

# Algunos aspectos relacionados a trasplantes de órganos y tejidos

Dra Alicia Lorenti

# TRASPLANTES



✓ **Organos sólidos**

✓ **Tejidos/Células**

✓ **Ortotópico**

✓ **Heterotópico**

✓ **Autoinjerto:** el donante es el receptor

✓ **Aloinjerto (homo):** entre individuos de la misma especie

✓ **Heteroinjerto (xeno):** entre individuos de diferentes especies

# Los primeros trasplantes

## Tx de piel

**1869** Reverdin → Autoinjerto

**1874** Menzel → Homoinjerto cadavérico  
**1881** Girdner → Problemas: Transmisión de enfermedades infecciosas; Rechazo inmunológico

**1925** → se recomienda usar piel de personas sanas

**1939-1945** (Segunda guerra mundial) → Grandes avances en el uso de injertos en soldados quemados

**1940** Medawar → bases del carácter inmunológico del rechazo de injertos de piel



# Los primeros trasplantes

- 1906 Jaboulay** → primer Tx renal en humano, con órgano de cerdo; 3 días después el órgano fue removido con los vasos trombosados
- 1954** → primeros Tx renales exitosos, entre gemelos idénticos
- 1963 Starlz** → primer Tx hepático, con resultado desfavorable
- 1964** → primeros Tx con donantes cadavéricos; uso de drogas inmunosupresoras para evitar rechazo agudo

# Los primeros trasplantes en Argentina

- 1928** Manes → primer Tx de córneas,  
Hospital Rawson
- 1948** Ottolenghi → primer Tx de huesos,  
Hospital Italiano
- 1988** de Santibañes → primer Tx hepático,  
Hospital Italiano

# Histocompatibilidad

1935, Carrel

El autoinjerto en el perro puede sobrevivir indefinidamente, pero el aloinjerto rápidamente cesa en sus funciones

Se postula que el poder del organismo para eliminar el tejido extraño era debido a órganos tales como el bazo o la médula ósea

Queda planteado el rechazo inmunológico y se abre el camino hacia la Histocompatibilidad.

# Histocompatibilidad

## Sistema MHC (Major histocompatibility complex)

- Descubrimiento: participación en los fenómenos de rechazo/aceptación de órganos y tejidos
- Importancia:
  - Básica: Implicancia en la respuesta inmune – presentación de antígenos a las células inmunocompetentes
  - Clínica: Transplantes, injertos
  - Genética Poblaciones Humanas: Excelente Marcador poblacional. Sistema genético muy polimórfico (muchos genes ligados; cada locus con una amplia serie alélica)

# Histocompatibilidad

Complejo mayor de histocompatibilidad o MHC: familia de genes ubicados en el cromosoma 6



codifican glucoproteínas presentadoras de antígenos en la superficie celular, o HLA (human leukocyte antigen)

Comprende 3 clases

MHC I

MHC II

MHC III (No se encuentran en superficie, no participan en la respuesta inmune)

# Complejo MHC

- ✓ Conocido en 1958
- ✓ Procesan antígenos del interior de las células y las transportan al exterior para ser reconocidas por las células T
- ✓ Permiten selección de pacientes receptores de Tx
- ✓ 1962: surgen las drogas inmunosupresoras (Azathoprine)
- ✓ 1968: aceptación de muerte cerebral como criterio de muerte
- ✓ 1968, en Tx renales se demostró los beneficios de la compatibilidad HLA donante-receptor, en cuanto a la supervivencia del implante. El rechazo de un implante no compatible es inevitable, aún con drogas inmunosupresoras



