



# 9º Congreso Societat Catalana de Trasplantament



25-28 de febrero 2007



PROUS SCIENCE





Reservados todos los derechos. Queda prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos de esta publicación por cualquier medio, incluida la traducción, así como su tratamiento informático, sin el permiso previo y por escrito del Editor. El uso de cualquier dato o material de esta publicación sin autorización podrá ser penalizado. A pesar de la recopilación y revisión cuidadosa de la información incluida en esta publicación, el Editor no se hace responsable de la actualización de la información ni de ningún error ni omisión de los datos contenidos en esta publicación. Los contenidos de esta publicación se presentan tal y como han sido escritos por sus autores, sin ninguna garantía, incluida cualquier garantía implícita de adaptación para fines particulares. Los contenidos de esta publicación están dirigidos exclusivamente a profesionales de la medicina y deben utilizarse exclusivamente con fines informativos y de investigación. El uso del contenido de la presente publicación con fines diagnósticos y/o terapéuticos, o la aplicación del mismo de forma directa en la práctica médica diaria o en la atención de pacientes será de responsabilidad exclusiva del profesional que lo lleve a cabo. El contenido de la presente publicación nunca ha de suplir la relación médico-paciente y en ningún caso sustituye a la opinión ni prescripción médica. Debido a la rapidez de los avances médicos se recomienda verificar de manera independiente los diagnósticos. Igualmente, en el caso de que hubiera mención de productos o fabricantes, en ningún caso debe entenderse como prescripción, recomendación o sugerencia de ninguna clase. Así mismo, el Editor no será responsable de los daños personales ni materiales derivados de la aplicación de métodos, productos, directrices, ideas o cualquier otra información contenida en esta publicación. Del mismo modo, el Editor tampoco será responsable de las decisiones tomadas por cualquier individuo que no sea profesional de la medicina ni de las acciones realizadas por éste a partir de la información incluida en esta publicación. Por último, el Editor no será responsable en ningún caso de la pérdida de beneficios ni de los daños asociados ni siquiera en el caso de haber sido informado de la posibilidad de que estos se produjesen.

© 2007, Societat Catalana de Trasplantament

© 2007, Prous Science, S.A.

Provença 388, 08025 Barcelona

Dep. legal: B-54.925-07

Impreso en España



# 9º Congreso Societat Catalana de Trasplantament



25-28 de febrero 2007



PROUS SCIENCE



## ÍNDICE

### Evaluación de los resultados en el trasplante de órganos

Medición de la supervivencia en el trasplante de órganos. Puntos críticos <i>V. Abraira</i> .....	1
The concept of quality of life in organ transplantation <i>P. Burra, M. De Bona, G. Germani, D. Canova, A. Maser, S. Tomat, M. Senzolo</i> .....	3

### Realidad de la tolerancia en el trasplante de órganos

Clinical and biological correlates of spontaneous tolerance occurrence to allotransplants in humans <i>J.-P. Soulillou</i> .....	5
Ethical issues in tolerance protocols: experience from the RISET European project <i>V. Commin, A. Cambon-Thousen on behalf of the RISET consortium</i> .....	6

### Biomarcadores: genómica, proteómica y metabolómica

Aplicabilidad y futuro de la proteómica en el trasplante de órganos sólidos <i>J. Abián</i> .....	11
Metabolomics: potential application to transplantation <i>U. Christians, V. Schmitz, W. Schoening, M. Haschke and J. Klawitter</i> .....	13

### Memorial Carles Margarit

Achievements and remaining challenges in living-donor liver transplantation <i>J. Belghiti</i> .....	19
---	----

### Superando la barrera humoral

Individualized approaches to the sensitized patient <i>F.H. Claas</i> .....	24
Surpassing the humoral barrier: Desensitization techniques <i>J.M. Gloor</i> .....	25

### Efectos directos, indirectos y secuelas de las infecciones víricas en el trasplante de órganos

Virus del grupo herpes y sus efectos a largo plazo en el trasplante de órganos <i>N. Manito</i> .....	28
Efectos directos, indirectos y secuelas de las infecciones por virus en el trasplante de órgano. Buscando la mejor estrategia de profilaxis en trasplante pulmonar <i>F. Zurbano</i> .....	30
Infecciones víricas emergentes y trasplante <i>A. Pahissa</i> .....	34

### Trasplante celular y de tejidos

Trasplante de limbo y de células madre en la superficie corneal <i>O. Gris</i> .....	36
---	----

### Controversias en hepatocarcinoma y trasplante hepático

First line treatment for HCC: resection or transplantation? <i>V. Mazzaferro</i> .....	39
---	----

Management of hepatocellular carcinoma in the waiting list before liver transplantation:  
treatment or priority

*P. Majno, for the Geneva Liver Cancer Study Group* ..... 39

### Consecuencias a largo plazo de la inmunosupresión crónica

Consecuencias a largo plazo de la inmunosupresión crónica: riesgo cardiovascular

*J. Pascual* ..... 43

Patients quality of life after renal transplantation

*H. Ekberg* ..... 46

Chronic allograft nephropathy: From renal function to urinomics

*H. de Fijter* ..... 49

### Inmunosupresores biológicos

Role of polyclonal T lymphocyte antibodies in renal transplantation

*Y. Lebranchu* ..... 53

Alemtuzumab in immunosuppressive therapy following renal transplantation

*M. Zilvetti, A. Sutherland, P. Trzonkowski, K. Wood and P.J. Friend* ..... 54

### Trasplante de células cardíacas

Neoangiogenesis with endotelial precursors for the treatment of ischemia

*P. Sepúlveda, J. Martínez-León and J.M. García-Verdugo* ..... 58

Stem cell mediated cardiomyogenesis

*C. Soler-Botija and J.C. Izpisua* ..... 59

Ingeniería tisular cardíaca

*A. Bayés Genís* ..... 61

### Inmunosupresión y trasplante hepático

Estrategias de inmunosupresión en el trasplante hepático con injerto parcial

*R. Charco* ..... 64

Long-term side effects of immunosuppression in liver transplantation

*M.R. Lucey* ..... 66

Influencia de las diferentes pautas de esteroides y de los diferentes anticalcineurínicos  
en la recidiva C postrasplante

*M. Berenguer* ..... 70

### Aspectos críticos en el trasplante de páncreas

Long-term results after pancreas transplantation

*D.E.R. Sutherland and A.C. Gruessner* ..... 73

Spectrum of histopathological changes in pancreas allograft rejection and relationship to graft loss

*C.B. Drachenberg* ..... 74

Pancreas transplantation alone and pancreas after kidney transplantation

*J. Pratschke* ..... 77

### Puentes al trasplante de órganos

Preemptive transplantation

*A. Hartmann* ..... 78

Hígado artificial

*R. Bañares* ..... 78



**Nuevos aspectos de la monitorización de la inmunosupresión:  
papel de la farmacogenética y de la farmacodinamia**

Biomarkers for monitoring pharmacodynamic interactions of immunosuppressants <i>M.J. Barten</i> .....	82
Pharmacogenetics of tacrolimus and sirolimus in renal transplant patients: From retrospective analyses to prospective studies <i>D. Anglicheau</i> .....	84

**Adaptación renal postrasplante**

Cellular senescence in chronic allograft nephropathy <i>A. Melk</i> .....	87
Crecimiento glomerular postrasplante y evolución del injerto <i>F. Moreso</i> .....	89
Progression of histological lesions after renal transplantation <i>M. Mengel</i> .....	92

**Nuevos avances en la técnica quirúrgica del trasplante hepático**

Laparoscopic left lateral sectionectomy in living donors <i>O. Soubrane and L. Haddad</i> .....	94
--	----

**Trasplante pediátrico: tan lejos o tan cerca del adulto**

Peculiaridades y resultados del trasplante cardiaco pediátrico <i>C. Maroto</i> .....	97
Trasplante pulmonar pediátrico <i>A. Moreno</i> .....	99
Resultados a largo plazo del trasplante hepático pediátrico <i>P. Jara</i> .....	103
Kidney transplantation in children and adolescents <i>M. Giessing, D. Müller, B. Winkelmann, J. Roigas and S. Loening</i> .....	106

**Novedades en la recidiva postrasplante hepático del VHC**

Diagnóstico no invasivo de la recidiva C postrasplante <i>J.A. Carrión y X. Forns</i> .....	109
--	-----

**Bronquiolitis obliterante, la asignatura pendiente**

Preventive strategies and rescue therapy for OB in lung transplantation <i>P.A. Corris</i> .....	113
Humoral rejection and its relevance in lung transplantation <i>M.R. Zamora</i> .....	114

**Donante en asistolia**

Ethical and legal issues in non-heart-beating organ donation <i>M.A. Bos</i> .....	118
Trasplante renal de donante en asistolia: resultados en riñón <i>A.I. Sánchez-Fructuoso</i> .....	122

**Nuevas dianas terapéuticas en inmunosupresión**

Pirfenidone: An anti-fibrotic agent with a potential therapeutic role in managing chronic allograft dysfunction <i>A. Dosajh</i> .....	124
--	-----

Treatment with the JAK-3 inhibitor CP-690,550 in renal transplantation

*C. Baan, W. Weimar, R. Gaston, D. Brennan, R. Mendez, J. Pirsch, S. Swan, M. Pescovitz,*

*G. Ni, C. Wang, G. Chan* ..... 125

**Obtención y preservación de órganos: cómo incrementar la seguridad y calidad de los órganos**

Enfermedades infecciosas en donantes extranjeros. Protocolo de evaluación serológica y microbiológica

*G. Garrido, R. Matesanz y B. Miranda* ..... 129

Mantenimiento fisiológico del donante de órganos en muerte encefálica. Influencia

de las catecolaminas y de los iones séricos del donante sobre los resultados del trasplante

*F. Caballero* ..... 130

Máquinas de perfusión-oxigenación extracorpórea de órganos. Evaluación y mejora de la viabilidad

*J.R. Núñez Peña* ..... 132

**Carles Margarit in memóram. Conferencia de clausura a cargo del Dr. Josep Lloveras** ..... 137

# EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS

## Medición de la supervivencia en el trasplante de órganos. Puntos críticos

V. Abraira

Sección de Bioestadística Clínica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, España.

Departamento de Matemática Aplicada de la Universidad Complutense de Madrid, España.

Se denomina *análisis de supervivencia* al conjunto de técnicas que permiten estudiar la variable tiempo hasta que ocurre un evento y su dependencia de otras posibles variables explicatorias, como por ejemplo, tiempo hasta que ocurre la muerte del enfermo (*tiempo de supervivencia*) o tiempo hasta que un cierto producto falla (*tiempo de fallo*). En trasplante se usa para analizar el tiempo de supervivencia y el tiempo hasta que el órgano falla. El análisis del tiempo hasta el evento suele presentar dos dificultades que impiden realizarlo con las técnicas estadísticas generales. En primer lugar, en estos estudios al final del periodo de seguimiento siempre hay individuos en los que no se ha podido observar el evento y, por lo tanto, en los que el tiempo hasta su ocurrencia es desconocido, si bien se tiene una información parcial sobre él, es mayor o igual que el tiempo observado. A este fenómeno se le denomina *censura* y es el que exige un planteamiento específico para estas variables, que permita aprovechar la información contenida en los tiempos censurados. Además, en la mayor parte de los estudios, la variable tiempo no tiene la distribución normal que las técnicas convencionales exigen, más bien suele tener una distribución asimétrica, en la que típicamente los eventos ocurren con mayor frecuencia al principio que al final del periodo de seguimiento.

El análisis consiste, en primer lugar, en estimar la denominada *función de supervivencia*. Esta función, que se suele representar en forma gráfica, informa para cada tiempo de la probabilidad de que un paciente sobreviva al menos ese tiempo. Esta información a veces se resume por un punto de la gráfica, para lo cual se pueden usar dos criterios: o la supervivencia en un tiempo predeterminado, como ocurre en estudios sobre cáncer, donde es habitual comunicar la probabilidad de supervivencia a los 5 años; o bien el tiempo en el que se alcanza una determinada supervivencia, como ocurre en trasplante, campo en el que es habitual resumir la supervivencia de una serie de pacientes por el tiempo en el que la probabilidad de supervivencia es 0,5 o, dicho en términos de frecuencia, tiempo en el que sobrevivirán la mitad de los pacientes. A este tiempo se le denomina *mediana de supervivencia* o *tiempo de semivida*. Cuando en la curva de supervivencia no se alcanza este tiempo, para su estimación es necesario extrapolar. Hay que ser consciente de que la extrapolación exige asumir en primer lugar que la curva estimada seguirá igual en el tiempo, pero también exige asumir qué significa “seguir igual”, es decir, es necesario establecer un modelo para la función de supervivencia. Los modelos más usados en el campo del trasplante renal son el exponencial y el de Weibull, aunque no siempre se justifica su elección adecuadamente.

Las funciones de supervivencia se estiman a partir de una muestra de pacientes. Como el número de pacientes va disminuyendo a lo largo del tiempo de seguimiento, la precisión de la estimación también disminuye, por ello es recomendable, aunque no siempre se hace, que las gráficas incluyan algún índice de esa precisión menguante, como los intervalos de confianza, o al menos el número de pacientes que permanecen en el estudio en cada tiempo. Hay autores (1) que proponen incluso que el eje de tiempo debería acabar en el tiempo en el que permanezcan el 10% de los pacientes iniciales.

Otros puntos críticos (2,3) de este análisis son:

- i) El método asume que las censuras no son informativas, es decir, que en la estimación de la función de supervivencia se considera que los individuos censurados tienen la misma mediana de supervivencia que los que, en ese tiempo, continúan en el estudio. Esta asunción no siempre es fácil de verificar, pero por ejemplo se violaría en

un estudio en el que se incluyeran como censurados aquellos enfermos que, por vivir en zonas lejanas al hospital, son dados de alta en situación preterminal.

- ii) El tiempo de seguimiento debe permitir capturar suficientes eventos. Cuánto tiempo es necesario para esto depende, naturalmente, de la enfermedad en estudio. Por ejemplo, un periodo de seguimiento de cinco años puede ser apropiado para el estudio de supervivencia en muchos tipos de cáncer; sin embargo, es claramente insuficiente para valorar la supervivencia en trasplante renal. Como indicador de la longitud del seguimiento se suele usar la mediana del seguimiento, aunque un método más robusto es el denominado *método de Kaplan-Meier inverso*.
- iii) Efecto cohorte: El método asume homogeneidad de los factores durante el seguimiento; sin embargo, estos estudios requieren estudiar enfermos durante mucho tiempo y es habitual que la observación no comience en el mismo momento para todos, por lo tanto existe el riesgo de que en esos intervalos de tiempo se hayan introducido cambios en los criterios de entrada a la cohorte o en el manejo de los pacientes, que atenten contra esa asunción y dificulten la interpretación del pronóstico.
- iv) Un último punto que requiere cuidadosa atención es la elección del evento en estudio, como muerte por una causa específica o por todas las causas; o muerte o fallo del injerto. Hay que considerar también cómo tratar los eventos competitivos que impiden la observación del evento de interés. Por ejemplo, si se está estudiando el evento fallo del injerto, ¿la muerte con órgano funcionando se considerará censura o evento?

En los análisis de supervivencia se pueden establecer otros dos objetivos además de estimar e interpretar las curvas de supervivencia, como son comparar curvas de supervivencia, por ejemplo, entre dos tratamientos, o entre dos grupos de pacientes establecidos con respecto a cualquier otro criterio y evaluar la relación de la supervivencia con otras, más de una, variables pronósticas. Para ello se usan los modelos de regresión, en particular el *modelo de Cox*. Este modelo permite relacionar diversas variables a la vez con el evento. Se obtiene, para cada variable, un coeficiente que cuantifica la relación de esa variable con el evento, evitando la perturbación de las demás, a través del *riesgo relativo*<sup>1</sup>, asumiendo que sea constante a lo largo del tiempo y de la escala de la variable. Aunque se usa menos en la literatura, los modelos también permiten predecir la curva de supervivencia para cada combinación de valores posibles de las variables que incluyen.

Los modelos multivariantes son una herramienta de análisis muy poderosa, pero que añaden puntos críticos al análisis:

- i) La asunción que se ha mencionado antes de riesgo relativo constante o, dicho de otro modo, de riesgo proporcional no siempre se cumple y por tanto conviene verificar en cada caso. Cuanto mayor sea el tiempo de seguimiento, más difícil es que se cumpla. En un estudio en el que, por ejemplo, ocurriera el evento en todos los pacientes, la asunción no se cumpliría.
- ii) Número de variables: el número máximo que se puede considerar (modelo saturado) es el número de pacientes menos uno. En un modelo que contenga más variables, el algoritmo de estimación de los coeficientes es irresoluble, pero, en general, el modelo saturado no tiene ningún interés porque no da ninguna posibilidad de eliminar el efecto del azar. El modelo deberá tener muchas menos variables independientes que el modelo saturado, un criterio habitual es incluir como máximo una variable cada 10 eventos (4).
- iii) El modelo de Cox, en su forma más simple, asume que las variables incluidas no cambian en el tiempo, o están medidas al comienzo del seguimiento. Existe una extensión del método que permite incluir variables "*tiempo dependientes*", aunque estas variables deben usarse con cuidado porque pueden dar lugar a la introducción de errores en relación con su ubicación en la cadena causal. Por ejemplo, la función renal medida en distintos momentos de la evolución de los pacientes. Como la función renal disminuye con el tiempo, los supervivientes en una cohorte tendrán una función renal más baja que los que han fallecido en fases tempranas. Introducir esta va-

<sup>1</sup>Aunque éste no es el lugar para entrar en este tipo de precisiones, quizás convenga aclarar que en español usamos la expresión "*riesgo relativo*" para dos conceptos ligeramente distintos, que en inglés se denominan "*relative risk*" o "*risk ratio*" uno de ellos y "*hazard ratio*" el otro. Aquí nos referimos a este último.

riable en un modelo puede llevar a la falsa interpretación de que cuanto menor sea la función renal, mejor es la supervivencia.

- iv) Colinealidad: si en el modelo se introducen variables correlacionadas entre sí, en el algoritmo de estimación de los coeficientes pueden surgir problemas numéricos de imprecisión e inestabilidad. Existen procedimientos para diagnosticar estos problemas, que es necesario realizar porque, si los hubiera, puede ser necesario eliminar alguna variable del análisis.
- v) Las estrategias de modelización, con las que se suelen ajustar los modelos, son un modo de analizar los datos dirigido por ellos, de tal modo que el modelo final suele ser “sobreooptimista”. Ello plantea la necesidad ineludible de su validación (5).

Validar un modelo consiste en asegurar que se comporta igual en otras muestras extraídas de la misma población (reproducibilidad) y/o de otras similares (transportabilidad) (6). Naturalmente, sólo la reproducibilidad es exigible a los autores del estudio. Se puede hacer de varias maneras. La primera y más obvia consiste en repetir el estudio en otra muestra para comprobarlo. Es algo muy costoso y que rara vez se hace. Otra alternativa conceptualmente similar consiste en partir aleatoriamente la muestra en dos grupos de pacientes (“grupo de trabajo” y “grupo de validación”), con el primero de ellos se ajusta el modelo y en el segundo grupo se comprueba que los resultados son similares. Un último procedimiento consiste en usar técnicas de re-muestreo (“jackknife” o “bootstrap”). Estas técnicas consisten en crear muchas muestras a partir de la original, eliminando, por ejemplo, un paciente cada vez. Con cada muestra se ajusta el modelo y se compara la supervivencia que el modelo predice en los pacientes eliminados con la realmente observada. Hay distintos estadísticos que resumen estas comparaciones.

## Referencias

1. Pocock, S.J., Clayton, T.C., Altman, D.G. *Survival plots of time-to-event outcomes in clinical trials: Good practice and pitfalls*. Lancet 2002; 359: 1686-1689.
2. Clark, T.G., Bradburn, M.J., Love, S.B., Altman, D.G. *Survival analysis part I: Basic concepts and first analyses*. Br J Cancer 2003; 89: 232-238.
3. Abraira, V., Quereda, C. *Curvas de vida y supervivencia en el tratamiento sustitutivo de la insuficiencia renal: Diálisis y trasplante renal*. En: Arias, M. (Ed.). *Métodos estadísticos en el trasplante renal*. Drug Farma, Madrid 2004; 67-133.
4. Peduzzi, P., Concato, J., Feinstein, A.R., Holford, T.R. *Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates*. J Clin Epidemiol 1995; 48: 1503-1510.
5. Wyatt, J.C., Altman, D.G. *Commentary: Prognostic models: Clinically useful or quickly forgotten?* BMJ 1995; 311: 1539-1541.
6. Justice, A.C., Covinsky, K.E., Berlin, J.A. *Assessing the generalizability of prognostic information*. Ann Intern Med 1999; 130: 515-524.

## The concept of quality of life in organ transplantation

P. Burra<sup>1</sup>, M. De Bona<sup>2</sup>, G. Germani<sup>1</sup>, D. Canova<sup>1</sup>, A. Maser<sup>1</sup>, S. Tomat<sup>1</sup>, M. Senzolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gastroenterology Section, Department of Surgical and Gastroenterological Sciences, Padua University, Italy.

<sup>2</sup>Gastroenterology Unit, Feltre, Italy.

The goal of organ transplantation is not only to ensure the survival of individuals with end-stage heart, lung, liver, kidney, pancreas and small bowel diseases, but also to offer patients the sort of health they enjoyed before the dis-

ease, achieving a good balance between the functional efficacy of the graft and the patient's psychological and physical integrity.

Quality of life (QoL) assessments are used to evaluate the physical, psychological and social domains of health, seen as distinct areas that are influenced by a person's experiences, beliefs, expectations and perceptions, and QoL is emerging as a new medical indicator in transplantation medicine too.

Improved surgical techniques and new immunosuppressive drugs have led to transplantation being performed in increasing numbers of patients with excellent results in terms of survival. The increase in the number of transplanted patients has given rise to a new socio-medical community of "transplanted people", characterized not only by clinical, but also by specific psychopathological features.

Transplanted people show changes in their relationships with their families and the medical staff, due both to their lengthy chronic disease and to the transplant surgery, experienced as a ritual of death and rebirth to a new life. Regaining bodily integrity is often complex because people have difficulty in accepting the new organ as part of the own body and not as a separate identity. Returning to physical activity, social relationships and work after transplant surgery may also be associated with psychopathological distress.

The goal of transplantation is not only to ensure their survival, but also to offer patients much the same state of health as they enjoyed before the disease, achieving a balance between the functional efficacy of the graft and patient's psychological and physical integrity.



## REALIDAD DE LA TOLERANCIA EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS

---

### Clinical and biological correlates of spontaneous tolerance occurrence to allotransplants in humans

---

**J.-P. Souillou**

*University of Nantes, Nantes, France.*

There are several examples of liver and kidney recipients who do not reject their transplants years after interruption of immunosuppressive drugs. In liver transplantation, approximately 25% of long-term recipients may not require immunosuppression (A. Sánchez, *Am J Transplant*, in press). Studies in kidney transplantation, where some patients interrupt their immunosuppression, indicate that recipients with stable long-term renal function may also be operationally tolerant (G. Roussey, *Am J Transplant* 2006). Why these mismatched grafts is accepted are unknown. It is therefore, crucial to understand the mechanisms of this tolerant state to eventually design tools to predict immunological risk after transplantation. Data obtained in our centre relating to the clinical frequencies and characteristics of operational tolerance in kidney recipients will be reviewed. We have shown that these patients are not clinically immunoincompetent and most of them respond subnormally to flu vaccination (C. Ballet et al., *Am J Transplant* 2006). Interestingly, we showed that operationally tolerant patients sometimes exhibit strong peripheral blood T cell repertoire selection (S. Brouard et al., *Am J Transplant* 2005) suggesting an “active” immunological state. However, “selected” T cell populations with altered repertoire do not accumulate inflammatory cytokines and differ from similar populations of normal individuals or chronic rejection (S. Brouard et al., *Am J Transplant* 2005). These patients display a blood T cell phenotypic pattern close from normal individuals and different to that observed in patients with chronic rejection who not only display significantly lower levels of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells but also very lower levels of FoxP3 transcripts in their CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> populations (S. Louis et al., *Transplantation* 2006). Operationally tolerant patients also differ from chronic rejection patients for CD8 markers with less CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> (D. Baeten et al., *J Am Soc Nephrol* 2006). However, preliminary results suggest that, despite T cell phenotypes do not significantly differ from normal individuals, operationally tolerant patients have more powerful CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells at inhibiting CD25<sup>-</sup> cells. Gene-profiling analyses of blood transcriptome using cDNA microarrays suggest that clusters of genes characteristic of the tolerant state can be distinguished but also suggest patients heterogeneity. A microarray dedicated to this spontaneous tolerant state has been obtained and predicts tolerance in most of the new cases of tolerance (Tol-test group). Interestingly, on this basis, 40% of long-term recipients receiving only minimal doses of corticoid (<10 mg steroid/day monotherapy) share the pattern of tolerant recipients. Taken together, the data suggest that human recipients spontaneously tolerating a mismatch kidney graft may present some anergic state combined with exacerbated Treg. However, donor specific regulation, anergy or deletion is still unexplored. Gene profiling may offer a tool for identifying possible tolerant “low risk” recipients among long-term graft recipients under life-long immunosuppression.

## Ethical issues in tolerance protocols: experience from the RISET European project

V. Commin, A. Cambon-Thomsen on behalf of the RISET consortium (1)

*Inserm, U 558, Epidemiology and analyses in public health, Department of epidemiology and public health, University Paul Sabatier, Platform "Genetics and society", Genopole Toulouse Midi-Pyrénées. Faculty of Medicine, Toulouse, France.*

### Acknowledgement

This work has been supported by EU FP6 integrated project RISET N LSHB-CT- 2005-512090 coordinated by Pr. M. Goldman (Belgium).

RISET is an EU funded project on reprogramming immune response for establishing tolerance in transplantation. It covers aspects from fundamental research to pilot clinical assays involving living donors, which imply donor cell infusions following specific in vitro manipulation in the context of the actual transplantation, without the classical immune suppressive drugs. A specific part of the project is devoted to legal and ethical issues. It aims at issuing guidelines, anchored in the pilot assays experience, in an analysis of the issues encountered and in an internal debate.

Such pilot assays cumulate a number of issues that are rarely found altogether: 1) interaction between therapeutic act and research act; 2) no possibility of classical phase I in healthy volunteers; 3) involvement of human beings both as patient and as donor, with possibly conflicting fundamental rights to be taken into account; 4) sample and sensitive data gathering and exchanging; 5) their secondary use; 6) genomics testing; 7) actual transplantation. Such issues have so far been considered in separate regulatory documents or ethical recommendations but never altogether and specific dimensions appear because of this complexity.

Referring to existing texts at Council of Europe and EU level and to ethical review of such protocols authorized in the framework of RISET, a set of recommendations are being produced and will be submitted to comments. They concern the validation of the trial protocol, the risk/benefit balance, the information and consent of donor and recipient, the right to withdraw and its limits, the information on results. The involvement of the scientific and medical community in such a work may not only increase their awareness of ethical issues but also be a precious help for research ethics committees facing this new kind of assays.

## Ethical issues in tolerance protocols: experience from the RISET European project

Transplantation dramatically improves the survival of patients with established organ failure; however, as a direct consequence of immunosuppressive drugs, recipients have a significant increased risk of infection and malignancies. Recent advances indicate that induction of tolerance, defined as the permanent acceptance of transplant in absence of continuous immunosuppression, is an achievable goal. In order to test the clinical applicability of such concepts a multidisciplinary approach is necessary and besides technical and medical aspects, ethical and regulatory dimensions are of utmost importance. Addressing these aspects is one of the major goal of the RISET project (Reprogramming Immune System for the Establishment of Tolerance).

### What is the RISET project?

RISET is a multinational European project funded by the European Commission that will focus on the translation of advances in tolerance research into clinical practice and industrial development (1). It covers aspects from fun-



damental research to pilot clinical assays involving living donors, which imply attempts to induce specific tolerance induction in the context of transplantation, without the classical immune suppressive regimen, and to assess biomarkers of tolerance. The pilot clinical assays may involve cellular therapy in the context of organ or haematopoietic stem cell transplantation.

The Riset work programme is organized into 4 technical workpackages (WP1-4) plus one WP for management (WP5):

WP1 deals with the development of biomarkers predictive of transplant tolerance or “near tolerance”. These tests will be validated in order to use them as immune tools in clinical trials.

WP2 deals with identification of new molecular targets for tolerance induction in preclinical models.

WP3 deals with clinical investigations towards implementation and evaluation of new approaches for tolerance induction in man. The current trials have been approved by local ethics committees and a number of patients are already enrolled (10 patients are planned for each protocol including kidney, bone marrow and liver recipients, respectively). The current trials take place in Belgium, Italy and Germany.

WP4 deals with Communication, dissemination, ethical, legal and societal aspects as well as education and training programmes. A specific part of the project is thus devoted to legal and ethical issues. It aims specifically at issuing guidelines, based upon pilot assays experience, analysis of issues encountered, internal consortium debate and commentaries from external experts. WP4 also aims at identifying ethical key issues to disseminate information on such advances in transplantation not only for the participants involved in the research but also for all stakeholders interested in transplantation.

We here focus on the ethical aspects of the pilot clinical trials in tolerance induction.

## Why ethics in the Riset project?

### *The need of ethical harmonization for tolerance protocols at the European level*

As all projects funded in the sixth research and development framework programme of the European Union (FP6) Riset has to respect in all aspects of its workplan not only national provisions but a number of European/International ethical guidelines given by European group on ethics and new technologies, Council of Europe and UNESCO whether or not national rules have implemented such recommendations (2).

Besides, in the field of very innovative strategies such as diagnostic tools such as new biomarkers, and therapies of high technicality such as cell therapy and immune cell therapy there are no ethical guidelines harmonized at the European level, even though a legal framework has been set up in the European Union concerning good medical practices in clinical trials thanks to the directive 2001/20/EC and also cell banking and samples flow in the field of cell therapy through the directive 2004/23/EC. Provisions at national level may be extremely diverse and thus may create difficulties for research at European level. Therefore, taking into account the opportunity offered by Riset to discuss such issues at a multinational European level regarding clinical pilot assays in the domain of tolerance in transplantation, the consortium has engaged in the process of producing guidelines in the domain, allowing 1) a coherence between assays within the consortium and 2) a common basis at European level for researchers, institutions and ethical review committees.

The respect of human dignity calls for implementing measures allowing fundamental values and rights such as autonomy, confidentiality, physical integrity be guaranteed as developed in medical research ethics (3-6).

### *However the tolerance clinical assays are cumulating a number of issues that are rarely found together*

They are: 1) overlap between therapeutic and research acts; 2) no possibility of classical phase I in healthy volunteers; 3) involvement of patient and donor, with possibly conflicting fundamental rights; 4) sample and sensitive data gathering and exchanging; 5) their secondary use; 6) genomics testing; 7) actual transplantation. Such issues

have so far been considered in separate regulatory documents or ethical recommendations but never altogether and specific dimensions may appear because of this complexity. We address them below in three categories: risks/benefits assessment; informed consent; recognition of donor.

### **Risks/benefits assessment**

The assessment of the risks/benefits balance is delicate because the strongest benefits of diminishing the immunosuppression are long term ones whereas the risks of graft failure may be short term ones. Moreover as only transplanted patients are involved in the clinical trial, there is no possibility of prior classical phase I assay on healthy individuals. Thus criteria of inclusion of patients in such assays also raise ethical questions. How to deal with and communicate about possible adverse reactions is another area of concern. The potential risks are not only in terms of the individual risks for the patient but also in terms of risk of loss of a transplant that is a rare resource in our society and that comes from living donors in the tolerance protocols studied. Issues of justice are pointing here.

### **Informed consent**

- *The overlap between the therapeutic act and the research protocol* implies that it may be difficult for the recipient to distinguish between what exactly is the research, embedded in the transplantation act and where the standard therapy stands. This requires a specific attention in the way the information is given.
- *Both donor and recipient are involved in the clinical trial.* Consequently specific information on the research and its possible consequences must be given to both of them. Some protocols may require an iterative donor cell procurement to maintain the tolerance status. Then the right to withdraw which is a classical feature of any consent procedure presents here specificities. If the donor withdraws his participation, the patient won't be able anymore to participate in the clinical trial. In the eye of ethics, there is a conflict between the fundamental right of the donor to withdraw from research and the right of the patient to continue being involved in the tolerance protocol once started. A balance should be found by early information of the donor of his responsibility towards the recipient in case of withdrawal, while maintaining the principle of consent withdrawal possibility.
- *Sample and data gathering and exchanging with traceability.* Tolerance pilot clinical assays require to gather sample and associated data and also to exchange them in order to ensure the follow-up of the recipient and the optimal assessment of biomarkers, in the context of a collaborative project. Since the removed material is associated with identifiable data, the research participants (both donor and recipient) should be informed that specific requirements guaranty the respect of confidentiality concerning their personal data. They should also consent to the flow of samples and associated data, the treatment of their material and the processing of their data.
- *Secondary use to be envisaged.* Even though the patient and the donor are informed that they are included in a clinical trial in the context of the sixth framework research programme of the European Union, they have to be aware of the secondary use of their removed material and associated data, for example for extended biomarkers testing that may not be described precisely at the moment of consenting.

In particular, prior to consent they should be informed of potential industrial development of in vitro tests or innovative therapies that might involve biological material or knowledge derived from their samples, without personal financial benefit for them. However in case of such development, the issue of fair benefit sharing between industrials and society (7) as well as mechanisms for this, remain open questions. Such questions are being amply discussed in the context of biobanks developments but have not been envisaged in this transplantation tolerance context (8-10).

### **Recognition of the donor**

A donor consents not only for his/her body part removal for the transplantation itself, but also for additional biological material donation which will be used during the tolerance induction protocol. It will provide especially cells that will be infused in the recipient for tolerance induction. If such a process is to be repeated as part of the protocol a kind of engagement binds the donor during the clinical trial period. Adequate information and a return of results should be provided to him/her as a full recognition of participation. The exact content of such research

results, which are different from the sole clinical outcome of the transplant patient, is also a matter of discussion. Moreover, the donor medical follow-up that is part of good practices in transplantation must also be seen in the light of a research participant follow up.

## **How to deal with ethics in such a collaborative transplantation international research project?**

Identifying the key ethical issues and proceeding towards drafting and endorsing recommendations in an international consortium requires some methodological considerations.

### *Identification of key ethical issues*

A number of ethical principles have already been taken into account in some national or international legal frameworks that implement provisions rooted in the World Medical Association Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Hence, the methodology used has consisted in an analysis, at national, European and international level of 1) existing ethical guidelines that apply to the tolerance protocol domain, 2) relevant legal and regulatory aspects, 3) role and function of ethics research committees in the various countries involved.

### *Internal consortium discussion*

Then the key issues identified have been debated in the RISE consortium where researchers and practitioners have contributed valuable considerations, anchored in their medical experience and research practice in the field of transplantation and immune cell therapy. These discussions were used to refine these key issues and to elaborate a first draft of recommendations, presently under validation.

This draft of recommendations aims to build standards to be used in order to overcome potential obstacles related to these key issues for future tolerance protocols. These recommendations are intended for RISE partners but also for other researchers and medical professional involved in transplantation and for institutions and local ethical review board solicited for tolerance induction protocols.

These guidelines are a basis of interest for informing patients, donors and their families, healthcare professionals and also society at large. In the latter, as the social body is more distantly concerned, the issues at stake refer to another scale of values than the individual ethics values which have been described above in the context of biomedical research involving individual subjects. They rely on sociological and communication studies that we will not approach here but that are part of RISE works on ethics.

### *Steps of validation of guidelines*

After several iteration of the guidelines within the consortium, a step of validation by external “experts” will be undertaken: members of ethics committees, persons teaching medical and research ethics, regulatory bodies, some representatives of patients/donors associations as well as some medical and health professionals and researchers involved in transplantation but not in RISE will be consulted in various countries, before opening the guidelines for public comments on the RISE web site. After taking into account the various comments a set of guidelines will be disseminated, as a RISE produced document. It will remain an evolving document.

### *Dissemination of guidelines*

The methodology that will be used to disseminate these guidelines on ethical keys issues relies on three pillars which are used generally for all aspects of RISE:

- *Training and educational programmes* on immune tolerance in transplantation, for relevant health care professionals, but also specific sessions open for donors, transplanted patients and their families.
- *Communication via RISET website for patients, donors and their families.* They are informed of the follow-up of research in all the RISET partner's countries and benefit from a return of results. A specific part on ethical aspects will be open for comments.

We will insure that ethical aspects and the corresponding guidelines are part of the following actions:

- *RISET website as a tool to inform the society* of the interests at stake in the field of transplantation tolerance. Another part of RISET WP4 is assessing the level of knowledge and public debate about issues at stake in translational research towards clinical application of tolerance.

The document will be in addition sent to relevant health and regulatory agencies, national and local ethics committees.

This dissemination towards the society at large of how ethical issues concerning tolerance in the field of transplantation are considered and taken into account, is also a way to inform the public of transplantation as such. In particular, it is a way to stress on transplantation with living donors that certainly needs more social recognition and a better medical follow-up after donation (11).

The involvement of the scientific and medical community in such a work of dialoguing and generating guidelines in the domain of ethics is an important step. It may not only increase the consortium and other researchers/health professionals awareness of ethical issues but also give the opportunity to help the formulation of the guidelines in order to take into account the practical experience. Such a document is intended to inform the work of research ethics committees facing this new kind of clinical protocols and institutions that needs to prepare educational curriculum in medical research ethics.

