C, plaquetes, etc.) i és inhibida per l'antitrombina. La significació clínica de la determinació dels complexos trombina-antitrombina és el diagnòstic d'esdeveniments trombòtics. Alteracions que predisposen a trombosis correlacionen amb concentracions elevades dels complexos Trombina-Antitrombina. En el nostre treball hem vist un pic d'aquests complexos el dia 7 posttrasplantament en les rates xenotrasplantades, que no atribuïm a la cirurgia perquè el grup equivalent d'al·lotrasplantament ha estat sotmès al mateix procediment i no presenta aquest increment. Malgrat observar aquest nivells alts dels complexos TAT no hem trobat alteracions trombòtiques en l'anàlisi histològica dels empelts. Això evidencia una activació de la coagulació inicial a l'animal receptor, probablement fruit d'una inestabilització de l'equilibri trombòtic-hemostàtic. Aquesta activitat pretrombòtica no va acompanyada de fenòmens clínics trombòtics i tendeix a desaparèixer progressivament als trenta dies i als tres mesos. Per aquest motiu, en els primers dies després del xenotrasplantament, s'observa una activació de la coagulació però no s'associa a una coagulopatia de consum perquè, com hem comentat anteriorment, els factors V, VIII i l'antitrombina no han disminuït.

Així doncs d'aquesta part de l'estudi en podem concloure que en el model de xenotrasplantament hepàtic hámster-rata es produeix una activació de la trombosi als primers dies posttrasplantament no associada a una coagulopatia de consum. Probablement aquesta desregulació és deguda a un desequilibri general com a conseqüència del recanvi de tots els components de síntesi hepàtica, però que no comporta més problemes perquè es corregeix amb el temps. Així mateix, el xenotrasplantament comporta que l'animal receptor adopti un

perfil de paràmetres hemostàtics de l'espècie donant. Finalment, l'absència de símptomes trombòtics i/o hemorràgics ens fa suposar que el canvi de *status* hemostàtic es realitza en condicions d'equilibri.

Aquest primer estudi ens va servir per veure que la pauta immunosupressora administrada, MMF durant 8 dies i dosis baixes de Tacrolimus, era suficient per frenar l'aparició del rebuig els primers dies postrasplantament i a més a més mantenir una situació d'acceptació indefinida del xenoempelt hepàtic. Malgrat trobar-nos davant d'una situació propera a la tolerància no podíem parlar-ne en sentit estricte. Amb la intenció d'induir tolerància i frenar l'aparició del rebuig vam plantejar-nos el segon estudi retirant el tractament immunosupressor i administrant l'antagonista del PAF UR-12670, fàrmac d'origen sintètic més potent que altres antagonistes del PAF amb els que ja s'havien fet estudis en trasplantament. Tal i com hem explicat a la introducció, el PAF o Factor d'Activació Plaquetar és un fosfolípid sintetitzat a partir de les membranes plasmàtiques i del que s'han descrit efectes sobre el sistema immunitari en processos de trasplantament. Es va demostrar la seva implicació en el camp dels trasplantaments per primer cop en trasplantament renal<sup>196</sup>. Aquest fet va ser el detonant per estudiar les propietats immunomoduladores dels fàrmacs antagonistes del PAF<sup>189</sup>. S'han dut a terme diferents estudis en al·lotrasplantament i xenotrasplantament on l'administració d'antagonistes del PAF han retardat l'aparició del rebuig. Així doncs ens va semblar una bona estratègia per induir tolerància continuar amb les dosis d'anticalcineurínic adaptades com a òptimes en l'estudi 1 en combinació amb un antagonista del PAF; esperàvem veure l'acceptació dels empelts un cop retirat el fàrmac anticalcineurínic.

El fetge es caracteritza per ser un òrgan amb característiques immunològiques particulars, presenta una clara resistència al rebuig mitjançat per anticossos. La causa que li dóna aquesta peculiaritat al fetge no és del tot coneguda però si que és ben sabut que té algunes característiques que hi juguen un paper important en aquest comportament. Així doncs el fet que tingui una microcirculació per sinusoides, amb un endoteli fenestrat sense làmina basal, i la seva doble aportació sanguínia per evitar lesions isquèmiques, ja que si una via d'aportació sanguínia es veu compromesa l'altra supleix la mancança de la circulació de la sang, són dues de les característiques que hi tenen una relació directa però no són les úniques. També es caracteritza perquè allibera a la circulació un nombre elevat de molècules de MHC les quals poden unir-se i bloquejar els anticossos que presenta el receptor. D'altra banda, autors com Gugenheim et al<sup>26</sup> han descrit una absorció massiva per part del fetge d'anticossos limfocitotòxics evitant així els seus efectes destructors. A més a més l'elevada quantitat de cèl·lules de Kupffer que té el fetge també participen en l'eliminació d'aquests anticossos. Un altre fet rellevant és que el fetge conté un elevat nombre de leucòcits passatgers que arriben al receptor juntament amb el fetge i que poden induir processos de