**Regions**



**HLA class II region loci**

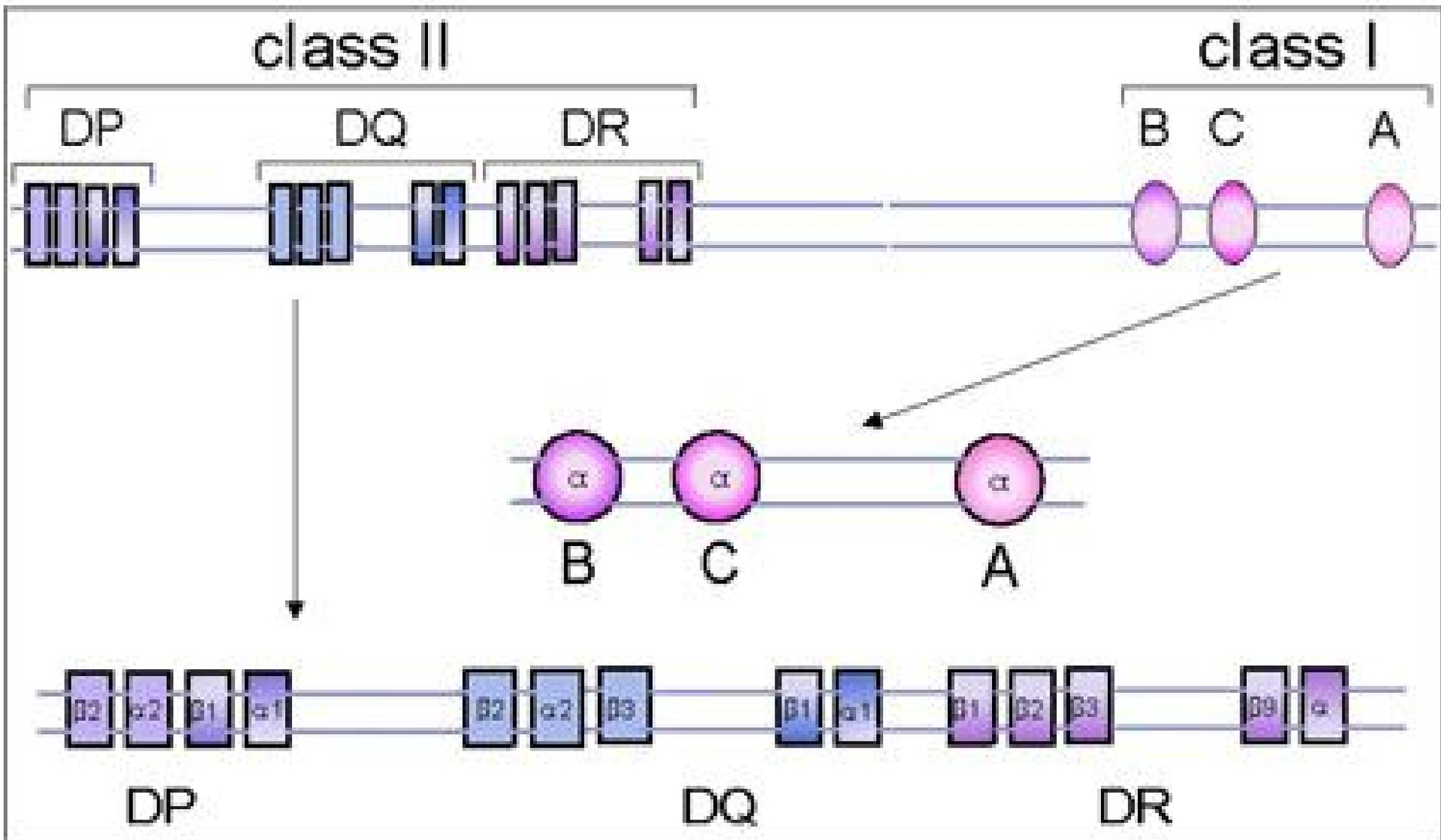


**HLA class III region loci**



**HLA class I region loci**



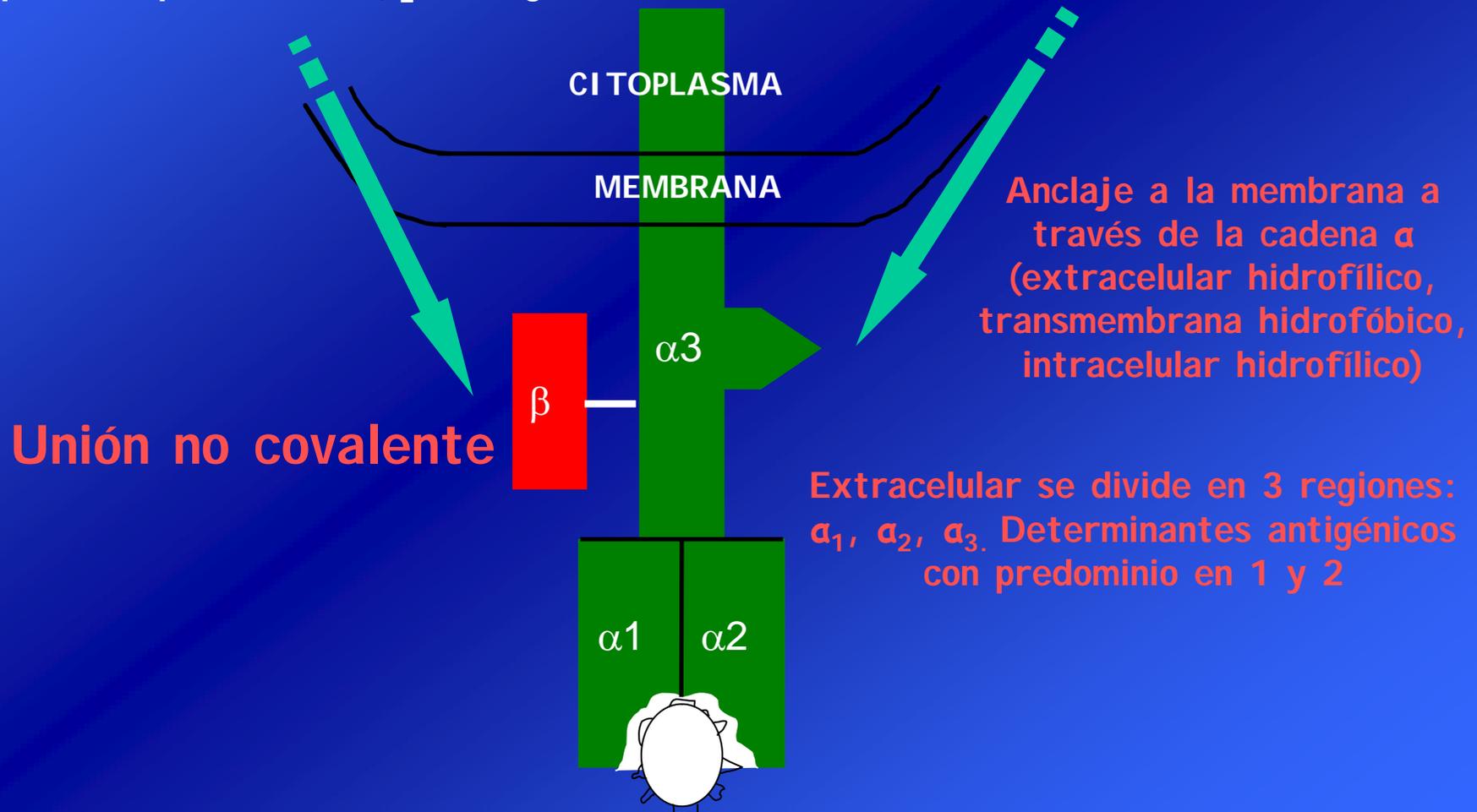


# MHC Clase I

Heterodímeros

Cadena liviana  $\beta$  (12 kD)  
(prot. no polimórfica,  $\beta_2$  microglobulina)

Cadena pesada  $\alpha$  (45 kD)