## References

1. Goldman, M. Coordinator. Reprogramming Immune System for the Establishment of Tolerance <http://www.risetfp6.org/>
2. Ethical rules in the EU's Sixth Framework Programme for Research. [http://ec.europa.eu/research/science-society/page\\_en.cfm?id=3199#2](http://ec.europa.eu/research/science-society/page_en.cfm?id=3199#2)
3. Additional protocol to the Oviedo Convention (clinical research 2005, cell therapy 2005). <http://conventions.coe.int/treaty/en/Treaties/Html/195.htm>
4. The Declaration of Helsinki adopted in 1964, updated in 2002. <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
5. Convention on human rights and biomedicine in <http://conventions.coe.int/treaty/en/Treaties/Html/195.htm>
6. European Directive 2001/20/EC relating to the implementation of good medical practises in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. [http://eudract.emea.eu.int/docs/Dir2001-20\\_en.pdf](http://eudract.emea.eu.int/docs/Dir2001-20_en.pdf)
7. Knoppers, B.M. *Population Genetics and Benefit sharing*. Community Genetics 2000; 3: 212-214.
8. UNESCO: The International declaration on human genetic data (October 2003). <http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001331/133171e.pdf#page=45>
9. Council of Europe: Recommendation Rec (2006)4 for research using biological material of human origin (march 2006) in: [http://www.coe.int/t/f/affaires\\_juridiques/coop%20E9ration\\_juridique/bio%20E9thique/textes\\_et\\_documents/Rec\\_2006\\_4F.pdf](http://www.coe.int/t/f/affaires_juridiques/coop%20E9ration_juridique/bio%20E9thique/textes_et_documents/Rec_2006_4F.pdf)
10. The European Group on Ethics in Sciences and new technologies: Adoption of an opinion on human tissue banking in: [http://ec.europa.eu/european\\_group\\_ethics/docs/avis11\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/european_group_ethics/docs/avis11_en.pdf)
11. Cassagrande, A., Déliot, C. *Questions éthiques autour du donneur vivant. Ouvrage réalisé à l'initiative de Fujisawa*. Editions Louis Pariente, Paris 2005; 69-71.

## BIOMARCADORES: GENÓMICA, PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA

### Aplicabilidad y futuro de la proteómica en el trasplante de órganos sólidos

**J. Abián**

*Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB, IIBB/CSIC-IDIBAPS, Facultad de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.*

La proteómica incluye un conjunto de áreas de investigación dirigidas al estudio global de la expresión proteica en células, tejidos y fluidos biológicos. Dado que las proteínas son los principales agentes que determinan la función celular, estos perfiles proteicos guardan una mayor correlación con el estado celular en un momento determinado que los correspondientes perfiles genómicos o transcriptómicos, por lo que aportan una visión más precisa de los agentes directamente implicados en el desarrollo de un determinado fenotipo.

Actualmente existe un amplio abanico de herramientas analíticas para el estudio del proteoma, que incluye desde metodologías clásicas establecidas, como el análisis en geles de poliacrilamida, hasta métodos relativamente nuevos, como la utilización de arrays de proteínas similares a los microarrays utilizados en genómica.

En los últimos años, estas aproximaciones proteómicas han mostrado su capacidad para descubrir nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico y nuevas dianas terapéuticas en diversos problemas de salud humana, especialmente en relación con el cáncer y las enfermedades cardiovasculares y neurológicas.

Existen ya varios ejemplos de aplicación de la proteómica en el caso del trasplante de órgano y en el problema del rechazo que abordan cuestiones básicas como las relacionadas con la respuesta celular inmunitaria o el análisis de modelos de isquemia-reperusión. Sin embargo, la principal utilidad de la proteómica en este campo se ha centrado muy específicamente en la búsqueda de biomarcadores de la evolución del paciente tras la intervención. La aplicación de estas herramientas al análisis de fluidos biológicos como el plasma y la orina ofrece la perspectiva del desarrollo de metodologías de diagnóstico no invasivas, alternativas o complementarias a la biopsia y, por tanto, de evidente relevancia en la práctica clínica.

En los citados estudios cabe resaltar la aplicación de tres técnicas principales: el análisis de expresión diferencial en geles bidimensionales de poliacrilamida (2DE), el análisis de expresión utilizando técnicas acopladas de cromatografía o electroforesis capilar y espectrometría de masas y el estudio de perfiles proteicos obtenidos mediante análisis directo por MALDI-TOF o SELDI-TOF.

Por ejemplo, Borozdenkova et al. han estudiado en biopsias cardíacas procedentes de pacientes trasplantados la presencia de marcadores de rechazo mediante 2DE. Estos autores observaron más de 100 componentes en los geles que mostraban cambios de nivel en situación de rechazo. Varias de estas proteínas fueron identificadas y dos de ellas, la alfa-beta-cristalina y la tropomiosina se validaron mediante ELISA en un grupo de pacientes y se confirmó su incremento significativo en el rechazo de cualquier grado.

El estudio de expresión mediante 2DE es, sin embargo, un procedimiento lento, que requiere un trabajo cuidadoso con objeto de asegurar una mínima reproducibilidad, por lo que, a pesar de considerarse una de las técnicas más clásicas para el estudio de proteínas, en general ha quedado restringido a los laboratorios de investigación. En los últimos años, la comercialización de nuevos soportes electroforéticos, así como el desarrollo de procedimientos de marcaje con fluoróforos como el DIGE, ha facilitado el uso de esta técnica por un mayor número de grupos y es probablemente una de las más utilizadas hoy en día en la investigación clínica donde se abordan problemas proteómicos.



El análisis de expresión mediante técnicas separativas acopladas a la espectrometría de masas constituye una alternativa a la 2DE que ofrece la posibilidad de automatización del proceso y una reproducibilidad muy superior. Estos procedimientos se aplican generalmente sobre digeridos enzimáticos de los extractos proteicos analizándose los péptidos producidos y no las proteínas. Esta aproximación, que es la base de la denominada *shotgun proteomics*, no presenta los sesgos característicos de la 2DE derivados de los problemas para analizar proteínas de pesos moleculares y puntos isoelectrónicos extremos y tiene un rango dinámico superior a ésta. Es además un procedimiento ideal cuando se trata de analizar directamente los componentes peptídicos de muestras biológicas entre los que se encuentran muchos de los marcadores biológicos (por ejemplo, fragmentos de proteínas tisulares que circulan en sangre o son emitidos a orina) y que por su tamaño no son analizables mediante 2DE. Utilizando estas técnicas, Kaiser y cols. han estudiado los perfiles de polipéptidos (en el rango entre 500-7500 Da) presentes en la orina de pacientes sometidos a trasplante de citoblastos hematopoyéticos. La comparación entre grupos de individuos sanos no trasplantados y pacientes con complicaciones por infección permitió caracterizar marcadores tempranos de alta sensibilidad y especificidad para el rechazo de injerto contra huésped. Algunos de estos marcadores eran además observables entre 5 y 15 días antes del diagnóstico clínico.

En el año 2002, Liotta y cols. comunicaron la posibilidad de diagnosticar el cáncer de ovario mediante un perfil de marcadores específicos monitorizados de forma rápida y directa en suero mediante SELDI-TOF. A pesar de la controversia generada (ver Ransohoff) y de los problemas intrínsecos asociados a esta aproximación, estos y otros trabajos mostraron la relevancia de las técnicas de perfilado proteico mediante MALDI-TOF para la búsqueda de marcadores. Utilizando estos procedimientos, Zhang y cols. observaron que la relación entre los niveles de la proteína de células de Clara y la lisozima en lavados broncoalveolares de pacientes sometidos a trasplante de pulmón estaban relacionados con el desarrollo del síndrome de bronquiolitis obliterante, marcador del rechazo crónico. Asimismo, Schaub et al. aplicaron esta técnica para buscar marcadores de rechazo agudo en la orina de pacientes con trasplante de riñón. Estos autores describieron una serie de señales, posteriormente identificadas como fragmentos de la microglobulina, cuya aparición era concomitante con la aparición de problemas en la función del órgano y que podían constituir posibles marcadores alternativos a la biopsia.

Es poco probable, sin embargo, que cualquiera de las aproximaciones citadas constituya en el futuro una plataforma para el diagnóstico clínico. Las herramientas corrientemente utilizadas en proteómica se dirigen principalmente al descubrimiento de nuevos marcadores cuyas funciones o estructura química es posible que no hayan sido descritas mediante otras estrategias. Sin embargo, una vez conocidos e identificados estos perfiles, los métodos de diagnóstico deben poder aplicarse de forma rápida y sencilla a un alto número de muestras. Estos métodos deberán tener un bajo coste y ser capaces de identificar paralelamente el conjunto de los marcadores que forman parte del perfil característico de la respuesta biológica. Los microarrays de proteínas, especialmente los basados en anticuerpos, son una de las herramientas más prometedoras en este sentido. Su disponibilidad comercial ha venido impulsada por los avances en la producción de anticuerpos a gran escala y por el conocimiento adquirido en el desarrollo de los chips genómicos. Actualmente se comercializan microarrays conteniendo cientos de anticuerpos diferentes y es posible preparar colecciones a medida para una determinada aplicación. Por tanto, es probable que esta tecnología constituya a corto plazo una de las principales aportaciones de la proteómica al diagnóstico clínico.

## Referencias

- Borozdenkova, S., Westbrook, J.A., Patel, V. y cols. *J Proteome Res* 2004; 3: 282-288.
- Kaiser, T., Kamal, H., Rank, A. y cols. *Blood* 2004; 104: 340-349.
- Petricoin, E.F., Ardekani, A.M., Hitt, B.A. y cols. *Lancet* 2002; 359: 572-577.
- Ransohoff, D.F. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 315-319.
- Schaub, S., Rush, D., Wilkins, J. y cols. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 219-227.
- Schaub, S., Wilkins, J., Antonovici, M. y cols. *Am J Transplant* 2005; 5: 729-738.
- Zhang, Y., Wroblewski, M., Hertz, M.I. y cols. *Proteomics* 2006; 6: 1001-1010.

## Metabolomics: potential application to transplantation

U. Christians, V. Schmitz, W. Schoening, M. Haschke and J. Klawitter

*Clinical Research & Development, Department of Anesthesiology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, USA.*

### Introduction

Although current immunosuppressive protocols have dramatically decreased and almost eradicated acute rejection episodes, there has been less progress in terms of long-term graft survival after kidney transplantation over the last two decades. Currently, serum creatinine concentrations are routinely used as a clinical marker for monitoring function of kidney allografts (Kreis, 1998; Berl, 2005). Once an elevation in serum creatinine concentrations is detected, a biopsy is procured to differentiate between the multiple possible diagnoses. Unfortunately, serum creatinine is not a sensitive biomarker. It has been shown that up to 30% of grafts with stable creatinine may have smoldering rejection and that treatment of this chronic/subclinical rejection may result in improved graft function (Kee et al., 2006; Nankivell and Chapman, 2006). Serum creatinine elevation after immune activation in the graft may be delayed, which allows ample time for a deleterious effect on the graft. Based on clinical experience over the last two decades, it is also reasonable to assume that pharmacokinetic therapeutic drug monitoring is not a viable strategy to avoid chronic immunosuppressant toxicity or chronic/subclinical rejection, whereas toxicodynamic/pathobiochemical monitoring based on biomarker patterns appears to be a more promising concept for early detection.

Late identification of chronic allograft nephropathy in individual patients has meant that interventional strategies used to prevent chronic renal allograft nephropathy and subsequent graft loss tend to be employed “too little and far too late” (Chapman et al., 2005). The key to reducing the damage caused by chronic allograft nephropathy is early detection. Today, the most common strategy to reduce the prevalence and severity of chronic allograft nephropathy is minimizing or discontinuing the doses of calcineurin inhibitors during long-term-maintenance immunosuppression (Chapman et al., 2005), often without knowing which factors contribute to chronic allograft nephropathy in an individual patient and without guidance by an appropriate diagnostic strategy. Overall, this often results in a reduction of immunosuppressive efficacy of the drug regimen and creates a dilemma. As mentioned above, the other major factor contributing to renal allograft nephropathy is subclinical or chronic rejection (Campistol and Grinyó, 2001). But treatment to avoid damage by rejection requires enhanced immunosuppressive drug regimens (Kee et al., 2006; Miyagi, 2005; Merville, 2005).

The development and validation of new diagnostic approaches is warranted. Modern screening technologies in the fields of genetics, genomics, protein profiling (proteomics) and biochemical profiling (metabolomics) have opened new opportunities for the development of sensitive and specific diagnostic tools (Christians et al., 2005).

Differentiating between rejection and immunosuppressant toxicity remains a diagnostic and analytical challenge (Kamoun, 2006; Koop et al., 2004) were the first to describe two markers laminin  $\beta_2$  and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mRNA expression in the renal cortex that allowed for distinguishing between chronic rejection and chronic cyclosporine toxicity with high specificity and sensitivity. However, a biopsy is required and a feasible method of monitoring these changes has not yet found its way into clinical diagnostics.

An ideal case scenario for diagnostic testing is the use of easily available body fluids such as plasma and urine for biomarker analysis. This is based on the assumption that all cells either directly or indirectly (*via* extracellular fluid) communicate with body fluids and that cell metabolites, peptides and proteins will be released by the cells *via* normal excretion, trans-membrane diffusion or transport, and after cell death (Anderson, 2004). Thus changes in protein, peptide and/or metabolite patterns in body fluids will, to a certain extent, reflect changes of biochemical processes in cells.

The use of “omics” approaches for the development of novel biomarkers for monitoring transplant patients has been advocated (Raulf, 2005; Christians et al., 2005). Although intriguing, the use of “omics” or systems biology-

based concepts as clinical diagnostic tools is not yet feasible, mostly because of the complexity of the data generated and the lack of algorithms to convert this information into clinically applicable information. A more realistic approach is the development of “combinatorial biomarkers”. Those are biomarker patterns that typically consist of five or more individual parameters, each of which usually must be changed two-fold or more to yield a significant result (Koop, 2005).

Metabonomics is defined as “a quantitative measurement of multi-parametric metabolic responses of multi-cellular systems to pathophysiological stimuli or genetic signaling” (Nicholson et al., 1999). The major technologies used are magnetic resonance spectroscopy (MRS) and mass spectrometry (Griffin, 2003; Pelcer, 2005; Dunn et al., 2005). The advantage of mass spectrometry is its superior sensitivity and the advantage of MRS is its non-invasiveness (Griffin, 2003; Pelcer, 2005; Dunn et al., 2005). Metabonomics has a long history in toxicology (Nicholson et al., 2002) and one of the *foci* has been nephrotoxicity (Shockor and Holmes, 2002).

The quality of diagnostic tools is defined by their sensitivity and specificity. In general, specific combinatorial biomarker patterns confer significantly more information than a single measurement and enable better specificity and sensitivity (Koop, 2005; Ilyn, 2004). Metabolic profiling seems to be a promising strategy since changes in the cell biochemistry are ultimately responsible for the histological and pathophysiological changes of the transplant kidney and are most likely already detectable before histological and pathophysiological changes occur.

## Studies

### *Urine metabolites reflect effects of immunosuppressants on rat kidney function*

**Background.** In this study, we tested the hypotheses that (A) short (6 days) and long-term exposure (28 days) to cyclosporine alone and/or sirolimus in a rat model will result in negative effects on kidney function that are reflected by changes in urine metabolite pattern as assessed by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and high-performance liquid chromatography- mass spectrometry (HPLC-MS) and (B) that changes in urine metabolic profiles occur before kidney GFR, serum creatinine concentrations and histology are significantly changed. **Methods.** Male Wistar rats received cyclosporine (10 or 25 mg/kg/d) and/or sirolimus (1 mg/kg/d) by oral gavage for 6 and 28 days. Urine metabolites were profiled using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Blood and tissue drug concentrations and urine 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane concentrations, as stable markers of *in vivo* oxidative stress, were quantified using HPLC-MS/MS (Haschke et al., 2007). Renal function was determined using the fluorescein isothiocyanate (FITC)-inulin method. Rats have significantly lower oral bioavailabilities and the chosen immunosuppressant doses resulted in blood concentrations within the target concentrations in kidney transplant patients. **Results.** Long-term treatment led to a decrease of glomerular filtration rates (cyclosporine -59%, sirolimus -25%) that was enhanced when both drugs were combined (-86%). Histology did not show any specific changes after 6 days, but revealed glomerular and tubular damage after treatment with cyclosporine and cyclosporine + sirolimus for 28 days. Blood and tissue concentrations of sirolimus were significantly increased when cyclosporine was co-administered. 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostanes in urine were elevated in all treatment groups and were highest after 6 days of combined treatment. <sup>1</sup>H-MRS analysis of urine (day 6) revealed changes in 2-oxoglutarate, citrate, creatine and succinate concentrations. Compared to baseline, after 28 days of treatment with cyclosporine + sirolimus, citrate, 2-oxoglutarate, hippurate, creatinine and trimethylamine-N-oxide were significantly reduced and acetate, lactate, trimethylamine and glucose concentration were increased. These changes correspond to those found for other xenobiotics known to cause S3 proximal tubular damage [Shockor and Holmes, 2002]. **Conclusions:** We showed (A) that the biochemical signature of cyclosporine and/or sirolimus-induced changes is time-dependent with oxidative stress dominating early after treatment initiation and tubular damage after long-term treatment, and that the extent of changes in metabolic profiles in urine after 6 days seem to be associated with the extent of metabolic changes in urine, decrease in GFR and increase of creatinine and urea in serum concentrations after 28 days.



*Changes of blood and urine metabolite patterns in healthy individuals after a single 5 mg/kg dose of cyclosporine*

**Background:** After it became clear from our animal studies that the effects of immunosuppressants on kidney metabolism are reflected in urine, we took first steps to translate our results into clinical studies to test if this strategy can potentially be used for toxicodynamic monitoring of transplant patients. This study assessed the feasibility of new strategies and methods for the early detection of cyclosporine nephrotoxicity. We used a combination of non-targeted <sup>1</sup>H-MRS-based metabolic profiling with the measurement of 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane concentrations, a well established marker of the formation of reactive oxygen species, and the determination of cyclosporine blood concentrations to estimate the potential effects of a single cyclosporine dose (5 mg/kg) on blood and urine metabolite patterns in healthy human individuals. **Methods:** In a cross-over, placebo controlled, two period single dose study, 13 healthy individuals received a single oral 5 mg/kg dose of cyclosporine (Neoral, Novartis, Basel, Switzerland) and the Neoral vehicle (placebo). Before and 4, 8, 12 and 24 hours after oral administration of the study medications, blood and urine samples for metabolic profiling were collected. In addition, blood for cyclosporine pharmacokinetic profiles was drawn. Cyclosporine concentrations were measured using a validated LC-MS/MS assay. Metabolite patterns in urine and plasma were assessed using MRS and isoprostane concentrations were measured using a sensitive and validated LC-MS/MS assay (Haschke et al., 2007). Data were analyzed using principal component and partial least square fit analyses (AMIX 3.5.1., Bruker, Rheinstetten, Germany) **Results:** Manual integration showed that the only statistically significant changes (p < 0.05) in blood were a small increase in alanine concentrations (16%) as well as reduced concentrations of acetate and glutamate (-29% and -22%, respectively). In the case of blood, it was not possible to identify a valid set of markers from the statistical <sup>1</sup>H-NMR spectra analysis. This was due to a large number of different MRS spectral regions that all contributed to the principal components. The principal component analysis of the urine <sup>1</sup>H-MRS spectra showed that the spectral region at 3.7 ppm contributed the most to principal component 1. Two-dimensional MRS experiments revealed that the difference in this spectral region was due to polyethylene glycol (PEG). PEG is a component of the Neoral formulation. The principal component 1 was mainly responsible for the separation of the treatment groups in the scores plot. Citrate (2.70 and 2.52 ppm) and trimethylamine oxide regions (3.30 ppm) also contributed to the principal component 1. Another metabolite that was found at higher concentrations in urine after cyclosporine than after placebo was lactate (2.4-fold higher). The urinary PEG MRS signal 4 hours after cyclosporine was 3-fold higher than in the placebo group. The signal at 3.7 ppm (PEG) was also integrated in the blood extracts and showed no difference between groups suggesting that cyclosporine affected renal PEG clearance. The measurement of 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane concentrations in the urine from healthy individuals showed significantly higher concentrations 4 hours after administration of cyclosporine as compared to after administration of the vehicle. After 4 hours, the average concentration in urine was almost 3-fold higher after cyclosporine than after the Neoral vehicle without cyclosporine (60 pg/mg<sub>creatinine</sub> versus 21 pg/mg<sub>creatinine</sub>, p < 0.05). There was also a tendency to higher isoprostane concentrations after 8 and 12 hours after cyclosporine than after placebo administration. However, the difference was not statistically different. **Conclusions:** Our study showed that significant changes in the blood and urine metabolite pattern are already detectable after a single 5 mg/kg cyclosporine dose. The urine metabolite pattern was more affected than that in blood. Increased isoprostane concentrations constituted the most significant difference between the urine metabolite patterns after cyclosporine and placebo. Since it is well established that oxygen radicals play a critical role in cyclosporine nephrotoxicity and isoprostanes are stable markers of oxidative stress, it can be hypothesized that isoprostanes are a potential sensitive marker of cyclosporine toxicity that is directly linked to the toxicodynamic effect of cyclosporine on the kidney. Another important difference was the concentration of PEG, an ingredient of the Neoral formulation, in urine. This finding emphasizes the importance of structural identification of metabolites.

*Monitoring the change after kidney transplantation by <sup>1</sup>H-MRS in a rat chronic rejection model*

**Background:** In this still ongoing study we investigated the effects of chronic rejection on kidney cell metabolism and metabolite patterns of urine and plasma using a Fisher 344-to-Lewis rat kidney transplant model (White and

Hildemann, 1969; Diamond et al., 1992). At the point of this analysis, the recipients have been followed for 12 weeks so that chronic rejection just starts to develop. **Methods:** Following 3 hours of cold ischemia, kidneys of Fisher 344 (RT1<sup>lv1</sup>) rats were transplanted to bilateral nephrectomized inbred male Lewis rats (RT1<sup>l</sup>) (LEW) (n=6). Recipients were treated with cyclosporine (1.5 mg/kg/day) for the first 10 days following transplantation. Prior to transplantation, at the first postoperative day, and then every two weeks after transplantation, the recipient Lewis rats were housed in metabolic cages for collection of 24-hour urine. After urine collection, jugular venous blood was drawn. Metabolite patterns in 500 L heparinized plasma and urine were analyzed using <sup>1</sup>H-MRS spectroscopy. **Results:** The calculated creatinine clearance showed a significant decrease two weeks after kidney transplantation compared with baseline (57% of control). Hereafter, creatinine clearance increased and was not statistically different from baseline, albeit there was a trend towards slightly lower values. The partial least squares fit analysis of the 24-hour urine <sup>1</sup>H-MRS spectra showed an increasing separation from the control group with the time after transplantation. The arrows in the T-scores plot indicate this trend. However, disappointingly, the metabolites in urine that were responsible for the shift of the urine metabolite patterns during development of chronic rejection were not different from those detected after treatment of rats with immunosuppressants. **Conclusions:** These results suggest that <sup>1</sup>H-MRS analysis will most likely not allow for differentiation between chronic rejection and immunosuppressant nephrotoxicity in rats. Although our previous studies indicated that <sup>1</sup>H-MRS detects changes in urine metabolite patterns with good sensitivity, the specificity of metabolite patterns detected by <sup>1</sup>H-MRS seems to be insufficient. A likely explanation is that <sup>1</sup>H-MRS is limited to the detection of high-abundance metabolites while it seems reasonable to expect that more specific information will be conferred by metabolites with lower abundance. Mass spectrometry-based metabolic profiling seems to be a more promising concept.

#### *Effects of calcineurin inhibitors and/or sirolimus on protein expression and metabolism in the kidney*

**Background:** The goal of this study was to evaluate the effects of calcineurin inhibitors and/or sirolimus on the kidney using a combined metabolic profiling/proteomics approach to (A) further elucidate the molecular mechanisms underlying changes of metabolite patterns in urine, (B) to study the effects of sirolimus in combination with calcineurin inhibitors and (C) to identify potential mechanistic differences between cyclosporine and tacrolimus. **Methods:** Male Wistar rats received cyclosporine (10 or 25 mg/kg/d) and/or sirolimus (1 mg/kg/d) by oral gavage for 28 days (n=6/group). Kidney tissue was collected by freeze-clamping of the still perfused kidney. Proteins were separated by 2-D gel electrophoresis. 3000 proteins per gel were revealed, however, a threshold value allowing detection of approximately 1500 spots per gel was used to compare the different treatments. Proteins observed in at least 23 out of 24 gels were clustered into 800 groups. Following manual correction, 75 proteins exhibited significant (p<0.05) intensity changes and 37 proteins showed a change in average spot density larger than 40%. The latter group of spots were excised from the gel, digested and analyzed by LC-MS/ion trap in combination with database searches. **Results:** Cyclosporine affected the following groups of proteins (partially confirmed by Western blot): calcium homeostasis (e.g. regucalcin, calbindin), cytoskeleton, hypoxia and mitochondrial function and cell metabolism (e.g. kidney aminoacylase, pyruvate dehydrogenase, fructose-1,6-bis phosphate). Several of the changes in protein expression were associated with and explained changes of metabolite concentrations in urine. This included, but was not limited to, an increase of kidney aminocyclase expression (decrease of hippurate and increase of benzoate concentrations in urine). **Conclusions:** Proteomics studies, followed by confirmation of the identified protein changes using Western blotting, provided mechanistic validation of several metabolite concentration changes in urine associated with cyclosporine and/or sirolimus treatment for 28 days.

## Conclusions

Based on our work we conclude:

- 1) After treatment of rats with calcineurin inhibitors and their combination with sirolimus for 28 days, glomerular filtration rates are significantly reduced. The decrease of glomerular filtration rates is associated with sig-

nificant changes in urine metabolite patterns that correlated significantly with the reduction in glomerular filtration rates.

- 2) The immunosuppressant-induced changes of metabolite patterns in urine were associated with a combination of changes in glomerular filtration, changes in secretion/ absorption by tubulus cells and changes in kidney cell metabolism. The latter was confirmed by proteomics studies. The changes in expression of several enzymes compared to untreated controls explained several of the changes in metabolite patterns observed in urine.
- 3) The extent of changes in glomerular filtration rates after 28 days were associated with the extent of metabolite pattern changes in urine after 6 days, although glomerular filtration rates at that time were not different from baseline and histological changes were not detectable.
- 4) Our studies showed that changes in urine metabolite patterns reflected the negative effects of immunosuppressants on kidneys with better sensitivity and specificity than changes in blood.
- 5) When the changes in urine metabolite patterns observed in our study were compared with urine metabolite pattern changes after treatment with toxins that are known to cause specific renal damage as described in the literature, the changes of urine metabolite patterns after 6 days of treatment with immunosuppressants were similar to those observed after agents causing oxidative damage, while the metabolite pattern changes after 28 days were typical for agents that cause tubular damage.
- 6) MRS-based metabolic profiling does not seem to be specific enough to differentiate between immunosuppressant-induced nephrotoxicity and chronic rejection of a kidney graft. More sensitive and targeted mass-spectrometry-based strategies will be required.
- 7) There are two major strategies for validating combinatorial biomarkers and to assess their value as diagnostic tools: (A) identification of the underlying molecular mechanisms leading to changes in metabolic patterns in body fluids and (B) statistical procedures establishing sensitivity and specificity. The good correlation between immunosuppressant-induced changes in protein expression and changes in urine metabolite patterns found in our studies showed that the combination of proteomics and metabolic profiling can be a potent mechanistic validation strategy.

In our opinion, biomarker identification and development using metabolomics strategies have the potential to yield new specific and sensitive diagnostic tools that will allow for:

- 1) predicting tolerability of a immunosuppressive drug regimen and will allow for individualization of immunosuppressive therapy,
- 2) monitoring allograft function and immunosuppressant toxicity (toxicodynamic therapeutic drug monitoring), and
- 3) facilitating the development of a new generation of immunosuppressive drugs and immunosuppressive drug regimens by allowing for more effective and faster pharmaco- and toxicodynamic screening and by providing new study end-points for clinical development.

Although first results look promising, significant further development will still be required. Overall, it is reasonable to expect that metabolomics-based diagnostic tools may significantly improve long-term outcome after transplantation due to their potentially better sensitivity and specificity than currently used biomarkers such as creatinine concentrations in serum.

## References

- Anderson, N.L. et al. *The human plasma proteome: A non-redundant list developed by combination of four separate sources*. Mol Cell Proteomics 2004; 3: 311-326.
- Berl, T. *American Society of Nephrology Renal Research Report*. J Am Soc Nephrol 2005; 16: 1886-1903.
- Campistol, J.M., Grinyo, J.M. *Exploring treatment options in renal transplantation: The problems of chronic allograft dysfunction and drug-related nephrotoxicity*. Transplantation 2001; 71(11 Suppl.): SS42-SS51.
- Chapman, J.R. et al. *Chronic renal allograft dysfunction*. J Am Soc Nephrol 2005; 16: 3015-3026.

- Christians, U. et al. *Biomarkers of immunosuppressive drug toxicity*. *Curr Opin Organ Transplant* 2005; 10: 284-294.
- Diamond, J.R. et al. *Progressive albuminuria and glomerulosclerosis in a rat model of chronic renal allograft rejection*. *Transplantation* 1992; 54: 710-716.
- Dunn, W.B. et al. *Measuring the metabolome: Current analytical technologies*. *Analyst* 2005; 130: 606-625.
- Griffin, J.L. *Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterization of xenobiotics toxicity and disease diagnostic*. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7: 648-654.
- Haschke, M. et al. *Quantification of 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane in human urine and plasma using high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry*. *Clin Chem* 2007 (in press).
- Ilyin, S.E. et al. *Biomarker discovery and validation: Technologies and integrative approaches*. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 411-416.
- Kamoun, M. *Mechanisms of chronic allograft dysfunction*. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 14-18.
- Koop, R. *Combinatorial biomarkers: From early toxicology assays to patient population profiling*. *Drug Discov Today* 2005; 10: 781-788.
- Kee, T.Y. et al. *Treatment of subclinical rejection diagnosed by protocol biopsy of kidney transplants*. *Transplantation* 2006; 82: 36-42.
- Koop, K. et al. *Differentiation between chronic rejection and chronic cyclosporine toxicity by analysis of renal cortical mRNA*. *Kidney Int* 2004; 66: 2038-2046.
- Kreis, H. *Management of the transplant recipient*. In: Davison, et al. (Eds.). *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, 2nd ed. Oxford University Press 1998; 2153-2176.
- Merville, P. *Combating chronic renal allograft dysfunction. Optimal immunosuppressive regimens*. *Drugs* 2005; 65: 615-631.
- Miyagi, M. et al. *Significance of subclinical rejection in early renal allograft biopsies for chronic allograft dysfunction*. *Clin Transplant* 2005; 19: 456-465.
- Nankivell, B.J., Chapman, J.R. *Chronic allograft nephropathy: Current concepts and future directions*. *Transplantation* 2006; 81: 643-654.
- Nicholson, J.K. et al. *“Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data*. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-1189.
- Nicholson, J.K. et al. *Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function*. *Nature Rev Drug Discov* 2002; 1: 153-161.
- Pelczer, I. *High-resolution NMR for metabonomics*. *Curr Opin Drug Discov Develop* 2005; 8: 127-133.
- Raulf, F. *Novel biomarkers of allograft rejection: “Omics” approaches start to deliver*. *Curr Opin Organ Transplant* 2005; 10: 295-300.
- Shockcor, J.P., Holmes, E. *Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis*. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 35-51.
- White, E. et al. *Chronic kidney allograft reaction in rats*. *Transplantation* 1969; 8: 602-617.

## MEMORIAL CARLES MARGARIT

### Achievements and remaining challenges in living-donor liver transplantation

**J. Belghiti**

*Department of HPB Surgery and Liver Transplantation, Hospital Beaujon, Clichy, France; University Paris 7 Denis Diderot*

With the increasing demand for liver replacement and the limited supply of organs a significant number of patients die while waiting. Live donor liver transplantation (LDLT) has emerged as an important option for many patients, particularly small pediatric patients, for whom graft shortage resulted to death on the waiting list. With excellent patients and graft's survival and donor safety, LDLT for pediatric transplantation has become a routine procedure. The application of LDLT to adult recipients requires a large graft subjects, a healthy person to major surgery with a high risk of morbidity and potential mortality. The live donor procedures are considerably more complex than whole organ deceased donor transplantation and there are specific considerations involved in the assessment of recipient and donor.

#### History and current situation

LDLT becomes a feasible procedure for three reasons: (a) liver parenchyma can be divided in totally functional units in terms of inflow (portal and arterial), outflow (venous drainage) and bile duct arborization; (b) each functional unit has a regenerative power and (c) liver transection can be performed safely. The history of LDLT started in 1989, when Raia et al. made their first attempt in a small child in Brazil. With the success of LDLT using small grafts for children, surgeons began to offer the procedure to adult recipients. In 1993, Makuuchi and his team performed the first successful adult-to-adult LDLT using the left liver graft. In 1996, right liver LDLT was developed in Hong Kong allowing donation from a similar size or even smaller person. Right graft donation becomes the predominant mode in adult-to-adult LDLT. To reduce the risk to the donor, the right lateral sector graft was developed by Makuuchi and Lee from Korea designed dual left liver grafts. Indeed, the expansion of living related transplantation which results from the technical expertise of south-eastern Asian surgeons in all the fields of liver and biliary surgery is expanding. In Japan, Korea, Taiwan and Hong Kong, the adult-to-adult LDLT is increasing to more than 1000 cases per year, while the child cases remains around 250 cases per year. In USA, the number of LDLT performed has rapidly increased, to reach over 400 transplantations in 2001. After a publicized donor death in New York, the number of adults LDLT dramatically decreased with 250 cases per year. Currently in Europe, the annual number of LDLT is around 350 with also a tendency of adult-LDLT decreasing.

#### Advantages

LDLT clearly has an advantage due to the more rapid availability of the graft. It considerably decreases the waiting time, avoiding a fraction of the 10% of deaths on the list. LDLT can be scheduled, allowing better preparation of the receiver with possible active preparation of the recipients. The graft has better viability because the donor is healthy and hemodynamically stable, and the cold ischemia much shorter than with cadaveric grafts. In contrast, there does not appear to be any immunological advantage of LRLT over cadaveric transplantation.



**Table 1. Results of three multicentric surveys originating from USA (i), Europe (ii), Asia (iii) compared to our experience.**

	USA <sup>7</sup>	Europe <sup>8</sup>	Asia <sup>20</sup>	Japan <sup>6</sup>	Beaujon
	2003	2003	2003	2003	2004
No. of patients	449	1468	1508	1841	127
Right hepatectomy (%)	NR	44%	37%	24%	45%
Allogeneic transfusion	5%	NR	0,5%	1%	2%
Morbidity	15%	18%	16%	12%	20%
Bile leak/abdominal collection	6%	4%	6%	4%	5%
Intraabdominal bleeding	NR	NR	0.2%	NR	0.8%
Biliary stricture	NR	1%	0.06%	0.3%	0.7%
Portal vein thrombosis	NR	1%	0.05%	NR	0.7%
Bilirubin >5 mg/dl	NR	NR	3%	NR	6%
PT <40%	NR	4%	NR	NR	3%
Need for reoperation	4.5%	NR	1.1%	1.2%	2%
Need for readmission	8.5%	NR	NR	NR	5%

NR: not reported.

- i. Brown, R.S., Russo, M.W., Lai, M. et al. *A survey of liver transplantation from living adult donors in the United States.* N Engl J Med 2003; 348: 818-25.
- ii. European Liver Transplant Registry (ELTR). Data analysis booklet, June 2002. Available at [http:// www.eltr.org](http://www.eltr.org)
- iii. Lo, C.M. *Complications and long-term outcome of living liver donors: A survey of 1,508 cases in five asian centers.* Transplantation 2003; 75: S12-5.

## Disadvantages

The donor, a perfectly healthy volunteer, faces unequivocal risks of morbidity and even mortality. This procedure is in opposition with the Hippocratic maxim “first cause no harm”. The risk of death for donors is much higher after left resection than after right hepatectomy (from 0.1% to 0.5%). There are 19 documented donor deaths worldwide. The postoperative morbidity (hemorrhage, biliary leak, pleurisy, pneumonia, infection, pulmonary embolism, etc.) for the donor is on average 25%. The results of three multicentric surveys originating from the USA (i) Europe (ii) and Asia (iii) are summarized in Table 1. All three surveys show comparable figures for the complications that were analyzed and our experience showed similar rate of morbidity. However, the number of these analyzed complications varied considerably being 5 in the USA, 7 in Europe and 21 in Asia. Improvement in the evaluation of the donor risk requires that these complications are more clearly identified and their incidence collected prospectively. A prospective study of our group showed that adverse events occurred in 50% of cases. For example, pulmonary complications are both ill-recognized and ill-defined. A prospective investigation by thoracic CT-scan on postoperative day 5-7 following donor’s right hepatectomies showed that the incidence of pleural effusion, atelectasia and pulmonary embolism is higher than usually reported up to 6% for pulmonary embolism. The long-term morbidity after donor operation is not well known. The psychological impact of live donation has been studied in surveys showing that more than 80% of donors retrospectively feel that they have been adequately informed. Although, pain was higher than initially thought, 90% would donate again. However, a great majority of donors for adults-LDLT feel insufficient express gratitude for their gift.

Recipient complications are more frequent for than with a total liver. LDLT is technically more complex than whole-organ cadaveric transplantation. The incidence of biliary complications increases with partial grafts up to 40%. Duct-to-duct anastomosis was found feasible in both right and left liver LDLT; this anastomosis is more advantageous in reducing the operation time, avoiding contamination of the operation field, expediting return of

gastrointestinal function, avoiding small bowel obstruction and permitting postoperative endoscopic stenting. A specific complication is observed when the recipient does not receive enough functional liver mass. The small-for-size syndrome is characterized by synthetic dysfunction, elevated aminotransferases, and prolonged cholestasis. Histologically, the graft have characteristics that include severe hepatocyte ballooning, cholestasis, and centrilobular necrosis. It is now better understood that excessive portal inflow can result in overperfusion of the partial graft and thereby result in poor graft function. Assuring perfect venous outflow and preventing portal venous overflow by splenic artery ligation and/or partial porto-caval anastomosis can prevent small-for-size syndrome. It has been speculated that the regenerating liver may be fertile ground for viral replication (particularly hepatitis C) or tumor growth and therefore lead to earlier, and perhaps more aggressive, recurrence after transplantation. Living donor recipients often require lower doses of tacrolimus than do cadaveric recipients to maintain similar tacrolimus through concentrations. A plausible explanation of this finding, is that hepatic clearance and hepatic metabolism may be reduced in partial liver grafts.