quimerisme quan migren cap als òrgans limfoides, procés necessari segons Starzl<sup>244,245</sup> per a la inducció i manteniment de la tolerància.

En aquest segon treball, on l'objectiu era poder induir tolerància, no vàrem observar un increment de la supervivència dels animals que van rebre un tractament amb l'antagonista del PAF administrat amb la idea de modular els canvis que podia experimentar la resposta immunitària amb la disminució de les dosis dels fàrmacs immunosupressors. Ni l'administració d'UR12670 durant els set primers dies, període clau per a l'acceptació de l'òrgan xenotrasplantat (l'acceptació de l'empelt hepàtic està associada a l'activació i apoptosi primerenca de les cèl·lules T reactives del receptor<sup>233</sup>), ni la seva administració diària va ser suficient per induir l'acceptació definitiva de l'empelt ni per reproduir l'estadi protolerant observat en l'estudi 1. Probablement, la possibilitat d'administrar l'antagonista del PAF UR-12670 de forma continuada (infusió, alliberació retardada, etc) permetria el manteniment de nivells constants del fàrmac afavorint l'acció immunomoduladora d'aquest. Així doncs, el que vam observar fou l'aparició del procés conegut com a Rebuig Tardà del Xenoempelt o LXR. Tanmateix en l'anàlisi histològica vam constatar una millora realment significativa dels empelts. No hem sabut trobar una explicació clara per aquesta discrepància entre la millora histològica i l'absència d'un increment de la supervivència, però sota el nostre punt de vista ha de ser conseqüència d'una suma de diferents factors.

Les causes de rebuig, tot i ser presents en els tres grups d'aquest segon estudi, semblen ser menys acusades al grup C, grup que rep de forma continuada l'antagonista del PAF. El benefici més clar de l'administració de l'antagonista del PAF UR-12670 el vam poder observar en la reducció del dany isquèmic; els grups A i B presentaven extenses àrees de necrosi confluent massiva tant en la zona lobel·lar com en la centrelobel·lar així com àmplies zones de pèrdua d'hepatòcits de les quals en resultaven grans àrees d'hemorràgia. El procés de rebuig implica l'activació de cèl·lules endotelials les quals causen l'expressió de PAF, amb el resultat del reclutament de leucòcits. Així doncs molts senyals proinflamatoris estan involucrats en l'activació de les cèl·lules endotelials<sup>246</sup> i l'administració de UR-12670 modula alguns d'aquests senyals portant canvis del patró de rebuig, que com ja hem explicat, principalment són reflexats en la reducció de necrosi hepatocitària, l'hemorràgia i en la infiltració de cèl·lules mononucleades. Els nivells de trasaminases que presenten els animals del grup C són considerablement més baixos durant tot el seguiment que se'ls efectua excepte els dies propers al rebuig quan tots els grups n'experimenten un augment brusc. Malgrat no aconseguir la significació estadística, aquest fet pot estar directament relacionat amb la reducció de la necrosi que presenten els empelts dels animals que integren aquest grup amb l'administració continuada d'UR-12670. Sota el nostre punt de vista la manca de significació

estadística no ens ha sorprès, tal i com ja s'ha observat en estudis clínics, no sempre existeix una bona correlació entre els valors sèrics de transaminases i el grau de lesió hepàtica.