# MHC Clase I

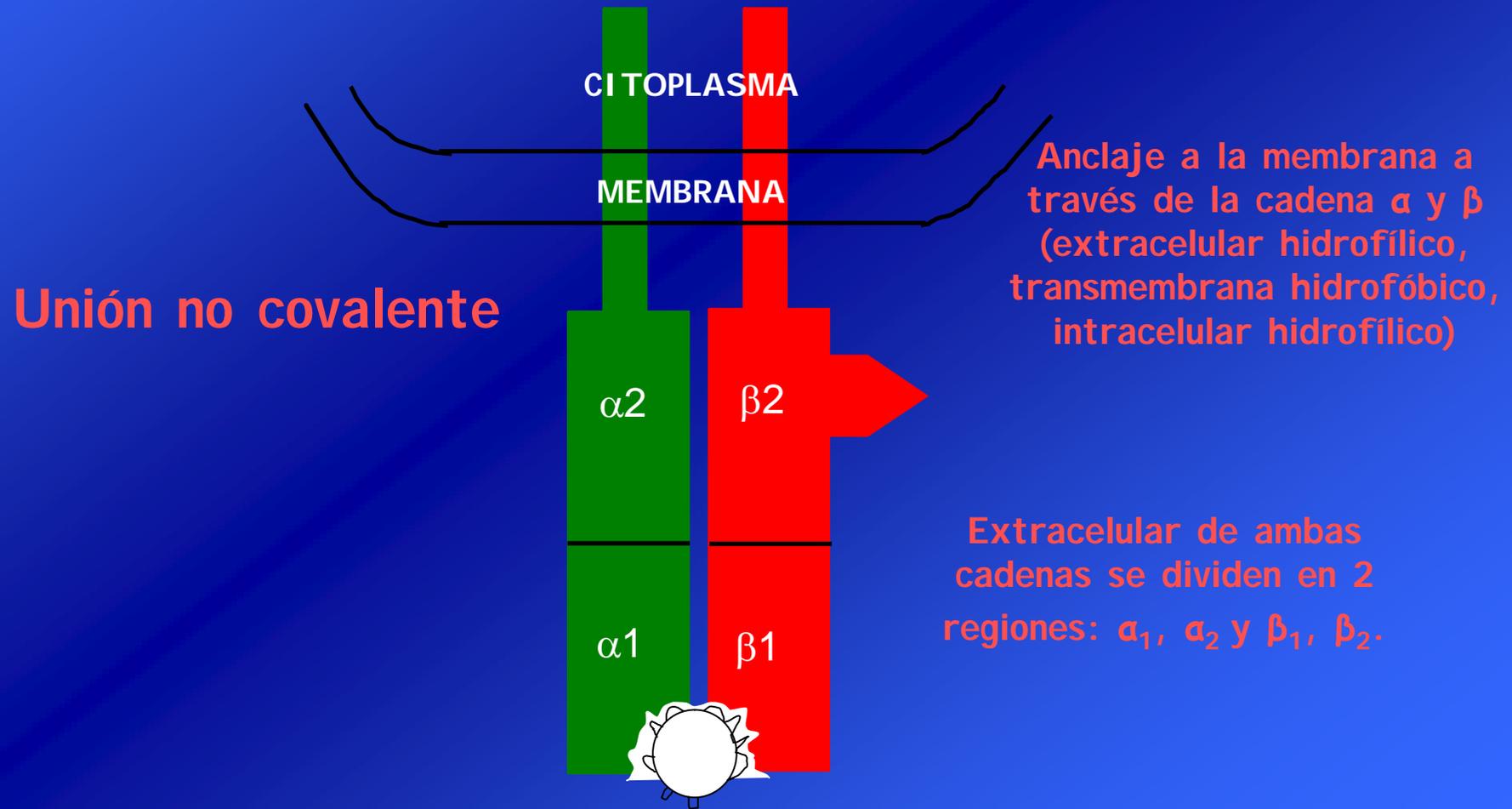
- ✓ Proteína de transmembrana
- ✓ Se expresa en todas las células nucleadas
- ✓ Presentan en superficie péptidos intracelulares a los linfocitos T CD8+
- ✓ Están codificadas por los locus A, B y C, que son las más importantes por su participación en la histocompatibilidad
- ✓ También existen los locus E, F y G, cuyas funciones no son claras. Participarían en la tolerancia materno-fetal y en algunos eventos inflamatorios

# MHC Clase II

Heterodímeros

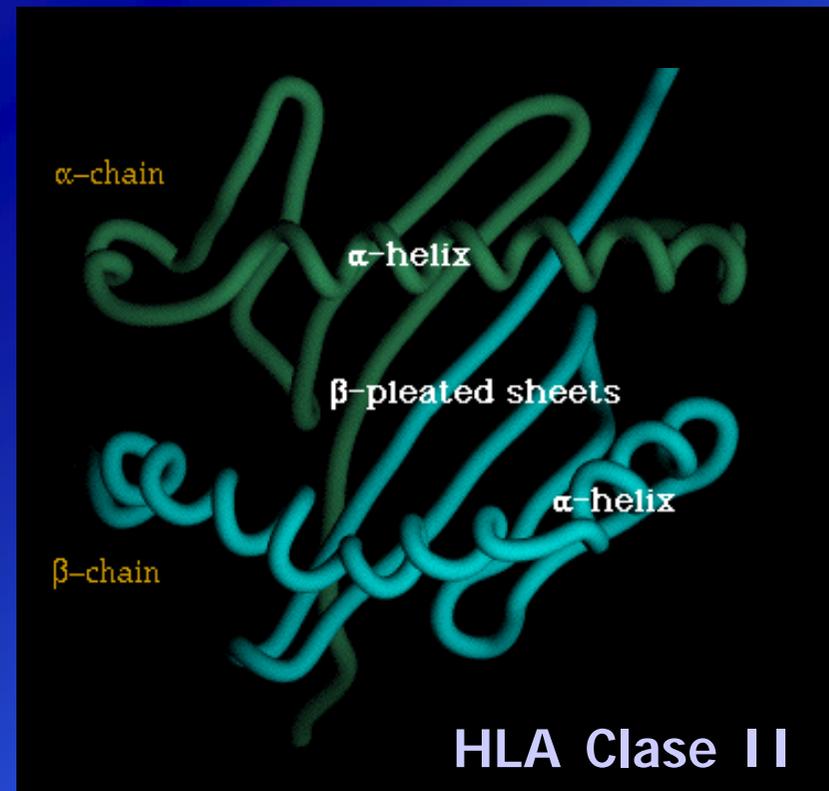
Cadena  $\alpha$  (31-34 kD)