## Indications

Live liver donation should only be performed if the risk to the donor is justified by the expectation of an acceptable outcome in the recipient. The patient and graft survival of a live donor transplant should approximate the expected outcome for a recipient with the same disease etiology undergoing a deceased donor transplant. The indications for live donor liver transplantation should be the same as those established for deceased donor transplantation with the exception of institutionally-approved protocol studies that consider live donor transplantation preferential to liver transplantation from a deceased donor. Live donor liver transplantation should offer an overall advantage to the recipient when compared to waiting for an acceptable deceased donor organ to become available for transplantation.

## Donor selection

Minimal age is determined by ability to give legal consent. Based upon reported general surgery data and experimental regeneration data, a limit of 60 years has been considered appropriate. In order to protect the donor from familial and commercial coercive pressures, the French law expanded in 2004 the circle of donors to any person showing proof of a common life of at least two years with the receiver. However, potential donors requires to meet an expert committee independent from the hospital. This committee informs of the risks incurred and of the potential consequences of organ removal. Then the donor must express his consent in front of a magistrate. The consent is revocable at any time without conditions.

The donor evaluation should be accomplished in a staged protocol. Donors should have normal liver function and no medical co-morbidities that would significantly increase the donor risk. Biochemical donor evaluation should include: routine blood tests, serologies, a comprehensive coagulation profile and etiologic markers of liver disease. Blood tests results that confirm donor infection with HIV, HCV or HBV (HBsAg+) are a contraindication for living liver donation. Testing for serum HBV DNA is recommended in donors with detectable anti-HBc with or without anti-HBs. Laboratory testing for a preexisting hypercoaguable condition should be performed especially if the potential donor has a history of venous thrombosis. A preoperative donor liver biopsy is indicated if blood specimen liver tests are abnormal and steatosis or other abnormalities are noted on imaging studies.

Morphological assessment included CT-scan with vascular reconstruction estimating the volume of the liver segments and anatomical vascular disposition. Biliary tree anatomy is preoperatively estimated by cholangio-MRI. The choice of the graft is based on both volumetric and vascular anatomy of the liver segments with a recent emphasis on the importance of the outflow. Absolute and relative contraindications for living donation are not clearly established but the donor safety leads many centers to eliminate donors with the following characteristics (Table 2).

**Table 2.** Absolute and relative contraindication to living donation.

- Association of arterial, portal and biliary abnormalities
- Steatosis higher than 30%
- Donor remnant liver volume smaller than 30% of the whole liver volume
- High body mass index
- Donor age >60 years

## Donor operation

The primary aim in performing LDLT is to harvest a sufficient graft volume with complete inflow and outflow of blood and with minimum risk for the donor. Contrary to hepatic resectional techniques, liver bipartition in LDLT is distinguished by the fact that both remaining liver in the donor and the graft represent totally functional units in terms of inflow (portal and arterial blood

supply), outflow (venous drainage) and bile duct arborization. The type of graft is selected with respect to two factors. First, graft volume is important in order to obtain 30-40% of the calculated standard liver volume of the recipient. Secondly, it is essential to obtain an autonomous graft with potential for provision of complete arterial, portal and hepatic venous flow and with complete biliary drainage. In most centers, donors are kept in the intensive care unit for the first night after the operation. Although, the postoperative management of the live liver donor patient largely parallels that other patients undergoing major hepatic resection, there are several important differences. There is increased pain in donor which may explain the high rate of postoperative pulmonary complications observed in the donor group. Unlike resection patients with tumors, donor complains of a profound fatigue, malaise and nausea early in the postoperative period. It is felt that these symptoms reflect the fact that donors suddenly lose much functional hepatic parenchyma. In a comparative study performed by our group we showed that after right hepatectomy, the left remnant liver parenchyma volume was half in donors as compared to the group operated for benign tumors. The presence of a low remnant liver volume observed in donors induced a rapid liver regeneration immediately after surgery.

## Outcomes

Over the last five years, LDLT has evolved to be a valuable strategy in reducing waiting list mortality for pediatric patients, and adult patients with chronic liver disease, acute liver failure and hepatocellular carcinoma. Despite the technical difficulties encountered, the results of recipients have improved to reach similar results than LT using cadaveric grafts. The one-year graft survival rate of the recent series is about 85%. This is an important message, especially for countries with a low deceased organ donation rate.

Conclusions: Liver Transplantation with living donor remains essential for pediatric and some adults recipients especially in countries with a low deceased organ donation rate. Although, LDLT has considerable advantages in terms of more rapid availability of the graft and possibilities to schedule the procedure, the risk for the donor, (especially after right hepatectomy) remains the main obstacle for the expansion of this procedure.

## References

- Raia, S., Nery, J.R., Mies, S. *Liver transplantation from live donors*. Lancet 1989; 26: 497.
- Tan, H.P., Patel-Tom, K., Marcos, A. *Adult living donor liver transplantation: Who is the ideal donor and recipient?* J Hep 2005; 43: 13-7.
- Ghobrial, R.M., Busuttil, R.W. *Challenges of adult living-donor liver transplantation*. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2006; 13: 139-45.
- Fan, S.T. *Live donor liver transplantation in adults*. Transplantation 2006; 82: 723-32.
- Florman, S., Miller, C.M. *Live donor liver transplantation*. Liver Transpl 2006; 12: 499-510.
- Elwood, D., Pomposelli, J.J. *Hepatobiliary surgery: Lessons learned from live donor hepatectomy*. Surg Clin N Am 2006; 86: 1207-17.



- Pruett, T.L., Tibell, A., Alabdulkareem, A. et al. *The ethics statement of the Vancouver forum on the live lung, liver, pancreas, and intestine donor*. *Transplantation* 2006; 81: 1386-87.
- Dondero, F., Taille, C., Mal, H. et al. *Respiratory complications: A major concern after right hepatectomy in living liver donors*. *Transplantation* 2006; 81: 181-6.
- Dondero, F., Farges, O., Belghiti, J. et al. *A prospective analysis of living liver donation shows a high rate of adverse events*. *J Hepatobiliary Pancreato Surg* 2006; 13: 117-22.

## SUPERANDO LA BARRERA HUMORAL

### Individualized approaches to the sensitized patient

**F.H. Claas**

*Professor of Immunogenetics of Transplantation. Leiden University Medical Center, Department of Immunohematology and Blood Transfusion. Director of the Eurotransplant Reference Laboratory and the National Reference Center for Histocompatibility. Leiden, the Netherlands.*

Highly sensitised (HS) patients tend to accumulate on the kidney waiting list of organ exchange organisations because it is difficult to find a crossmatch negative kidney for these patients. Recently, several protocols have been developed to remove the donor-specific HLA antibodies from the serum of these patients before transplantation. These approaches include the use of intravenous immunoglobulines (IvIg), plasmapheresis and immunoabsorption. Although successful in a proportion of the sensitized patients, these therapies imply an increased dose of immunosuppression for the patient and a considerable financial burden for the society.

An alternative approach is to accept that a patient is sensitized and to try to enhance the selection of cross-match negative donors for these patients. Extensive screening of patient sera can lead to the definition of those HLA alloantigens towards which the patient never made antibodies: the so-called acceptable mismatches. A computer algorithm called HLAMatchmaker is very instrumental in finding these acceptable mismatches. The principle of the acceptable mismatch program is that one can predict that donors compatible with patients own HLA antigens in combination with the acceptable mismatches will give a negative crossmatch with the sera of a highly sensitized patient. Within Eurotransplant the mandatory allocation of such donors to highly sensitized patients has significantly increased their chance to be transplanted with a crossmatch negative donor. Therefore we advocate the acceptable mismatch program as a first tool to enhance transplantation of highly sensitized patients. No additional immunosuppression is necessary and graft survival in this group of “difficult” patients is identical to that of non-sensitized recipients. For many highly sensitized patients (about 60% of the population) the AM-program facilitates transplantation within an adequate time period with excellent graft survival. However, patients with unusual HLA phenotypes have a diminished chance to receive a suitable donor offer. These patients have odd phenotypes due to their provenience or to rare antigen combinations, if compared to the donor population. In addition, they tend to have antibodies towards frequently occurring HLA antigens. The power of the AM-program diminishes after a period of 18 to 24 months. Patients will then accumulate on the list with a very low or no chance to receive a crossmatch negative donor. We have developed a computer program which can calculate the chance that an individual highly sensitized patient will receive a suitable donor organ within a reasonable time period from the Eurotransplant donor pool. If this chance is extremely low, two possibilities are available: increase the donor pool by a more extensive international collaboration, or, if such collaboration is not possible, removal of the circulating antibodies by therapies such as IvIg-treatment, plasmapheresis, and/or immune absorption.

In conclusion we propose a two-step approach to enhance transplantation of HS-patients. First an exact definition of the HLA sensitisation should lead to the identification of acceptable HLA mismatches, which will enable the patient to participate in an AM program. After this analysis, calculations of the chances of the patients to receive a crossmatch negative post-mortal kidney should be done. Only in case the patients belong to the category of rare phenotypes, removal of HLA antibodies by IvIg or pl-CMV-Ig or eventually immune absorption should be considered. By this approach an excellent graft survival and a short waiting time are guaranteed for a large proportion of the patients. Furthermore, the costs for transplantation and maintenance therapy will be significantly lower than in a situation where all patients are considered for IvIg treatment.

In view of the long-term patient and graft survival additional thoughts should be spent on the reasons why patients are highly sensitised. Lowering the incidence of sensitisation for example by filtering of blood components and HLA matching in all allocation procedures worldwide will help in this direction.

As the nature of the HLA polymorphism does not allow all patients to profit from this approach, removal of circulating HLA antibodies can be considered as a rescue therapy for those patients for whom the AM-program does not give a solution.

## Surpassing the humoral barrier: Desensitization techniques

**J.M. Gloor**

*Associate Professor of Internal Medicine and Pediatrics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.*

### Historical background

Historically, the presence of anti-HLA antibodies with donor specificity (Donor specific antibodies, DSA) has been considered to be an absolute contraindication to transplantation (1). Nevertheless, in recent years, advances in detection of DSA as well as methods for lowering DSA activity prior to transplantation have permitted successful transplantation in this setting (2-6). Although the long-term results of this approach to transplantation remains undetermined, intermediate term outcomes appear encouraging, improving the likelihood of transplantation of highly sensitized patients with renal insufficiency currently waiting for prolonged periods of time for compatible donors. Although these new techniques appear to represent realistic options for the allosensitized transplant candidate, the protocols have several unique features which distinguish them from those used in standard transplantation. These features include:

1) comprehensive analysis of recipient sera for the presence of DSA and their level of activity prior to transplantation; 2) pretransplant conditioning to lower DSA levels sufficiently to prevent immediate allograft injury; 3) therapy directed against preventing a post transplant anamnestic increase in DSA production; and 4) monitoring in the post transplant period to detect increasing DSA, allowing intervention prior to antibody-mediated allograft injury.

### Antibody characterization

Initial assays used to detect anti-HLA antibodies were based on the interaction between donor target cells, typically T and B lymphocytes, and recipient sera. The goal was to detect DSA directed against donor HLA class I and II antigens. Donor T lymphocytes expressing HLA class I antigens, as well as donor B cells expressing both class I and II antigens have most commonly been used as target cells. Testing for complement mediated cell death (CDC, complement dependent cytotoxicity crossmatch) is performed by incubating donor cells with recipient serum in the presence of complement. This assay, which is commonly used in the majority of transplant centers, detects DSA present at a high enough activity to result in cell death. Nevertheless, DSA may be present at levels below that which result in cell death. These lower levels of DSA activity may be detected using more sensitive assays such as flow cytometric crossmatching, in which donor cells are incubated with recipient serum, and DSA adherent to the cells are detected using fluorescent-labeled secondary anti-human globulin antibody. Complement dependent cytotoxicity and flow cytometric crossmatching have been the most commonly used assays to detect DSA, but suffer from significant limitations. Assays based on the interaction of antibodies with a cell membrane are inherently non-specific. Positive reactions may be produced by the interaction of non-HLA directed antibodies and cell surface antigens lacking in significance from the standpoint of transplantation. Conversely, antibodies with donor specificity may pass undetected due to insufficient test sensitivity. In an attempt to address these limitations, new tests

have been developed in which purified HLA antigens are bound to solid phase surfaces, such as synthetic microspheres (“flow beads”) or tissue typing trays. These can subsequently be tested using flow cytometric techniques or ELISA. These assays are capable of detecting DSA below the threshold of detection using cell based assays, and since they contain only purified HLA antigens, they overcome the difficulties associated with nonspecific antibody-antigen interactions. Importantly, the HLA class specificity (class I or II) may be defined in an exact manner which was unavailable using cell based assays. Using these assays in combination it is now possible to characterize sensitized patients with in terms of level of DSA activity: high DSA is defined as a level of antibody activity above the threshold capable of resulting in immediate allograft injury, and low DSA, in which antidonor antibodies are detectable, but are present at a level of activity below the threshold causing immediate allograft injury.

## Goals of desensitization

At the time of transplantation high levels of DSA will result in immediate injury to the allograft endothelium with subsequent ischemic allograft injury, which in its most severe form is defined as “hyperacute rejection” and which can result in early allograft loss. Thus, the first goal in transplantation of sensitized patients is to lower DSA activity to below the level causing endothelial injury. Although historically this level of DSA has been considered to be that associated with a positive T cell cytotoxicity crossmatch, advances in antibody characterization have revealed that immediate injury due to preformed antibodies can occur with lower, “subcytotoxic” levels of DSA detectable by flow cytometry. In addition, as solid phase assays have become more commonly used to characterize DSA it has become clear that high levels of HLA class II DSA activity represent a significant risk for hyperacute rejection.

In addition to allograft injury resulting from high levels of DSA activity at the time of transplantation, low DSA activity may also represent an important risk for poor outcome. Individuals with low DSA at transplant (as shown by a crossmatch negative by CDC but positive by flow cytometry) may have satisfactory initial allograft function, only to develop humoral rejection during the first days to weeks after transplantation. This is due to an anamnestic increase in DSA activity following exposure to donor antigens shed from the allograft into the recipient circulation. The object of therapy in this group of patients is to prevent this post transplant increase in DSA production.

## Approach to patients with high level DSA activity

Two general strategies for lowering high levels of DSA activity have been reported to be effective in several different series. High doses of intravenous immunoglobulin (“high dose IVIG”) has been employed to neutralize a positive complement dependent cytotoxicity crossmatch, permitting successful transplantation in both living donor as well as deceased donor transplants (5, 6). Although the exact mechanism of activity is incompletely understood, and in fact may be multifactorial, the interaction of DSA with anti-idiotypic antibodies present in the IVIG is thought to be an important component. Other mechanisms include inactivation of complement, induction of apoptosis in B cells, and stimulation of “blocking” IgM antibodies (7). The combination of high dose IVIG and antithymocyte globulin induction has also been reported to be effective in preconditioning patients with a positive B cell CDC crossmatch (8). The second approach to desensitization consists of periodic plasmapheresis followed by lower dose IVIG supplementation. Serial plasmapheresis treatments have been reported to be effective in lowering DSA sufficiently to permit successful transplantation (3, 4). Although the optimum method of desensitization is not yet completely determined, in a comparison of high dose IVIG vs. plasmapheresis/low dose IVIG regimens, it appears that both approaches are effective when DSA activity is relatively low, while neither is effective when CDC crossmatches are markedly positive. In patients with intermediately positive CDC crossmatches it appears that plasmapheresis based regimens may be more effective in DSA lowering (9). An important consideration is that the time required for preconditioning prior to transplantation makes high dose IVIG a more practical approach for deceased donor kidney transplantation (6).

## Approach to patients with low level DSA activity

Individuals in whom DSA are present at low levels prior to transplant are still at risk for antibody mediated humoral rejection in the post transplant period (10). The approach to therapy for this patient group is directed toward preventing the post transplant anamnestic increase in DSA. High dose IVIG in conjunction with antithymocyte globulin induction has been reported to be effective in this setting (8, 11).

## Conclusion

Patients with DSA represent a challenging population in whom kidney transplantation has historically been considered to be contraindicated. Nevertheless, in recent years new treatment protocols have appeared which provide acceptable intermediate term outcomes for recipients of these transplants. Although these protocols require significant investment of time and resources, they appear to provide a good option for the allosensitized patient.

## References

1. Patel, R., Terasaki, P.I. *Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation*. New Engl J Med 1969; 280: 735.
2. Gebel, H.M., Bray, R.A. *Sensitization and sensitivity: Defining the unsensitized patient*. Transplantation 2000; 69: 1370.
3. Montgomery, R.A., Zachary, A.A., Racusen, L.C. et al. *Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients*. Transplantation 2000; 70: 887.
4. Gloor, J.M., DeGoey, S.R., Pineda, A.A. et al. *Overcoming a Positive Crossmatch in Living Donor Kidney Transplantation*. Am J Transplant 2003; 3: 1017.
5. Jordan, S.C., Vo, A., Bunnapradist, S. et al. *Intravenous immune globulin treatment inhibits crossmatch positivity and allows for successful transplantation of incompatible organs in living-donor and cadaver recipients*. Transplantation 2003; 76: 631.
6. Glotz, D., Antoine, C., Julia, P. et al. *Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulin*. Am J Transplant 2002; 2: 758.
7. Jordan, S.C., Vo, A.A., Tyan, D., Nast, C.C. *Desensitization therapy with high-dose intravenous gammaglobulin: Applications to treatment of antibody-mediated rejection*. Pediatric Transplantation 2004.
8. Akalin, E., Ames, S., Sehgal, V. et al. *Intravenous immunoglobulin and thymoglobulin facilitate kidney transplantation in complement-dependent cytotoxicity B-cell and flow cytometry T- or B- cell crossmatch positive patients*. Transplantation 2003; 76: 1444.
9. Stegall, M.D., Gloor, J.M., Winters, J., Moore, S.B. *A Comparison of Plasmapheresis vs High-Dose IVIG Desensitization in Renal Allograft Recipients with High Levels of Donor Specific Alloantibody*. Am J Transplant 2006; 6: 346.
10. Karpinski, M., Rush, D., Jeffery, J. et al. *Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch*. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 2807.
11. Gloor, J.M., Mai, M.L., DeGoey, S. et al. *Kidney transplantation following administration of high dose intravenous immunoglobulin in patients with positive flow cytometric/negative enhanced cytotoxicity crossmatch*. Am J Transplant 2004; 4(Suppl. 8): 256.

## EFFECTOS DIRECTOS, INDIRECTOS Y SECUELAS DE LAS INFECCIONES VÍRICAS EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS

### Virus del grupo herpes y sus efectos a largo plazo en el trasplante de órganos

**N. Manito**

*Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco, Hospital Universitario de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, España.*

#### Introducción

La familia de los herpesvirus, como el citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein-Barr (VEB), son causa de una importante morbilidad y mortalidad en el paciente con trasplante de órganos sólido (TOS).

El CMV es la causa infecciosa más importante de morbilidad y mortalidad en el trasplante de órganos sólidos. Los efectos del virus se dividen en dos categorías fundamentales: síndromes infecciosos directamente relacionados con el virus y el papel indirecto que el virus desempeña en la patogénesis de otros procesos que pueden afectar al paciente trasplantado. Estos efectos indirectos no dependen del nivel de viremia; es más, se producen en momentos con escasa replicación viral. Por tanto, dichos efectos están en relación con el efecto del virus sobre la inmunidad del huésped. Los efectos indirectos más importantes del CMV en el TOS son: rechazo celular agudo, rechazo y disfunción crónica del injerto, facilitar infecciones oportunistas e interacciones con otros virus, complicaciones cardiovasculares-aterosclerosis, oncogénesis y reducción de la supervivencia del injerto.

El CMV es un miembro de la familia de los herpesvirus y comparte con ellos la capacidad de permanecer latente tras una infección aguda. Aunque el lugar exacto que abriga esa latencia no se ha elucidado, se ha detectado el genoma viral en monocitos/macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células endoteliales.

La activación celular y ciertos fármacos usados en el trasplante han demostrado que reactivan e incrementan la replicación del virus. Además, un bajo grado de persistencia viral puede estar presente en células infectadas bajo control del sistema inmunitario. En condiciones que disminuyan la respuesta inmunitaria, como es la terapia inmunosupresora que sigue al trasplante, se facilita la replicación viral. Por lo tanto, estos dos mecanismos (latencia y persistencia) son importantes en el trasplante de órgano sólido. Otro aspecto importante del CMV y de los otros herpesvirus es su alto poder de infectividad a otros tipos de células, ya sea a través de transfusiones, trasplantes o por contacto con cualquier tipo de célula. Finalmente, todos los herpesvirus se pueden considerar como oncogénicos. En pacientes con infección por CMV es más frecuente el desarrollo de enfermedad linfoproliferativa asociada a la infección por VEB.

#### Impacto clínico a largo plazo del CMV en el TOS

- **Rechazo agudo**

La infección por CMV se ha relacionado de forma secuencial con la presencia de rechazo agudo celular en el TOS. La infección aguda por CMV puede desencadenar una respuesta inmunitaria que ocasione rechazo agudo celular mediante la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) y los antígenos HLA de clase II en las células endoteliales capilares. También se ha demostrado que existe similitud entre la secuencia de DNA de los antígenos clase I del complejo mayor de histocompatibilidad humano y glucoproteínas del CMV. El reconocimiento por



parte del sistema inmunitario de células infectadas por el CMV desencadenaría el rechazo celular. Asimismo, la respuesta inflamatoria asociada al rechazo agudo celular, junto con la liberación de citocinas, activará la infección latente por CMV.

Estudios previos en experimentación animal han mostrado una implicación de la infección por CMV en el rechazo agudo en diversos órganos como riñón, hígado, corazón y pulmón. No obstante, los datos más aclaratorios de esta relación provienen de los estudios aleatorizados donde se utilizan fármacos anti CMV. En un trabajo prospectivo en trasplante renal de pacientes sin profilaxis para el CMV se observó que tanto la infección como la enfermedad por CMV era un factor de riesgo predictivo para el desarrollo de rechazo agudo del injerto. También en pacientes con trasplante renal que son seronegativos para CMV y que reciben un injerto seropositivo, el uso de profilaxis para el CMV reduce la incidencia de rechazo agudo renal un 50%. No obstante, otros estudios muestran que los episodios de rechazo agudo preceden a la viremia por CMV y ocurren durante el periodo de tratamiento profiláctico. Esto significaría que la enfermedad por CMV no sería un inductor del rechazo agudo cuando se utiliza sistemáticamente profilaxis antiviral. La hipótesis, que se ha confirmado en otros estudios, sería que la terapia antiviral actuaría potenciando el efecto inmunosupresor de los fármacos. Recientemente un estudio en trasplante cardíaco muestra que una profilaxis agresiva contra el CMV con inmunoglobulina hiperinmune y ganciclovir endovenoso reduce de forma significativa la tasa de rechazo agudo tratable ( $\geq 3$  A de la clasificación de la ISHLT).

#### • Rechazo crónico

Hay una asociación entre los herpesvirus y el desarrollo de aterosclerosis en estudios experimentales tanto en animales como en humanos. En el TOS existen diversos estudios que muestran la relación entre la infección por CMV y el rechazo crónico. Los estudios experimentales sugieren que la infección por CMV acelera la respuesta inmunitaria dirigida contra el endotelio del injerto trasplantado. Existe amplia evidencia de que la infección por CMV altera la expresión de los antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad, da lugar a una mayor expresión de moléculas de adhesión (molécula de adhesión intercelular tipo I y selectina-E) y crea un estado procoagulante, y de que facilita una mayor captación de lipoproteínas por monocitos y macrófagos.

En el trasplante cardíaco, el rechazo crónico, también llamado enfermedad vascular del injerto (EVI), supone junto a los tumores la mayor causa de mortalidad a largo plazo. La patogenia de la infección por CMV en el desarrollo de la EVI se ha estudiado por la determinación de genes que se expresan precozmente en las células infectadas en el endotelio. De hecho, las medidas terapéuticas encaminadas a prevenir, retrasar o atenuar la infección por CMV en el receptor de trasplante cardíaco han obtenido beneficio en el desarrollo de EVI. En trasplante renal, la infección por CMV (viremia o enfermedad) durante las primeras etapas postrasplante es un factor independiente asociado al desarrollo de rechazo crónico. En el trasplante hepático, la relación entre el rechazo crónico y la infección por CMV es controvertida. Algunos estudios encuentran el DNA viral en los hepatocitos, células endoteliales y epitelio biliar de pacientes con rechazo crónico. Posiblemente uno de los aspectos más importantes de la infección por CMV en el trasplante hepático sea la potenciación de los efectos deletéreos sobre el injerto hepático en receptores positivos al virus C. En el trasplante pulmonar se ha observado que los pacientes que muestran una replicación viral precoz, mediante la detección del DNA del CMV, tienen una mayor incidencia de bronquiolitis obliterante.

#### • Otros efectos indirectos del CMV

La infección por CMV puede limitar la supervivencia del injerto y del paciente en el TOS. Existen datos a su favor en trasplante hepático, renal y pulmonar pediátrico. Otro aspecto a destacar es la potenciación de forma no específica de la inmunosupresión, que facilita la aparición de infecciones oportunistas. En el trasplante hepático se potencia la infección por virus C y la presencia de infecciones bacterianas. También se asocia la infección por CMV a una mayor incidencia de infección por VEB y en el desarrollo de procesos linfoproliferativos.

## Virus de Epstein-Barr (VEB)

El VEB está asociado al desarrollo de linfomas desde hace más de treinta años, cuando se identificó en pacientes con linfoma de Burkitt. Posteriormente se ha asociado al VEB con otros síndromes linfoproliferativos. El VEB puede estar en situación de latencia o replicarse según diversos estímulos, siendo su tropismo dirigido hacia los linfocitos B y T. Los síndromes linfoproliferativos postrasplante (SLPT) son una de las complicaciones graves que presentan los trasplantes de órganos sólidos y suponen una limitación a la supervivencia tanto del injerto como del paciente. Son factores de riesgo para el desarrollo de los SLPT: la infección primaria por el VEB y la inmunosupresión, en especial la utilización de anticuerpos antilinfocitarios. El término SLPT se refiere a un amplio espectro de estadios de la enfermedad que varían enormemente en cuanto a presentación clínica y comportamiento. La incidencia es variable según el órgano trasplantado: oscila entre un 1% y un 6% en trasplantes de riñón, hígado o corazón, y entre un 7% y un 33% en trasplante pulmonar, de intestino y multivisceral. En los últimos años el avance terapéutico más importante en el manejo de estos pacientes ha sido el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD20 (rituximab). No obstante, la presencia de un SLPT se asocia a una elevada mortalidad, por lo que sería importante conocer si la profilaxis con fármacos antivirales puede proteger del desarrollo de estos síndromes. Estudios en trasplante renal apoyan el uso profiláctico de antivirales, especialmente del ganciclovir.

## Virus del herpes humano 8 (VHH-8)

El VHH-8 es un gamma-herpesvirus. Está reconocido como el causante del sarcoma de Kaposi. Hoy día, su abordaje terapéutico se centra sobre una estrategia novedosa en el campo de la inmunosupresión. Diversos autores han mostrado que la retirada de los inhibidores de la calcineurina (ciclosporina y tacrolimús) y su sustitución por un inhibidor m-TOR como sirolimús o everolimús puede limitar y hacer desaparecer el tumor. Los herpesvirus humanos 6 y 7 son causa de cuadros agudos y no se les ha relacionado con efectos a largo plazo en el TOS. No obstante, se ha podido observar un efecto sinérgico entre estos virus y el CMV.

## Efectos directos, indirectos y secuelas de las infecciones por virus en el trasplante de órgano. Buscando la mejor estrategia de profilaxis en trasplante pulmonar

**F. Zurbano**

*Servicio de Neumología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España.*

La infección por CMV puede originar un cuadro clínico o infección abortada en pacientes con inmunidad normal o una infección diseminada en pacientes con alteración en el sistema inmunitario y sin profilaxis.

Las tasas de infección y enfermedad en trasplante pulmonar son más elevadas que en el resto de trasplante de órgano sólido. Sin profilaxis se describen incidencias que oscilan entre el 38% y el 75%. Es además relativamente frecuente la neumonitis, con una mortalidad significativa y el desarrollo de otras complicaciones infecciosas, bacterianas o fúngicas, por su efecto inmunomodulador, y es un importante factor de riesgo de rechazo agudo y crónico (1).

Dadas estas posibles consecuencias, la mejor estrategia, hoy en día, para evitar estas secuelas es prevenir el desarrollo de la infección viral activa mediante una profilaxis también activa (2). Para ello y como señalan diversos grupos, entre otros el grupo de Barcelona (3), la utilización del tratamiento anticipado no parece adecuada por el excesivo riesgo de no detectar precozmente infecciones o enfermedades graves, con sus nefastas consecuencias.



Aceptada, por tanto, como más adecuada la profilaxis activa, las controversias actuales se pueden resumir en dos:

- Tipo de medicación a utilizar.
- Duración de la profilaxis.

## Tipo de medicación

La aparición del valganciclovir, profármaco del ganciclovir, con una biodisponibilidad del 60%, muy superior a la del ganciclovir oral (biodisponibilidad del 6%-9%), ha mejorado la comodidad y el cumplimiento terapéutico y se supone que ha disminuido el riesgo de aparición de cepas resistentes, manteniendo la seguridad del fármaco y su eficacia.

En un estudio sobre 372 pacientes en trasplante de órgano no pulmonar (4), se comparó la eficacia y seguridad de la profilaxis con valganciclovir frente a ganciclovir oral, ambos durante 100 días. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ni a los 6 meses ni a los 12 meses del trasplante (Tabla 1).

	Valganciclovir % (N)	Ganciclovir % (N)
Pacientes	239	125
6 meses	12,1% (29)	15,2% (19)
12 meses	17,2% (41)	18,4% (23)

detectó viremia en 16 de 40 del grupo valganciclovir, comparado con 18 de 40 en el grupo ganciclovir y enfermedad en 8 y 7, respectivamente. Durante el seguimiento hasta los 12 meses, se detectó enfermedad en 12 y 14 pacientes respectivamente, en ningún caso hubo diferencias entre los grupos (Tabla 2).

	Valganciclovir	Ganciclovir
Viremia 6 meses	16 (40)	18 (40)
Enfermedad CMV 6 meses	8 (40)	7 (40)
Enfermedad CMV 12 meses	12 (40)	14 (40)

ción vírica durante la profilaxis, pero que reaparece tras ser suspendida, por lo que sugieren que quizás su duración deba ser más prolongada, fundamentalmente en pacientes de mayor riesgo, como más adelante comentaré.

Con respecto a la utilización de gammaglobulina CMV, su administración aislada se ha demostrado eficaz en trasplante renal y cardíaco (6), aunque en ninguno es capaz de prevenir la aparición de enfermedad grave, por lo que se recomienda su administración en combinación con ganciclovir. Lo mismo ocurre en el trasplante pulmonar, su administración aislada no es eficaz (7, 8), pero en combinación con ganciclovir disminuye de forma significativa la incidencia de enfermedad CMV y sus consecuencias –rechazo agudo, bronquiolitis obliterante–, en comparación con la utilización de ganciclovir de forma aislada, como vemos en el trabajo publicado por Valantine (9). A pesar de ello, un alto porcentaje de artículos muestran que su profilaxis no incluye la utilización de gammaglobulina.

Lo mismo podría decirse con respecto al trasplante pulmonar. En este estudio publicado por Humar y cols. (5) y comparado con un control histórico, se analiza la eficacia de la profilaxis con valganciclovir 12 semanas frente a un control histórico con ganciclovir i.v. 2 semanas más ganciclovir i.v. u oral hasta 12 semanas. No se detectó CMV en ninguno de los dos grupos durante la profilaxis. A los 6 meses de la suspensión, se

En este estudio se analizó por separado el grupo de mayor riesgo, emparejamiento D+ R-. Diez pacientes recibieron valganciclovir y otros 10 ganciclovir i.v. No se detectó viremia durante la profilaxis; sin embargo, una vez finalizada y durante el seguimiento hasta 6 meses, se detectó viremia en el 80% de los casos y enfermedad por CMV en el 40%, lo que da pie a los autores para afirmar que la eficacia del valganciclovir es similar a la del ganciclovir i.v. y que se consigue una buena supresión de la replica-

## Duración de la profilaxis

Ésta no debiera ser muy prolongada cuando se utiliza ganciclovir oral, dada la baja concentración plasmática que se consigue y el riesgo de desarrollo de resistencia. La recomendación más generalizada en la literatura oscila entre 45 y 100 días. La disponibilidad de valganciclovir ha desfasado esta recomendación, ya que permitiría profilaxis más prolongadas sin el teórico riesgo de desarrollar resistencias o al menos con el mismo riesgo que el ganciclovir i.v.

La cuestión actual consiste en determinar la duración óptima de la profilaxis con valganciclovir, equilibrando sus riesgos y beneficios. La recomendación más generalizada es que debe prolongarse 100 días y su nivel de evidencia es B II (10) (recomendaciones GESITRA-SEIMC y RESITRA sobre prevención y tratamiento de la infección por citomegalovirus en pacientes trasplantados. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23: 424-37).

En un trabajo publicado por Zamora hace dos años (11), se intentó determinar si profilaxis más prolongadas, hasta 180, 270 y 365 días, tendrían mayor eficacia. El trabajo se diseñó para enrolar 30 pacientes en cada uno de los tres grupos, pero en el 30% de los pacientes hubo que suspender la profilaxis antes del día 180 por toxicidad y, en concreto, en 23 de 29 pacientes por leucopenia grave, de tal forma que resultaron 5 grupos de profilaxis y en ellos se analizó el porcentaje de pacientes libres de CMV a los 180 días de suspendida. Los resultados se recogen en la Tabla 3.

Sin embargo, y aunque los resultados parecen concluyentes, hay que tener en cuenta dos aspectos fundamentales que además están probablemente interrelacionados:

1º. El alto porcentaje de efectos tóxicos (30% de los pacientes), fundamentalmente neutropenia, con el riesgo consiguiente de sepsis bacteriana y fúngica.

2º. La inmunosupresión, que consistía en CSA a niveles de 400-450 ng/ml durante todo el primer año más azatioprina según cifra de leucocitos entre 3.000 y 6.000 más esteroides. Esta intensa inmunosupresión

inevitablemente aumenta el riesgo de replicación vírica, lo que en parte podría explicar que en esta serie se requiera una profilaxis más prolongada que si la inmunosupresión fuese menos intensa.

La pregunta es: ¿Es esto una especulación o tiene alguna base en la que sustentarse?

Como he comentado al principio, la infección por CMV origina un cuadro clínico abortado en pacientes con inmunidad normal y, por el contrario, puede producir una grave infección diseminada en pacientes con alteración del sistema inmunitario.

En trasplante renal se ha demostrado (12) que altas dosis de inmunosupresión originan una alteración funcional y una pérdida progresiva de linfocitos T CD4 específicos para CMV a lo largo del tiempo, lo que se correlaciona con la aparición de infección por CMV. De hecho, se describe en estudios longitudinales una disminución exponencial de dichos linfocitos justo antes del comienzo de la infección y coincidiendo con la expansión del virus. Pasados los primeros meses, se consigue un equilibrio estable entre la replicación vírica y los linfocitos T CD4 específicos.

En un estudio transversal (13), comparando controles sanos con pacientes con trasplante renal, cardíaco y pulmonar, se encuentra correlación entre el número y el porcentaje de linfocitos T CD4 específicos y la susceptibilidad a infecciones por CMV, con una notable significación en el trasplante pulmonar ( $p=0,005$ ) y además una disminución de la reactividad de estos linfocitos que está relacionada con los niveles de anticalcineurínicos.

Westall (14), en un estudio prospectivo y longitudinal, demuestra que, en ausencia de reactivación vírica, el número de células T específicas para CMV permanece estable.

Además, en un estudio sobre la cinética de la infección por CMV y su relación con la restauración de los linfocitos T CD4 y CD8 específicos para CMV (15), realizado sobre 38 pacientes con diversos trasplantes, todos positivos para CMV, sin profilaxis y durante un seguimiento de un año, se determina que la restauración de los linfocitos T CD4 y 8 específicos confiere protección contra el CMV, mientras que la ausencia de restauración se asocia

**Tabla 3. Resultados con profilaxis prolongadas. Se concluye que la profilaxis debería prolongarse hasta 180 días.**

Tiempo (días)	Pacientes sin enfermedad (%)
<100	59
100-179	64
180*	90
270*	95
365*	90

\* $p < 0,02$  con respecto a los dos primeros.

consistentemente con episodios repetidos de reactivación. Se describen además dos tipos de pacientes, aquellos cuya restauración es precoz, antes del día 30 postrasplante, que representan el 55%, y aquellos cuya restauración es tardía, posterior al día 30, que alcanzan el 44%. Se restauran antes los linfocitos T CD8 que los CD4 (81 días contra 179,  $p < 0,001$ ).

Entre los factores que afectan a la restauración de la inmunidad celular están:

- El número de linfocitos T CD4 y CD8 antes del trasplante.
- El tipo de trasplante.
- El régimen inmunosupresor.
- La presencia de inducción.
- La presencia o ausencia de rechazo.

Durante el año de seguimiento, ningún paciente desarrolló enfermedad por CMV a pesar de la ausencia de profilaxis. Aunque todos fueron diagnosticados de infección por antigenemia o DNA, se utilizó tratamiento anticipado cuando se superó una cifra de corte de 50 células o 300.000 copias y fueron tratados 3 pacientes de 21 del grupo precoz y 13 de 17 del grupo tardío ( $p < 0,001$ ).