L'anàlisi histològica mostra una reducció de la quantitat de cèl·lules mononucleades infiltrants al parènquima hepàtic, tant macròfags, macròfags residents i limfòcits. En relació als limfòcits, la manca de diferències significatives estadísticament probablement és deguda al fet que les mostres dels empelts dels grups A i B, que no reben UR-12670 o bé en reben els primers set dies després del trasplantament respectivament, presenten extenses àrees de necrosi i hemorràgia intersticial i això faria que la part on resten estructures histològiques valorables i on es pot determinar l'infiltrat limfocitari sigui menor i emmascarar els resultats numèrics. La disminució del nombre de cèl·lules infiltrants al parènquima hepàtic, concretament als espais porta, pot ser deguda al paper que se li atribueix al PAF com a regulador de l'extravasació leucocitària. A més a més, en alguns models experimentals ha estat demostrat que el PAF pot modelar moltes funcions limfocitàries, tant mitjançant la producció de prostanoïds com de manera directa amb l'activació limfocitària i la síntesi d'IL-2<sup>247</sup>. Per tant, possiblement l'antagonista del PAF UR-12670 inhibeix l'activació limfocitària i la seva funció efectora en aquests animals. Un fet d'especial rellevància és la relació que hi ha entre la reducció de la necrosi i el baix nombre de cèl·lules mononucleades infiltrant al parènquima, ja que l'infiltrat cel·lular pot ser la causa de la pèrdua d'hepatòcits per mitjà d'un mecanisme de citotoxicitat hepatocitària associada a una resposta d'hipersensibilitat retardada junt amb nivells baixos d'anticossos IgM. El terme hipersensibilitat retardada es refereix a l'acció d'alguns limfòcits Th1 que davant de determinats antígens segreguen citocines que indueixen una reacció inflamatòria. Nosaltres hem atribuït el fet que els patrons histològics dels grups A i B siguin tan similars a que el grup B només rep l'antagonista del PAF durant els set primers dies després del trasplantament. Si bé el fàrmac actua durant els primers dies<sup>219</sup> no té un efecte citoprotector a llarg termini si no s'administra de forma continuada. Així doncs la millor preservació de l'arquitectura hepàtica observada en els empelts del grup C indica clarament que el PAF es troba implicat en el procés de rebuig tardà del xenoempelt (LXR).

La valoració dels resultats de l'estudi immunohistoquímic ens dóna proporcions de cada subpoblació limfocitària però no ens indica si hem observat més o menys infiltrats en un grup o en un altre. Quan observem els resultats qualitius obtinguts d'aquesta caracterització limfocitària de les cèl·lules infiltrants als espais porta veiem que els dos grups que reben UR-12670 presenten proporcions molt semblants de les diferents subpoblacions limfocitàries i difereixen significativament de les que presenta el grup A que no rep l'antagonista del PAF. Quantitativament també veiem una disminució estadísticament significativa en relació al nombre de macròfags ED1<sup>+</sup> infiltrants i una disminució notable, sense arribar a la significació

estadística, de macròfags residents ED2<sup>+</sup>. Així doncs, sembla que, tot i que no hem pogut veure un increment de la supervivència de l'empelt, l'UR-12670 condiona les proporcions de les subpoblacions limfocitàries ja als primers dies després del trasplantament i té un efecte directe inhibint la migració de monòcits cap a l'empelt. Amb les determinacions realitzades no podem conèixer quin és el mecanisme concret en el que l'antagonista del PAF es veu implicat de manera directa però si que ens suggereix que és un mecanisme implicat en la resposta primerenca de l'organisme davant l'empelt els primers dies postrasplantament, que com ja hem citat anteriorment, és un període decisiu per a l'acceptació de l'empelt<sup>233</sup>. Potser podríem pensar en un cert tipus d'anèrgia o alteració específica que pot estar relacionada amb la naturalesa de la primera trobada de les cèl·lules del sistema immunitari amb els antígens. Un cop analitzats els nostres resultats, on veiem un efecte beneficiós de l'antagonista del PAF, es fa palès que tot i conèixer algunes de les accions del PAF sobre els leucòcits com l'increment de la seva proliferació perquè augmenta els nivells d'IL-2 o el seu paper com a molècula d'adhesió durant les interaccions inicials entre leucòcit-endoteli ens manca un coneixement més profund dels papers que realitza el PAF en el sistema immunitari.

D'altra banda la quantificació dels nivells d'anticossos antihàmsster per citometria de flux demostra que l'antagonista del PAF, a la dosi de 20 mg/kg/dia, no té efectes en la disminució del nivell de xenoanticossos, realitzant les determinacions a diferents dies postrasplantament. Vam confirmar observacions anteriors tant del nostre grup com d'altres autors<sup>59,154</sup>, observant-ne un pic important d'anticossos IgM i un de moderat de IgG al dia +7 postrasplantament. El mateix comportament i amb nivells similars va ser observat en els tres grups de l'estudi malgrat que és conegut el paper del PAF en l'activació primerenca de les cèl·lules B i per tant pot regular la producció d'anticossos<sup>248</sup>. D'aquests resultats podem extreure'n que durant els primers dies postrasplantament es produeix una intensa resposta humoral majoritàriament T-independent, i quan es retira la immunosupressió no s'observa un increment del nivell d'anticossos, fet que suggereix un silenciament de la resposta humoral T-depenent.