Cadena  $\beta$  (26-29 kD)



# MHC Clase II

- ✓ Se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno profesionales (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas)
- ✓ Pueden encontrarse tras la estimulación con interferón  $\gamma$ , en las células endoteliales, epiteliales y linfocitos T
- ✓ Presentan péptidos derivados de la degradación de antígenos exógenos fagocitados por endocitosis, a los linfocitos T CD4+
- ✓ Son codificados por los locus DP, DQ, DR



# MHC Clase III

- ✓ Codifican para otros componentes del aparato inmunológico, como algunos factores del complemento
- ✓ Codifican para algunas citoquinas, como TNF  $\alpha$
- ✓ Sus funciones son muy diferentes de las de las clases I y II
- ✓ No participa en los procesos de rechazo

# Tipificación HLA

De vital importancia en:

Tx



En el receptor, reconocimiento directo o indirecto de las moléculas HLA no compatibles del donante, con la consiguiente activación de la respuesta inmune

Evaluación de enfermedades autoinmunes



Papel del HLA en la presentación de péptidos endógenos en la etiología de estas enfermedades

# Métodos de detección de proteínas HLA

- Serológicos - Utilización de anticuerpos específicos para antígenos leucocitarios HLA
- Moleculares - Detección de secuencias de DNA implicadas en la codificación de antígenos HLA

# Métodos serológicos de detección de proteínas HLA

## Linfocitotoxicidad

Se desarrolló en 1964

Se basa en la lisis celular producida por la reacción de anticuerpos específicos para antígenos leucocitarios HLA, con activación del complemento

La muerte celular es indicador de especificidad común de antígeno y anticuerpo, constituyendo la prueba positiva

# Linfocitotoxicidad

Se ponen en contacto linfocitos del paciente a estudiar con un panel de anticuerpos específicos para diversos alelos MHC de las clases I y II

Se incuba en presencia de complemento y se valora la citotoxicidad según la captación o exclusión de un colorante vital por las células

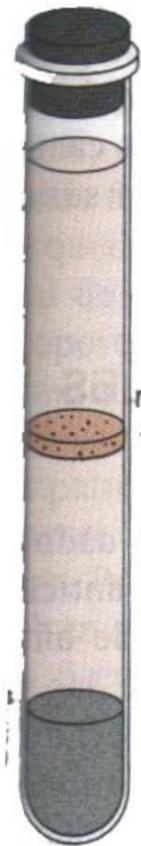
Se puede realizar cross-match contra donante (mejorando la sensibilidad de la técnica), o contra panel de células distintas

# Linfocitotoxicidad

Si los leucocitos expresan el alelo MHC para el que es específico el anticuerpo, se activa la vía clásica del complemento, y las células se lisan y captan el colorante

Esta prueba puede indicar la presencia o ausencia de diversos alelos MHC

Se evalúa el porcentaje de células lisadas



Células mononucleares

Se añaden células a un panel de antisueros



En microplaca de pozos

### Reacción positiva

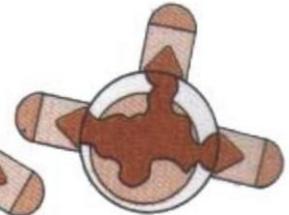
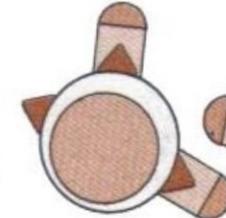
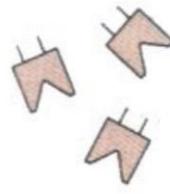
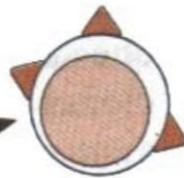
Célula B27 positiva

Anti-HLA B27

Reacción del anticuerpo

Complemento fijado

Célula dañada y penetración de colorante



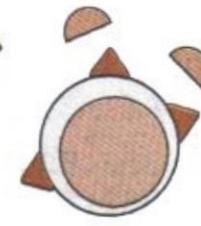
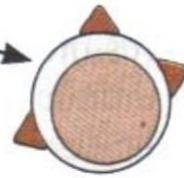
Linfocito

Antisero

Reacción

Complemento

Tinción de eosina



Célula B27 positiva

Anti-HLA-B8

El anticuerpo no reacciona

No se fija complemento

La célula permanece viable y sin teñirse

### Reacción negativa

# Cultivo Mixto de Linfocitos

Se determina la alorreactividad in vitro de las células T entre donante y receptor

Se usa para Tx renales y de médula ósea con donante vivo relacionado

Se combinan las células del donante inactivadas (por radiación o tratamiento con mitomicina), con las células del receptor

Se calcula el índice de estimulación midiendo la incorporación de timidina tritiada

# Cultivo Mixto de Linfocitos

Los linfocitos del receptor son inducidos a proliferar en presencia de células de un donante HLA diferente

Las células con HLA idéntico permanecen en reposo

La proliferación se desencadena principalmente por diferencias en los antígenos HLA clase II entre las dos poblaciones de células por analizar

# **Aloinmunidad para parejas infértiles**

## **(abortos espontáneos reiterados)**

La mujer embarazada tiene Ab bloqueantes, que tienen función de protección del embarazo

Estos Ab no están presentes en mujeres con abortos reiterados

El mecanismo podría ser el bloqueo del aloantígeno específico de la célula estimuladora (feto), o bloqueo del receptor del linfocito T materno, que reconoce el aloantígeno