La monitorización simultánea de la infección por CMV y la respuesta inmunitaria específica en alguno de estos pacientes mostró los siguientes datos, tomados como ejemplos:

- Un trasplante cardiaco con restauración precoz que no presentó infección por CMV.
- Un trasplante cardiaco, restaurador lento, con infección por CMV precoz.
- Un trasplante pulmonar con un rechazo agudo precoz que presentó una depleción de linfocitos T CD4 tras los bolos de esteroides e inmediatamente después una infección por CMV tratada con ganciclovir y nuevas depleciones de linfocitos coincidiendo con esteroides y ATG seguidas de infección por CMV.
- Por último, un trasplante pulmonar con una restauración muy retardada, sobre todo de linfocitos T CD4 y numerosos episodios de infección por CMV que requirieron múltiples tratamientos.

Este estudio muestra que los pacientes que no desarrollan inmunidad específica durante el primer mes presentan infección por CMV y requieren tratamiento, mientras que aquellos que restauran su inmunidad celular desarrollan menos infecciones y no precisan tratamientos (infección abortada).

Este y los anteriores trabajos comentados nos sugieren que bajas dosis de inmunosupresión se asocian con cifras estables de linfocitos T CD4 específicos y eficaz control de la infección por CMV, mientras que altas dosis de inmunosupresión originan bajos niveles de linfocitos T CD4 específicos y predisposición a complicaciones infecciosas, es decir, que existe un equilibrio entre la respuesta celular inmunitaria y la replicación del CMV, y aunque se necesitan estudios más extensos, probablemente la monitorización de la carga viral y de los linfocitos T CD4 podría contribuir tanto a la instauración del tratamiento o profilaxis como a la determinación de su duración óptima, evitando de esta forma la administración de medicación innecesaria.

## Referencias

1. Zamora, M.R. *Citomegalovirus and Lung Transplantation*. Am J Transplant 2004; 4: 1219-1226.
2. Opelz, G., Döhler, B., Ruhstroth, A. *Citomegalovirus Prophylaxis and Graft Outcome in Solid Organ Transplantation: A Collaborative Transplant Study Report*. Am J transplant 2004; 4: 928-936.
3. Monforte, V., Roman, A., Gavalda, J. y cols. *Preemptive therapy with intravenous ganciclovir for the prevention of Citomegalovirus disease in lung transplant recipients*. Transplant Proc 2005; 37: 4039-4042.
4. Paya, C., Humar, A., Domínguez, E. y cols. *Efficacy and Safety of Valganciclovir vs. Oral Ganciclovir for Prevention of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients*. Am J Transplant 2004; 4: 611-620.

5. Humar, A., Kumar, D., Preiksaitis, J. y cols. *A trial of Valganciclovir Prophylaxis for Citomegalovirus Prevention in Lung Transplant Recipients*. Am J Transplant 2005; 5: 1462-1468.
6. Kocher, A.A., Bonaros, N., Dunkler, D. y cols. *Long term results of CMV Hyperimmune globulin prophylaxis in 377 heart transplant recipients*. J Heart Lung Transplant 2003; 22: 250-257.
7. Kruger, R.M., Paraniathi, S., Storch, G.A., Lynch, J.P., Trulock, E.P. *Impact of prophylaxis with citogam alone on the incidence of CMV viremia in CMV seropositive lung transplant recipients*. J Heart Lung Transplant 2003; 22: 754-763.
8. Zamora, R.M. *Citomegalovirus and Lung Transplantation*. Am J transplant 2004; 4: 1219-1226.
9. Valantine, H.A., Luikart, H., Doule, R. y cols. *Impact of Cytomegalovirus Hyperimmune Globulin on outcome after Cardiothoracic Transplantation. A Comparative study of combined Prophylaxis with CMV Hyperimmune Globulin plus Ganciclovir versus Ganciclovir alone*. Transplantation 2001; 72: 1647-1652.
10. Recomendaciones GESITRA-SEIMC y RESITRA sobre prevención y tratamiento de la Infección por Citomegalovirus en pacientes trasplantados. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 424-437.
11. Zamora, M.R., Nicolls, M.R., Hodges, T.N. y cols. *Following universal prophylaxis with intravenous Ganciclovir and Cytomegalovirus Immune Globulin. Valganciclovir is Safe and Effective for Prevention of CMV Infection Following Lung Transplantation*. Am J Transplant 2004; 4: 1635-1642.
12. Sester, M., Sester, U., Gartner, B. y cols. *Levels of Virus-specific CD4 Cells correlate with Citomegalovirus control and predict Virus-induced Disease After Renal Transplantation*. Transplantation 2001; 71: 1287-1294.
13. Sester, U., Gartner, B.C., Wilkens, H. y cols. *Differences in CMV- Specific T Cells levels and Long term susceptibility to CMV Infection alter Kidney Heart and Lung Transplantation*. Am J Transplant 2005; 5: 1483-1489.
14. Westall, G., Kotsimbos, T., Brooks, A. *CMV-Specific CD8+ T Cell Dynamics in the blood and Lung Allograft Reflect Viral Reactivation following Lung Transplantation*. Am J Transplant 2006; 6: 577-584.
15. Gerna, G., Lilleri, D., Fornara, C. y cols. *Monitoring of Human Cytomegalovirus-Specific CD4+ and CD8+ T Cell Immunity in Patients receiving Solid Organ Transplantation*. Am J Transplant 2006; 6: 2356-2364.

## Infecciones víricas emergentes y trasplante

**A. Pahissa**

Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España.

Las infecciones ocasionadas por virus son una de las causas más importantes de morbimortalidad en los receptores de un trasplante. Este tipo de pacientes pueden adquirir los virus a través de vías diferentes. La adquisición exógena se efectúa por diversos mecanismos, como el órgano del donante, transfusiones de productos hemáticos o bien por una exposición comunitaria. La reactivación endógena de virus latentes es un problema común en este tipo de pacientes y puede provocar una serie de enfermedades o bien unos efectos indirectos sobre la función del órgano trasplantado. Estos efectos indirectos pueden estar causados por una serie de antígenos inducidos por el propio virus, por una disregulación de las citocinas o bien a través de un fenómeno de inmunomodulación. Tradicionalmente los virus del grupo herpes, en particular los citomegalovirus, y los virus de la hepatitis han sido los más importantes en los pacientes sometidos a un trasplante de órgano sólido. Aunque este hecho sigue siendo cierto, en estos últimos años se han descrito una serie de virus, que podríamos considerar como emergentes, y que progresivamente, y a medida que los profesionales han ido incrementando su grado de conocimiento, han adquirido un mayor protagonismo como causantes de enfermedad en este grupo de pacientes.

A continuación voy a describir brevemente los que para mí tienen, hoy en día, un mayor interés.

## Poliomavirus BK

Se trata de un virus de adquisición infantojuvenil, con poca trascendencia en la población inmunocompetente, pero que en la inmunodeprimida, y muy especialmente en los receptores de trasplante renal o de progenitores hematopoyéticos (TPH) puede representar un serio problema. La manifestación clínica más importante en el trasplantado de riñón es una nefropatía, que en este tipo de enfermo deberá diferenciarse de un rechazo y que se puede presentar hasta en un 8%, mientras que en el TPH se caracteriza por el desarrollo de una cistitis hemorrágica. El diagnóstico de seguridad está basado en la anatomía patológica, pero el diagnóstico de sospecha se efectúa a través de la presencia de las células Decoy en la orina y/o de viruria, o bien a través de la carga viral en plasma o en orina obtenida por PCR. El único tratamiento médico aceptado es el cidofovir, aunque los resultados son variables, generalmente ligados a una reducción de la inmunosupresión.

## Adenovirus

La incidencia de la enfermedad en los trasplantados de órgano sólido (TOS) es desconocida, mientras que en los TPH se sitúa entre un 3% y un 45%, siendo diferente según se trate de un trasplante alogénico o autólogo. La enfermedad se puede manifestar como una cistitis hemorrágica o bien una enfermedad respiratoria (alta o baja) o, con menor frecuencia, gastrointestinal o hepática. La confirmación diagnóstica y el seguimiento se efectúa por PCR. El cidofovir es la mejor alternativa terapéutica.

## Otros virus emergentes

Entre los virus respiratorios cabe destacar los metaneumovirus, el del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y el virus de la gripe, este último con el riesgo potencial de la variante H5N1 (gripe aviar). El primero ha adquirido mayor protagonismo en el trasplante de pulmón, al haberse considerado como un posible cofactor para el desarrollo de una bronquiolitis obliterante. El coronavirus causante del SARS afecta a pacientes trasplantados que presentan una mayor capacidad de infectividad, así como una más elevada mortalidad. La gripe en la población trasplantada provoca una mayor morbimortalidad, especialmente en los trasplantados de pulmón y en los TPH. Desconocemos las implicaciones del H5N1, pero cabe pensar que en la población trasplantada, y en ausencia de defensa inmunitaria, podría tener un efecto devastador.

Por último, merecen ser comentados el virus del Nilo occidental, endémico en el área mediterránea, pero curiosamente con un gran protagonismo en EE.UU., donde se han descrito casos de encefalitis (con una mortalidad del 40%) adquirida a través del órgano trasplantado o bien de los productos hemáticos recibidos durante la intervención quirúrgica del trasplante; el virus de la coriomeningitis linfocitaria, del cual recientemente se ha comunicado, como en el caso del virus anterior, la transmisión donante-receptor, con una mortalidad del 90%, lo que hace inviable la aceptación de posibles donantes afectados de una encefalitis, y por último el parvovirus B19, virus muy prevalente entre la población general, causante de alteraciones en el hemograma –la más común es la anemia–, aunque también puede ocasionar otros cuadros, como exantema, artralgias, miocarditis, hepatitis e incluso neumonitis.



## TRASPLANTE CELULAR Y DE TEJIDOS

### Trasplante de limbo y de células madre en la superficie corneal

O. Gris

*Unidad de Córnea y Superficie Ocular, Instituto de Microcirugía Ocular (IMO), Barcelona, España.*

#### Introducción

El globo ocular se encuentra recubierto en su superficie por dos tipos de epitelio: el epitelio corneal, que recubre un tejido completamente transparente como es la córnea, y el epitelio conjuntival, que recubre la esclera y continúa por la cara interna de los párpados. La zona de transición entre los dos epitelios se encuentra en la periferia corneal (en los 360°) y se denomina “limbo esclerocorneal”. En las capas más basales del limbo esclerocorneal se encuentran las células madre para el epitelio corneal y, desde allí, las células epiteliales migran de manera centrípeta a la vez que maduran y ascienden de las capas más profundas a las más superficiales. Finalmente, las células epiteliales maduras se eliminan por descamación hacia la lágrima en el centro de la córnea, de manera que el ciclo completo de renovación epitelial dura aproximadamente 7 días. Para mantener una buena visión es imprescindible que la córnea se encuentre completamente transparente, y ello sólo se consigue si el epitelio que la recubre tiene un fenotipo corneal. Las células madre del epitelio corneal localizadas en el limbo producen el epitelio corneal, pero además actúan como una barrera que impide el crecimiento del epitelio conjuntival sobre la córnea. Si por cualquier motivo se produce una pérdida de las células madre del limbo, es el epitelio conjuntival que rodea a la córnea, y que posee unas características histológicas distintas, el que invade y recubre la córnea. Esta situación de presencia de epitelio conjuntival sobre la córnea se debe siempre a una falta de células madre del epitelio corneal y se denomina “insuficiencia límbica”.

#### Clínica y tratamiento de la insuficiencia límbica

El epitelio conjuntival sobre la córnea es menos regular y transparente que el corneal, por lo que el primer síntoma que aparece en estos ojos es la disminución de la visión. Además, las uniones intercelulares y la adherencia del epitelio conjuntival también son menores, por lo que son frecuentes las erosiones corneales recurrentes, que producen una inflamación mantenida en la superficie ocular y que acaban en la neovascularización y opacificación de la córnea. El diagnóstico de la insuficiencia límbica se hace confirmando la presencia de epitelio conjuntival sobre la córnea. En la mayor parte de casos el diagnóstico puede realizarse explorando la superficie ocular en la lámpara de hendidura tras instilar una gota de fluoresceína. El epitelio corneal posee unas fuertes uniones intercelulares que no permiten el paso del colorante, mientras que el epitelio conjuntival sí lo permite y presenta una tinción moteada que aparece característicamente unos segundos después de aplicar la fluoresceína. La confirmación histológica de la insuficiencia límbica puede realizarse fácilmente recogiendo células de la superficie ocular mediante citología de impresión. Sólo el epitelio conjuntival posee células caliciformes, por lo que, en ojos sanos, éstas no deben aparecer nunca en el epitelio corneal. El diagnóstico de insuficiencia límbica queda confirmado siempre que en una muestra de epitelio tomada sobre la córnea se encuentren células caliciformes.

La insuficiencia límbica puede ser transitoria o permanente. La insuficiencia límbica transitoria o reversible es aquella que podemos recuperar si eliminamos la causa en las fases iniciales del cuadro (por ejemplo, la secundaria a lentes de contacto). Dentro de la insuficiencia límbica permanente debemos distinguir las formas parciales, que



afectan sólo a una parte del limbo esclerocorneal, de las formas totales, que afectan a los 360° del limbo esclerocorneal. En las formas parciales, con una reserva de limbo funcionante, podemos intentar tratamientos conservadores como la epiteliectomía conjuntival secuencial para que, tras eliminar el epitelio conjuntival que hay sobre la córnea, ésta vuelva a ser recubierta por el epitelio corneal. Sin embargo, en los casos de insuficiencia límbica completa, con afectación de los 360° del limbo, el único tratamiento posible es el trasplante de células madre del epitelio corneal. Ello puede realizarse con un trasplante del limbo esclerocorneal (que incluye a las células madre y todo su entorno) o trasplantando de manera selectiva las células madre del epitelio corneal tras su cultivo y expansión en el laboratorio.

## Trasplante de limbo

En esta técnica quirúrgica, tras eliminar todo el limbo destruido y el epitelio conjuntival que recubre la córnea receptora, se procede al trasplante de un anillo tisular de unas 250-300 micras de espesor que incluye a las células madre y que ha sido previamente disecado del ojo donante. En casos de afectación unilateral puede realizarse un trasplante con limbo procedente del ojo sano. Las ventajas de utilizar el autotrasplante son que el tejido trasplantado se implanta inmediatamente después de la extracción y sin riesgo de rechazo, por lo que la proliferación celular es mayor y no es necesario realizar inmunosupresión en el paciente. El principal inconveniente es que estamos extrayendo limbo al único ojo sano del paciente y por tanto éste debe asumir un cierto riesgo de acabar con insuficiencia límbica en ambos ojos. Conservando la mitad del limbo en el ojo sano el riesgo de insuficiencia límbica para este ojo donante es mínimo, pero esta limitación a utilizar como máximo 180° de limbo (generalmente en dos fragmentos de 90°) es uno de los inconvenientes del autotrasplante. Además, si el trasplante fracasa no existe la posibilidad de repetir el autoinjerto.

En casos de afectación bilateral, o de lesión unilateral si el paciente rechaza utilizar el ojo sano como donante, el trasplante debe realizarse con limbo procedente de otro donante. En estos casos de alotrasplante el donante suele ser un cadáver, porque de esta manera sí puede utilizarse la totalidad del limbo donante (aportando un mayor número de células madre) y, además, en caso de fracaso el trasplante puede repetirse. El inconveniente del alotrasplante es que precisa de inmunosupresión sistémica ya que, a diferencia del trasplante de córnea, la inmunosupresión tópica se acompaña de un porcentaje elevado de rechazo. El alotrasplante de limbo procedente de un familiar vivo es una opción poco utilizada, ya que sólo representa una clara ventaja en casos de inmunocompatibilidad completa entre donante y receptor. En el resto de casos, con inmunocompatibilidad sólo parcial, la inmunosupresión sistémica es necesaria y además se suman otros de los inconvenientes comentados para el autoinjerto por tratarse de donantes vivos (riesgo en el ojo donante, extensión limitada a la mitad del limbo y la imposibilidad de repetir un nuevo trasplante con el mismo donante).

Para el trasplante de limbo hay una serie de factores preoperatorios que empeoran claramente el pronóstico de la cirugía. La presencia de alteraciones palpebrales o en las pestañas que puedan afectar a la superficie ocular, la presencia de inflamación significativa en la superficie ocular y la ausencia de lágrima, suelen conducir al fracaso tras la cirugía, por lo que, siempre que sea posible, estas situaciones deben solventarse o mejorarse antes del trasplante. Cuando estos factores de mal pronóstico no están presentes, la supervivencia del trasplante de limbo es elevada, con cifras del 75-80% al año de la cirugía. Sin embargo, la supervivencia disminuye al 50% cuando el seguimiento se prolonga hasta los 5 años.

## Expansión ex vivo de células madre limbares

En los últimos años distintos estudios realizados en humanos han demostrado los beneficios de la expansión ex vivo de las células madre del epitelio corneal para la reconstrucción de la superficie ocular en ojos con insuficiencia límbica total. En casos de insuficiencia límbica unilateral esta técnica permite utilizar el ojo sano contralateral para realizar un autotrasplante sin que este ojo donante asuma riesgos. A partir de una pequeña muestra de limbo sano (1 ×

2 mm) puede conseguirse en el laboratorio la expansión de las células madre que posteriormente se trasplantarán al ojo dañado del paciente. El soporte sobre el que se expanden y trasplantan las células madre suele ser la membrana amniótica, ya que ésta imita el nicho de las células madre, proporciona un microambiente no inflamatorio y favorece la adhesión y migración de las células. Algunos grupos han utilizado también con éxito capas nutrientes fibroblásticas 3T3 como base para la expansión.

En los casos de insuficiencia límica total bilateral, en los que se necesita un trasplante alogénico, hemos obtenido mejores resultados con el trasplante de limbo que con las células madre cultivadas. Por el contrario, en los casos de afectación unilateral con posibilidad de realizar un autotrasplante, nuestra primera opción es el trasplante de células madre limbares expandidas ex vivo sobre membrana amniótica, ya que consigue buenos resultados sin poner en peligro el ojo donante.

## CONTROVERSIAS EN HEPATOCARCINOMA Y TRASPLANTE HEPÁTICO

---

### First line treatment for HCC: resection or transplantation?

---

**V. Mazzaferro**

*Gastrointestinal, Liver Surgery and Transplantation Unit, "Istituto Nazionale Tumori", Foundation IRCCS Milan, Italy.*

Liver resection (LR) and transplantation (OLT) are as of today, together with ablative therapies, the only curative treatments available for hepatocarcinoma. Specific guidelines have not yet been defined in order to choose between these procedures because of the objective difficulty in collecting large numbers in centers with same policies. Hereby follows an in dept analysis of today's literature regarding the work out to follow in this choice. Often these procedures are offered to patients who do not fit standards proposed in an evidence based scenario, broadening boundaries which seem to be to narrow because of the always increasing patient request.

Theoretically liver transplantation is the preferable treatment because it removes the underlying liver disease and the widest resection margins possible; unfortunately organ shortage remains the main limitation. Following this current and considering the good survival rates achieved, numerous centers have adopted policies aimed, in an organ sparing frame of mind, to propose LR as a first treatment for early HCC and to focus OLT on selected patients who present with either a late recurrence (*"salvage" transplantation*) or with biologically aggressive parameters at histology (*"preventive" or "de principe" transplantation*).

The only determinant factor missing in most of the experiences is the exact measure of the difference in **gain of life expectancy** given to the patient with one procedure rather than with the other. Tuned with all the other analysed factors this should be considered in a final decisional model to adopt not just for a single patient but for large cohorts.

### Management of hepatocellular carcinoma in the waiting list before liver transplantation: treatment or priority

---

**P. Majno, for the Geneva Liver Cancer Study Group**

*Clinics of Visceral Surgery and Transplantation, University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland.*

#### Purpose of the review

To put into perspective the current knowledge on management of HCC patients on the waiting list before liver transplantation (WL).

## Background

In the current era of organ shortage, patients with hepatocellular carcinoma spend a considerable time on the waiting list, facing the risks of not being transplanted because of contraindications developed while waiting (dropout). Management strategies have been devised to monitor or slow the progression of the tumour beyond the criteria accepted for transplantation: transarterial chemoembolisation (TACE), radiofrequency thermo-ablation (RFTA) and prioritisation. Each experience will be analysed on the background of a benchmark attitude of surveillance alone. The main limitation of the available literature is that the criteria for tumour progression mandating delisting of the patients, and other fundamental parameters of liver transplantation for HCC such as recurrences after a reasonable follow-up are not always detailed.

### *Surveillance*

Only one study reliably reports the outcome of surveillance with no additional treatment on the waiting list. The landmark paper from the Barcelona Clinic Liver Cancer study group (BCLC) compares a series of 50 patients when the waiting time was 62 days to 37 patients when the waiting time increased to 162 days (1). In the latter period two patients dropped out because of liver decompensation and 6 patients because of tumour progression (drop-out rate 32%). The recurrence rate after transplantation was 3/83 (37?) patients, with a relatively short follow-up after transplantation of 26 months. The paper established that the results of LT for HCC should be evaluated as “intention to treat” and introduced the concept that dropouts were a major determinant, together with recurrences, in evaluating the results of LT for HCC. Unfortunately subsequent papers were largely inferior in the quality and purity of data, and no other series is available to establish the outcome of surveillance alone without treatment. The fact that reports are so scanty, and that the BCLC itself moved to an attitude of systematic treatment on the WL suggests that further studies are unlikely.

### *TACE*

Maddala et al. from the Mayo clinic reported a series of 54 patients treated with TACE for a median of 211 days before transplantation (2). The criteria for monitoring and exclusion of patients on the waiting list were well defined. The dropout rate was 14% and the recurrences after transplantation were 10%, with a probably short follow-up after transplantation (unspecified). More recently, Millonig et al. from Innsbruck reported a series of 116 patients (68 within Milan’s criteria) treated with TACE for a median waiting time of 274 (36-1037) days (3). The dropout rate in patients within Milan’s criteria was 2%, and recurrences after transplantation were 8, after probably a longer median follow-up than the Mayo Clinic series (unspecified). To overcome these limitation we analysed our own experience with TACE on 43 patients within Milan’s criteria treated between 2000 and 2004 (for whom data on outcome with a follow-up longer than 2 years are available). The tumour related drop-out rate was 10% and recurrences were 10% after a median waiting time of 203 (27-1036) days, proving that TACE allows limiting the pre-transplant dropout rate without transforming dropout into recurrences. A larger study from the BCLC identifies a group of patients at high risk, with tumours >3 cm, not responding to TACE, with AFP>200 and tumour progression in the previous 6 months, in whom the risk of dropout at 12 months was 52% (17/29) and a group without these variables, in whom the risk was 3% (3/150) (4).

## Radiofrequency Thermal Ablation (RFTA)

Mazzaferro et al. had no dropouts in a consecutive series of 50 patients treated by RFTA in a single session, with an ITT survival of 83% at 3 years, and a longer waiting time than in Innsbruck (290 days) (5). Only two recurrences

were recorded, and both in patients with tumours exceeding 5 cm and with a partial response to treatment. More recently, a study from Los Angeles reported 52 patients (43 within Milan's criteria) waiting for 387 (9-1326) days (6). The total dropouts were 6 of whom 3 were tumour related. Unfortunately only a limited follow-up was available to interpret the results in terms of recurrences.

## Prioritisation

Fast-tracking patients with HCC may be a double edged sword as time on the waiting list may be a privileged period to observe the biology tumour and to allows weeding out patients with aggressive cancers that will progress to the stage of contraindications while waiting. The concern is pertinent to living-donor liver transplantation (LDLT) as preliminary results from North-western University Chicago reported a higher incidence in patients fast-tracked either by recent UNOS/MELD rules, or by the use of split-LD grafts, as compared to patients from a previous period with longer waiting times (T1-T2: 5/32 vs. 0/25, T3-T4 : 4/9 vs. 1/8, respectively) (7). The difference for the whole series was statistically significant. The results of two large series from Japan cannot be taken to validate the assumption of more frequent recurrences, with results for LDLT similar to what is expected in patients with an equivalent tumour stage. It is customary, however, for Japanese patients to be treated with TACE, PEI or resection before LDLT.

UNOS waiting-list data do not allow to answer the question on whether prioritisation is associated to a high incidence of recurrence, as the information available is limited to the waiting list and does not take recurrences into account. Probably recurrences are not appreciably increased in patients at the lower end of Milan's criteria (T1: 1 nodule <1.9 cm), but is higher for patients at the upper end or beyond.

An additional concern about fast tracking appeared after the UNOS allocation policy assigned MELD points to HCC patients to compensate for the preserved liver function. In the early phase of the adjustment, 31% of patients transplanted with the diagnosis of early HCC (T1) were found to have no tumour in the explanted liver (8), and these patients are no longer given priority above the calculated MELD score.

## Conclusions

While there are no solid data to recommend a management policy, it appears that treatment on the waiting list does not harm, and may allow to bridge patients to transplantation and sufficient time to select poor risks during a hopefully limited observation time. Furthermore, in case of dropout for a given patient, treatment by TACE or RFTA represents the most effective and timely palliative treatment. As the consensus in practice is now to treat patients, the most relevant question is not whether to treat or not to treat, but which treatment is most appropriate (RFTA, TACE or a combination of both: a randomised multicentre study comparing TACE and RFTA+ TACE is ongoing in Switzerland, open now to other centres), and in particular what should be the criteria for removing a patient from the list. A strategy of prioritisation, while appropriate from a patient's perspective, may transform dropouts into recurrences and be counterproductive from a wider societal perspective.

## References

1. Llovet, J.M., Fuster, J., Bruix, J. *Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: Resection versus transplantation.* Hepatology 1999; 39: 1434-1440.
2. Maddala, Y.K., Stadheim, L., Andrews, J.C. et al. *Drop-out rates of patients with hepatocellular cancer listed for liver transplantation: Outcome with chemoembolization.* Liver Transpl 2004; 10: 449-455.
3. Millonig, G., Graziadei, I., Freund, M.C. et al. *Response to Chemoembolization correlates with outcome after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma.* Liver Transpl 2007; 13: 272-279.

4. Llovet, J.M., Sala, M., Fuster, J. et al. *Predictors of drop-out and survival of patients with hepatocellular carcinoma candidates for liver transplantation*. Hepatology 2003; 38: 763A.
5. Mazzaferro, V., Battiston, C., Perrone, S. et al. *Radiofrequency ablation of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients awaiting liver transplantation: A prospective study*. Ann Surg 2004; 240: 900-909.
6. Lu, D.S.K., Yu, N.C., Raman, S.S. et al. *Percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma as a bridge to liver transplantation*. Hepatology 2005; 41: 1130-1137.
7. Kulik, L., Abecassis, M. *Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology 2004; 127: S277-S282.
8. Wiesner, R.H., Freeman, R.B., Mulligan, D.C. *Liver transplantation for hepatocellular cancer: The impact of the MELD allocation policy*. Gastroenterology 2004; 127: S261-S267.



## CONSECUENCIAS A LARGO PLAZO DE LA INMUNOSUPRESIÓN CRÓNICA

### Consecuencias a largo plazo de la inmunosupresión crónica: riesgo cardiovascular

**J. Pascual**

*Servicio de Nefrología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid; Department of Surgery, Division of Transplantation, University of Wisconsin Hospital and Clinics, Madison, Wisconsin, USA.*

Las causas más importantes de pérdida del injerto son la muerte del enfermo con un injerto renal funcional y la nefropatía crónica progresiva, y la principal causa de esas muertes con injerto renal funcional es la cardiovascular. Dos hechos aparentemente contradictorios ilustran el impacto de la enfermedad cardiovascular en el trasplantado: por un lado, se ha constatado que el trasplante renal detiene la progresión de la enfermedad cardiovascular, reduciendo de modo muy significativo la incidencia acumulada de eventos cardiovasculares en los pacientes trasplantados respecto de los que permanecen en diálisis (1); por otro, la mortalidad cardiovascular anual en los trasplantados de riñón es más elevada que en la población general, especialmente (10 veces mayor) en el grupo de edad joven, entre 25 y 44 años (2).

Probablemente, el factor de riesgo cardiovascular (RCV) más importante en el enfermo trasplantado es la enfermedad cardiovascular acumulada en la etapa anterior al trasplante, por lo que resulta especialmente relevante la prevención tanto primaria como secundaria durante la etapa de enfermedad renal crónica en todos sus estadios (3). Los factores de RCV clásicos, tanto antes como después del trasplante, son probablemente los más importantes, de modo similar a lo que acontece en la población general. Durante la etapa de enfermedad renal avanzada y diálisis, estos factores se unen a otros de creciente importancia, como la alteración del balance calcio-fósforo, la hiperhomocisteinemia, el estrés oxidativo, la hiperfibrinogenemia, el exceso de productos de glicosilación avanzada o el permanente estado proinflamatorio en que se encuentran estos pacientes. Lamentablemente, esta situación no suele remitir después del trasplante renal, e incluso muchos de estos factores (por ejemplo la obesidad o la dislipemia) se agravan de modo importante. Un estilo de vida desfavorable, la comorbilidad y las enfermedades intercurrentes, la necesaria inmunosupresión farmacológica y una función con frecuencia precaria del injerto renal colaboran a esta situación de elevado RCV (4).

La generalización del uso de ciclosporina (CsA) durante los años 80 mejoró los resultados globales, pero incrementó la prevalencia de hipertensión arterial e hipercolesterolemia respecto de lo observado con el tratamiento previo basado en azatioprina (5). Posteriormente, se ha constatado un descenso significativo de la tensión arterial, del colesterol plasmático y la fibrinogenemia en enfermos convertidos de CsA a tacrolimús (6,7). La revisión sistemática de 7 ensayos controlados comparativos entre CsA y tacrolimús realizados antes de 2003 ha permitido comprobar que el tacrolimús es responsable de una mayor incidencia de diabetes mellitus de novo definida como necesidad de insulina (9,8 vs. 2,7%,  $p < 0,0001$ ) (8). Cuando el criterio de definición de diabetes mellitus se amplía incluyendo a los pacientes con glucemia basal superior a 126 mg/dl, aunque no requieran insulina, la comparación directa entre una pauta basada en CsA y otra basada en tacrolimús con las mismas dosis de esteroides reduce estas diferencias (33,6 vs. 26%,  $p = 0,046$ ) (9).

El uso de esteroides es uno de los elementos más desfavorables en el perfil de RCV del enfermo trasplantado renal (10-13). Las nuevas pautas inmunosupresoras tienden a la minimización del uso de estos fármacos en enfermos que no presenten un elevado riesgo inmunitario, con dos estrategias fundamentales: 1) la omisión completa o su uso limitado a los primeros días tras el trasplante (en el contexto de una inducción con anticuerpos) (10) o 2) la utilización de dosis bajas durante unos meses y su posterior suspensión (11, 12). Con ambas estrategias se consi-

que la misma eficacia que con pautas esteroideas estándar y un mejor perfil de RCV, sobre todo en el perfil lipídico y el desarrollo de diabetes mellitus de novo.

Los inhibidores de la señal de proliferación, sirolimús y everolimús, presentan mecanismos de acción y perfiles de toxicidad diferentes a los observados con los demás fármacos inmunosupresores. Se podría resumir su impacto en cinco puntos: 1) una disminución en la tensión arterial, más patente en ausencia de anticalcineurínicos (14-16), 2) un aumento importante en la prevalencia de dislipemia y necesidad de tratamiento hipolipemiante (14-16), 3) un dudoso efecto sobre el metabolismo hidrocarbonado y la prevalencia de diabetes mellitus de novo (17, 18), 4) un aumento en el desarrollo de proteinuria, muy relevante en algunos enfermos (19, 20), y 5) un alto potencial en protección del paciente a largo plazo, por sus efectos antifibróticos, antiproliferativos y antineoplásicos (20-24).

Una función del injerto renal disminuida es probablemente el factor de riesgo vascular más importante en el enfermo trasplantado (25). En el estudio del Registro de EE.UU. en casi 60.000 receptores de trasplante renal, se observa que el riesgo de muerte cardiovascular aumenta significativamente en función de la cifra de creatinina sérica (Cr<sub>s</sub>) al año del trasplante (25). Este riesgo es el doble, por ejemplo, entre los receptores con una Cr<sub>s</sub> superior a 2,5 mg/dl que en aquellos con Cr<sub>s</sub> de 1,5 mg/dl. El ensayo ALERT de tratamiento con fluvastatina en receptores de trasplante renal ha confirmado que la prevalencia de eventos cardiovasculares mayores, muerte cardiaca, e incluso muerte por cualquier causa, es muy superior en los receptores con una función subóptima del injerto (riesgo relativo entre 1,9 y 2,9 por cada 100 μmol/l de incremento en la Cr<sub>s</sub>) (26, 27).

Diversos estudios muestran una Cr<sub>s</sub> final más elevada cuando el anticalcineurínico utilizado es CsA que cuando es tacrolimús, tanto en trasplante renal (28) como hepático (29). Sin embargo, la hipótesis más recientemente planteada es que la ausencia de anticalcineurínicos proporcionaría la mejor función renal del injerto posible y constituye la teórica base racional para el desarrollo de pautas de este tipo (30, 31). La mejor función renal y menor nefrotoxicidad histológica observada a los dos años evitando la CsA no se han confirmado cuando esta comparación se llevó a cabo entre pautas basadas en sirolimús y tacrolimús (32). Tampoco la extensión de esta experiencia a dos estudios controlados multicéntricos que incluyeron casi 1000 pacientes pudieron demostrar ninguna ventaja en cuanto a la función renal en las pautas basadas en sirolimús y sin inhibidores de la calcineurina, y sí un apreciable aumento en la morbilidad y la mortalidad, que obligó a sus respectivos comités a su suspensión prematura. Finalmente, se han comunicado los resultados del estudio SYMPHONY, en el que, después de una inducción con daclizumab, la pauta basada en tacrolimús-MMF permitió obtener mejor supervivencia del injerto, cifras menores de rechazo y una mejor función renal que la basada en sirolimús-MMF (33). Estos resultados sugieren que la pauta sin anticalcineurínicos basada en sirolimús es menos eficaz y segura que la basada en tacrolimús. Ni siquiera experiencias en donantes marginales han permitido detectar que una pauta sin anticalcineurínicos obtenga mejores resultados en la supervivencia del injerto o la función renal (34).

Los mejores resultados de una pauta sin inhibidores de la calcineurina son los obtenidos en el estudio multicéntrico de suspensión de CsA en pacientes tratados durante 3 meses con CsA, sirolimús y esteroides (35). El grupo de enfermos en los que se suspendió la CsA presentaron mejor perfil de riesgo vascular, mejor función renal y mejor supervivencia del injerto que el grupo en el que se mantuvo la pauta CsA-sirolimús. Sin embargo, este estudio no permite generalizar la idea de la mayor eficacia y seguridad de la suspensión del anticalcineurínico por tres motivos fundamentales: 1) un 20% de enfermos nunca llegaron a la distribución aleatoria a suspender o mantener CsA, y precisamente este subgrupo está constituido por los enfermos de más edad, más rechazo, más función retardada, más donante cadáver, esto es, más parecidos al paciente trasplantado estándar en la mayor parte de unidades de trasplante en la actualidad, 2) la combinación de CsA a dosis plenas y sirolimús es nefrotóxica, y resulta lógico que la función renal mejore, e incluso la supervivencia sea mayor, al resolver esa nefrotoxicidad suspendiendo la CsA, sin que ello signifique que fuera mejor que el mantenimiento de una combinación menos nefrotóxica, como tacrolimús-micofenólico, 3) la tasa de abandonos del estudio es muy elevada (44% en el grupo de suspensión y 60% en el de mantenimiento de CsA) y cabe pensar que muchos de los abandonos del grupo de suspensión lo son por reintroducción de un inhibidor de la calcineurina y muchos de los abandonos del grupo de mantenimiento lo son por suspensión del inhibidor de la calcineurina, con lo que al final ambas ramas de tratamiento se han modificado profundamente y ya no tienen ningún poder estadístico para constatar diferencias relevantes. Son necesarios nuevos estudios de utilización de inhibidores de la calcineurina durante periodos cortos y posterior suspensión para demostrar

que esta estrategia es mejor que el mantenimiento de dosis bajas de tacrolimús y ácido micofenólico, y que al suspender el inhibidor de la calcineurina no aumenta la producción de aloanticuerpos específicos del donante o el desarrollo de rechazo agudo, clínico y subclínico.

Por consiguiente, aunque la hipótesis de que el desarrollo de pautas libres de inhibidores de la calcineurina es atractiva y teóricamente se acompañaría de mejores niveles de función del injerto renal, la realidad es que no se han conseguido generalizar por problemas de eficacia y seguridad.

De la presente revisión, pueden extraerse tres conclusiones fundamentales:

- 1) La suspensión de esteroides a los tres meses en pautas basadas en tacrolimús es una de las medidas más positivas para mejorar el perfil de riesgo cardiovascular tras un trasplante renal. Una inducción con anticuerpos anti-IL2r permite incluso prescindir de los esteroides.
- 2) Con los fármacos actualmente disponibles, una pauta sin anticalcineurínicos no es segura.
- 3) La pauta basada en dosis moderadas de tacrolimús con posterior minimización de éste y suspensión de los esteroides proporciona en la actualidad la inmunosupresión de mayor garantía a corto y medio plazo.

## Referencias

1. Meier Kriesche et al. Am J Transplant 2004.
2. Foley et al. Am J Kidney Dis 1998.
3. Levey et al. Kidney Int 2005.
4. Ojo AO. Transplantation 2006.
5. Marcen et al. Transplantation 2001.
6. Artz et al. Am J Transplant 2004.
7. Baid-Agarwal et al. Transplantation 2004.
8. Heisel et al. Am J transplant 2004.
9. Vincenti et al. Am J Transplant 2006 (Abstract).
10. Rostaing et al. Transplantation 2005.
11. Vanrenterghem et al. Am J Transplant 2005.
12. Pascual et al. Transplantation 2006.
13. Pascual et al. Cochrane Database Syst Rev 2006.
14. Groth et al. Transplantation 1999.
15. Kreis et al. Transplantation 2000.
16. Legendre et al. Transplant Proc 2003.
17. Teutonico et al. JASN 2005.
18. Araki et al. Transplantation 2006.
19. Van Akken et al. Kidney Int 2006.
20. Letavernier et al. CJASN 2007.
21. Eisen et al. New Engl J Med 2003.
22. Starling et al. Am J Transplant 2005 (Abstract).
23. Pascual, J. Nefrología 2005.
24. Campistol et al. JASN 2006.
25. Meier Kriesche et al. Transplantation 2003.
26. Fellstrom et al. Transplantation 2005.
27. Soveri et al. Nephrol Dial Transplant 2006.
28. Vincenti et al. Transplantation 2005.
29. Lucey et al. Am J Transplant 2005.
30. Flechner et al. Am J Transplant 2004.