Els nivells d'anticossos en sèrum fa evident la participació dels anticossos en el model de trasplantament hepàtic que hem utilitzat. Malgrat observar aquest important pic d'IgM al dia 7 postrasplantament no sembla suposar un motiu de rebuig de l'òrgan trasplantat ja que observem, en tots els grups, una supervivència al voltant dels 60 dies. D'altra banda tampoc vam observar canvis rellevants dels nivells en sèrum de la molècula C3 del complement. Amb l'anàlisi de les determinacions de dipòsits d'immunoglobulines i de complement vam observar dipòsits lleus de IgG i de C3 i moderats de IgM. Aquests fets indiquen que no es dona un procés típic de rebuig humoral com es dona al xenotrasplantament cardíac heterotòpic tal i com ja han descrit altres autors com Molleví et al. <sup>59</sup>. Un cop més es fa palesa la resistència del fetge al rebuig humoral.

Malgrat treballar amb un model que presenta un rebuig amb més característiques de ser un procés cel·lular, no hem de restar-li importància als anticossos que també s'hi troben implicats. Per tal de conèixer millor les característiques d'aquests anticossos vam realitzar la tècnica d'*immunoblot* i vam dur a terme determinacions d'immunofluorescència indirecta. L'*immunoblot* no ens mostrà que els anticossos IgM detectats per citometria de flux que estàvem valorant compartissin l'especificitat per un nombre reduït d'antígens sinó que en resultà un patró de bandes força nombroses i per tant que possiblement ens trobàvem davant d'un nombre elevat d'antígens o bé un epítop comú en moltes molècules. El fet que el mateix patró de bandes s'observés als diferents grups i a diferents dies postrasplantament suggereix que l'especificitat d'aquests anticossos es manté en tots els grups i a diferents temps postrasplantament. A més a més cal destacar que observem un paral·lelisme amb el patró de bandes observat quan el sèrum enfrontat al *blot* és sèrum de rates *naive* tot i que la intensitat d'aquestes bandes sigui molt menor. Així doncs els nostres resultats no coincideixen amb els de Chong et al.<sup>150</sup>, que descriuen un canvi d'especificitat dels anticossos implicats en el LXR quan els comparen amb els presents en el rebuig vascular agut en un model de trasplantament cardíac heterotòpic. Nosaltres no observem un canvi de patró en xenotrasplantament hepàtic entre les mateixes espècies, hámster i rata. Amb els estudis d'immunofluorescència indirecta on hem enfrontat mostres de sèrum dels diferents grups a diferents dies postrasplantament, hem corroborat el manteniment de l'especificitat dels anticossos ja que vam observar un canvi d'intensitat però no de distribució de la fluorescència. Aquesta fluorescència era situada vorejant els vasos grans, els hepatòcits i entremig dels infiltrats inflamatoris. Aquests resultats junt amb els de l'*immunoblot* ens indiquen que són anticossos que s'uneixen a proteïnes de membrana i probablement a la matriu extracel·lular també. El fet que tot indiqués que el ventall d'antígens fos tant ampli ens va fer plantejar la idea de que es pogués tractar d'anticossos específicament dirigits contra antígens de hámster o bé es tractava d'anticossos naturals sobreexpressats. Per tal de fer una petita incursió en aquest tema vàrem enfrontar sèrum del dia 7 postrasplantament a mostres d'esòfag de simi, esòfag de hámster, a xenoempelts cardíacs de hámster i a fetge normal de rata de la soca Lewis. El que vàrem observar va ser una clara fluorescència en tots els casos excepte en les mostres de rata fent-nos pensar que els anticossos IgM que trobem en nivells molt més elevats del normal el dia set postrasplantament, podria tractar-se d'anticossos naturals no específics d'espècie enlloc d'anticossos específics de hámster; aquests anticossos són polireactius, van dirigits contra estructures molt ubiqües i molt conservades filogenèticament<sup>249</sup>. El fet que les mostres de rata no mostrin un marcatge fluorescent reforça la teoria que es pugui tractar d'anticossos naturals dirigits contra polisacàrids, fosfolípids o certes proteïnes.