Se evalúa la presencia de Ab preformados anti-linfocitos del hombre mediante cultivo mixto linfocitario

# **Alloinmunidad para parejas infértiles (abortos espontáneos reiterados)**

**Se realiza luego de descartar patologías anatómicas, genéticas, endocrinológicas, infecciosas y autoinmunes**

**Mujeres que carecen o presentan niveles inadecuados de anticuerpos bloqueantes, son tratadas con inmunizaciones con linfocitos de su esposo**

**El sistema inmune materno genera el reconocimiento necesario para que se desencadenen los mecanismos protectores del embarazo**

## **Problemas de los métodos serológicos:**

Tienen baja especificidad

El polimorfismo del HLA es alto



## **Métodos moleculares de detección de HLA**

### **Ventajas**

Mayor resolución

Mayor reproducibilidad

Mayor precisión

# Sondas de oligonucleótidos específicas de secuencias (SSOP)

Amplificación específica de cada locus HLA a estudiar, por medio de PCR

Hibridación del producto amplificado, usando sondas de oligonucleótidos de secuencia específica: segmentos cortos de DNA de cadena simple (18-24 nucleótidos)

## **Sondas de oligonucleótidos específicas de secuencias (SSOP)**

**Cada uno está constituido por una secuencia de nucleótidos complementaria a un motivo de secuencia particular que se encuentra dentro de las regiones invariables de los alelos HLA individuales**

# Sondas de oligonucleótidos específicas de secuencias (SSOP)

Estas sondas sólo hibridan con sus secuencias exactamente complementarias

La diferencia de sólo un simple par de bases hace que las sondas no se hibriden

Esta propiedad de especificidad perfecta de secuencia logra una mayor resolución

Permite lograr una tipificación de alta resolución

# Primers de secuencia específica (SSP)

Se extrae el DNA de la muestra (células, tejidos) y se mezcla con primers específicos para cada una de los alelos HLA clase II que se tipifican (DRB1, DRB3, etc.)

Se colocan alícuotas de la muestra en tubos separados. Cada uno contiene un conjunto de primers específicos y se amplifica en un termociclador

Es una técnica rápida, de mediana resolución

# Primers de secuencia específica (SSP)

Se hace electroforesis con los productos amplificados y se tiñen con bromuro de etidio

Si hibridizan con la muestra de DNA, se hace visible una banda (la cual indica la presencia del alelo HLA particular)

La falta de amplificación implica la ausencia de esa secuencia alélica particular en la muestra de DNA.

# Microquimerismo

## Seguimiento de Tx de médula alogeneico

Se monitorea la repoblación de la médula ósea del receptor con células del donante

Se determinan secuencias polimórficas de ADN que sean diferentes entre el receptor y el donante

Se detecta si las células presentes en la médula ósea del receptor corresponden a las del donante (microquimerismo completo), a las del receptor más las del donante (microquimerismo mixto) o a las del receptor solamente (ausencia de microquimerismo)

# Microquimerismo

## Seguimiento de Tx de médula alogeneico

Este monitoreo resulta fundamental después del trasplante, ya que se pueden obtener datos importantes para el manejo clínico del paciente

La presencia de microquimerismo se asocia a mayor tolerancia del injerto

Se ha estudiado también en receptores de órganos sólidos, como riñón y corazón



## Tipos de rechazo inmunológico

**Hiperagudo:** mediado por anticuerpos preexistentes secretados por linfocitos B, con activación de complemento. Rápida respuesta hacia vasos del órgano trasplantado (infarto del órgano en minutos). No es frecuente en alotrasplantes (ABO incompatibles, mujeres multíparas, pacientes retrasplantados). Es el fundamental en xenotrasplantes

**Agudo:** Aparece en los primeros días postrasplante y con riesgo a lo largo de toda la vida. Mediado por linfocitos T.

**Crónico:** Aparición tardía. No es bien conocido. Probablemente mediado por inmunidad natural o inflamación inespecífica

# Tipos de rechazo inmunológico

**Vascular tardío:** similar al hiperagudo, pero de aparición tardía. Tampoco es bien entendido

**Enfermedad de injerto contra huésped (GVHD):** se da en receptores de Tx de médula. Linfocitos del donante ejercen rechazo sobre las células huésped. Puede ser aguda o crónica. Cuanta mayor es la incompatibilidad, mayor es el riesgo de GVHD

# Cómo detener al sistema inmune

## Drogas inmunosupresoras



# Inmunosupresores inespecíficos

## Corticoides

- ✓ Hormonas producidas por las glándulas adrenales
- ✓ Corticoides sintéticos

Efecto principal: antiinflamatorio

- ✓ Inhiben el traslado de glóbulos blancos al sitio de inflamación
- ✓ Inhiben la producción de citoquinas
- ✓ Gran cantidad de efectos secundarios

# Inmunosupresores inespecíficos

## Aziatropina

Importante inmunosupresor introducido en la década del 60

Efecto principal: inhibe la síntesis de DNA de las células del sistema inmune, deteniendo la amplificación de la respuesta del rechazo

- ✓ No inhibe sólo la replicación de las células circulantes

# Inmunosupresores parcialmente específicos

Ciclosporina A (1972)

Tacrolimus

Obtenidos de hongos, cambiaron la historia de los  
trasplantes

Efecto principal: inhibe la síntesis de interleuquina 2  
(actúa sobre algunas poblaciones de linfocitos, no todas)

Efecto inespecífico: vasoconstricción (toxicidad renal)

Sirolimus

Efecto principal: inhibe los mecanismos de proliferación  
celular

# Inmunosupresores específicos

Anticuerpos dirigidos contra moléculas fundamentales del sistema inmune

1975, César Milstein, unió linfocitos con células de mieloma: producción de Ab específicos (monoclonales)

Efecto principal: reconocimiento específico de determinados tipos de linfocitos (balas mágicas), sin afectar el resto