31. Flechner et al. Am J Transplant 2006 (Abstract).
32. Larson et al. Am J Transplant 2006.
33. Ekberg et al. Am J Transplant 2006 (Abstract).
34. Cruzado et al. Am J Transplant 2007.
35. Oberbauer et al. Transplant Int 2005.

## Patients quality of life after renal transplantation

### H. Ekberg

*Department of Nephrology and Transplantation, Malmö University Hospital, Sweden*

Advances in transplantation procedures and immunosuppressive treatments have increased 1-year kidney graft survival rates to over 90%, according to for example the 2004 annual report of the US scientific registry for transplant recipients (1). This success means that maximizing health-related quality of life (HRQoL) is emerging as a primary focus for renal transplant patient care.

### Why does HRQoL of life matter?

- It gives an insight into the patient perspective of disease, which is traditionally overlooked.
- It drives consultation and health care utilization.
- It can differentiate between treatment options.
- Assessing quality of life also enables the cost-effectiveness of treatment to be expressed in a standardized way (cost/Quality Adjusted Life Year).

HRQoL is distinguished from quality of life as it specifically measures the impact of health status on a patient's ability to lead the life they wish for. Unlike general quality of life measures, HRQoL measures do not ask about non-health issues such as socioeconomic status.

Self-rated health has been found to be a better predictor of mortality than physician reports (2). How you measure quality of life depends on what you want to do with the results.

- *Generic measures* allow comparisons between different diseases and with the healthy population (e.g. the Short Form-36 general health questionnaire [SF-36]).
- *Disease-specific measures* are more sensitive to differences between treatment groups and change over time (e.g. the Gastrointestinal Quality of Life Index [GIQLI]).
- *Symptom scales* can assess the prevalence of a disease, and its association with risk factors and outcomes such as quality of life (e.g. the Gastrointestinal Symptom Rating Scale [GSRs]).

Instruments used in cross-sectional surveys are considered more reliable if they have been validated. This confirms that the questionnaire has internal consistency, known-groups validity and test-retest reliability.

A high response rate is necessary to minimize response bias (the risk that only certain sorts of subjects may return a questionnaire, e.g. those with symptoms). In studies with a low response rate, it is essential to provide some characteristics of non-responders, to show that the study results are representative of the source population as a whole. Typical recall periods range from 1 week to 1 year, and are better the shorter they are. A number of studies

have found that renal transplantation dramatically improves HRQoL for patients with end-stage renal disease (3-5). However, HRQoL is still not completely 'normalized' to that of the general population (6, 7). Two previous studies, in the USA and Japan, have found that HRQoL for renal transplant patients is most impaired in the SF-36 dimensions of general health and physical functioning.

Here, two recent studies will be presented. First, we have a study on quality of life initially after kidney transplantation (a sub-study within the ELiTE-Symphony study), and secondly, a study of the long-term effects after transplantation (a survey of the entire population of kidney recipients in the Nordic countries).

The main objectives of the Symphony-HRQoL sub-study were to evaluate the HRQoL of patients receiving a kidney transplant during the first year after transplantation and also to compare the HRQoL of patients with different kinds of immunosuppressive therapy (8).

The Symphony study is a randomized, open, international multicentre study with four parallel treatment arms (9). All centres in Spain participating in the Symphony study were invited also to participate in this sub-study. Patients received one of the following immunosuppressive regimens: (Group A-control) standard dose of cyclosporine, mycophenolate mofetil (MMF) and steroids; (Group B) daclizumab, low dose of cyclosporine, MMF and steroids; (Group C) daclizumab, low dose of tacrolimus, MMF and steroids; (Group D) daclizumab, low dose of sirolimus, MMF and steroids.

HRQoL was evaluated with the validated Spanish version of the SF-36 health survey. This is a generic HRQoL questionnaire which provides the scores in eight dimensions and two summary measures: Physical Component Summary-PCS and Mental Component Summary-MCS. Scores in all dimensions and summary measures were standardized by age and gender using Spanish Normative Values of the questionnaire. A dimension score between 45 and 55 is similar to that of the general population with the same age and gender; above 55 is better and below 45 is worse. Patients' HRQoL was evaluated at 1 (base-line), 3, 6 and 12 months after transplantation. Data on age, gender and acute rejection episodes were also collected.

A preliminary analysis was performed with 126 patients, 73 males (58%) and 56 females (42%), with a mean age of 49.22 ( $\pm 12.1$ ) years. Twenty-four patients had an acute rejection episode. There were no significant differences between treatment groups in age, gender or episodes of acute rejection (A - 20%; B - 15.8%; C - 10%; D - 21.1%).

PCS score of all patients improved significantly during the one year of follow-up ( $p=0.003$ ), but MCS score did not. There were no significant differences in any SF-36 standardized scores between the four treatment groups. Patients with acute rejection showed worse MCS score at 6 months of follow-up ( $p<0.03$ ).

In conclusion of this study, all patients receiving a kidney allograft showed a significant improvement, during the first year of follow-up in the physical area of the HRQoL, but not in the mental area, which, on the other hand, was not deteriorated at start of follow-up. Significant differences on HRQoL were not identified between the four treatment groups in the study.

Immunosuppressive therapies have been associated with gastrointestinal (GI) side-effects which may impair HRQoL. In the following study (10), the aim was to assess GI symptoms, HRQoL and the association of GI symptoms with immunosuppressive treatments in a large section of the Nordic renal transplant population.

A total of 6067 renal transplant recipients from Sweden, Denmark, Norway and Finland were asked to complete the SF-36 questionnaire and the GSRS. A maximum recall period of 4 weeks was used. SF-36 scores were compared with country norm values, and  $\geq 5$  point differences in each dimension considered clinically meaningful. GSRS scores were compared with the prevalence of GI symptoms in the general population from previously published studies. Logistic regression analysis was used to identify immunosuppressants associated with GI symptoms.

The questionnaires were completed by 4232 patients, giving a response rate of 70%. The prevalence of troublesome GI symptoms (GSRS  $>1$ ) was 83% for indigestion, 69% for abdominal pain, 58% for constipation, 53% for diarrhoea, 47% for reflux and 92% for any GI symptom. Compared with the general population, HRQoL was most commonly meaningfully impaired in the dimensions of general health (53% of patients), vitality (44%) and bodily pain (43%). The presence and severity of GI symptoms was associated with worse HRQoL. Tacrolimus showed a significant association with diarrhoea (OR: 1.7; 95% CI: 1.4-2.0) and constipation (OR: 1.3; 95% CI: 1.1-1.6); sirolimus was associated with indigestion (OR: 2.9; 95% CI: 1.0-8.1) and abdominal pain (OR: 2.2; 95%



CI: 1.1–4.4); and prednisolone was associated with indigestion (OR: 1.3; 95% CI: 1.0–1.6) and constipation (OR: 1.3; 95% CI: 1.1–4.4).

The survey indicates that there is a high prevalence of GI symptoms among renal transplant recipients, with most patients being troubled by diarrhoea, indigestion, constipation, abdominal pain or reflux. Several commonly prescribed immunosuppressants are associated with an increased likelihood of GI symptoms.

HRQoL is impaired in renal transplant recipients compared with the general population, particularly in the SF-36 dimension of general health, in agreement with previous studies. It was also found that renal transplant recipients commonly had impaired HRQoL in the SF-36 dimensions of vitality and bodily pain.

Interestingly, HRQoL was least impaired among renal transplant recipients in the mental health SF-36 dimensions of role-emotional, social functioning and mental health. For these dimensions, more patients had a meaningfully increased quality of life than had a meaningfully decreased quality of life compared with the general population.

One could speculate that in physical terms, renal transplant patients often have impaired HRQoL, probably due to their immunosuppressive treatments, and perhaps because these treatments lead to GI symptoms. In contrast, their higher scores in the mental health dimensions compared with the general population may suggest that these patients feel happier and able to function well socially because they appreciate the difference transplantation has made to their lives.

The Nordic survey has implications for clinical practice. Managing GI symptoms by careful choice of immunosuppressants should be a focus for improving HRQoL in renal transplant patients. On the other hand, the so-called DIDACT study (11), a thoroughly carried-out study on post-transplant diarrhea, showed that approximately 50% of patients may experience resolution of their diarrhea without the need of changes in immunosuppressive therapy. The investigators concluded that treatments such as stopping of diarrhea-causing concomitant drugs, administration of anti-infectives and changes in diet and lifestyle should be considered before any changes in immunosuppression are performed.

In conclusion, GI symptoms are more prevalent in the post-renal transplant population than in the general population and are associated with impaired HRQoL. Several commonly used immunosuppressive drugs may be associated with GI symptoms, and these problems, affecting the HRQoL, tend to be underestimated by physicians in general, partly because patients often do not volunteer this information. Therefore, careful questioning by physicians is required, to help them to choose the best treatment for each individual patient.

## References

1. Scientific Registry for Transplant Recipients Annual Report, US Department of Health (2004), [www.ustransplant.org](http://www.ustransplant.org)
2. Heistaro et al. *J Epidemiol Community Health* 2001; 55: 227-232.
3. Jofre et al. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: 93-100.
4. Franke et al. *Qual Life Res* 2003; 12:103-115.
5. Hathaway et al. *Clin Transplant* 1998; 12: 168-174.
6. Matas et al. *Clin Transplant* 1998; 12: 233-242.
7. Tsuji-Hayashi et al. *Transplantation* 1999; 68: 1331-1335.
8. Oppenheimer et al. *ASN* 2006, abstract #TH-PO566.
9. Ekberg et al. *Am J Transpl* 2006; 6(Suppl. 2), abstract #49; 83.
10. Ekberg et al. *Transplantation* 2007; 83(3): 282-289.
11. Maes et al. *Am J Transpl* 2006; 6: 1466-1472.



# Chronic allograft nephropathy: From renal function to urinomics

**H. de Fijter**

*Leiden University Medical Center, Department of Nephrology, Leiden, The Netherlands.*

## Introduction

Impaired renal function has become increasingly recognized as an independent and dominant risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in the general population as well as transplant recipients. Chronic allograft nephropathy (CAN) is the most prevalent cause of renal graft failure in studies that censored for patient death. The burden of chronic kidney disease in renal transplant recipients is estimated as high as 75% of patients having an estimated GFR (MDRD equation) less than 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>.

Chronic allograft nephropathy is a descriptive term for histologic lesions in a renal allograft and includes atherosclerosis, glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and tubular atrophy. Clinically, chronic allograft nephropathy can lead to chronic transplant dysfunction, characterized by a decline in function and the development of proteinuria. The lesions of chronic allograft nephropathy can originate from various causes and the differential diagnosis includes chiefly recurrent and de novo glomerulonephritis, chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity, and a group of lesions of unknown origin called chronic rejection. The diagnosis of chronic rejection is verified by histology: the presence of glomerular and/or vascular lesions against a background of interstitial fibrosis and tubular atrophy. Before establishing the diagnosis other known causes have to be ruled out. Immunofluorescence and electron microscopy are useful tools in addition to histology to establish the diagnosis.

## Pathogenesis

The pathogenesis of chronic allograft nephropathy is multifactorial and comprehends progression factors that are alloantigen-independent as well as alloantigen-dependent factors that are crucial for the development of chronic allograft nephropathy. Transplant vasculopathy is characterized by intimal proliferation and can ultimately result in luminal occlusion, antibodies reactive with endothelial cell antigens and HLA antigens are thought to be involved. Transplant glomerulopathy is characterized by duplications of the glomerular basement membrane, and antibodies reactive with GBM antigens may be involved in the development of these lesions. Both glomerulopathy and vasculopathy are frequently found in a background of interstitial fibrosis and tubular atrophy.

Recently CAN has been redefined by the presence and severity of interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF & TA). These background lesions are less well understood and renal function is an inadequate measure of ongoing tissue injury either as a result of ongoing rejection or early interstitial CNI toxicity, but quantitative histomorphometry using Sirius red at 6 months has been shown to correlate strongly with GFR in patients with established CAN and time to graft failure (1, 2). Most of the progression factors, including donor age, seem responsible for the development of these lesions. Risk factor analysis for chronic allograft nephropathy in the absence of glomerular or vascular lesion revealed young recipient age, sensitization, and late acute rejection episodes, suggesting the alloantigen-dependent responses also play a role in this entity. Protocol biopsies obtained 2 years after transplantation have documented (3) signs of CAN, dominated by interstitial fibrosis and tubular atrophy, in the majority of the CNI-treated patients, which occurred in the absence of subclinical acute rejection or discernible changes in renal function. Recently, a similar incidence and severity of interstitial fibrosis in early surveillance biopsies from living- and deceased-donor kidneys was found, challenging the impact of injury related to brain death and/or prolonged preservation (4). Tubular atrophy and interstitial fibrosis that develops early after transplantation is most likely the consequence of the summated effects of tissue injury from acute rejection, and/or, given the initial higher dosing, early (chronic) CNI nephrotoxicity, in which obliteration of peritubular capillaries may have an important role. At least 4 different forms of CAN (defined by the presence of IF & TA) can be identified: CAN with vasculopathy, CAN

with chronic Transplant Glomerulopathy, CAN with calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity and CAN with superimposed subclinical acute rejection (SAR).

## CAN with CNI-related nephrotoxicity

Results from studies that focus on optimal therapeutic index of CNI depend on the drug monitoring strategy that is used and especially the target ranges of drug levels that are accepted. Trough levels of both CsA and tacrolimus are not closely correlated with drug exposure, the risk for allograft rejection, or their adverse effects. The  $AUC_{0-12h}$  and derived parameters, such as absorption profiles, have been shown to correlate more closely with clinical outcome. We developed a population-based model with limited sampling and Bayesian estimation to standardize systemic drug exposure for calcineurin inhibitors after renal transplantation (5,6). We applied these Bayesian estimators to compare an exposure-controlled dosing strategy to prevent structural changes, quantified by morphometric analysis of nonpolarized Sirius red staining of 6- and 12-mo protocol biopsies. We found no difference in the profibrogenic effect as measured by Sirius red staining of either of the currently available CNI in biopsies that were obtained 6 and 12 mo after renal transplantation (7). At the molecular level, no differences were found in the extent of protein deposition of TGF- $\beta$  and interstitial collagens, as well as cortical mRNA levels of TGF- $\beta$  and collagens  $\alpha 1(I)$  and  $\alpha 1(III)$  (8). Six months after implantation, no significant differences were found in the extent of protein deposition as well as cortical mRNA levels of TGF- $\beta$  in cyclosporine or tacrolimus treated patients. TGF- $\beta$  expression in 6-month biopsies was however significantly increased as compared to pre-transplant values with a wide variability within both treatment groups. Laminin  $\beta 2$  and TGF- $\beta$  mRNA levels in the renal cortex, have been shown to distinguishing chronic CNI toxicity from chronic rejection with high sensitivity and specificity (9).

## CAN with superimposed SAR

SAR in protocol biopsies that were performed as early as 14 days after living-donor transplantation most likely represents a donor-specific immune response as it correlates with HLA-DR mismatching (10,11). Newer drug regimens significantly reduced the incidence of both early and late clinical acute rejection, but the prevalence of SAR remained essentially unchanged (12). Untreated borderline infiltrates in clinical biopsies that were performed 2 to 3 months after transplantation tended to persist, but the majority (72%) did not progress to clinical acute rejection within the next month (13). A relevant proportion of patients with SAR in earlier protocol biopsies ( $\leq 3$  months) may therefore benefit from additional treatment or a modification of their immunosuppressive regimen as suggested by the work of Rush *et al.* (14). Treatment of early SAR up to month 3 resulted in a three-fold decreased incidence of late (beyond month 6) clinical acute rejection (9). Evaluation of serial protocol biopsies that were taken from the first year in the subgroup of pediatric transplant recipients with established CAN revealed that the superimposition of recurrent or persistent SAR but not borderline changes was associated with histologic progression and subsequent functional deterioration. Development of CAN at 1 year was strongly associated with a previous late clinical acute rejection (15). By design we did not treat SAR in 6 month protocol biopsies (16). Under controlled systemic exposure and subsequent tapering, graft fibrosis accompanied by SAR in the same biopsy at 6 months was not associated with progressive damage or functional impairment. In contrast to previous studies, we observed no late clinical acute rejection, and the AUC method makes inadequate immunosuppression an unlikely cause of ongoing rejection. The strong correlation between late acute rejection and chronic rejection as well as late graft loss has been reported consistently (17, 18). It remains, however, controversial whether SAR, borderline changes, or even inflammation, generally not qualifying for borderline rejection, result in different functional prognosis with longer times of follow-up (19). In our study, under controlled systemic exposure and tapering of either CsA or tacrolimus, early acute rejection rates were low and no late acute rejection occurred, indicating that individualized CNI exposure may be at least as effective in the prevention of late clinical acute rejection as treating early SAR with high-dosage steroids (16).

## Conclusion

We clearly lack a reliable metric at the time of biopsy to decide whether additional treatment is beneficial, because there is no doubt that extra boluses of steroids or recycling of the steroid taper add significantly to posttransplantation morbidity. Minimization or, preferably, elimination of CNI nephrotoxicity, an important determinant for late or progressive deterioration of graft function in a substantial proportion of renal allograft recipients appears to be a key decision to potentially modify long-term outcome (20, 21). At present, we lack a reliable metric to decide whether asymptomatic interstitial infiltrates represent ongoing rejection or the exponent of a regulatory response that is self-limiting, is not harmful to the graft, and does not need drug adjustments. Although strategies involving systems biology with transcripts, proteomics and metabolomics are still in their discovery phase, these innovative methods hold the promise to provide relevant biomarkers at the tissue level or in biological fluids. Since biochemical urinary fingerprints are closest to the phenotype, the urinomics approach is the next challenge to optimize clinical immunosuppression and prevent functional deterioration.

## References

1. Grimm, P.C., Nickerson, P., Gough, J. et al. *Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function.* J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1662-1668.
2. Díaz Encarnación, M.M., Griffin, M.D. et al. *Correlation of quantitative digital image analysis with the glomerular filtration rate in chronic allograft nephropathy.* Am J Transplant 2004; 4: 248-256.
3. Solez, K., Vincenti, F., Filo, R.S. *Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a US multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: A report of the FK506 Kidney Transplant Study Group.* Transplantation 1998; 66: 1736-1740.
4. Cosio, F.G., Grande, J.P., Larson, T.S. et al. *Kidney allograft fibrosis and atrophy early after living donor transplantation.* Am J Transplant 2005; 5: 1130-1136.
5. Scholten, E.M., Cremers, S.C., Schoemaker, R.C. et al. *AUC-guided dosing of tacrolimus prevents progressive systemic overexposure in renal transplant recipients.* Kidney Int 2005; 67: 2440-2447.
6. Cremers, S.C., Scholten, E.M., Schoemaker, R.C. et al. *A compartmental pharmacokinetic model of cyclosporin and its predictive performance after Bayesian estimation in kidney and simultaneous pancreas-kidney transplant recipients.* Nephrol Dial Transplant 2003; 18: 1201-1208.
7. Rowshani, A.T., Scholten, E.M., Bemelman, F. et al. *No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year.* J Am Soc Nephrol 2006; 17: 305-312.
8. Roos-van Groningen, M.C., Scholten, E.M., Lelieveld, P.M. et al. *Molecular comparison of calcineurin inhibitor-induced fibrogenic responses in protocol renal transplant biopsies.* J Am Soc Nephrol 2006; 17: 881-888.
9. Koop, K., Bakker, R.C., Eikmans, M. et al. *Differentiation between chronic rejection and chronic cyclosporine toxicity by analysis of renal cortical mRNA.* Kidney Int 2004; 66: 2038-2046.
10. Shapiro, R., Randhawa, P., Jordan, M.L. et al. *An analysis of early renal transplant protocol biopsies: The high incidence of subclinical tubulitis.* Am J Transplant 2001; 1: 47-50.
11. Choi, B.S., Shin, M.J., Shin, S.J. et al. *Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: Ten-year experience at a single center.* Am J Transplant 2005; 5: 1354-1360.
12. Nickerson, P., Jeffery, J., Gough, J. et al. *Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: A pilot study.* J Am Soc Nephrol 1999; 10: 1801-1805.
13. Meehan, S.M., Siegel, C.T., Aronson, A.J. et al. *The relationship of untreated borderline infiltrates by the Banff criteria to acute rejection in renal allograft biopsies.* J Am Soc Nephrol 1999; 10: 1806-1814.
14. Rush, D., Nickerson, P., Gough, J. et al. *Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: A randomized study.* J Am Soc Nephrol 1998; 9: 2129-2134.

15. Shishido, S., Asanuma, H., Nakai, H. et al. *The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy.* J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1046-1052.
16. Scholten, E.M., Rowshani, A.T., Serge Cremers, S. et al. *Untreated rejection in 6-month protocol biopsies is not associated with fibrosis in serial biopsies or with loss of graft function.* J Am Soc Nephrol 2006; 17: 2622-2632.
17. Nankivell, B.J., Fenton-Lee, C.A., Kuypers, D.R. et al. *Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome.* Transplantation 2001; 71: 515-523.
18. Sijpkens, Y.W., Doxiadis, I.I., Mallat, M.J. et al. *Early versus late acute rejection episodes in renal transplantation.* Transplantation 2003; 75: 204-208.
19. Moreso, F., López, M., Vallejos, A. et al. *Serial protocol biopsies to quantify the progression of chronic transplant nephropathy in stable renal allografts.* Am J Transplant 2001; 1: 82-88.
20. Bakker, R.C., Hollander, A.A., Mallat, M.J. et al. *Conversion from cyclosporine to azathioprine at three months reduces the incidence of chronic allograft nephropathy.* Kidney Int 2003; 64: 1027-1034.
21. Gallagher, M.P., Hall, B., Craig, J. et al. *A randomized controlled trial of cyclosporine withdrawal in renal-transplant recipients: 15-year results.* Transplantation 2004; 78: 1653-1660.

## INMUNOSUPRESORES BIOLÓGICOS

### Role of polyclonal T lymphocyte antibodies in renal transplantation

**Y. Lebranchu**

*University François Rabelais, Tours, France.*

Polyclonal antibodies have been widely used in renal transplantation for many years in order to prevent and treat acute cellular rejection. Polyclonal anti-lymphocyte antibodies are the IgG fraction of sera from rabbits or horses immunized with human thymocytes or T cell lines. They are distinguished by the immunizing cells and by the animal in which they are produced. Polyclonal antibodies target a broad range of T cell surface antigens but also contain antibodies against NK cells, against B cells such as CD 20 antibodies and against leukocyte adhesion molecules and chemokine receptors.

The immunosuppressive activity of anti-thymocyte globulins (ATG) results primarily from the depletion of T lymphocytes. ATG induce rapid and profound depletion of blood CD3 T lymphocytes and profound long-term changes, counts increasing slowly between the first month and the third year post transplantation. T cell depletion is dose-dependent in blood, and T cell subsets are significantly smaller with 1.5 mg/Kg/day compared to 1 mg/Kg/day. Similar dose-dependent depletion occurs in the spleen and the lymph nodes and is associated with cell death, as shown by the percentages of annexin V positive cells and the occurrence of DNA breaks revealed by TUNEL analysis.

ATG are therefore widely used in the prevention and treatment of acute cellular rejection and are now very popular in the U.S., as shown by American practice in kidney transplantation over the last few years, with an increasing use of depleting ATG. Anti-lymphocyte antibodies were shown in the nineties to improve cadaveric kidney allograft survival compared to conventional immunosuppression with an odds ratio of graft failure of 0.66 at two years in Szezech's metaanalysis, indicating a beneficial effect on allograft survival. However this metaanalysis was published ten years ago and the question has re-arisen with the new immunosuppressive agents. Effective response was clearly demonstrated by a European study including 555 patients conducted by B. Charpentier comparing three arms with and without ATG. In patients receiving triple therapy with tacrolimus the acute rejection rate was significantly lower with ATG than that of patients without ATG (15% versus 25%). Similar results have been reported by G. Mourad in 309 patients, with an incidence of acute rejection of 15% versus 30%. Therefore, in terms of efficacy, ATG decreased the rate of acute rejection in comparison with conventional triple therapy. Nevertheless the use of depleting antibodies was associated with an increased incidence of CMV infection in the absence of prophylaxis, compared to anti IL-2R antibodies, and an increased incidence of PTLD but not of cancer in the U.S. Registry (USRTR), with a relative risk of 1.78. In summary, rejection is rare with ATG and CNI can be delayed. In contrast there is an increased incidence of CMV and PTLD in the absence of prophylaxis.

Thus the question is whether to use ATG for all patients, or for subsets of patients with increased risk of rejection. We compared ATG and Simulect combined with triple therapy in patients with low immunological risks. The incidence of acute rejection was similar. Graft and patient survival was similar at one year and at five years. Renal function was similar at one year and at five years. ATG does not therefore seem to be always necessary in combination with triple therapy for low immunological risk patients. However, in 278 patients with high risk of acute rejection or DGF, randomized to receive either ATG or basiliximab, D. Brennan demonstrated a reduced incidence of acute rejection (15.6% versus 25.5%). Similar results will be reported at the next ATC meeting by M. Hazzan, who conducted the TAXI Trial comparing ATG and daclizumab in patients with high immunological risk and showed a significant reduction in incidence of acute rejection at one year with ATG. ATG thus reduces the inci-



dence of acute rejection in patients with high immunological risks. As ATG contains antibodies against adhesion molecules, preoperative use of ATG has been investigated in order to reduce leukocyte adhesion to endothelium and to avoid ischemia reperfusion injury. A short study reported by Googins showed significant decrease in DGF, improved early allograft function and decreased length of hospitalization in patients receiving preoperative ATG.

Moreover ATG can be used for patients to avoid certain immunosuppressive agents. Steroid withdrawal or avoidance is currently very popular and with F. Oppenheimer and Y. Van Rentherghem we reported the first study showing the importance of ATG in steroid sparing. In this study, we compared the incidence of rejection in patients receiving classical triple therapy with Neoral, MMF and steroids to patients receiving half the dosage of steroids for three months and withdrawal at three months. Five hundred patients were included in this study. The incidence of acute rejection was increased in the low dose-withdrawal group in patients who did not receive induction therapy with ATG. In contrast, the incidence was similar in patients receiving ATG, with a very low incidence of acute rejection after steroid withdrawal.

The influence of ATG has also been investigated in CNI avoidance regimens because the results of large randomized trials using induction with anti IL-2 receptor antibodies have been disappointing. The Symphony Study showed an increased incidence of acute rejection, with 37% in the sirolimus arm, in comparison with the cyclosporin and the tacrolimus arms. We therefore investigated the de novo combination of MMF and m-TOR inhibitors with a more powerful induction agent, i.e. thymoglobulin. One hundred fifty patients were randomized to receive either sirolimus or Neoral at transplantation. Both groups received thymoglobulin for 5 days, and Cellcept and steroids which were withdrawn at 6 months. Patient and graft survival were excellent at twelve months and steroids were withdrawn in more than 80% in both groups. The incidence of BPAR was low and similar in terms of severity. GFR, the primary end point, was better in the sirolimus group, with a difference of 8 ml/min as early as two months after grafting. This remained significant throughout the study, and at 12 months the percentage of patients with good renal function reached more than 70% in the sirolimus group. Similar results for tacrolimus avoidance with ATG have been reported by T. Larson. Thus CNI avoidance and steroid withdrawal is possible with ATG, the majority of patients receiving bitherapy with sirolimus and MMF at 12 months with good renal function.

Finally, T cell depletion with ATG could perhaps be used to induce tolerance because very exciting results have recently been reported by M. Lopez. In vitro ATG causes rapid and sustained expansion of CD4+ CD25+ T cells when cultured with human PBL. These cells have enhanced expression of markers of regulatory T cells (T Regs) such as GITR, CTLA4 and Fox P3 and suppress a direct allo-immune response. Thus, ATG is a good inducer of human T Regs in vitro. This may be valuable in transplantation in the future in order to design studies to induce tolerance since CD4+ T Regs are spared from deletion in mice by anti lymphocyte serum.

## Alemtuzumab in immunosuppressive therapy following renal transplantation

**M. Zilvetti, A. Sutherland, P. Trzonkowski, K. Wood and P.J. Friend**

*Nuffield Department of Surgery, University of Oxford, United Kingdom.*

The results following renal transplantation have improved significantly in recent years due to improvement in surgical techniques, treatment and prevention of complications and new drugs to prevent rejection.

The history of renal transplantation as in any other solid organ has seen how the priorities to improve the outcome changed. The surgical challenges of implanting an organ were overcome with new techniques to the point where nowadays even a donor nephrectomy in a living donor is considered a safe procedure.



The follow up of renal transplant patients has also seen a major change. Treatment of complications, prevention of infections as well as correction of side effects such as hyperlipidemia and hypertension has prolonged both graft and patient survival in the short and mid term.

New immunosuppressive drugs have been developed and possibly are the single most important factor in the success of solid organ transplantation. The potency of these drugs has clearly reduced the incidence of acute rejection to levels which were unthinkable a few decades ago.

However, despite the improvements in all these areas, there is hardly a change in outcome in the long term. Chronic allograft nephropathy (CAN) is considered the first cause of graft loss after the first year post transplant. Death with a functioning graft comes second in the list.

We have achieved an acceptable outcome at one year. Is it possible then to obtain similar results in the long term?

New strategies are being developed to improve results in the long term. Chapman et al have shown the progression of CAN can be tracked as far as three months post transplant. In other words, the correctable factors in order to minimise the incidence of CAN should be addressed from early stages in the post transplant period. One of these factors is the immunosuppressant regime both in the immediate post transplant period and the maintenance.

Calcineurin inhibitors (CNI) have shown to be responsible for part of these events which take place in the kidney following transplantation. The effect of tacrolimus seemed to compensate partially the well known nephrotoxicity of CyA.

In order to reduce even further the exposure to tacrolimus, CNI sparing and withdrawal protocols have been designed with variable results. Overall they have shown that it is possible to avoid the use of CNI and that conversion to CNI free maintenance immunosuppression is possible and achievable.

Monoclonal and polyclonal antibodies have emerged in recent times as powerful drugs which may enable new strategies in immunosuppression following organ transplantation. ATG and OKT3 as well as anti IL2 antibodies are examples of these agents.

Alemtuzumab, commonly known as CAMPATH 1H, has already a long history in terms of its development. However, its application in transplantation is quite recent.

CAMPATH 1 H was developed in Cambridge (CAMbridge PATHology). The first two molecules were murine based antibodies: CAMPATH 1M and CAMPATH 1G. The humanised form is what is now known as CAMPATH 1H. Initially it was designed to treat conditions such as GvHd in bone marrow transplantation. From there its use was extended to B cell leukaemia (refractory to conventional therapy), autoimmune diseases, and recently clinical trials are assessing its effectiveness in multiple sclerosis.

The effect of CAMPATH is on cells which express the surface antigen CD 52. These include lymphocytes T and B, monocytes, macrophages and other cells involved in immune response. However, the major effect is over T cells followed by B lymphocytes.

Sir Roy Calne and his group in Cambridge were the first to study its use in renal transplantation. The previous molecule, CAMPATH 1G, had been used in treating refractory steroid resistant rejection with success. The hypothesis formulated in order to justify its use was that the use of a powerful depleting agent should enable the immune system to reset and would allow the new lymphocytes developed in this "new" environment to induce a form of tolerance.

The five years report of this study was published recently by Watson et al. Their protocol consisted in Campath 1H induction followed by low dose Cyclosporin. Its twelve month report showed an incidence of rejection of 30 %. However, graft and patient survival were excellent. At five years, the results showed no significant improvement in terms of graft function compared to a historic control group. The possibility of reducing the load of immunosuppression in the long term is raised. The most obvious explanation to the lack of improvement in renal function might be the use of cyclosporine.

From this initial study, the use of Campath has risen, especially in the USA. Taken from the UNOS database, Campath induction has increased steadily in the last 3 years. Most of the studies conducted, however, are small and show the attempt of establishing the real role of Campath within the other alternatives.

Kirk et al published two small studies where Campath was used as induction in two small groups of renal transplant recipients, both including recipients of living donors. In the first one (n=7) no maintenance immunosuppression was given post transplant. The incidence of rejection was 100 % but all of them responded to rescue therapies and were able to continue on either sirolimus (n=6) monotherapy or sirolimus + prednisolone (n=1). From this

study, it was raised the possibility of monocytes and/or macrophages as responsible for the majority of the rejection episodes. In a second cohort of 5 patients, deoxyspergualin was given for 14 days post transplant in an attempt to reduce the capacity of these cells to induce rejection. All the patients experienced rejection but again rescue therapy was effective.

The University of Wisconsin with Stuart Knechtle, have also been interested in the use of Campath 1 H in renal transplant. A report which included 126 patients showed a decreased incidence of acute rejection and no increased risk of infections and or malignancy.

The results of a pilot study at three years were presented last year by Knechtle. In this study, 29 patients had received induction with Campath and sirolimus monotherapy post transplant. The incidence of rejection had been high, close to 30%. However, the graft and patient survival were 96 and 100% respectively and 57% were on monotherapy at three years. In his conclusions, a course of CNI in the early stages was recommended.

Ciancio et al conducted another study comparing different induction agents: thymoglobulin, Campath and daclizumab. The results showed a similar incidence of rejection and infectious complications. The Campath group, where the dose of tacrolimus was reduced compared to the other two groups and was steroid free, showed possibly a better renal function but not statistically significant. However, in this group, 80 % were steroid free at 15 months.

Kaufman et al also assessed the effectiveness of Campath compared to basiliximab in a protocol where tacrolimus was again used in combination with MMF. The results showed acceptable rejection rates and low incidence of infections and malignancy.

Shapiro et al went a bit further. In their study of over 200 patients, tacrolimus monotherapy was used following induction with Campath. The rejection rate was less than 7 % with patient and graft survival similar to control historic control.

All these studies show the different strategies in designing Campath based protocols. In Oxford, taking some of these experiences into account, we conducted an initial pilot study where Campath was administered on days 0 and 1 followed by sirolimus and MMF. The results of a group of 22 patients (7 from Oxford) were presented by Stuart Flechner in 2005. In this group of patients, the incidence of rejection was over 36% and most importantly, the incidence of drug side effects was unacceptably high. However, graft and patient survival was 86 and 95% respectively and almost 95% were steroid free and almost 76% were CNI free at 16 months. The combination of Campath with sirolimus and MMF was proven to be too powerful to be used safely and a course of CNI was again recommended.

In a second study, Campath induction was followed by a period of CNI with MMF for six months. At this point, tacrolimus was discontinued and sirolimus commenced at low dose. During the first twelve months, MMF was administered at reduced dose. The ultimate goal was to switch to sirolimus monotherapy at twelve months.

Thirty patients were recruited, with the same number of heart beating and non-heart beating donors. Outcome measures included renal function (serum creatinine and calculated creatinine clearance), incidence of infections, malignancy and rejection.

Follow up was up to eighteen months. Six patients had to be withdrawn from the study. Two patients died. Twenty six patients were switched from tacrolimus to sirolimus at 6 months and 23 reached the twelve months mark where MMF was initially discontinued.

Renal function was optimal at eighteen months. Graft function is 100%, steroid free was achieved in over 95% of patients, and 86% were exposed to CNI for 6 months.

At eighteen months the incidence of rejection showed a different pattern depending on the different time points. In the first six months, two patients experienced three episodes of rejection. Between month 6 and 12, where immunosuppression included sirolimus and MMF, there were no rejection episodes. Finally, 23 patients reached twelve months. The first 18 had MMF stopped. However, three patients experienced acute rejection. The remaining 5 patients had MMF reduced to half dose in view of the rejection rate at this time point, with no further episodes of rejection.

Infections complications were not increased using this regime compared to the standard.

In terms of malignancy, two patients developed post transplant lymphoproliferative disease confirmed by histology. A third patient, with a background of primary lymphoma 5 years prior to his transplant, developed a recurrence.

The incidence of PTLD in Campath renal recipients has been reported as 0.4%. (UNOS database). It has not shown any increased risk in patients receiving induction with Campath compared to other agents (anti-IL2, ATG).

Fourteen patients of this small cohort were studied in more detail by K. Wood's group in the Nuffield Department of Surgery. Studies of the lymphocyte subpopulations, sensitivities to immunosuppression and kinetics in repopulation of the different cell groups were reported by Trzonkowski. Their results confirmed, amongst other conclusions, the need to include CNI in the immediate post transplant period and the role of maintenance immunosuppression even at reduced dose in the long term.

We concluded that this protocol allows minimal exposure to CNI and a steroid free regime at twelve months. The ultimate effect on long term graft and patient survival is still to be assessed.

The incidence of PTLD has to be taken into consideration and probably indicates that in certain recipients the use of Campath might not be indicated, i.e. elderly recipients.

As several authors have already pointed out, a randomised controlled trial is required to assess the effectiveness of Campath based immunosuppression protocols compared with the best available. In the United Kingdom, Oxford is currently setting a multicenter trial that will address this and other issues as regards the use of Campath in renal transplantation.

## TRASPLANTE DE CÉLULAS CARDIACAS

### Neoangiogenesis with endotelial precursors for the treatment of ischemia

**P. Sepúlveda, J. Martínez-León and J.M. García-Verdugo**

*Fundación Hospital General Universitario de Valencia, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Spain.*

The development of the vascular system is driven by two mechanisms, vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis is defined by de novo vessel formation from mesodermal undifferentiated precursors. Angiogenesis consisted on a cellular process by which already formed vessels produce ramifications and they invade tissues in answer to normal or pathological stimuli. It was thought that vasculogenesis and angiogenesis coexisted in the embryo while angiogenesis was the only mechanism of vascular development present in the mature organism. However, recent findings suggest the existence of vasculogenesis in the adult.