Dels resultats d'aquest segon estudi veiem que en el model de xenotrasplantament hepàtic ortotòpic hámster-rata és dóna una resposta depenent d'anticossos i de cèl·lules mononucleades ja que hem observat l'increment dels nivells d'anticossos i cèl·lules limfocitàries infiltrants als empelts hepàtics. En el context del LXR que nosaltres hem vist en el nostre estudi, l'antagonista del PAF UR-12670, administrat diàriament a una dosi de 20 mg/kg, no és suficient per perllongar la supervivència de l'empelt i induir tolerància. Tanmateix modula la resposta cel·lular, té un efecte citoprotector sobre els hepatòcits i millora l'estat general de l'empelt suggerint la implicació del PAF en aquesta forma de rebuig.

Finalment, després de valorar la nostra experiència creiem que una estratègia idònia per induir tolerància en una combinació concordant com és la de hámster-rata seria aquella que s'iniciés el tractament amb fàrmacs immunosupressors el dia del trasplantament a dosis com les proposades al primer estudi de la present tesi (0.5mg/Kg) i es mantingués la immunosupressió de manera continuada però reduint-ne progressivament les dosis (0.2mg/Kg, 0,1mg/Kg) fins al moment de la seva retirada al voltant del dia +100, quan es considera com a supervivència indefinida de l'empelt, i acompanyant aquest tractament amb un immunomodulador com podria ser l'antagonista del PAF UR-12670, buscant la via d'administració més idònia, que es mantindria de forma indefinida.

## **6. CONCLUSIONS**



1. En el model de xenotrasplantament hepàtic ortotòpic hámster-rata, es poden aconseguir supervivències indefinides en monoteràpia amb Tacrolimus a dosis baixes sense que es manifesti cap signe de rebuig i amb una correcta funció de l'empelt.
2. L'increment de la subpoblació de limfòcits T CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-</sup> i la presència de gran quantitat de cèl·lules B (i no cèl·lules plasmàtiques) en els empelts de les rates xenotrasplantades, juntament amb el bon estat general dels animals, una preservació total de la histologia, una bona funció hepàtica, un equilibri de l'*status* hemostàtic acompanyat d'uns nivells molt baixos d'immunosupressió, ens fa assegurar que en aquests animals s'està donant un procés d'acceptació indefinida de l'empelt que anomenem "protolerant".
3. Els canvis de les proporcions i del nombre total de cada subpoblació limfocitària en sang perifèrica són bons indicador del que està succeint a l'empelt.
4. En els models de rosegadors de llarga supervivència utilitzats en aquesta tesi, no existeixen diferències en les subpoblacions limfocitàries en sang perifèrica entre al·lotrasplantament i xenotrasplantament.
5. En el model de xenotrasplantament hepàtic hamster-rata es produeix una activació de la trombosi en els primers dies posttrasplantament no associada a coagulopatia de consum. Probablement, aquesta desregulació és deguda a un desequilibri general com a conseqüència del recanvi de tots els components de síntesi hepàtica, però que no comporta més problemes perquè és corregida amb el temps.
6. El xenotrasplantament hepàtic comporta que l'animal receptor adopti el perfil de paràmetres hemostàtics de l'espècie donant.
7. L'absència de símptomes trombòtics o hemorràgics ens fa suposar que el canvi del *status* hemostàtic es realitza en condicions d'equilibri.
8. L'administració continuada de l'antagonista del PAF UR-12670 a una dosi de 20 mg/kg no és suficient per perllongar la supervivència de l'empelt i induir tolerància.
9. Tanmateix modula la resposta cel·lular, redueix la infiltració leucocitària, condiona les subpoblacions limfocitàries infiltrants al parènquima, té un efecte citoprotector sobre els hepatòcits i millora l'estat general de l'empelt suggerint la implicació del PAF en el rebuig tardà del xenoempelt (LXR).

10. En el model de xenotrasplantament hepàtic hámster-rata no es dóna un canvi d'especificitat dels anticossos d'isotip IgM a diferents dies postrasplantament.
11. Així mateix, aquests anticossos polireactius de l'isotip IgM presents al sèrum de les rates xenotrasplantades a diferents dies postrasplantament no són específics d'espècie.