# Otras formas de detener al sistema inmune

## Inmunomodulación

Introducción de factores que regulan la respuesta inmune

## Tolerancia inmunológica

Introducción de genes en el órgano a trasplantar para "disimularlo" frente al sistema inmune

# Todos los Tx son iguales??

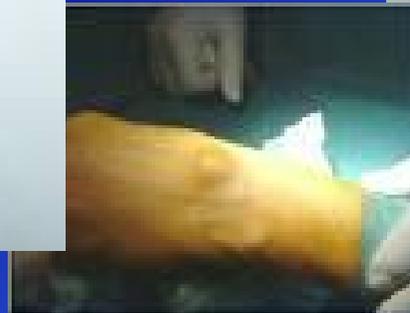
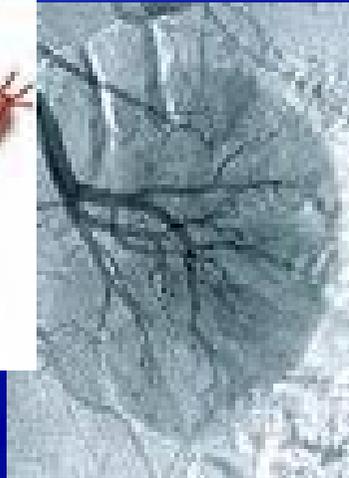
**Ablación a corazón batiente**

**Ablación con paro cardiorrespiratorio**

**La ablación a corazón batiente es indispensable en Tx de órganos sólidos, para los cuales el tiempo de isquemia es determinante**

**En cualquier caso, es fundamental el correcto mantenimiento del órgano (Temperatura, soluciones de preservación)**

# Hasta dónde puede llegar el Tx



# Tx de tejidos/células

Médula ósea autóloga u homóloga  
Riesgo de GVHD (graft vs host disease)

**Tx de islotes pancreáticos (diabetes  
insulinodependiente)**

Otras células (Sangre de cordón, médula  
ósea en otros órganos, hepatocitos,  
cardiomioplastia, células stem, etc)

# Qué pasa con la donación de órganos

Siempre son escasos

Quiénes participan en el proceso de donación

- 1- La comunidad
- 2- Los profesionales de la salud
- 3- Los organismos legislativos
- 4- Los organismos regulatorios
- 5- Los organismos de difusión

# **El INCUCAI coordina la ablación e implante de órganos**

**Ley 24193 del 22 de enero de 2006**

**Incorpora el concepto de donante presunto (a diferencia del anterior de donante expreso)**

**El donante tiene derecho a decidir qué órganos desea donar y con qué finalidad (trasplante o investigación)**

**La voluntad del donante, si fue expresa, no puede ser revocada por sus familiares**

**Sólo puede ser revocada cuando no existiera la constancia expresa**

**En <18 años no emancipados, la decisión queda en manos de sus padres o tutores**

# Consentimiento expreso

Japón

# Consentimiento presunto

España (>número de donantes)

Francia

Austria

Bélgica

Dinamarca

Holanda

Noruega

Suecia

Finlandia

# Xenotrasplante

Problemas asociados

- ✓ Inmunológicos
- ✓ Infectológicos

Inmunológicos: rechazo hiperagudo por anticuerpos naturales (en el cerdo anti- $\alpha$ -1,3 galactosa)  
Las células endoteliales son "específicas de especie"

Infectológicos: transmisión de zoonosis

## Transgénesis??

Cerdos transgénicos: expresan en su endotelio inhibidores del complemento humano

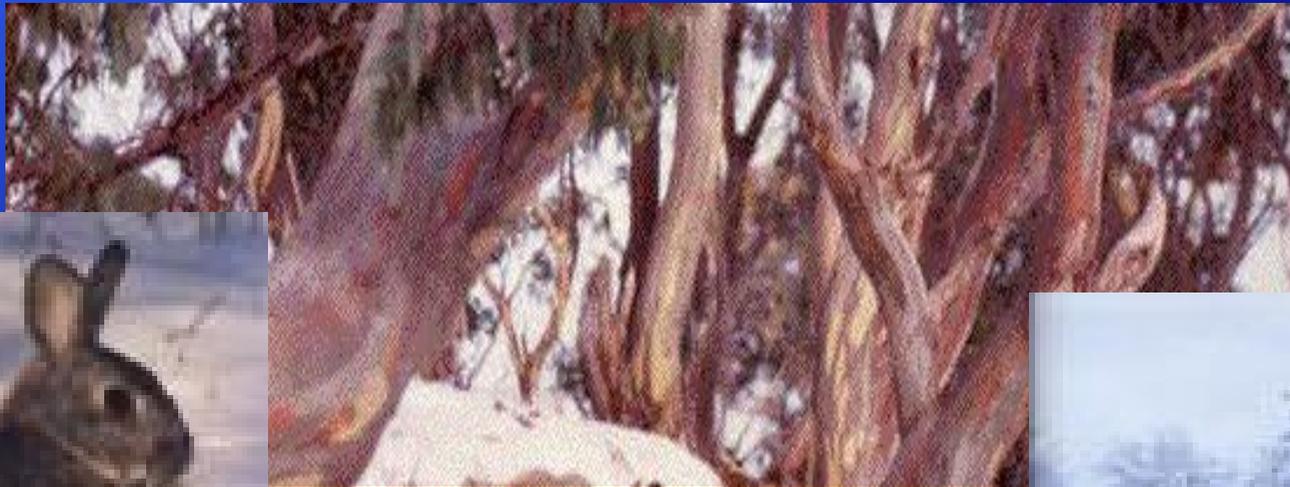
# Criopreservación de órganos/tejidos

Fantasia o posibilidad para el futuro?



Criopreservación es la conservación de la estructura y función de tejidos biológicos, a ultra-bajas temperaturas

Quién es la que más sabe de  
criopresrvación?