In the embryo, blood vessels and hematopoietic cells arise from the hemangioblast, a common precursor cell. Compelling evidence suggests that bone marrow from adults contains endothelial cell precursors (EPC), similar to embryonic hemangioblasts, able to increase neovascularization of tissue after ischemia. In addition to hematopoietic EPC, other sources and types of EPC also capable to differentiate to the endothelial lineage exist not only in the BM, like the mesenchymal stem cells, multipotent adult progenitor cells (MAPC) and side population cells, but also in the peripheral blood (PB) and in multiple tissues, named circulating endothelial precursors (CEP) and tissue resident stem cells (TRSC).

Many evidences suggest that tissue injury involve the recruitment of circulating or resident stem cell populations that complement neoangiogenesis supported by pre-existing endothelium, leading to organ revascularization. Hypoxic inducible factors (HIF) are transcription factors that activate pathways with the ability to increase oxygen supply and promote adaptative response to stress. Between the multiple targets of HIF genes are the VEGF, erythropoietin, angiopoietin, placental growth factor and platelet-derived growth factor, indicating that HIF-1 functions as a master regulator of angiogenesis in ischemic tissues. One of the main factors involved in the recruitment in response to ischemia is the VEGF, and increased expression of this growth factor after either vascular injury or exogenous delivery recruits EPC. In addition, in humans, cells expressing the CXCR4 are EPC of both hematopoietic and non-hematopoietic origin. The later population has been proved to express tissue specific markers (TCSC) with the ability to migrate to the sites of injury.

Several proangiogenic growth factors such as SDF-1, angiopoietin-1, placental growth factor and erythropoietin, are able to augment EPC levels and improve neovascularization. Increased levels of SDF-1 by intramyocardial injection of syngeneic cardiac fibroblasts stably transfected to express SDF-1 induced homing of CD117-positive cells to injured myocardium. Inducing VEGF expression in the adult rat heart or liver induced a massive infiltration of circulating cells including CEP. Estrogens mobilizes BM derived EPC and contributes to reendothelialization after arterial injury. Other types of EPC mobilization like physical training or treatment with HMG CoA reductase inhibitors have been also described. However, such functional improvements are not entirely due to EPC mobilization but also to direct proangiogenic or antiapoptotic effects.

Regarding the therapeutic angiogenesis induced with EPC it was published several years ago the usefulness of ex vivo expanded EPC in the treatment of ischemic diseases. Transplantation of this population to athymic nude rats with hindlimb ischemia resulted in a blood flow recovery and increase in capillary density in the ischemic hindlimb. Other authors demonstrated the benefits of the more primitive EPC population, the CD34+ fraction, to treat ischemia. In addition, the authors demonstrated that injection of CD34+ cells with phenotypic features of mature endothelium was not sufficient for the induction of neoangiogenesis and proposed that the injection of a fraction containing angioblast activity was required. More recently, it has been demonstrated that the ability of

CD34+ cells to repair infarcted myocardium is mediated by concurrent mechanisms of vasculogenesis and cardiomyogenesis. This work is in agreement with *in vitro* studies showing the ability of CD34+ cells to transdifferentiate into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells and differs from those postulating the lack of transdifferentiation of EPC to other non-hematopoietic phenotypes.

As mentioned above, transplantation of EPCs either derived from BM or peripheral blood in rodent animal models of ischemia (hind limb, myocardial infarction, etc) augmented the number of vessels and angiogenesis leading to an improvement in blood flow and tissue performance. Encouraged by these results, several clinical trials were developed. Initial results point to the feasibility and safety of autologous EPC transplantation. Transplantation of *ex vivo* expanded EPC improved coronary flow reserve and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). Other studies performed with autologous total BM mononuclear fraction (BM-MNC) showed an improved myocardial perfusion and modulated heart rate variability in patients with myocardial infarction. Transplantation of autologous BM-MNC was also performed to treat ischemic limbs associated to peripheral arterial disease. Enriched-EPC populations like BM-CD133 were also assessed by intracoronary injection showing an improvement in left ventricular performance, but the treatment was associated with increase in coronary events. Taken together, these studies suggest that intracoronary infusion of EPC can improve outcome after myocardial infarction. However, larger scale randomized trials are required to evaluate the long-term clinical outcome.

In conclusion, these studies support the idea that both cultured and freshly isolated human EPCs have therapeutic potential to treat ischemic damage. Although important advances have been made related to the mechanisms controlling the recruitment, differentiation and function of these cells, more studies are required to optimize the treatment of ischemic diseases with EPC either by endogenous mobilization or transplantation.

## Stem cell mediated cardiomyogenesis

C. Soler-Botija and J.C. Izpisua

*The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, USA.*

### Introduction

$\beta$ -catenin is an intracellular protein component of adherent junctions and a transcriptional regulator of several genes involved in proliferation and survival. In cell adhesion, it is part of a complex of proteins that links cadherins, transmembrane cell-cell adhesion receptors, to the actin cytoskeleton. Modulation of gene expression by  $\beta$ -catenin is mediated through its translocation into the nucleus where it interacts with transcription factors of the Tcf/Lef family.

The aim of the present study was to determine the effect of  $\beta$ -catenin overexpression after an acute myocardial infarction in a mouse model of the disease. Several studies define a role for  $\beta$ -catenin in the proliferative and migratory responses of cells during embryogenesis and in neoplastic disease. However, little is known about a potential role of  $\beta$ -catenin in controlled cell proliferation and migration during repair processes after an injury like myocardial infarction. It has been reported that the  $\beta$ -catenin-APC complex might have a role in the proliferation and migration of vascular endothelial cells during neovascularization of the infarcted area. In our study, we want to determine if  $\beta$ -catenin overexpression might increase the number of capillaries in the damaged tissue after an acute myocardial infarction and, at the same time induce proliferation and survival of the cells.

### Methods

Myocardial infarction was induced in wild-type C57Bl6 female mice by permanent ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD). The animals were anesthetized with isoflurane (2%) and mechanically ventilated. An anterior thoracotomy was performed, the heart was exposed and the LAD was ligated by a 7-0 silk suture 1



mm below the atrioventricular border. The mice were then randomly given an intramyocardial injection with a 30-gauge needle of 100  $\mu$ l of EFGP-adenovirus (control) or ad-catenin-IRES-GFP Adenovirus (nonphosphorylatable constitutively active  $\beta$ -catenin). The muscle layer and skin were closed after the injection.

Ten days after myocardial infarction and adenovirus injection, mouse hearts were excised and fixed in 10% buffered formalin and cryopreserved in 30% sucrose.

Serial cryosections of the heart were stained with Masson's trichrome for infarct size measurements. Infarct size was defined as the percentage of fibrotic area in the left ventricle. Quantitative assessment of the parameters was performed with the use of image analysis software (Image J, NIH).

To evaluate capillary density and cardiomyocyte proliferation, immunodetection was used. The sections were incubated with antibodies specific to CD31 (PCAM-1) for the detection of capillaries, and BrdU (proliferation marker) and Nk $\times$ 2.5 (cardiac marker) for the detection of proliferating cardiomyocytes.

Apoptotic cells were evaluated by the terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay in serial cryosections with the ApopTag kit (Chemicon). Five fields each were selected in the scar, border and distal areas for the analysis of capillary density, proliferation and cell death.

All data were expressed as means  $\pm$  SE. Comparison of means were performed using the Student *t* test or analysis of variance and the Scheffé *post hoc* test for multiple comparisons between groups. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results and conclusions

The infarct size analysis showed that the mean percentage of the scar in the left ventricle of control mice ( $40.90 \pm 4.29$ ) was statistically similar to the  $\beta$ -catenin injected group ( $39.54 \pm 7.21$ ;  $p=0.884$ ). These results show that the effect  $\beta$ -catenin might have in proliferation and survival of the cells in the infarcted myocardium is not effective enough to reduce the size of the infarction.

To assess the proliferative state of cardiomyocytes, we counted the cells where BrdU and Nk $\times$ 2.5 co-localized and determined the mean percentage of the total number of cardiomyocytes in each high power field at 640x magnification. The analysis revealed that, although the number of proliferating cardiomyocytes in the  $\beta$ -catenin treated group were higher ( $5.41 \pm 0.81$ ), the results did not reach statistical significance compared to the control group ( $4.16 \pm 0.92$ ;  $p=0.398$ ). The comparison of the areas bordering the scar and the most distal ones showed that the number of proliferating cardiomyocytes was higher in the distal zones, probably due to the fact that this tissue has better vascularization.

To explore the protective effect of  $\beta$ -catenin in the infarcted myocardium, we performed the TUNEL technique, which allow us to detect dying cells by an apoptotic mechanism. A significant decrease in the number of TUNEL-positive cells per  $\text{mm}^2$  was observed in  $\beta$ -catenin-injected mice compared with the non-injected group ( $76.99 \pm 12.24$  cells/ $\text{mm}^2$  versus  $128.00 \pm 13.60$  cells/ $\text{mm}^2$ ;  $p=0.003$ ). The analysis of the scar and distal areas showed a significant decrease in the number of apoptotic cells in the distal myocardium of treated mice ( $56.62 \pm 19.70$  cells/ $\text{mm}^2$ ) compared with controls ( $175.57 \pm 20.53$  cells/ $\text{mm}^2$ ;  $p < 0.001$ ). Although these values do not reflect the total number of dying cells in the tissue, they show that  $\beta$ -catenin might influence programmed cell death and might have a protective effect in those areas where the damage is not so significant.

The determination of the capillary number per  $\text{mm}^2$  showed an increased vascularization in the  $\beta$ -catenin treated mice ( $428.39 \pm 15.46$  capillaries/ $\text{mm}^2$ ) compared with the control group ( $279.20 \pm 18.17$  capillaries/ $\text{mm}^2$ ), with the differences being statistically different ( $p < 0.001$ ). The comparison of the scar and the distal zones revealed that the differences were significantly high in the scar area ( $524.12 \pm 20.08$  capillaries/ $\text{mm}^2$  in treated group versus  $250.28 \pm 12.60$  capillaries/ $\text{mm}^2$  in controls;  $p < 0.001$ ). However, we did not find any statistical differences in the distal zone ( $333.91 \pm 17.84$  capillaries/ $\text{mm}^2$  in treated group versus  $332.21 \pm 44.94$  capillaries/ $\text{mm}^2$  in controls).

Collectively, these results suggest that  $\beta$ -catenin overexpression have a positive effect in the infarcted myocardium increasing the capillary density and thus, providing more oxygen and nutrients to the damaged tissue, where it is needed for the recovery of the myocardium. Moreover,  $\beta$ -catenin might have a protective effect over programmed



cell death, also acting as a beneficial factor. However,  $\beta$ -catenin seems not to increase the number of proliferating cardiomyocytes in the infarcted myocardium. Further experiments to determine if  $\beta$ -catenin influences the proliferation rate of cells others than the cardiomyocytes are needed.

## Ingeniería tisular cardiaca

### A. Bayés Genís

*Programa de Regeneración Cardíaca, Servicio de Cardiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.*

En una revisión de los estudios realizados en terapia de regeneración cardíaca se observa que la estrategia preferentemente utilizada ha sido la administración intracoronaria de células derivadas de la médula ósea (BMC) o células progenitoras circulantes (CPC). Se han publicado cuatro estudios clínicos aleatorizados post IAM y uno en cardiopatía isquémica crónica. Asimismo, hay un estudio clínico aleatorizado en que se utilizó la movilización de células madre pluripotenciales con citocinas (G-CSF). Una tercera estrategia, la administración intramiocárdica de mioblastos, se encuentra actualmente en suspenso, ya que el único estudio clínico aleatorizado sobre esta estrategia hubo de detenerse prematuramente al no observarse un beneficio en la función cardíaca, tanto la función contráctil como el remodelado, y sí, en cambio, un efecto adverso que propiciaba una mayor incidencia de arritmias cardíacas.

El estudio BOOST (1) fue un estudio clínico aleatorizado y controlado que indicó la existencia de un posible efecto beneficioso derivado de la administración intracoronaria de BMC autólogas sobre la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) a los seis meses de seguimiento en pacientes post IAM, aumentando la FEVI en este grupo un 6,7%, frente a un 0,7% en el grupo control ( $p < 0,005$ ). Cuando se observan los resultados de este estudio en detalle, sin embargo, aparecen algunas dudas acerca del posible beneficio derivado de esta estrategia: 1) una nueva evaluación de la FEVI a los 18 meses mostró que el efecto beneficioso registrado a los seis meses había ya desaparecido en esta nueva evaluación; 2) un análisis que evaluó los resultados a los seis meses en el subgrupo de pacientes con una FEVI deprimida (FEVI  $< 52\%$ ) mostró que en este subgrupo la mejoría no había sido significativa. Esta ausencia de eficacia ha sido más recientemente demostrada en cuatro nuevos estudios clínicos aleatorizados. En dos de estos estudios, la administración intracoronaria de BMC autólogas durante las primeras horas tras una terapia de reperfusión óptima en pacientes que habían sufrido un IAM no mejoró la recuperación de la función ventricular izquierda a los 4-6 meses respecto al grupo control (2, 3). El tercero de estos estudios (4), también en pacientes post IAM, reveló la existencia de una relación entre la administración intracoronaria de BMC y un aumento del 2,5% en la FEVI (aumento del 5,5% frente al 3% en el grupo controlado con placebo;  $p = 0,01$ ) determinada mediante angiografía; sin embargo, señaló asimismo la necesidad de evaluar si realmente la administración intracoronaria de BMC resulta beneficiosa sobre la morbimortalidad cardiovascular en estudios de mayor tamaño. Por último, el cuarto (5), en pacientes con un infarto de miocardio cicatricial, obtuvo unos resultados muy similares, con un aumento del 2,9% de la FEVI mediante angiografía a los tres meses.

Tampoco la movilización de células madre pluripotenciales mediante terapia con el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en pacientes con IAM mostró tener un efecto beneficioso significativo sobre el tamaño del infarto, la función ventricular izquierda o la reestenosis coronaria (6), por lo que en conjunto se deduce que, antes de seguir por esta vía, que ha mostrado tener unos resultados muy escasamente satisfactorios, parece necesario conocer un poco mejor qué tipo de células estamos tratando.

Ello ha dado lugar al nacimiento de la ingeniería tisular cardíaca, una técnica que persigue la obtención, a partir de células madre pluripotenciales o de cualquier otro tipo que sean susceptibles de ser transformadas, de miocardiocitos o células altamente diferenciadas que podrían reemplazar al miocardio infartado y de angioblastos que producirían neovasos, mejorando la zona intermedia entre el infarto y el área no afectada, así como que estas células se puedan colocar de forma ordenada en una estructura polimérica, constituyendo el llamado *tejido cardíaco diseñado mediante ingeniería* o EHT (*engineered heart tissue*).

La ingeniería tisular cardíaca busca, por tanto, reconstruir o regenerar el tejido perdido, evitar o, como mínimo, retardar la progresión del remodelamiento ventricular y bloquear o tratar de revertir la reducción de la función cardíaca acaecida tras un infarto agudo de miocardio. Se han ensayado diversas formas de ingeniería tisular cardíaca. Una de estas formas consiste en el cultivo de monocapas celulares que se adherirán entre sí formando una estructura tridimensional. Para ello se administran células aisladas sobre una matriz extracelular (colágeno, alginato, PGA, PLA) con una malla que sirva de sostén a las células o capaz de interactuar con las células de forma que las sostenga (hidrogel).

Actualmente hay varios equipos de investigación que lideran la ingeniería tisular cardíaca en el ámbito mundial, entre los que destacan el grupo de Rob Langer en EEUU, el de Thomas Eschenhagen en Alemania, el de Idezo Mori en Japón, el de Jonathan Leor en Israel y el de Ren-Ke Li en Canadá.

El grupo de Langer, en EEUU, se encuentra actualmente desarrollando la técnica llamada de “cell patch” (tiritas celulares), que consiste en la perforación de un polímero biocompatible y biodegradable de forma que se vuelva poroso, que posteriormente se rellena con las células seleccionadas y se coloca en un cultivo conectado a un electroestimulador que envía unos pulsos eléctricos que provocarán una contracción continuada del polímero. Se obtendrá, por tanto, un polímero con dos fases (contracción y relajación) susceptible de ser aplicado a la zona cicatricial en el contexto de una cirugía cardíaca.

Por su parte, el grupo de Eschenhagen, en Alemania, a partir de cardiomiocitos neonatales, es decir, células ya diferenciadas, que se cultivan con colágeno, matrigel y un medio con suero y se colocan dentro de moldes circulares formando estructuras cardiomiocíticas en forma de anillo, provoca una mayor diferenciación cardíaca y estabilidad de estas células manteniéndolas continuamente en un estado contráctil mediante estimulación mecánica. La agrupación de estas estructuras altamente rígidas por hallarse en permanente contracción acabará fusionándose entre sí, pudiendo suturarse al ápex de un ventrículo infartado y evaluar si el injerto realizado, que estará formado por fibras miocárdicas especializadas con un sarcómero altamente diferenciado, presenta o no una capacidad de regeneración.

Una tercera línea de investigación, muy atractiva desde una perspectiva conceptual, es la seguida por el grupo de Idezo Mori en Japón, consistente en el cultivo de células pluripotenciales mesenquimales *in vitro* hasta que estas células alcanzan la confluencia o estado en el que dejan de proliferar y empiezan a sintetizar matriz extracelular. Cultivando estas células en un soporte de respuesta térmica, se consiguió que, al modificar la temperatura, se desprendiese la monocapa de células mesenquimales, obteniéndose un parche celular viable. La aplicación de este parche o membrana sobre la zona necrótica en el ápex del corazón infartado ha demostrado que una proporción de estas células puede crecer hasta formar una capa más gruesa en la que pueden distinguirse vasos neoformados, células indiferenciadas y algunas células diferenciadas o cardiomiocitos. Aunque al tratarse de una única monocapa resulta difícil que esta técnica pueda tener un impacto eficaz sobre la función contráctil, no deja de ser por ello un concepto interesante en la terapia de regeneración cardíaca que merece una mayor investigación.

Nuestro grupo del Hospital de La Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, en colaboración con ingenieros químicos de la Universidad de Barcelona y electrónicos de la Universidad Politécnica de Cataluña, está desarrollando un proyecto de evaluación de la pluripotencialidad y capacidad de diferenciación a adipocitos, osteocitos y/o cardiomiocitos de las células madre humanas adultas derivadas de la médula ósea o procedentes del tejido graso corporal. Para ello se estudia el fenotipo de estas células, se realizan análisis de senescencia para observar si existen alteraciones en los telómeros, y se llevan a cabo ensayos de diferenciación, especialmente diferenciación cardiomiogénica, para observar si existe una liberación ordenada de  $Ca^{++}$  entre una célula y la célula contigua o aparece la formación de uniones intercelulares (*gap junctions*) o conexiones intercelulares esenciales para que puedan existir actividades de coordinación rápida, como la contracción del músculo cardíaco o la transmisión de señales eléctricas neuronales. Estas células se colocan posteriormente en un cultivo con biorreactores especialmente diseñados con objeto de desarrollar matrices tridimensionales a partir de las cuales se generan tiritas celulares (*cell patches*).

Los primeros resultados de esta experiencia mostraron la formación de monocapas de células madre con un polímero, que tras un buen resultado inicial se comprobó que eran aún demasiado frágiles y se rompían con facilidad. A partir de ello, sin embargo, se ha avanzado hacia estructuras tridimensionales más densas y complejas, formadas por la presencia de células madre adultas en el interior de una matriz extracelular, que al ser electroestimuladas se

contraen de forma sincrónica y que de alguna forma representarían un primer punto de partida desde el cual seguir avanzando hasta llegar a desarrollar nuestras propias matrices.

Actualmente esta investigación se encuentra en una fase muy preliminar de la aplicación de las matrices o membranas desarrolladas en modelos de necrosis tisular cardíaca en animales de experimentación. En una experiencia preliminar sobre un infarto provocado en un modelo porcino, se ha podido observar la persistencia de tejido miocárdico en la zona necrótica infartada sobre la que se colocó una de estas membranas, un fenómeno que no se observó en el resto del área de infarto que no fue recubierta por la membrana y que indicaría que posiblemente estemos avanzando en una buena dirección.

En conclusión, la ingeniería tisular es ya una realidad, actualmente aún en una fase preclínica, que busca la generación de estructuras miocárdicas totalmente funcionales y vascularizadas a partir de materiales autólogos siguiendo las guías GMP (*Good Manufacturing Practice*) y GLP (*Good Laboratory Practice*). La obtención de buenos resultados con relación a su aplicabilidad y valor terapéutico en modelos de necrosis tisular cardíaca en distintos animales de experimentación, especialmente el modelo porcino y el murino, debería llevarnos a su evaluación en estudios clínicos aleatorizados en un futuro próximo.

## Referencias

1. Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J. et al. *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. *Lancet* 2004; 364(9429): 141-148.
2. Janssens, S., Dubois, C., Boagaert, J. et al. *Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Double-blind, randomised controlled trial*. *Lancet* 2006; 367(9505): 113-121.
3. Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S. et al. *Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction*. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1199-1209.
4. Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A. et al. *Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction*. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1210-1221.
5. Assmus, B., Honold, J., Schachinger, V. et al. *Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction*. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1222-1232.
6. Zohlnhofer, D., Ott, I., Mehilli, J. et al. *Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: A randomized controlled trial*. *JAMA* 2006; 295(9): 1003-1010.

## INMUNOSUPRESIÓN Y TRASPLANTE HEPÁTICO

### Estrategias de inmunosupresión en el trasplante hepático con injerto parcial

**R. Charco**

*Cirugía Hepática y Trasplante, IMDiM, Hospital Clinic, Barcelona.*

#### Introducción

La estrategia en la inmunosupresión en el trasplante hepático parcial de donante vivo no difiere en mucho de la del trasplante con injerto completo. Cuando trasplantamos un injerto parcial procedente de un donante vivo, en el adulto, estamos trasplantando una masa hepática menor que en el trasplante hepático con injerto completo. Varios estudios demuestran que para alcanzar las mismas concentraciones terapéuticas de anticalcineurínico se necesita menos dosis que con el trasplante con injerto completo y la correlación del nivel valle con el área bajo la curva es excelente. La causa es que disminuye el aclaramiento debido a la masa hepática reducida. Aunque a partir de la semana del trasplante la mayoría de injertos se han regenerado en un 90-95%, el metabolismo hepático está disminuido.

El trasplante hepático con injerto parcial procedente de donante vivo es un escenario ideal para inducir tolerancia, ya que conocemos al donante y al receptor y podemos programar el día del trasplante.

Los problemas actuales de los pacientes trasplantados son el rechazo crónico, importante en el trasplante de corazón, pulmón o riñón, ya que en el hígado esta complicación es poco frecuente; los efectos adversos de la inmunosupresión, como la hipertensión arterial, la dislipemia, la diabetes y la nefrotoxicidad; el aumento del riesgo de cáncer debido al tratamiento inmunosupresor, y en el trasplante hepático, la recidiva de la enfermedad viral (VHC). En la actualidad, la pérdida de injertos por rechazo agudo es excepcional en cualquier tipo de trasplante de órgano sólido, gracias a que disponemos de una amplia gama de inmunosupresores que, en combinación o en monoterapia, presentan una alta eficacia en la prevención y el tratamiento del rechazo agudo.

En esta última década los anticuerpos policlonales (ALG o ATG) y el anticuerpo monoclonal OKT3 han disminuido su utilización a favor de anticuerpos más selectivos como los anti-IL2. La azatioprina ha sido prácticamente desplazada por el micofenolato y el inhibidor de la calcineurina tacrolimús supera en utilización a la ciclosporina. Los corticosteroides, con todo su potencial de efectos secundarios, siguen formando parte de la mayoría de pautas inmunosupresoras (1).

La estrategia en la inmunosupresión en el trasplante hepático parcial de donante vivo (THDV) no difiere en mucho de la del trasplante con injerto completo. El hecho de que la masa hepática sea menor al trasplantar un injerto parcial procedente de un donante vivo en un adulto que cuando se realiza un trasplante completo condicionará algunos aspectos de la inmunosupresión, al menos durante los primeros días. Si utilizamos una pauta clásica doble con un anticalcineurínico más esteroides a dosis convencionales como en el trasplante de cadáver, las concentraciones sanguíneas del anticalcineurínico serán mucho más altas de lo esperado, lo que habitualmente se acompaña de disminución de la diuresis en el postoperatorio inmediato y aumento de la creatinina sérica, con los consecuentes reajustes de dosis, quedando en ocasiones el paciente con baja inmunosupresión. Como ya dijimos, esto se debe a la disminución del aclaramiento por la reducción de la masa y el metabolismo hepáticos (2). Existen varios estudios que demuestran que para obtener niveles adecuados de anticalcineurínico en el postoperatorio del trasplante hepático con injerto parcial procedente de donante vivo se necesita menor dosis (3). Trotter demuestra que la relación concentración/dosis obtenida con ciclosporina o tacrolimús en el trasplante hepático con injerto parcial es superior que en trasplante de cadáver (2).

## Experiencia en el Hospital Clínic

En el Hospital Clínic realizamos un estudio cuyo objetivo fue conocer la correlación entre la concentración valle de tacrolimús y la concentración del área bajo la curva en el contexto del THDV. Se compararon 10 pacientes trasplantados con injerto hepático parcial de donante vivo con 11 pacientes trasplantados con injerto completo de cadáver (THC). La dosis inicial de tacrolimús fue de 0,05 mg/kg/día en el THDV y de 0,1 mg/kg/día en el THC. Todos los pacientes, en ambos grupos, recibieron 1 g de metilprednisolona i.v. en el periodo intraoperatorio, seguido de una pauta descendente de prednisona. Como era de esperar, no hubo diferencias significativas en la media de los niveles valle de tacrolimús al décimo día postrasplante en los pacientes con injerto parcial en comparación con los pacientes con un injerto completo (14,1 ng/dl vs. 9,1 ng/dl). El área bajo la curva fue similar en ambos grupos (185,1 ng-h/ml en el grupo de injerto parcial y 148,1 ng-h/ml en el grupo de injerto completo, a pesar de haber recibido el doble dosis. Además, la correlación entre el área bajo la curva y en el nivel valle fue excelente (coeficiente de correlación: 0,936) (4).

En el periodo de enero de 2000 a diciembre de 2005 se han efectuado 49 THDV en nuestro hospital. Cuando analizamos a los 32 pacientes que habían recibido tacrolimús y esteroides como tratamiento inmunosupresor, observamos que los efectos adversos secundarios a la inmunosupresión inicial no eran despreciables: insuficiencia renal 28%, diabetes mellitus 41%, hipertensión 19% y toxicidad neurológica 31%. Diecisiete pacientes (53%) presentaron algún episodio de rechazo durante el primer año de seguimiento (10 leves, 5 moderados y 4 graves). Casi la mitad de estos rechazos fueron silentes y se detectaron por biopsias de protocolo. Los efectos adversos a la inmunosupresión, así como el rechazo, han motivado cambios en los fármacos inmunosupresores, el más frecuente de los cuales ha sido la adición de micofenolato al régimen inmunosupresor. Si analizamos la función renal de los pacientes trasplantados a los dos años de seguimiento, observamos una mejor función renal en los 13 pacientes que recibieron micofenolato frente a los 19 que no lo recibieron. Existen pocos estudios en la literatura que analicen la inmunosupresión en el contexto del donante vivo. En trasplante hepático infantil, un estudio de Schuller en 30 pacientes muestra el beneficio en la disminución de la incidencia de rechazo con la inducción con anti CD25 seguida de una triple terapia donde incluye tacrolimús, micofenolato y corticosteroides (5). Ringe reporta en su trabajo un 19% de rechazo agudo en una serie de 20 pacientes adultos de THDV con triple terapia (tacrolimús, micofenolato y anti CD25) sin corticosteroides (6).

En el Hospital Clínic hemos optado por la cuádruple terapia secuencial. Los pacientes reciben 1 g de metilprednisolona i.v. durante la fase anhepática de la intervención quirúrgica, seguido de 200 mg de prednisona el día 1 postrasplante y continuando con una pauta descendente hasta alcanzar 20 mg de prednisona el 7º día postoperatorio. Basiliximab 20 mg en las primeras 6 horas postoperatorias en la UCI, dosis que se repite al 4º día postoperatorio. Micofenolato 1 g/12 h por vía enteral desde el día del trasplante. Tacrolimús 0,025 mg/kg/12 h por vía oral a partir del 5º-7º día postoperatorio, cuando el paciente presenta una buena diuresis, recuperación de la función renal y no existe ninguna contraindicación para iniciar el anticalcineurínico. En estos momentos disminuimos las dosis de micofenolato a 1-1,5 g/d.

## Trasplante hepático de donante vivo y tolerancia

El THDV es el mejor escenario para crear tolerancia, ya que podemos seleccionar el mejor donante y podemos preparar al donante y al receptor antes del trasplante, puesto que sabemos el día y la hora en que vamos a realizarlo. Un estudio multicéntrico belga (7) demuestra que la retirada de la inmunosupresión precoz es posible después del THDV tras la infusión de "stem cells" del donante en el receptor. Los receptores reciben ATG durante 5 días, esteroides y sirolimús desde el día 1 postrasplante. El día 7 se les administra una infusión de "stem cells" del donante y, cuando el paciente presenta una función hepática normal, se procede a la retirada de la inmunosupresión. Otro centro muy activo en la creación de tolerancia es la Universidad de Pittsburg. El protocolo es más complejo, con la diferencia fundamental de que la inducción es con Campath y el inmunosupresor principal tacrolimús.



En resumen, podemos decir que en el trasplante hepático con injerto parcial debemos utilizar el 50% de la dosis inicial de anticalcineurínico que utilizamos en el trasplante con injerto completo para conseguir los mismos niveles. Además, en muchas ocasiones, estos niveles son impredecibles, por lo que la triple terapia o cuádruple secuencial con la incorporación tardía del anticalcineurínico parece ser una de las opciones más adecuadas. No hay duda que el THDV es el mejor escenario para la inducción de tolerancia.

## Referencias

1. Shapiro, R. y cols. *Am J Transpl* 2005; 5: 874-886.
2. Trotter, J. y cols. *Liver Transplantation* 2002; 8: 212-218.
3. Taber, D.J. y cols. *Liver Transplantation* 2002; 8: 219-223.
4. Charco, R. y cols. *Transplant Proc* 2005; 37: 3930.
5. Schuller, S. y cols. *Transplant Proc* 2005.
6. Ringe, B. y cols. *Transplant Proc* 2005.
7. Donckler, V. y cols. *Liver Transplantation* 2006; 12: 1523.

## Long-term side effects of immunosuppression in liver transplantation

**M.R. Lucey**

*University of Wisconsin, School of Medicine and Public Health, Madison, USA.*

### Defining success after liver transplantation

Typically, success of liver transplantation is measured by recipient survival and graft survival. However, important as survival statistics are, they do not tell the whole story. Many studies of immunosuppressive therapy in liver transplants have adopted the “control of rejection” as an important end-point. This is a problematic parameter, since mild acute cellular rejection appears to confer a survival advantage in liver patients (1). Among the many dangers facing the allograft is recurrence of the original disease, and new hepatocellular or biliary injury. Ultimately, defining the success of transplantation requires consideration of the health *in toto* of the recipient.

**Table 1. Defining success after liver transplantation.**

- Survival
- Controlling rejection
- Controlling morbidity:
  - Re emergence of original syndromes
  - New syndromes in the transplanted liver
- Control of long-term side-effects of immunosuppression

### Changing use of immunosuppressants in US

In the past 25 years, transplant programs have gathered many patients with extended post-transplant survival. These patients have tended to remain in contact with their transplant center, which in turn has managed their immunosuppression. During this time there have been considerable shifts in the use of immunosuppressants, which in turn has altered the nature and frequency of the prevailing unwanted side-effects (2). Cyclosporine has been largely



replaced by tacrolimus as the calcineurin inhibitor of choice; mycophenolate mofetil has eclipsed the use of azathioprine and there has been a trend to use less corticosteroids. Other new immunosuppressants such as sirolimus have yet to establish their place in the armamentarium for managing liver transplant recipients. The utility of anti-lymphocyte induction therapy is also controversial. Each of these immunosuppressant agents carries a burden of unwanted morbidity (see Table 2).

**Table 2. Morbidity from immunosuppressants.**

Hypertension	Cyclosporine, tacrolimus, corticosteroids
Renal failure	Cyclosporine, tacrolimus
Diabetes mellitus	Cyclosporine, tacrolimus, corticosteroids
Hyperlipidemia	Cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, corticosteroids
Osteopenia	Cyclosporine, tacrolimus, corticosteroids
Impaired wound healing	Corticosteroids, sirolimus
Thrombocytopenia	Mycophenolate
Infection	All
Lymphoma	All
Diarrhea	Mycophenolate
Pneumonitis	Sirolimus

## Cyclosporine vs. tacrolimus

As mentioned above, tacrolimus has replaced cyclosporine as a first choice calcineurin inhibitor for liver transplantation in the US (2). Two recent studies have addressed the relative benefits and deficiencies of these two agents. First, Haddad et al. carried out a meta-analysis of randomized clinical trials in which tacrolimus was compared with cyclosporine for the initial treatment of primary liver transplant recipients (3). Sixteen studies, in which there were 1899 subjects in the tacrolimus

group and 1914 subjects in the cyclosporine group, were analyzed. One-year patient (RR 0.85, 95% CI 0.73-0.99) and graft (RR 0.73, 95% CI 0.61-0.86) survival were significantly better among the tacrolimus recipients. Tacrolimus reduced the number of patients with acute rejection and steroid-resistant rejection in the first year. There was no difference in the incidence of lymphoproliferative disease or new-onset dialysis between the two groups, but there was a significant increase in *de novo* diabetes mellitus in the recipients of tacrolimus (RR 1.38, 95% CI 1.01-1.86). The authors summarize their findings as follows: “treating 100 recipients with tacrolimus instead of cyclosporine(e) would avoid rejection and steroid-resistant rejection in 9 and 7 patients respectively, graft loss and death in 5 and 2 recipients respectively, but 4 additional patients would develop diabetes after transplantation” (4).

Lucey et al. reported a retrospective chart review of 1065 consecutive liver allograft recipients in 11 centers from 01/97 to 09/98, followed for 3 years or until graft loss (5). Five hundred and ninety four patients received tacrolimus, 450 received cyclosporine and 21 got neither calcineurin inhibitor. During follow-up, more patients switched from cyclosporine to tacrolimus (26.7%) than from tacrolimus to cyclosporine (12.8%;  $p < 0.0001$ ). While both calcineurin inhibitors were associated with excellent patient and graft survival, renal function, blood pressure, and serum lipid levels were significantly better with tacrolimus treatment. Corticosteroid use was more common in cyclosporine-treated patients ( $p < 0.00001$ ). Patients receiving tacrolimus experienced lower serum creatinine levels at months 3 through 36 ( $p < 0.0001$ ). Systolic blood pressure was lower in patients receiving tacrolimus ( $p < 0.001$ ) despite a reduced requirement for antihypertensive agents ( $p < 0.0001$ ). Further, tacrolimus was associated with lower total cholesterol and triglyceride levels for months 3 through 24 and 3 through 12, respectively ( $p < 0.01$ ). This was in spite of a reduced requirement for antihyperlipidemic agents ( $p < 0.0001$  at 2 and 3 years). The incidence of new-onset diabetes mellitus was similar in both groups.

## Long-term complications

Liver transplant recipients have many sources of chronic morbidity in greater prevalence than the US population. It can be stated unequivocally that liver transplant recipients are at increased risk for systemic hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus, obesity, renal failure, various cancers and osteopenic bone disease. This simple assessment is misleading, since it does not take into account the changing composition over time of the immunosuppression protocol in each individual patient. Thus, post liver transplant management utilizes a heavy load of immunosuppres-

sion in the first few weeks or months, and then gradually reduces both the variety and doses of immunosuppressants. Immunosuppressant medications interact with each other to cause unwanted effects. For example, as will be discussed below, several immunosuppressants interact to cause hypertension, hyperlipidemia, and diabetes, which in turn constitute a significant burden of cardiovascular risk factors in the liver transplant recipient (Table 3). Diabetes mellitus is a good example of the interaction of immunosuppressants with additional comorbidities, in this case corticosteroids and tacrolimus or cyclosporin combining with obesity and hepatitis C infection, to produce the clinical syndrome. In other words, when assessing an important health consequence in a specific individual liver transplant recipient, it is necessary to consider the complete profile of co-morbid challenges, and avoid assuming that the immunosuppressant is the culprit for every problem.

## Cardiovascular health

Several single center studies have suggested that there is a greater frequency of death from heart attack or stroke in liver transplant recipients compared to the general population (6-9). As shown in Table 3, liver transplant recipients have an increased rate of several cardiovascular risk factors. In addition, cigarette smoking is common in liver transplant recipients. DiMartini found that 40% of a cohort of patients transplanted for alcoholic liver disease were smokers at all follow up points (10). Liver transplant recipients are at increased risk of systemic hypertension, particularly patients in whom cyclosporine is the primary immunosuppressant (5). Hypercholesterolemia is greatest in patients treated with sirolimus, but is also a consequence of cyclosporine, and corticosteroids (11). Diabetes, as mentioned above, has many contributory causes. Most recently the diabetogenic propensity of tacrolimus and hepatitis C infection in combination has received considerable attention (12).

**Table 3. Cardiovascular risk factors following liver transplantation.**

Risk factor	Prevalence posttransplant	Rate in US population
Hypertension (BP < 140/90)	41-81%	15.7%
Hypercholesterolemia (>240 mg%)	20-66%	14.9%
HDL < 35 mg%	42%	12%
Diabetes mellitus	21-32%	6.2%
Obesity (BMI > 30)	39-43%	16.1%

## Chronic renal failure

Liver transplant recipients are at increased risk of chronic renal failure (13). Ojo et al. reviewed the SRTR database which included more than 12,000 at risk lives 5 years after transplantation. The primary end-point analyzed was chronic renal failure (defined as a glomerular filtration rate of 29 ml per minute per 1.73 m<sup>2</sup> of body-surface area or less, according to the clinical-practice guidelines of the National Kidney Foundation) or the onset of ESRD (as determined by the initiation of dialysis therapy or preemptive kidney transplantation). They found that almost 20% of liver transplants recipients were in renal failure at 5 years after transplant. The excess risk of chronic renal failure, calculated by Cox multivariable regression analysis, was associated with the age of the recipient, prior renal failure, diabetes or positive anti-HCV, and lastly an episode of postoperative acute renal failure. Regarding immunosuppressive protocols, the use of cyclosporine rather than tacrolimus was significantly associated with chronic renal failure (relative risk, 1.25; P<0.001). Furthermore, chronic renal failure was associated with an elevated risk of death after transplantation, although this risk was not fully accounted for by death from renal failure.