**LA NATURALEZA**

## Con qué estrategias?

Evitar la nucleación de hielo

Deprimir el punto de congelación

Tolerar los cambios osmóticos

Estrategias de deshidratación

Acumular proteínas "anti-freeze"

# Qué pasa cuando una célula se congela?

Agua líquida



Agua sólida

Aumenta la concentración de los solutos  
en el agua remanente

Si se supera el punto de solubilidad,  
el soluto precipita

# Por qué la célula se daña?

- Daño primario (físico)

Destrucción mecánica por cristales de hielo intracelulares

Concentración de sales (shock osmótico)

- Daño secundario (biológico)

Inhibición de mecanismos de reparación

Destrucción de procesos metabólicos (Toxicidad del crioprotector)

# Cuáles son las consecuencias?

**Pérdida de integridad estructural**

**Alteraciones de la señalización**

**Daño de la membrana**

**Pérdida de capacidad regenerativa**

**Daño de organelas**

**Alteraciones metabólicas**

**Pérdida de funcionalidad**

# De qué depende una exitosa criopreservación?

Estado pre-congelamiento

Tipos celulares

Concentración de células

Crioprotector

Velocidad de agregado del crioprotector

Velocidad de descenso de la T

Velocidad de descongelamiento

Velocidad de eliminación del crioprotector

# Qué estrategias existen?

Uso de crioprotectores

+

Descenso lento de la temperatura

---

La mayor parte de los cristales de hielo serán extracelulares

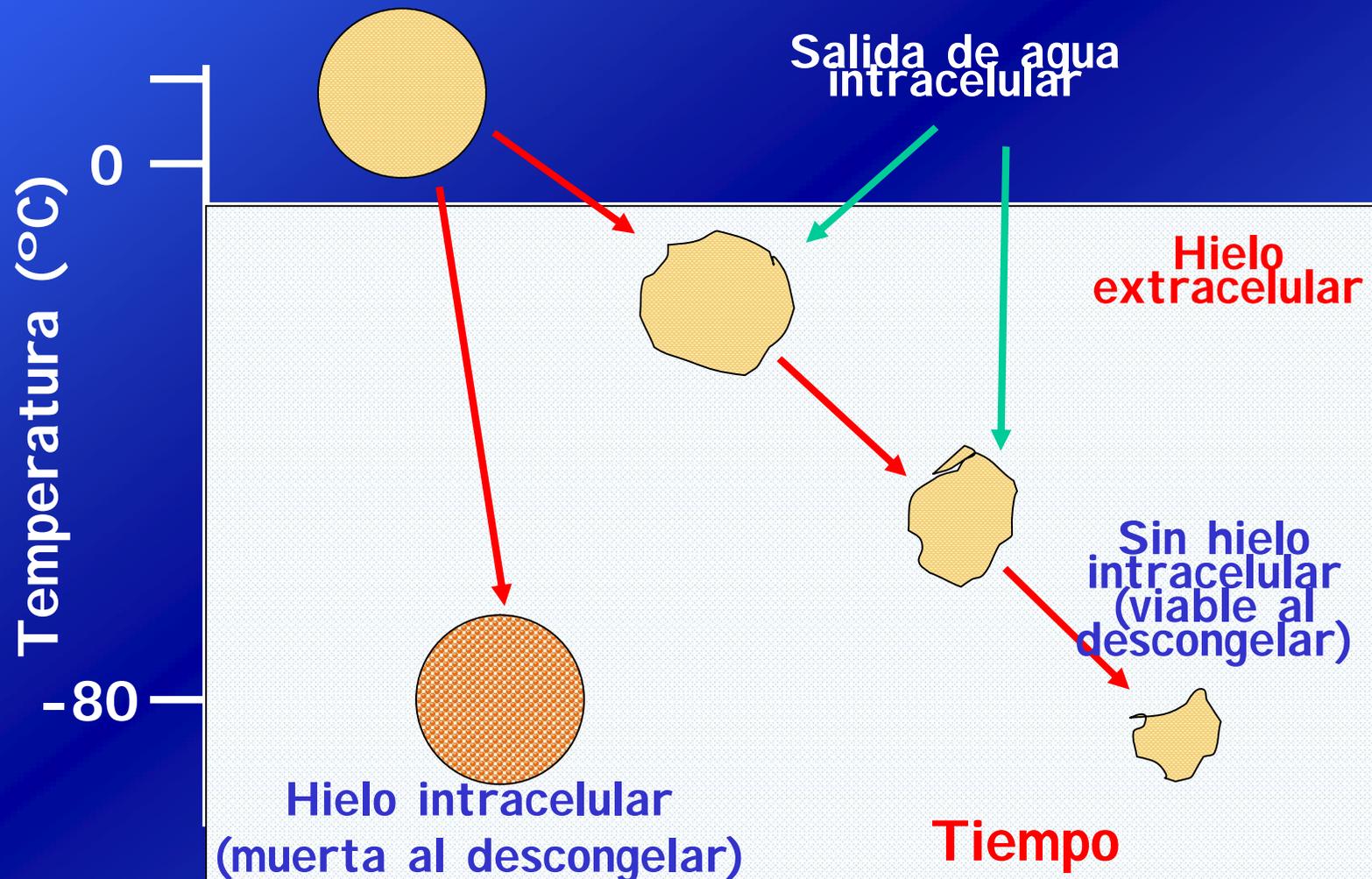
Qué pasa con un descenso rápido

El agua no saldrá rápidamente. El citoplasma se super-enfriará



La mayor parte de los cristales de hielo serán intracelulares

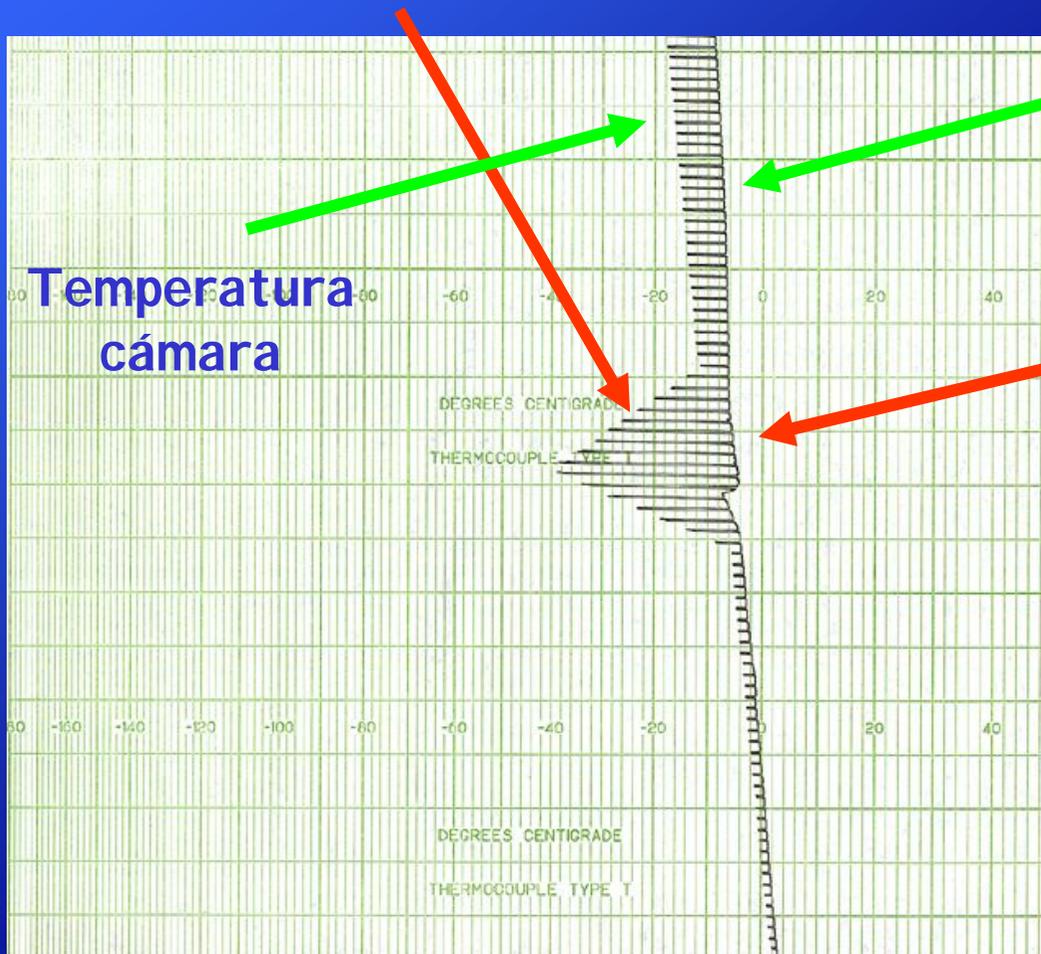
# Efectos de la tasa de cambio de la temperatura



# Cómo se logra el descenso controlado



# Descenso de T de la cámara para absorber el calor latente de fusión



Temperatura muestra

Temperatura cámara

Punto de congelación

Los distintos tipos celulares de un órgano/tejido tienen distinto comportamiento