The greater risk to renal function incurred by use of cyclosporine has been observed in other studies also (see "Cyclosporine vs. tacrolimus" above, and references 3 and 4). One response is to change cyclosporine to tacrolimus. An alternative approach is to substitute sirolimus or mycophenolate (14).

## Osteopenic bone disease

Hay et al. have recently reported on the long-term evaluation of bone loss and gain after liver transplantation in a group of high risk patients with a prior diagnosis of cholestatic liver disease (15). They found that most patients entered transplantation with reduced bone mass, and lost further bone mass in the first 4 months, after which bone gain occurred. The greatest gain occurred in the patients with the most severe bone disease at transplantation. Surprisingly, the study did not show a correlation between corticosteroid dose, or rejection episodes and bone loss or bone gain. This was explained by the authors as a consequence of the invariable early postoperative use of high dose corticosteroids at the Mayo Clinic. The study did not assess the benefits of bisphosphonates, calcium, vitamin D metabolites or hormone replacement therapy in post-menopausal women. However recent studies in which have shown that the initial bone loss described in Hay's work is prevented when bisphosphonate therapy is begun early after liver transplantation (16,17).

## Conclusions

The goal of liver transplantation is to achieve long-term health. Most liver transplant recipients require immunosuppressants for many years after their transplant. Late-onset acute cellular rejection is a hazardous consequence of inadequate immunosuppression (18). Each immunosuppressive agent has its own profile of side-effects, which may work in concert with other medicines or co-morbidities to produce ill-health in an individual patient. The managing physician should aim to minimize the unwanted effects by tailoring the immunosuppressive protocol to the particular co-morbid risks of each patient. In certain circumstances it may be useful to switch immunosuppressant to reduce the risk of a particular unwanted effect. This is particularly true in regards to preserving renal function where the most common change would be from cyclosporine to tacrolimus or a non calcineurin inhibitor. Some experts have advocated the same approach, albeit switching tacrolimus to cyclosporine, to improve glycemic control in diabetics with stable allograft function (19). At the same time, appropriate medical management should be incorporated into all post transplant protocols. This should include control of cardiovascular risks including blood pressure, blood lipids, hyperglycemia, obesity and smoking; early use of bisphosphonates in any patient maintained on corticosteroid therapy, and careful surveillance for cancers.

## References

1. Wiesner, R.H., Demetris, A.J., Belle, S.H. et al. *Acute hepatic allograft rejection: Incidence, risk factors, and impact on outcome*. 45 *Hepatology*. 1998; 28: 638-645.
2. Meier-Kriesche, H.-U., Li, S., Gruessner, R.W.G. et al. *Immunosuppression: Evolution in Practice and Trends, 1994-2004*. *Am J Transplant* 2006; 6I(5p2): 1111.
3. Haddad, E.M., McAlister, V.C., Renouf, E. et al. *Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients*. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 4: CD005161.
4. McAlister, V.C., Haddad, E., Renouf, E. et al. *Cyclosporin versus tacrolimus as primary immunosuppressant after liver transplantation: A meta-analysis*. *Am J Transplant* 2006; 6: 1578-1585.
5. Lucey, M.R., Abdelmalek, M.F., Gagliardi, R. et al. *A comparison of tacrolimus and cyclosporine in liver transplantation: Effects on renal function and cardiovascular risk status*. *Am J Transplant* 2005; 5: 1111-1119.
6. Johnston, S.D., Morris, J.K., Cramb, R., Gunson, B.K., Neuberger, J. *Cardiovascular morbidity and mortality after orthotopic liver transplantation*. *Transplantation* 2002; 73: 901-906.
7. Sheiner, P.A., Magliocco, J.F., Bodian, C.A. et al. *Long-term medical complications in patients surviving > or = 5 years after liver transplant*. *Transplantation* 2000; 69: 781-789.
8. Rabkin, J.M., Corless, C.L., Rosen, H.R., Olyaei, A.J. *Immunosuppression impact on long-term cardiovascular complications after liver transplantation*. *Am J Surg* 2002; 183: 595-599.

9. Abbasoglu, O., Levy, M.F., Brkic, B.B. et al. *Ten years of liver transplantation: An evolving understanding of late graft loss*. *Transplantation* 1997; 64: 1801-1807.
10. DiMartini, A., Javed, L., Russell, S. et al. *Tobacco use following liver transplantation for alcoholic liver disease: An underestimated problem*. *Liver Transpl* 2005; 11: 679-683.
11. Trotter, J.F., Wachs, M.E., Trouillot, T.E. et al. *Dyslipidemia during sirolimus therapy in liver transplant recipients occurs with concomitant cyclosporine but not tacrolimus*. *Liver Transpl* 2001; 7: 401-408.
12. Saliba, F., Lakehal, M., Pageaux, G.P. et al. *Risk factors for new-onset diabetes mellitus following liver transplantation and impact of hepatitis c infection: An observational multicenter study*. *Liver Transpl* 2006; 13: 136-144.
13. Ojo, A.O., Held, P.J., Port, F.K. et al. *Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ*. *N Engl J Med* 2003; 349: 931-940.
14. Wilkinson, A., Pham, P.T. *Kidney dysfunction in the recipients of liver transplants*. *Liver Transpl* 2005; 11: S47-51.
15. Guichelaar, M.M., Kendall, R., Malinchoc, M., Hay, J.E. *Bone mineral density before and after OLT: Long-term follow-up and predictive factors*. *Liver Transpl* 2006; 12: 1390-1402.
16. Millonig, G., Graziadei, I.W., Eichler, D. et al. *Alendronate in combination with calcium and vitamin D prevents bone loss after orthotopic liver transplantation: A prospective single-center study*. *Liver Transpl* 2005; 11: 960-966.
17. Crawford, B.A., Kam, C., Pavlovic, J. et al. *Zoledronic acid prevents bone loss after liver transplantation: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *Ann Intern Med* 2006; 144: 239-248.
18. Anand, A.C., Hubscher, S.G., Gunson, B.K., McMaster, P., Neuberger, J.M. *Timing, significance, and prognosis of late acute liver allograft rejection*. *Transplantation* 1995; 60: 1098-1103.
19. Dumortier, J., Bernard, S., Bouffard, Y., Boillot, O. *Conversion from tacrolimus to cyclosporine in liver transplanted patients with diabetes mellitus*. *Liver Transpl* 2006; 12: 659-664.

## Influencia de las diferentes pautas de esteroides y de los diferentes anticalcineurínicos en la recidiva C postrasplante

**M. Berenguer**

*Servicio de Medicina Digestiva, Hospital La Fe, Valencia, España.*

El pronóstico en pacientes con trasplante de hígado por cirrosis VHC está, en gran parte, determinado por la recurrencia de la enfermedad primaria. Ésta es extremadamente variable y hasta un 40% de los pacientes progresan a cirrosis en los primeros 5 a 10 años tras el trasplante. Existen numerosos factores relacionados con la progresión de la hepatitis C recurrente, factores dependientes del virus, el huésped, el donante, la cirugía y los tratamientos que administramos. De todas estas variables, aquellas para las cuales existen datos suficientes que apoyan una asociación con la enfermedad progresiva son la utilización de órganos de donantes ancianos, una carga viral elevada en el momento del trasplante, la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana, el desarrollo de diabetes mellitus tras el trasplante, un tiempo de isquemia prolongado, y un estado de sobreinmunosupresión, generalmente en el contexto de un tratamiento antirrechazo. Los datos respecto a otros factores, particularmente respecto a la inmunosupresión específica, son más controvertidos. La mayor rapidez de la progresión de la hepatitis C en pacientes trasplantados respecto a pacientes inmunocompetentes indica de forma indirecta el papel relevante que desempeña la inmunosupresión en esta enfermedad. Además, en los últimos años, la agresividad de la hepatitis C recurrente parece haber empeorado, al menos en algunos centros, de forma paralela a los cambios tanto en la calidad del donante (donantes más ancianos) como en la inmunosupresión utilizada, con la introducción de fármacos

inmunosupresores cada vez más potentes y la retirada cada vez más precoz de fármacos inmunosupresores de segunda línea, como pueden ser los corticosteroides. Estos cambios han generado un interés renovado por el papel que desempeña cada inmunosupresor sobre la replicación del VHC y la progresión de la hepatitis tras el trasplante.

## **Inhibidores de la calcineurina y hepatitis C postrasplante**

Estudios *in vitro* han demostrado recientemente un posible efecto antiviral de la ciclosporina, que parece mediado por la unión y bloqueo de la ciclofilina B. Este efecto no se ha observado en los estudios experimentales *in vitro*, tanto en el modelo de replicón como en cultivo de hepatocitos, con tacrolimús. La traslación de estos resultados *in vitro* en datos *in vivo* no muestra resultados paralelos. En cuanto a la replicación del VHC, hasta la fecha tres estudios, dos prospectivos y uno retrospectivo, no han demostrado diferencias de viremia entre los pacientes tratados con ciclosporina o tacrolimús. En el único estudio prospectivo aleatorizado, los resultados, curiosamente, fueron aparentemente contrarios a los resultados *in vitro*, con unos cambios en los niveles de viremia superiores en el grupo de pacientes asignados a ciclosporina que en el grupo de pacientes tratados con tacrolimús. En cuanto a la progresión de la hepatitis C postrasplante, la gran mayoría de estudios retrospectivos que han evaluado el papel de los inhibidores de la calcineurina sobre la tasa de hepatitis C recurrente, su gravedad o la supervivencia del injerto o el paciente no han demostrado diferencias entre ambos fármacos. Los resultados en cuanto a supervivencia también han demostrado ser idénticos en un metaanálisis publicado recientemente en el cual se incluyeron los únicos 5 estudios publicados hasta 2005 con un seguimiento mínimo de 12 meses. En el único estudio prospectivo basado en biopsias de protocolo, la única diferencia observada entre los pacientes asignados a ciclosporina y los que recibieron tacrolimús fue el tiempo hasta la recurrencia, significativamente más corto en los pacientes tratados con tacrolimús que en los tratados con ciclosporina. Sin embargo, queda por demostrar que estas diferencias en cuanto a “tiempo hasta la recurrencia” tengan alguna repercusión clínica en el pronóstico.

## **Pautas de esteroides y hepatitis C postrasplante**

Numerosos estudios han demostrado que los bolos de esteroides utilizados en el tratamiento del rechazo son perjudiciales para el pronóstico de los pacientes infectados por VHC, ya que, por una parte, aumentan de forma significativa los niveles de viremia y, por otra parte, aceleran la progresión de la enfermedad. Debido a este papel negativo de los bolos de esteroides, numerosos centros optaron por reducir el tiempo de exposición a estos fármacos retirándolos cada vez más precozmente. Desafortunadamente, los resultados obtenidos con estas pautas de reducción precoz de esteroides no han sido positivos, al menos en estudios retrospectivos.

La segunda alternativa es la de utilizar pautas inmunosupresoras sin esteroides. Estas pautas en las que se combinan otros fármacos tales como tacrolimús y mofetil micofenolato, han demostrado ser pautas bien toleradas y seguras para el paciente. Aún son pocos los datos respecto a los posibles beneficios para pacientes infectados por VHC. En los cuatro estudios prospectivos publicados hasta la fecha donde se ha analizado el papel de estas pautas inmunosupresoras, los resultados parecen apoyar estas estrategias al asociarse con menores tasas de recidiva y menor gravedad de ésta. Los datos, sin embargo, aún son preliminares y con escaso seguimiento.

## **Conclusiones**

Con los datos disponibles hasta la fecha, la supervivencia postrasplante parece no diferir en función del inhibidor de la calcineurina utilizado. Existen aún pocos estudios con un diseño adecuado que hayan valorado el papel de estos inhibidores de la calcineurina sobre la progresión de la hepatitis C recurrente; de momento, la única diferencia observada ha sido el tiempo hasta la recurrencia, más precoz en los pacientes tratados con tacrolimús. En cuanto a las pautas de esteroides, hay numerosas dudas respecto a su papel en la evolución de la hepatitis C recurrente.



Parece que ni los bolos de esteroides ni las pautas en que se interrumpen precozmente son beneficiosos para los pacientes infectados por VHC. Por el contrario, las pautas de reducción paulatina de esteroides o aquellas en las que no se utilizan estos fármacos podrían desempeñar un papel beneficioso en el curso evolutivo de la hepatitis C recurrente. En un estudio reciente en el cual se modificó la inmunosupresión permitiendo una reducción paulatina de los esteroides y evitando la sobreinmunosupresión (bolos de esteroides, triple o cuádruple terapia a dosis plenas), se logró mejorar significativamente los resultados en cuanto a gravedad de la hepatitis C recurrente.

## Referencias

- Berenguer, M. *What determines the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation.* J Hepatol 2005; 42: 448-456.
- Berenguer, M., Aguilera, V., Prieto, M. et al. *Effect of calcineurin inhibitors on survival and histologic disease severity in HCV-infected liver transplant recipients.* Liver Transpl 2006;12: 762-767.
- Lake, J.R. *The role of immunosuppression in recurrence of hepatitis C.* Liver Transpl 2003; 9: S63-S66.
- Berenguer, M., Aguilera, V., Prieto, M. et al. *Significant improvement in the outcome of HCV-infected transplant recipients by avoiding rapid steroid tapering and potent induction immunosuppression.* J Hepatol 2006; 44: 717-722.
- Margarit, C., Bilbao, I., Castells, L. et al. *A prospective randomized trial comparing tacrolimus and steroids with tacrolimus monotherapy in liver transplantation: The impact on recurrence of hepatitis C.* Transpl Int 2005; 18: 1336-1345.
- Martin, P., Busuttil, R.W., Goldstein, R.M. et al. *Impact of tacrolimus versus cyclosporine in hepatitis C virus-infected liver transplant recipients on recurrent hepatitis C: a prospective randomized trial.* Liver Transpl 2004; 10: 1258-1262.
- Samonakis, D.N., Triantos, C.K., Thalheimer, U. et al. *Immunosuppression and donor age with respect to severity of HCV recurrence after liver transplantation.* Liver Transpl 2005; 11: 384-385.
- Tisone, G., Orlando, G., Cardillo, A. 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: 702-709.



# ASPECTOS CRÍTICOS EN EL TRASPLANTE DE PÁNCREAS

## Long-term results after pancreas transplantation

D.E.R. Sutherland and A.C. Gruessner

Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA.

### Purpose

To document the incidence of long term (10-20 years) function (insulin-independence) and the half-lives of pancreas allografts in diabetic recipients by recipient category (simultaneous with [SPK] or subsequent to [PAK] or without [PTA] a kidney transplant) and era of transplant.

### Methods

The IPTR and the United Network for Organ Sharing (UNOS) merged data base was used to determine in each recipient category the primary pancreas (and for SPK the kidney) allograft survival rates and estimated half-lives (from the time of transplant for all cases and from 1 year for those functioning at 1 year) for USA cases done in five eras from 1988 to 1999 (n = 9464 overall, 8104 SPK, 965 PAK, 395 PTA). The University of Minnesota data base, containing 1905 transplants (681 SPK, 709 PAK, 513 PTA) in 1598 patients from 1978-2006 (124 from living donors [LDs]), was analyzed to calculate actuarial graft survival rates (GSRs) for the entire series; and actual 10, 15 and 20 year pancreas allograft survival rates in three eras from 1978-1996 (793 cases, 100 from LDs).

### Results

USA cases: For SPK cases the 7 year pancreas (and kidney) graft survival rates (GSRs) in the eras 1988-91, 92-93, 94-95, 96-97 and 98-99 were 56 (58), 59 (59), 62 (63), 64 (68) and 63(69)%, respectively; for PAK, 19, 21, 40, 39 and 44%, respectively; for PTA, 16, 29, 28, 28 and 51%, respectively. From the 94-96 era 52% of SPK, 25% of PAK and 16% of PTA pancreases were functioning at 10 years, and for the 1988-91 era 34%, 5% and 7% were functioning at 15 years. The graft half-lives by era and category are shown in Table 1.

The half-lives are highest in the SPK category (and beginning at 1 year higher for the pancreas than the kidney) and have increased in successive eras, but more so in the PAK and PTA categories than in the SPK category, narrowing the gap. For the 98-99 era for grafts functioning at 1 year, half-lives are over 12 years for both SPK grafts and nearly 8 years for PAK and over 9 years for PTA grafts.

Minnesota cases: Of the 793 pancreas transplants (341 SPK, 226 PAK, 225 PTA) done at the University of Minnesota from 1978 to 1996, 228 (220 deceased, 28 living donor) functioned >10 years (29%): 151

**Table 1. Pancreas and kidney half-lives (months) from transplant (and from 1 year post-tx) by era.**

	SPK		PAK	PTA
	Pancreas	Kidney		
1988-91	100 (153)	107 (137)	22 (67)	20 (68)
1992-93	115 (153)	110 (137)	21 (69)	31 (83)
1994-95	122 (155)	128 (147)	49 (90)	29 (68)
1996-97	141 (153)	140 (147)	52 (84)	36 (70)
1998-99	143 (155)	149 (152)	77 (94)	90 (109)

SPK (44%), 41 PAK (18%) and 36 (16%) PTA. The 10 year graft function rates tended to increase in successive eras, overall 12% for 1978-86 (n = 169), 28% for 1986-91 (n = 261) and 37% for 1992-96 (n = 363); for SPK, 58% (n = 7), 37% (n = 118) and 48% (n = 216) in the successive eras; for PAK, 10% (n = 70), 22% (n = 60) and 32% (n = 96); and for PTA, 11% (n = 92), 21% (n = 82) and 18% (n = 51). Likewise, 15 year survival rates increased from the 1978-86 to 1987-91 era, for all cases from 8% to 19%; by category, 29% to 27% for SPK, 7% to 12% for PAK, and 8% to 13% for PTA. Thus, we can anticipate the 20 year survival rate will increase in successive eras from the 5% it is overall for the 1978-86 era (14% for SPK, 6% for PAK and 4% for PTA). Of the 9 grafts functioning over 20 years, 3 are from deceased and 6 from living donors. The above are actual GSRs. Actuarial pancreas GSRs for the 1978-2006 Minnesota SPK, PAK and PTA cases (regardless of donor source) at 1 year were 65, 47 and 42% at 10 years and 38, 20 and 13% at 20 years; for LD cases, 10 year GSRs in the respective categories were 70%, 50% and 56%, and at 20 years for PAK and PTA cases were 38% and 22%, respectively.

## Conclusions

Since the mid-1990s, pancreas allograft half-lives range from 8-9 for solitary (PAK, PTA) to nearly 13 years for SPK transplants, and function (insulin-independence) for more than 20 years is clearly achievable as demonstrated by the number of living and deceased donor cases that have done so in eras begun 2 to 3 decades ago. Indeed, half-lives in SPK cases tend to be slightly higher for the pancreas than the kidney, perhaps showing that beta cells may be more likely to functionally survive than nephrons in the face of immunosuppressive drug toxicity or chronic immune attack. The potential to increase the percentage of pancreas allografts that can function for a normal life span clearly exists.

## Spectrum of histopathological changes in pancreas allograft rejection and relationship to graft loss

**C.B. Drachenberg**

*University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA.*

Improved surgical techniques, availability of potent immunosuppressants, accurate diagnosis of rejection, better treatment of infections, and careful selection of donors and recipients have all resulted in excellent one year graft and patient survival after pancreas transplantation (1-5). Despite all of these advances, a proportional improvement in long term allograft survival has not been achieved yet, because similar to other transplanted organs progressive graft sclerosis inexorably develops over time (6-10).

Schematically, the causes of pancreas graft loss are considered either technical or immunological. The first group includes: thrombosis, infection, pancreatitis, anastomotic leak and bleeding. These complications usually require removal of the organ. The immunological causes include acute and chronic rejection, as well as recurrence of autoimmune isletitis with destruction of insulin producing cells (1, 11-19).

Accurate determination of the cause of graft loss requires histological evaluation of the explanted specimen with systematic evaluation of the endocrine and exocrine components and specifically of the arteries. This is particularly important in the early post-transplantation period (<1 month) when both acute rejection and technical failures often present similarly with graft thrombosis (7).

## Histological features and grading of acute rejection

Experimental studies of unmodified rejection in pancreatic allografts have shown that the earliest acute changes consist of interstitial (septal) infiltrates with prominent lymphocytic infiltration of interlobular veins. In subsequent days there is more generalized lymphocytic inflammation with involvement of the acini and damage and drop-out of acinar cells. Further progression of rejection leads to involvement of arterial branches (19). These same morphological findings have been described in needle allograft biopsies and were the basis for the development of a schema to assess and grade acute rejection (20). In this schema biopsies with no inflammation and biopsies with minimal septal inactive inflammation were considered negative for acute rejection and were graded 0 and I, respectively. More significant histological changes that were considered indicative of acute rejection were classified as follows: active septal inflammation with venous endotheilitis, ductal inflammation, Grade II; acinar inflammation in addition to septal changes, Grade III; arterial inflammation, Grade IV, and changes associated with diffuse parenchymal necrosis, Grade V (3, 21, 22). In experimental as well as clinical studies, islets were shown not to represent a primary target of rejection (3, 19). This grading scheme showed good reproducibility, prognostic significance and correlation with other clinical parameters, including response to treatment (21, 22). A recent study of a larger number of patients with repeated biopsies and prolonged follow-up has shed additional light on the prognostic value of each of the different histological parameters of acute rejection (23).

*Septal inflammation with minimal, focal acinar involvement (<5%)* has a good response to standard antirejection treatment (80-90%) (21) and has not been shown to lead to irreversible parenchymal injury such as scarring (23). This mild form of rejection is defined by the presence of lymphocytic inflammatory infiltrates in the interlobular septa with variable numbers of eosinophils. The lymphocytic inflammation typically permeates branches of the interlobular pancreatic ducts (ductitis) and involves the septal veins causing venulitis (mononuclear cell cuffing with damage and lifting up of endothelial cells). Very focal acinar inflammation may be seen in areas adjacent to the septa but the changes are largely septal in nature.

*Acinar inflammation* characterized by the presence of inflammatory infiltrates admixed with the exocrine glands is the most common finding in biopsies performed for increase in pancreatic serum enzymes (20, 21). These infiltrates are composed of lymphocytes with variable proportions of eosinophils and are typically associated with spotty acinar cell damage and drop-out (i.e. apoptosis).

Pancreas allograft rejection presenting with acinar inflammation has been shown to be responsive to antirejection treatment in a significant proportion of patients (i.e. 68% to pulse steroids and 85 % response to pulse steroids + antilymphocytic drugs) (21). However, resolution of the acinar inflammation has been shown to leave as sequela, increased lobular fibrosis and irreversible loss of the glandular components. Thus, determination of the extent of acinar inflammation (focal vs. diffuse) is now recognized as being the most important prognostic factor for the development of chronic rejection/graft sclerosis (23).

*Intimal arteritis* defined by the adherence of mononuclear inflammatory cells to the arterial endothelium and associated endothelial damage (lifting of the endothelium) is a more rare finding in pancreas allograft biopsies, mostly due to sampling issues (3). This lesion is, however, clinically important because is more refractory to antirejection treatment (i.e. 50% to pulse steroids and 71% response to pulse steroids + antilymphocytic drugs) (21). In addition, similar to other solid organs, intimal arteritis is a precursor of transplant arteriopathy (proliferative endarteritis) a lesion typically seen in the vessels of patients presenting with late graft thrombosis (7).

*Transplant arteritis* defined as fibrinoid necrosis of the arterial walls with transmural mixed inflammation is the most severe manifestation of acute rejection but is fortunately very rare in occurrence, Response to antirejection treatment in patients with arteritis has been reported to be less than 20% (21). The presence of arteritis indicates a very high risk for graft thrombosis and infarction (3).

When acute rejection results in acute ischemic injury associated with confluent areas of parenchymal necrosis patients present with hyperglycemia and the prognosis is dismal (3, 7, 21).

*C4d positivity - acute humoral rejection*, akin to that seen in renal allografts, has recently been recognized in pancreas transplants in association to early graft failure. Histological evaluation demonstrates diffuse staining of capillaries with C4d stain. In a well documented report, graft dysfunction consisting of increase in serum amylase

and development of hyperglycemia occurred approximately one month post-transplantation. Donor specific antibodies were concurrently identified in serum. The patient was treated with rituximab and intravenous immunoglobulin, with resolution of the graft dysfunction (11).

The clinical implications of each of the various histological features of acute rejection are currently being considered in the process of updating the pancreas allograft grading scheme for acute rejection. A formal proposal for an actualized grading schema is being developed by an international panel of experts and will be presented at the next Banff Conference for Allograft Pathology (June 2007 in La Coruña, Spain).

## References

1. Gruessner, A.C., Sutherland, D.E. *Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004.* Clin Transplant 2005; 19: 433-455.
2. Kuo, P.C. et al. *Solitary pancreas allografts. The role of percutaneous biopsy and standardized histologic grading of rejection.* Arch Surg 1997; 132: 52-57.
3. Drachenberg, C.B. et al. *Evaluation of pancreas transplant needle biopsy: Reproducibility and revision of histologic grading system.* Transplantation 1997; 63: 1579-1586.
4. Bartlett, S.T. et al. *Equivalent success of simultaneous pancreas kidney and solitary pancreas transplantation. A prospective trial of tacrolimus immunosuppression with percutaneous biopsy.* Ann Surg 1996; 224: 440-449; discussion 449-452.
5. Klassen, D.K. et al. *Pancreas allograft biopsy: Safety of percutaneous biopsy-results of a large experience.* Transplantation 2002; 73: 553-555.
6. Humar, A. et al. *Chronic rejection: The next major challenge for pancreas transplant recipients.* Transplantation 2003; 76: 918-923.
7. Drachenberg, C.B. et al. *Pancreas transplantation: The histologic morphology of graft loss and clinical correlations.* Transplantation 2001; 71: 1784-1791.
8. Stratta, R.J. *Graft failure after solitary pancreas transplantation.* Transplant Proc 1998; 30: 289.
9. Stratta, R.J. *Patterns of graft loss following simultaneous kidney-pancreas transplantation.* Transplant Proc 1998; 30: 288.
10. Papadimitriou, J.C., Drachenberg, C.B., Klassen, D.K. et al. *Histological grading of chronic pancreas allograft rejection/graft sclerosis.* Am J Transplant 2003; 3: 599-605.
11. Melcher, M.L. et al. *Antibody-mediated rejection of a pancreas allograft.* Am J Transplant 2006; 6: 423-428.
12. Sibley, R.K. et al. *Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases.* Lab Invest 1985; 53: 132-144.
13. Thivolet, C. et al. *Serological markers of recurrent beta cell destruction in diabetic patients undergoing pancreatic transplantation.* Transplantation 2000; 69: 99-103.
14. Troppmann, C. et al. *Vascular graft thrombosis after pancreatic transplantation: Univariate and multivariate operative and nonoperative risk factor analysis.* J Am Coll Surg 1996; 182: 285-316.
15. Obermaier, R. et al. *Ischemia/reperfusion-induced pancreatitis in rats: A new model of complete normothermic in situ ischemia of a pancreatic tail-segment.* Clin Exp Med 2001; 1: 51-59.
16. Tyden, G. et al. *Recurrence of autoimmune diabetes mellitus in recipients of cadaveric pancreatic grafts.* N Engl J Med 1996; 335: 860-863.
17. Grewal, H.P. et al. *Risk factors for postimplantation pancreatitis and pancreatic thrombosis in pancreas transplant recipients.* Transplantation 1993; 56: 609-612.
18. Jennings, W.C., Smith, J., Corry, R.J. *Thrombosis in human pancreatic transplantation associated with elevated cyclosporine levels and possible protection by antihypertensive agents.* J Okla State Med Assoc 1990; 83: 255-257.
19. Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C. *The inflamed pancreas transplant: Histological differential diagnosis.* Semin Diagn Pathol 2004; 21: 255-259.

20. Steiniger, B., Klempnauer, J. *Distinct histologic patterns of acute, prolonged, and chronic rejection in vascularized rat pancreas allografts.* Am J Pathol 1986; 124: 253-262.
21. Nakhleh, R.E., Sutherland, D.E. *Pancreas rejection. Significance of histopathologic findings with implications for classification of rejection.* Am J Surg Pathol 1992; 16: 1098-1107.
22. Papadimitriou, J.C. et al. *Histologic grading of acute allograft rejection in pancreas needle biopsy: Correlation to serum enzymes, glycemia, and response to immunosuppressive treatment.* Transplantation 1998; 66: 1741-1745.
23. Papadimitriou, J.C. et al. *Effectiveness of immunosuppressive treatment for recurrent or refractory pancreas allograft rejection: Correlation with histologic grade.* Transplant Proc 1998; 30: 3945.
24. Papadimitriou, J.C., Drachenberg, C.B., Klassen, D.K. et al. *Diffuse acinar inflammation is the most important histological predictor of chronic rejection in pancreas allografts.* Transplantation 2006; 82(1 Suppl. 2): 223.

## Pancreas transplantation alone and pancreas after kidney transplantation

**J. Pratschke**

*Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité, Campus Virchow-Klinik, Universitätsmedizin Berlin, Germany.*

More than 23,000 pancreas transplantations have been performed with increasing tendency over the last decades. The majority of pancreas transplantations were performed with kidney transplantations as simultaneous pancreas-kidney transplantations. Most medical societies support the procedure for patients with type I diabetes that at the same time suffer from irreversible kidney failure. Despite current controversy pancreas transplantation alone or pancreas after kidney transplantation may be considered for patients with severe secondary complications as hypoglycemia, ketoacidosis, neuro- and retinopathy e.g. Due to its beneficial influence on the development of secondary complications single pancreas transplantation has been proposed increasingly as therapeutical approach for diabetic patients with good renal function or patients with a functioning renal allograft after loss of the transplanted pancreas. However historically the acceptability of the single pancreas transplantation as well as pancreas after kidney transplantation was low due to the relatively high rates of complications, a higher acute rejection rate and a reduced graft survival. Moreover it was described that the survival of patients with diabetes and preserved kidney function after single pancreas transplantation was decreased compared to patients receiving conventional therapy during waiting time. These retrospective studies focus on the observation period before 2003 and one of the main reasons for the inferior outcome of pancreas transplantation alone is the morbidity and mortality rate associated with the surgical transplant procedure. Nevertheless recent studies showed that pancreas transplantation alone leads to a significant improvement of diabetic nephropathy and kidney function and can sustain kidney function and therefore prevent the need of a kidney graft. Beside beneficial effects on glucose metabolism and kidney function it is also reported, that pancreas transplantation alone is effectively improving the quality of life of diabetics and may ameliorate cardiovascular risk factors and improve cardiac function and is by far the most effective treatment option. Additionally refinements in surgical procedure, a potent induction therapy and improvement in the postoperative treatment have lead to an overall decrease of complications after pancreas transplantation. In consequence, in experienced centers the complication rate after single pancreas transplantation is comparable to the outcome after simultaneous pancreas-kidney transplantation.

The issue of pancreas transplantation alone or pancreas after kidney transplantation remains still debatable. The possibility to prevent kidney failure and therefore avoid kidney transplantation by pancreas transplantation alone requests a serious consideration of risks and benefits of this procedure. Although recent publications are in favor of a single pancreas transplantation, a longer follow-up is requested to demonstrate persisting good long-term outcome. However, a pancreas after kidney transplantation is an attractive approach after loss of the pancreas graft or the availability of a suitable living kidney donor.



## PUENTES AL TRASPLANTE DE ÓRGANOS

### Preemptive transplantation

**A. Hartmann**

*Renal Section, Rikshospitalet University Hospital, Oslo, Norway.*

#### Background

Preemptive kidney transplantation (PKT) has been increasingly acknowledged for treatment of end-stage renal disease patients. In general PKT is recommended but is generally performed in less than about 10% of transplantations world-wide. In living donor transplantation the rates are somewhat higher, up to 25% in many reports. In Norway we have used live donors (LD) and also elective preemptive deceased donors (DD) transplantation actively since the transplant program was launched in 1969. We have performed over 3000 DD transplantations and 2000 LD transplantations at our centre serving the whole country.

#### Results

From 1989 through 2004 we performed 2992 first kidney transplantations, 710 were PKT's (24%). Preemptive patients had more LD (64% vs 36%,  $p < 0.001$ ), had less occurrence of PRA (6% vs 3%,  $p < 0.01$ ), had less diabetes nephropathy (7% vs 14%,  $p < 0.001$ ) and were on average 11 years younger ( $p < 0.001$ ). Actuarial patient survival in PKT patients was 96% at one year, 88% at 5 years and 77% at 10 years. Patient and uncensored graft survival were significantly better in PKT patients with DD ( $p < 0.001$ ), but no difference was seen in LD recipients ( $p = 0.1$ ). Death censored graft survival was equal for PKT patients and those transplanted after start of dialysis, both in the LD and the DD group. In a multiple Cox model addressing uncensored graft losses we included PKT, recipient and donor age, recipient sex, PRA positivity, DR mismatches (0 vs 1 or 2) and diabetes nephropathy versus other diagnoses as covariates. Analysis of the DD cohort revealed PKT (RR = 0.63,  $p = 0.0003$ ) and also all the other covariates except recipient sex as independent risk factors whereas the same analysis of the LD cohort did not show any benefit of PKT (RR = 1.13,  $p = 0.28$ ) but the other covariates had similar impact as in DD transplant recipients.

#### Conclusion

In our series preemptive transplantation yielded better survival after DD transplantation but the benefit was not seen in LD, perhaps in part due to very short dialysis times in this cohort. PKT is advantageous also for convenience and cost and thus the present study support the general view that preemptive transplantation is the optimal solution for renal-end-stage patients.

### Hígado artificial

**R. Bañares**

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España.*

La posibilidad de sustituir la función de cualquier órgano aguda o crónicamente enfermo es una de las mayores aspiraciones de la medicina, con un grado de desarrollo claramente variable en función de los órganos afectados. En



algunos casos, como el de la diálisis para suplir el riñón, hay procedimientos que constituyen una realidad clínica universalmente validada y adoptada; sin embargo, en otros casos, como el del cerebro, es hoy por hoy una perspectiva irreal. En este contexto, el desarrollo del soporte hepático artificial es una antigua aspiración de la hepatología que ha pasado por diferentes alternativas fundamentalmente determinadas por el desarrollo conceptual de la propia especialidad y el crecimiento tecnológico. En este sentido, uno de los acontecimientos recientes de mayor importancia en el campo del soporte hepático artificial es el desarrollo de la diálisis de albúmina. Este procedimiento, basado en la capacidad detoxificante de la albúmina, que ha demostrado su efecto sobre alteraciones biológicas características de la insuficiencia hepática, ha puesto de nuevo sobre la mesa la posibilidad de evaluar en la práctica clínica tanto la fisiopatología de la insuficiencia hepática aguda como la delimitación de la utilidad de un dispositivo de soporte hepático artificial.

### Delimitación conceptual de la insuficiencia hepática

La insuficiencia hepática puede presentarse en la práctica clínica en dos escenarios claramente delimitados. El primero de ellos, la insuficiencia hepática fulminante o insuficiencia hepática aguda grave (*acute liver failure*) tiene una definición clásica que está marcada por la presencia de una enfermedad de corta evolución (ocho semanas) que aparece sobre un hígado previamente sano y cursa con deterioro de la función hepática (coagulopatía) y la aparición de encefalopatía hepática. El paradigma de esta situación es la hepatitis fulminante; en este caso es posible la reversibilidad completa del daño de la anatomía del hígado, así como de su función. El segundo escenario, la insuficiencia hepática crónica reagudizada (*acute-on-chronic liver failure*) se define de manera imprecisa como el deterioro agudo de la función hepática (ictericia, coagulopatía, encefalopatía) en pacientes portadores de una enfermedad crónica, asociado a la presencia de un desencadenante (ingestión de alcohol, hepatitis sobreañadida, etc.). Como en el caso de la insuficiencia hepática fulminante, es posible la recuperación de la función hepática hasta la situación de partida. Aunque cada una de estas situaciones tiene claras diferencias, existen elementos comunes en ambos escenarios, como la presencia de una enfermedad de corto tiempo de evolución, la afectación de órganos vulnerables (fundamentalmente el cerebro, el riñón y el equilibrio circulatorio) y la posible reversibilidad del cuadro.

### Necesidad clínica de los sistemas de soporte artificial

En los últimos años se han producido importantes avances para el tratamiento de las diferentes enfermedades hepáticas, que abarcan desde el desarrollo de alternativas farmacológicas en la terapéutica de las hepatitis virales o el control de las complicaciones de la hipertensión portal, hasta la amplia consolidación del trasplante como tratamiento de la enfermedad hepática grave aguda o crónica. Sin embargo, el tratamiento de la insuficiencia hepática, tanto aguda como crónica reagudizada, sigue basándose fundamentalmente en el soporte de los órganos afectados a la espera de la posibilidad de un trasplante hepático. Por otra parte, el trasplante no es una alternativa universalmente aplicable, tanto por la existencia de contraindicaciones (comorbilidad grave, presencia de infecciones, etc.), como por la controversia en su indicación (hepatitis aguda alcohólica, postoperatorio de cirugía hepática, etc.). Por otra parte, y aunque la disponibilidad de un hígado en breve plazo es prácticamente la norma en España, el soporte de la función hepática hasta la donación efectiva es claramente un objetivo esencial. Además, es posible que el soporte artificial de la función hepática durante un intervalo de tiempo suficiente facilitara en algunos pacientes la recuperación espontánea de la función y de la integridad anatómica del hígado, permitiendo evitar las consecuencias a largo plazo del tratamiento inmunosupresor, aspecto que adquiere especial relevancia cuando se considera que una buena parte de los pacientes con insuficiencia hepática fulminante son jóvenes.