Temperatura → +

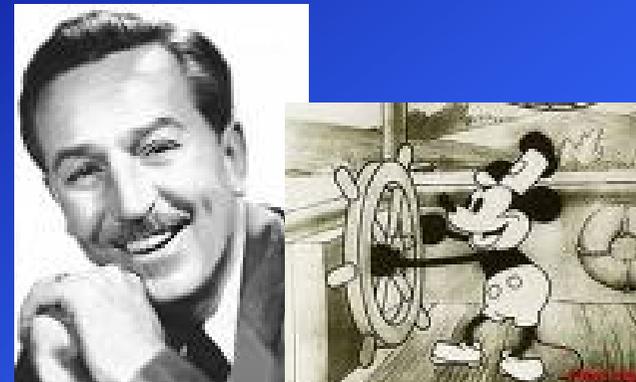
Los distintos tipos celulares de un órgano/tejido tienen distinto comportamiento, y por lo tanto distinta respuesta a las temperaturas ultrabajas

Existen otras estrategias en estudio, como la vitrificación, muy usada en plantas

La criopreservación de algunos tejidos manteniendo la viabilidad o bien la estructura es una realidad

**Aún no se ha logrado con éxito la criopreservación de órganos animales**

**Dónde está Walt Disney?**



# Trasplante o Medicina Regenerativa?

Qué mecanismos usa el organismo para regenerar un órgano o tejido dañado?

Se pueden imitar esos mecanismos?

Se pueden generar tejidos in vitro?

Qué células estarían disponibles para ser usadas?

Qué factores solubles harían falta?

Son necesarios "soportes" para las células?

Qué requisitos deberían cumplir esos materiales de soporte

# Los distintos órganos tienen capacidad de regeneración diferentes

Alto recambio celular  
Alto potencial regeneración



Sangre

Epidermis

Epitelio intestinal

Epitelio mamario

Endotelio vascular

Bajo recambio celular  
Bajo potencial regeneración



Parénquima pulmonar

Cerebro

Retina

Corazón

Riñón

Bajo recambio celular  
Alto potencial regeneración



Hígado

Músculo esquelético

Pequeña vasculatura

Corteza adrenal

Páncreas

# Qué conocimientos hacen falta para imitar la regeneración

Mecanismos de reparación/homeostasis del órgano

Células que participan

Factores solubles

Células stem, presencia y ubicación

Nicho de células stem

Activación de las células stem

Dediferenciación de células diferenciadas

Activación de caminos de señalización

**Medicina  
regenerativa**

**Ingeniería de  
tejidos**

## **APLICACIONES**

**Heridas**

**Tejido osteoarticular**

**Músculo cardíaco,  
vasos, válvulas**

**Órganos bioartificiales**

**Sistema nervioso**

**Aparato urinario**

**Muchas gracias**