Asimismo, uno de los problemas más acuciantes en pacientes en espera de un trasplante hepático es el deterioro progresivo de la función hepática y la muerte en lista de espera, que se acerca al 10% en la mayor parte de las unidades de nuestro país. La disponibilidad de un procedimiento de soporte transitorio de la función hepática supone una razonable aspiración terapéutica. Por todo ello, una de las mayores aspiraciones terapéuticas en la hepatología moderna es el desarrollo de procedimientos de soporte hepático artificial.

## Objetivos teóricos del soporte hepático artificial

Los objetivos de las alternativas de soporte hepático artificial pueden delimitarse desde un punto de vista teórico en objetivos primarios y secundarios. Los objetivos primarios consistirían en la normalización completa de la función y anatomía del hígado en la insuficiencia hepática fulminante o en la restitución de la funcionalidad hepática al estado previo a la descompensación aguda en pacientes con insuficiencia hepática crónica reagudizada. Como objetivos secundarios, los sistemas de soporte artificial podrían servir de puente hasta el trasplante hepático, prevenir la progresión de la insuficiencia hepática o facilitar el soporte del fallo multiorgánico.

## Perspectiva general de los procedimientos de soporte hepático artificial

Existen diferentes procedimientos teóricos para facilitar el soporte hepático artificial: el trasplante hepatocitario orto o heterotópico, la perfusión cruzada a través de hígados de animales (primates y cerdo), la implantación de dispositivos constituidos por una matriz biocompatible cubierta de hepatocitos y, por último, la perfusión a través de dispositivos de circulación extracorpórea. De todos ellos, los dispositivos de circulación extracorpórea son los más ampliamente evaluados.

Desde el punto de vista de la presencia o no de elementos celulares en la constitución de los dispositivos extracorpóreos se puede diferenciar entre dispositivos biológicos (que incorporan elementos celulares procedentes de líneas celulares humanas o de animales; Hepat-assist) o dispositivos detoxificantes (en los cuales se produce un proceso de detoxificación a través de diferentes procedimientos dialíticos; MARS, Prometheus).

### *Sistemas bioartificiales*

Un sistema de soporte bioartificial consta básicamente de un número determinado de células hepáticas procedentes de diversas fuentes introducidas en un biorreactor, donde son inmovilizadas, cultivadas e inducidas a desarrollar funciones que les son propias mediante la perfusión a su través de sangre o plasma de pacientes con insuficiencia hepática. La complejidad de este tipo de dispositivos es enorme, tanto por las dificultades en la obtención y mantenimiento de la base celular como por el diseño de la matriz que soporta las células, de manera que el desarrollo futuro de los dispositivos bioartificiales requiere la solución de los siguientes problemas:

- 1) Asegurar la adecuada oxigenación del biorreactor. Teniendo en cuenta el elevado consumo de oxígeno de los hepatocitos, es imprescindible disponer de una adecuada fuente de oxígeno para garantizar la viabilidad de las células del sistema, para lo cual existen diferentes soluciones técnicas en fase de desarrollo.
- 2) Asegurar la viabilidad celular y la interacción célula-célula. Las células hepáticas mantenidas en cultivos pierden rápidamente su capacidad de interacción y de diferenciación, incluyendo la formación de canalículos biliares y el desarrollo de uniones intercelulares. Para ello es importante la optimización de la matriz extracelular, que no debe ser simplemente un procedimiento de soporte, sino que debe aportar la posibilidad de mantener las características funcionales propias de los hepatocitos in vivo.
- 3) Obtención de células. Si bien las células humanas son obviamente las ideales para el aislamiento y cultivo, la necesidad de órganos completos para trasplante impide destinar las células procedentes de estos órganos como fuente de cultivos celulares; ello ha motivado la utilización de hepatocitos animales, fundamentalmente porcinos, procedentes de animales libres de patógenos y de escasa capacidad inmunogénica. Sin embargo, el desarrollo de la tecnología asociada a las células madre abre numerosas posibilidades futuras. Los tipos de células madre candidatos a su utilización como soporte celular en los biorreactores pueden ser hepáticos (hepatocitos maduros, células ovales, hepatoblastos, etc.) y extrahepáticos (células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales). Sin embargo, la tecnología asociada a la utilización de células madre debe solventar diferentes problemas, como el mantenimiento de su capacidad proliferativa (hasta alcanzar al menos 10 billones de células, cantidad mínima necesaria para un sistema de soporte hepático artificial), la necesidad de asegurar su diferenciación

en hepatocitos maduros funcionales y, por último, el extraordinario coste actual, que debe disminuir claramente antes de poder extender su utilización en dispositivos clínicamente aplicables.

### *Sistemas de detoxificación*

Si bien, desde un punto de vista teórico, la incorporación de elementos celulares es atractiva, el desarrollo actual se ve dificultado por la falta de demostración de una actividad biosintética clara (posiblemente debido a la insuficiente masa celular o su escasa viabilidad y funcionalidad), por la dificultad en la obtención, mantenimiento y manufacturación de los elementos celulares y por la ausencia de otros tipos celulares diferentes de hepatocitos. Por tanto, la mayor parte de la información clínica disponible o en fase de desarrollo se centra en los procedimientos extracorpóreos de detoxificación, basados en la depuración de las sustancias tóxicas asociadas a la insuficiencia hepática ligadas o no a la albúmina y potencialmente responsables de la disfunción multiorgánica.

Actualmente hay dos dispositivos disponibles o en fase de desarrollo: la diálisis de albúmina (MARS: acrónimo de *molecular adsorbent recirculating system*) y la plasmaseparación fraccionada y adsorción (Prometheus). El primero de estos procedimientos ha sido mucho más evaluado en la literatura.

El sistema Prometheus se basa en la plasmaseparación a través de una membrana especialmente diseñada (albu-flow) que permite el paso de la albúmina del paciente pero no de células ni otras sustancias de mayor peso molecular. El plasma así separado es perfundido a través de dos sistemas de adsorción que permiten la eliminación de las sustancias ligadas a la albúmina. El plasma separado y adsorbido es posteriormente dializado mediante un dializador de alto flujo. Los datos preliminares indican que la eficacia para la disminución de bilirrubina del sistema Prometheus es superior a la del sistema MARS, si bien parece asociarse a mayor inestabilidad y no modifica las alteraciones hemodinámicas propias de la insuficiencia hepática.

## **Eficacia clínica de los procedimientos de soporte artificial**

A pesar del indudable atractivo asociado a la idea del soporte hepático artificial, la información disponible en ensayos aleatorizados es escasa, procede de épocas cronológicas diferentes y poco comparables y agrupa diferentes procedimientos y dispositivos. Recientemente se han publicado dos metaanálisis que han pretendido aportar información adicional. Básicamente, y a pesar de sugerir efectos beneficiosos, fundamentalmente en la insuficiencia hepática crónica agudizada, ambos metaanálisis indican la necesidad de desarrollar estudios aleatorizados de diseño adecuado y con variables clínicamente relevantes como objetivo principal. Así pues, no existe en el momento actual una respuesta convincente acerca del efecto sobre la supervivencia del tratamiento mediante soporte artificial en pacientes con insuficiencia hepática.

Afortunadamente, están en marcha varios estudios adecuadamente diseñados que exploran la eficacia de la diálisis de albúmina en pacientes con insuficiencia hepática aguda y con insuficiencia hepática crónica reagudizada.

## **Perspectivas de futuro**

La necesidad de disponer de procedimientos de soporte hepático artificial sigue siendo evidente; a pesar de la escasez de datos sólidos en el momento actual, es de esperar que el desarrollo tecnológico podrá facilitar la elaboración de nuevos dispositivos de mayor eficacia y seguridad. Por otra parte, es imprescindible que el desarrollo científico se atenga a un diseño metodológicamente irreprochable y responda preguntas relevantes tanto en relación con la selección de variables clínicas como en la valoración de los cambios fisiopatológicos propios de esta apasionante entidad.

## NUEVOS ASPECTOS DE LA MONITORIZACIÓN DE LA INMUNOSUPRESIÓN: PAPEL DE LA FARMACOGENÉTICA Y DE LA FARMACODINAMIA

### Biomarkers for monitoring pharmacodynamic interactions of immunosuppressants

**M.J. Barten**

*University Hospital Jena, Department of Cardiac and Thoracic Surgery, Friedrich-Schiller University Jena, Germany.*

Current practice of immunosuppressive therapy after organ transplantation is to combine cyclosporine (CsA) or tacrolimus (TRL) with either sirolimus (SRL) or mycophenolate mofetil (MMF). However, conventional therapeutic drug monitoring (TDM) of blood or plasma levels of these immunosuppressants may not necessarily predict the pharmacologic effects on immune cells (pharmacodynamic, PD). Furthermore, the current practice of combinations of immunosuppressive drug therapy may be associated with synergistic and antagonistic effects. Additional, inter-subject variability may occur in the sensitivity to suppression of immune function. Therefore the optimisation of immunosuppressive multi-drug regimens is difficult to obtain with drug levels alone and the common problem of chronic over immunosuppression should be avoided. Against this background numerous attempts have been made to develop appropriate biomarkers to complete drug monitoring by measuring therapeutic benefit (1).

The basis of our PD assays to assess drug interactions relies on the following methods (2): 1. whole blood as the matrix of choice to reflect the effects of immunosuppressive drugs *in vivo*; 2. flow cytometry for analysis; 3. biomarkers of T cell function like proliferation (proliferating nuclear antigen, PCNA) and expression of surface antigens, all of which have potential roles in co-stimulation (CD25, CD71), adhesion (CD134, CD154) and apoptosis (CD95) of the immune response. *In vitro*, different concentrations of CsA or TRL were added to whole blood of human healthy volunteers together with different concentrations of either SRL or mycophenolic acid (MPA) (2). In our experimental model we obtained blood from non-transplanted rats to compare *ex vivo* PK/PD relationships of SRL and MMF mono-therapy with SRL and MMF combination therapy with calcineurin-inhibitors (3, 4).

*In vitro*, MPA acts in combination with CsA or TRL synergistically at low concentrations to inhibit T cell proliferation (PCNA). Increasing concentrations of MPA antagonizes the CsA or TRL effect on T cell proliferation. MPA concentrations potentiates independently synergistic the TRL effect to inhibit expression of T cell surface antigens, whereas in combination with CsA the effect of MPA on T cell surface antigens (CD71, CD95, CD134, CD154) is antagonistic regardless of the concentrations used, despite an independently synergistic effect at the lowest concentrations on CD25 expression. Independent synergism as using low concentrations of MPA indicates that different transduction pathways are impaired (2).

Furthermore, *in vitro* low concentrations of SRL acts synergistic in combination with CsA or TRL in the inhibition of expression of PCNA. The effect of SRL on the expression of T cell surface antigens is synergistic in combination with TRL and in combination with CsA the effect of SRL ranged from synergistic (CD154) to independently synergistic (CD25, CD95). Higher SRL concentrations act antagonistically in combination with CsA or TRL with respect to T cell function. Concentrations producing synergistic effects in our study are comparable for MPA to subclinical concentrations of MPA and, in the case of CsA, TRL and SRL are comparable with low to high clinical concentrations, respectively [2].

The effect of MPA on T cell proliferation and the effect of SRL on both T cell proliferation and surface antigen expression in combination with either CsA or TRL describe initial synergistic effects followed by antagonistic effects with increasing concentrations which occur at the same time in experiments with partial agonists (2).

In the rat model the overall dynamics of inhibition of T cell proliferation is higher after combination of increasing doses of CsA with SRL therapy compared to SRL mono-therapy. Although SRL blood exposure is similar in the mono-therapy and combination groups, addition of CsA increases the overall inhibition of T cell function compared with 3 mg/kg SRL mono-therapy. Interestingly, despite significant differences in the maximal blood CsA concentrations by doubling the CsA dose (2.5 and 5 mg/kg), no difference is observed between the mono-therapy and combination groups regarding the maximal inhibition of T cell proliferation (PCNA). Whereas an increased maximal inhibition of T cell surface antigens (CD11a, CD25, CD71, CD134) expression is found after combination drug therapy compared with SRL mono-therapy. An explanation of these findings might be the difference in the mode of action during the cell cycle for SRL and CsA. Furthermore, the addition of higher dose levels of CsA to SRL have no additive PD effects on T cell function which may be explained by an antagonistic interaction using higher dose levels of these two drugs as observed *in vitro* (3).

In the same animal model the overall inhibition of T cell function is higher for each of two MMF doses (2.5 mg/kg or 5 mg/kg) combined with CsA (5 mg/kg) or TRL (4 mg/kg) drug therapy compared to MMF mono-therapy. Inhibition of T cell proliferation is nearly complete for the combination of the highest drug dose levels, compared to a lower inhibitory effect on T cell surface antigen expression. The extent of inhibition of T cell function is higher if TRL is combined with MMF compared to the extent of inhibition for the combinations of CsA with MMF. The highest inhibitory effect on T cell function is observed 2 or 6 h after dosing for all combinations of MMF plus CsA or TRL, but a considerable recovery of lymphocyte function is observed 48 h after dosing for all drug combinations. Despite the 2-fold increase in the MPA-AUC<sub>0-24</sub> and comparable high AUC<sub>0-24</sub> for CsA and TRL, the inhibitory effects of 5 mg/kg MMF plus CsA or TRL on T cell function is significantly different only at time points of maximal inhibition (C<sub>2</sub> or C<sub>6</sub>) compared to the inhibitory effect of the combinations with 2.5 mg/kg of MMF plus CsA or TRL. However, the inhibitory effects between both MMF doses plus TRL on T cell surface antigens do not differ at any time point (4). This confirms our *in vitro* results that higher MPA concentrations do not have additive or synergistic effects.

In conclusion, such PD assays which focus on the end products of specific intracellular biochemical pathways in T cells allow the assessment of the combined response of drugs acting together on different mechanisms of action, which are likely to be responsible for suppressing immune functions. Recently, a novel approach explores lymphocyte apoptosis in whole blood as a concept for a biomarker linked PD monitoring of drug combination therapy after heart transplantation (5). Overall, the presented data indicate the potential of measuring PD of drug combination therapy to enhance PK measurements for efficient use of agents like SRL and MMF resulting in reduction or elimination of calcineurin-inhibitors without increasing the risk of rejection. In the future the recent rapid advances in our scientific understanding of both the clinical chemistry and genomics will develop diagnostic assays of biomarkers for PK, PD and for pharmacogenetics which should be the foundation for establishing individualized therapy after organ transplantation.

## References

1. Oellerich, M., Barten, M.J., Armstrong, V.W. *Biomarkers the link between therapeutic drug monitoring and pharmacodynamics*. Ther Drug Monit 2006; 28: 35-38.
2. Barten, M.J., Dhein, S., Chang, H. et al. *Assessment of immunosuppressive drug interactions: Inhibition of lymphocyte function in peripheral human blood*. J Immunol Meth 2003; 283: 99-114.
3. Barten, M.J., Streit, F., Boeger, M. et al. *Synergistic effects of sirolimus with cyclosporine and tacrolimus: Analysis of immunosuppression on lymphocyte proliferation and activation in rat whole blood*. Transplantation 2004; 77: 1154-1162.
4. Barten, M.J., Shipkova, M., Bartsch, P. et al. *Mycophenolic acid interaction with cyclosporine and tacrolimus in vitro and in vivo*. Ther Drug Monit 2005; 27:123-131.
5. Boldt, A., Barten, M.J., Sagner, A. et al. *The influence of immunosuppressive drugs on T-cell and B-cell apoptosis via p53-mediated pathway in vitro and in vivo*. Transplantation 2006; 15: 422-428.



## Pharmacogenetics of tacrolimus and sirolimus in renal transplant patients: From retrospective analyses to prospective studies

D. Anglicheau

*Service de Transplantation Rénale et de Soins Intensifs, Hôpital Necker, Paris, France.*

### Introduction

It is well recognized that different transplant recipients respond in different ways to immunosuppressive medication. The inter-individual variations are greater than the intra-individual variations, a finding consistent with the notion that inheritance is a determinant of drug responses. The promises of pharmacogenetics are to elucidate the inherited basis of differences between individual responses to drugs, in order to identify the right drug and dose for each patient. The recent identification of genetic polymorphisms in drug metabolizing enzymes and drug transporters led to the hypothesis that genetic factors may be implicated in the inter-individual variability of the pharmacokinetic or pharmacodynamic characteristics of immunosuppressive drugs, major side effects, and efficacy.

The purpose of this paper is to provide a short overview of recent results obtained in the field of pharmacogenetics of tacrolimus (Tac) and sirolimus (Srl), and to discuss if a genetic approach, in association with therapeutic drug monitoring, may limit the pharmacokinetic variations observed among individuals.

### Tacrolimus and sirolimus pharmacological characteristics

At present, in most transplant centers, calcineurin inhibitors, namely cyclosporine and Tac, represent the cornerstone of immunosuppressive therapy after solid organ transplantation. More recently, the mTOR inhibitors Srl and everolimus have been approved in place of or in synergy with the calcineurine inhibitors.

Despite their effectiveness, the clinical use of these drugs is hampered by a number of pharmacological challenges. These immunosuppressive drugs are characterized by a narrow therapeutic index. Overdosing increases the risk of dose-related side effects, including for example the risk of nephrotoxicity with Tac, and increases susceptibility to infection for both drugs, whereas underdosing increases the risk of transplant rejection and graft loss or damages. This situation is further complicated by the large inter- and intra-individual variations in drugs pharmacokinetic characteristics. To avoid over- or underimmunosuppression, therapeutic drug monitoring is performed. Dosage regimens are usually adjusted in order to reach a pre-defined target blood concentration that has been associated with the optimal balance between efficacy and toxicity.

It is well known that a significant part of the inter-individual variations in these drugs results from variability in the expression and/or function of the cytochrome P450 3A (CYP3A) enzymes and of the multidrug transporter P-glycoprotein (Pgp). Even though many non genetic factors such as organ function or drug interactions may be involved, there have been significant recent advances in the definition of genetic factors that impact on immunosuppressive drugs pharmacokinetics. CYP3A and Pgp are expressed not only in the liver but also in the intestinal wall where they are responsible of intestinal metabolism. The recent identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes led to the hypothesis that genetic factors may be involved in the inter-individual variability of the pharmacokinetic or pharmacodynamic characteristics of immunosuppressive drugs.

Of the four identified members of the CYP3A subfamily, CYP3A4 and CYP3A5 are the major enzymes responsible for drug metabolism in adults. These enzymes are known to be highly variable among individual and more than 80% of this variability has been linked to genetic factors. Since the past 5 years, several SNPs have been described in the CYP3A genes, particularly in the CYP3A4 and CYP3A5, and also in the pseudogene CYP3A1. Regarding CYP3A5 gene, the most common and functionally important variant is an intronic SNP, namely CYP3A5\*3.

This SNP is located in intron 3. It is responsible for an alternative splicing resulting in the production of a truncated protein. This means that *CYP3A5*\*3/\*3 genotype carriers do not express the enzyme. Among *CYP3A5*\*3/\*3 subjects, *CYP3A5* expression comprises only 4.2% of total CYP3A in the liver and 2.7% of total CYP3A in the jejunum. Among heterozygous *CYP3A5*\*1/\*3 subjects, however, *CYP3A5* expression is appreciable, with about 50% of total CYP3A in the liver and 61% of CYP3A in the jejunum.

Pgp acts as a transmembrane efflux pump involved in export of xenobiotics from inside the cells. Present in various epithelial and endothelial cells, including the gut epithelial cells, Pgp affects the absorption of drugs from the gut, their distribution among the body's compartments and their metabolism and excretion. In the gut, a strong expression of Pgp lowers the substrates absorption. Conversely, alteration in expression raises this drug absorption. *MDR1* SNPs have been recently described.

### Tacrolimus pharmacogenetics

As regard to *CYP3A* SNPs, most pharmacogenetic studies have identified a significant association between various SNPs located in the *CYP3A* genes cluster and the pharmacokinetic characteristics of Tac. These SNPs are located in the 5'-flanking region of the *CYP3A4* gene (*CYP3A4*\*1B allele), in the *CYP3AP1* pseudogene (*CYP3AP1*\*3 allele), and in the *CYP3A5* gene (*CYP3A5*\*3 allele). However, since there is a tight linkage disequilibrium between these 3 SNPs, this suggests that ultimately the *CYP3A5*\*1/\*3 SNP alters Tac dose requirements.

If Tac dose requirement has been repeatedly found to be 30-50% higher in patients expressing the *CYP3A5* enzyme, the data on the influence of the *MDR1* genotypes are more questionable. We have demonstrated in accordance with MacPhee et al. a slight but significant association between *MDR1* SNPs and Tac dose requirements. However, negative studies demonstrate that this gene appear to contribute little to the interindividual variations of Tac pharmacokinetics.

### Sirolimus pharmacogenetics

As regard to Srl dose requirements, very similar data have been obtained in patients on primary Srl therapy. We first reported the association between *CYP3A* and *MDR1* genetic polymorphisms and Srl pharmacokinetics demonstrating that patients expressing the *CYP3A5* enzyme (*CYP3A5*\*1 carriers) require more Srl to reach target predose concentrations compared with *CYP3A5*\*3/\*3 carriers. These results were recently confirmed by Le Meur et al. During the first 3 months after transplantation, the mean Srl trough levels in *CYP3A5* expressors are below target, whereas these trough levels in *CYP3A5* non expressors are above desired target leading to an increased risk of drug toxicity.

### Perspectives

The genetic basis of the interindividual variations of immunosuppressive drugs pharmacokinetics and pharmacodynamics is clearly not related to a single genetic polymorphism but probably to many variants in genes implicated in absorption, metabolism, transport, distribution, drug receptors and targets. The first perspective in the field of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs is to investigate the combined effect of many different SNPs in different genes. Increasing technological advances in molecular biology such as the combined use of SNPs and DNA chip technology, and biocomputing, will allow the screening and analysis of thousands of SNPs in one assay, that might further improve predictions prior to transplantation to define genetic backgrounds with different pharmacokinetic/dynamic profiles. Genes implicated in both efficacy and safety of a drug, including immunogenetics, will be included in the tested SNPs.

The second challenge will be to move from the retrospective studies described above to prospective randomized studies to explore if a pharmacogenetic approach taken into account a limited number of SNPs would be useful to guide initial dosing of a given drug. Because the association between Tac dose requirement and *CYP3A5* polymorphism has been clearly suspected by many retrospective studies, and indicates that pharmacogenetic analysis may assist in guiding individual Tac dosing, a prospective, randomized, multicenter study was initiated in France with the aim to explore the benefit of a *CYP3A5* genotyping before starting a Tac treatment in kidney transplant patients. Patients are randomized to receive Tac either at a conventional dose, or at an initial dose according to their *CYP3A5* genotype. This study will be one of the first prospective studies in this field, and will permit to formally test if a genetic approach, in association with therapeutic drug monitoring, may limit the pharmacokinetic variations observed among individuals.

The last one is based on “target” pharmacogenetic to investigate the role of the polymorphisms of other genes implicated in the efficacy and/or safety of the drug.

## ADAPTACIÓN RENAL POSTRASPLANTE

### Cellular senescence in chronic allograft nephropathy

**A. Melk**

*Division of Pediatric Nephrology, Children's Hospital, University of Heidelberg, Germany.*

Allograft nephropathy (AN), which means tubular atrophy, interstitial fibrosis and loss of renal function, occurs commonly in renal transplants. We have previously postulated that the powerful effect of old donor age on transplant outcome, and the similarity of the lesions of renal aging to some of the histologic lesions seen in AN suggest that somatic cell limitations –i.e. cellular senescence– contribute to aging, AN and potentially other progressive kidney diseases (1-3). We subsequently examined the features of somatic cell senescence in rat, mouse and human kidneys with age and after transplantation (4-7). As outlined below, the evidence supports the hypothesis. In particular, all three species show increased expression of the cell cycle inhibitor p16<sup>INK4a</sup> (p16 from here on) and human kidneys also manifest telomere loss in cortex with age. The presentation is going to cover previous work and will expand to ongoing studies that explore the effect of transplant stresses on the expression of features of somatic cell senescence.

#### Telomere shortening in human kidneys with age

We explored the relationship between age and telomere length in human kidneys (5). Comparison of terminal restriction fragments (TRF) in human kidneys showed that telomere length was greater in cortex than in medulla of young kidneys. Significant telomere loss occurred in cortex with aging. This age-dependent telomere loss in renal cortex could be relevant to the loss of mass and cells in the cortex during aging.

#### Other features of human kidney aging

We evaluated the relationship between renal age in humans and a number of phenomena associated with cellular senescence *in vitro* (6). Human kidneys expressed relatively constant levels of mRNA for most genes related to senescence, except for the cell cycle inhibitor p16, which emerged as the marker that showed the strongest association with renal aging on both mRNA and protein expression levels. Proliferation as measured by Ki-67 expression (a nuclear antigen expressed in proliferating cells) was inversely correlated with p16 as an irreversible inhibitor of the cell cycle. Cyclooxygenase 1 and 2 mRNA expression was low in kidneys from young children but elevated in older kidneys, associated with increased protein expression by immunohistochemistry. Age-related fibrosis and tubular atrophy (nephron loss) correlated with p16, p53, cyclooxygenase 1, TGF-β1 and heat shock protein A5 expression. Glomerulosclerosis correlated only with the expression of p16 and p53. Thus changes observed in cellular senescence *in vitro* do occur in human kidney with age, particularly in the renal cortex, and correlate with histological features and Ki-67. P16 emerges with the most consistent correlations with age, histological changes, and loss of cell replication, but we also note evidence for a role of p53 and other genes.

#### Microarray studies in human aging

The results from microarray studies on human kidneys of various ages indicate that human transcriptome is remarkably stable over 88 years of life at the whole kidney level. Thus the cells that become abnormal with age may

be transcriptionally silenced or eliminated. Some older kidneys showed an increase in immunoglobulin genes, compatible with a low level of B cell/plasma cell infiltration with age.

## Renal senescence in rat and mouse

We compared the structural and functional changes in rat kidney with age to the phenomena associated with cellular senescence *in vitro* (4). Rat kidney telomeres were much longer than human telomeres, approximately 35-40 kb, and did not shorten significantly over 24 months. Expression of mRNA for p16 was undetectable in most young rats but rose 27-fold during growth and a further 72-fold during aging. P16 protein was localized to the nucleus and increased with age. Lipofuscin and senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -GAL) increased in epithelium with age. Lipofuscin was further increased in atrophic nephrons. We conclude that cell senescence occurs in both growth and aging in rat kidney, and may contribute to the age-related pathology. Thus despite the absence of telomere shortening, rat kidney develops some striking features of cell senescence both in apparently normal epithelium and in atrophic epithelium, perhaps reflecting cumulative environmental stress.

Mouse kidneys at 18 months show only minor changes in kidney histology, and less lipofuscin and SA- $\beta$ -GAL than old rat kidneys (unpublished data). Like rat kidneys, telomeres were very long and did not shorten critically with age. Expression of telomere regulating genes (Tert, TRF1, TRF2) was highest in newborns but was sustained throughout life. The most striking change associated with age was again the expression of senescence associated cell cycle inhibitor p16, which was very low in newborns, increased 10-fold by 3 months and another 10-fold in 18 months old kidneys. P16 was expressed with age in all renal cell types, particular in tubular nuclei. P16 mRNA also increased in brain and heart with aging. P19<sup>ARF</sup> was high in newborn kidney, fell during development and rose again in old mice. The other candidate senescence genes, such as PCNA, Hsp70, TGF- $\beta$ , HIC-5, SMP30, GADD45 and SMP30, had their highest expression with development, not in old mice. The progressive p16 expression with age despite a benign histological phenotype suggests that many cells over time become senescent with irreversible cell cycle arrest without leading to disturbances regarding histopathology and function. But the accumulation of p16 positive senescent cells could severely limit organ homeostasis when abnormal environmental stresses are encountered. We were able to show this in our experiments on acute rejection in old mice.

## Acute rejection induces senescence features in mouse kidney, and old kidneys show increased susceptibility

We have studied a mouse model that mimics two processes during clinical transplantation: transplantation stress and acute rejection. Transplant rejection induced p16, on the mRNA and protein level, in both young (3 months) and old (18 months) kidney allografts. However, induction was detectable in old allografts by day 7, along with severe tubular atrophy. Young allografts only showed induction at day 21 after severe and prolonged rejection. At day 7, old donor kidney isografts also developed tubular atrophy, indicating increased vulnerability of the old tissue to environmental stress. Tubules in old kidneys also showed a loss in tubular cell nuclei. The number of tubular cells remained constant in grafts from young mice. Rejection was very similar in old and young allografts as seen in similar Banff scores, MHC expression, cellular infiltrate, expression of cytotoxic T cell genes and IFN- $\gamma$ . Thus older age alters the way that kidneys react to transplantation and rejection stress, consistent with abnormal fragility of senescent cells to stresses surrounding transplantation (unpublished data).

## Human kidneys with allograft nephropathy (AN) and other chronic renal diseases develop p16 expression

To examine the hypothesis that AN and other renal diseases show accelerated senescence, we compared p16 protein expression in human renal transplant biopsies taken at the time of transplantation with a biopsy of the same kid-



ney diagnosed with AN (7). We found that p16 was strongly induced in kidney transplants with tubular atrophy and interstitial fibrosis compared to the biopsy of the same kidney at the time of transplantation. The changes in p16 expression seen in AN biopsies occurred at a mean period of time that was less than five years, and were more severe than observed previously in normal aging, consistent with accelerated senescence.

## References

1. Halloran, P.F., Melk, A., Barth, C. *Rethinking chronic allograft nephropathy: The concept of accelerated senescence.* J Am Soc Nephrol 1999; 10: 167-181.
2. Melk, A., Halloran, P.F. *Cell senescence and its implications for nephrology.* J Am Soc Nephrol 2001; 12: 385-393.
3. Melk, A. *Senescence of renal cells: Molecular basis and clinical implications.* Nephrology Dialysis Transplantation 2003; 18: 2474-2478.
4. Melk, A., Kittikowit, W., Sandhu, I. et al. *Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening.* Kidney Int 2003; 63: 2134-2143.
5. Melk, A., Ramassar, V., Helms, L.M.H. et al. *Telomere shortening in kidneys with age.* J Am Soc Nephrol 2000; 11: 444-453.
6. Melk, A., Schmidt, B.M., Takeuchi, O. et al. *Expression of p16<sup>INK4a</sup> and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney.* Kidney Int 2004; 65: 510-520.
7. Melk, A., Schmidt, B.M.W., Vongwiwatana, A., Rayner, D.C., Halloran, P.F. *Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16<sup>INK4a</sup> in deteriorating renal transplants and diseased native kidney.* Am J Transplant 2005; 5: 1375-1382.

## Crecimiento glomerular postrasplante y evolución del injerto

**F. Moreso**

*Servicio de Nefrología, Hospital de Bellvitge, Barcelona, España.*

### Introducción

En el trasplante renal de cadáver se implanta habitualmente un solo riñón al receptor con el objetivo de poder realizar dos trasplantes a partir de un único donante. Existen diversas evidencias experimentales y clínicas que sugieren la existencia de una relación entre la masa renal trasplantada y la supervivencia del injerto. En diversos estudios experimentales se ha demostrado que el disponer de una mayor masa renal protege al injerto. En la práctica clínica se ha documentado que los receptores adultos de un órgano infantil o los receptores de gran tamaño corporal presentan una peor supervivencia a largo plazo. Incluso se ha demostrado que las diferencias en la superficie corporal entre los receptores de riñones procedentes del mismo donante pueden influir en la evolución del injerto. Por todo ello, creemos de interés analizar la importancia de la masa nefronal trasplantada, así como la evolución del tamaño glomerular después del trasplante.

### Estimación de la masa renal

El filtrado glomerular renal depende del área de filtración glomerular y ésta, a su vez, depende del número de nefronas, del volumen de cada una de ellas y de la superficie capilar glomerular.

Entre las distintas especies animales, la adaptación a una mayor demanda metabólica asociada a una mayor superficie corporal se produce a expensas de un significativo aumento en el número de nefronas, mientras que la modificación del volumen glomerular es menor. En humanos, la variabilidad en el número de nefronas es muy amplia, y estudios no sesgados en autopsias combinando la técnica del fraccionador con la del disector han mostrado en individuos sanos un rango entre  $0,23$  y  $1,82 \times 10^6$  nefronas. En humanos se ha demostrado que la hipertensión arterial y la insuficiencia renal se asocian con un menor número de nefronas y con un mayor volumen glomerular medio, ya que la relación entre ambos parámetros es inversa.

Por otra parte, el número de nefronas no se puede modificar tras el nacimiento, por lo que la adaptación al incremento del tamaño corporal tras el mismo se produce a través de un progresivo aumento del volumen glomerular. Se ha demostrado, tanto experimentalmente como en la práctica clínica, que existe un umbral a partir del cual la inadecuación entre la masa renal y la demanda metabólica conduce progresivamente a la glomerulosclerosis y la insuficiencia renal.

La estimación del número total de nefronas y del volumen glomerular medio se puede realizar *ex vivo* con métodos laboriosos pero no sesgados. La estimación *in vivo* requiere la combinación de distintas técnicas que deben ser validadas.

## Número total de nefronas en pacientes trasplantados renales

En 1994 se realizó un experimento en perros para validar la estimación del número de nefronas *in vivo*. Se demostró que a partir de la estimación del volumen cortinal renal mediante una resonancia magnética nuclear, la de la fracción glomerular cortinal en una biopsia renal y la del volumen glomerular en la misma biopsia se podía estimar con suficiente precisión el número total de glomérulos.

Nosotros aplicamos esta técnica a un grupo de 39 pacientes trasplantados renales estables a los 4 meses del trasplante. Se realizó resonancia magnética nuclear del injerto, se midió el área cortinal en cada una de las secciones obtenidas y se estimó el volumen cortinal mediante el principio de Cavalieri. A los pacientes se les realizó una biopsia renal de protocolo en la que se estimó la fracción de volumen glomerular cortinal mediante una técnica de contar de puntos y el volumen glomerular medio. Este último parámetro se estimó con dos métodos, uno más laborioso, basado en el estudio de secciones sucesivas del tejido, conocido como *método del perfil de área máxima*, y uno más simple, en el que sólo se utiliza una sección. Dado que el más simple no había sido validado en trasplantes renales, se realizaron ambos para su validación. El número total de glomérulos estimado fue de  $0,73 \pm 0,33 \times 10^6$  con un rango entre  $0,21$  y  $1,66 \times 10^6$ . Además, observamos que los donantes de mayor edad presentaban un número menor de nefronas y un mayor volumen glomerular medio. Finalmente, demostramos una relación directa entre el número total de glomérulos y el filtrado glomerular renal en el momento de la biopsia.

## Adaptación glomerular postrasplante

Dado que el número de nefronas implantadas no se puede aumentar, para adecuar la superficie de filtración a la demanda metabólica del receptor será necesario aumentar el volumen glomerular medio. Es conocido que la capacidad para aumentar el volumen glomerular depende en gran parte de la edad del individuo, siendo dicha capacidad mucho mayor en los niños.

Estudiamos en un grupo de pacientes con una biopsia renal preimplante y una biopsia de protocolo a los 4 meses la evolución del volumen glomerular medio. En este grupo de pacientes pareado pudimos demostrar que se produce un aumento significativo del volumen glomerular de alrededor del 20%. Además, observamos que los pacientes con el diagnóstico de nefropatía crónica del injerto en la biopsia de protocolo no presentaban un aumento del volumen glomerular y que existía una relación directa entre el volumen glomerular a los 4 meses y el filtrado glomerular renal. Estos resultados sugieren que el aumento del volumen glomerular es necesario para conseguir una función renal adecuada y que la presencia de lesiones crónicas impide dicha adaptación.

En un estudio posterior, evaluamos la evolución del volumen glomerular medio en un grupo de pacientes con una biopsia de protocolo a los 4 meses y a los 12 meses. Durante este período observamos un crecimiento adicional del volumen glomerular medio, mientras la función renal y la proteinuria permanecían estables. Tras categorizar a los pacientes como aquellos que presentaban o no un significativo aumento del volumen glomerular medio entre ambas biopsias, pudimos demostrar que la presencia de rechazo subclínico persistente se asociaba a una mayor progresión de las lesiones tubulointersticiales crónicas, a una mayor progresión de la glomerulosclerosis y a una incapacidad para aumentar el volumen glomerular medio.

No hay estudios sistemáticos que hayan valorado la evolución del volumen glomerular medio a partir del año del trasplante. Los estudios realizados por Bathena sugieren que a partir de los 2 años del trasplante, pero no antes, la presencia de glomerulosclerosis se asocia con un mayor volumen glomerular medio. En este caso, el aumento progresivo de los glomérulos conduciría a la glomerulosclerosis.

## Volumen glomerular medio y supervivencia del injerto

De los trabajos de nuestro grupo se deduce que el aumento del volumen glomerular medio representa un adecuado mecanismo de adaptación del injerto al receptor, mientras que la no adaptación debería relacionarse con una mayor gravedad de las lesiones agudas, una mayor progresión de las lesiones crónicas y un peor pronóstico para el injerto. Por otra parte, sabemos que los injertos obtenidos de donantes de más edad tienen un mayor volumen glomerular medio, una mayor progresión a la glomerulosclerosis y un peor pronóstico para el injerto. Con el objetivo de dar respuesta a esta aparente paradoja, planteamos un estudio con una serie amplia de pacientes con una biopsia de protocolo a los 4 meses y analizamos la relación entre el volumen glomerular medio y la supervivencia del injerto cesurando el fracaso por fallecimiento del receptor. Dado que tanto el volumen glomerular medio como el filtrado glomerular medio se asocian con la supervivencia del injerto, se buscó el mejor punto de corte para ambas variables. El análisis mediante regresión de Cox multivariante ajustando por la edad del donante, el rechazo agudo y la presencia de nefropatía crónica del injerto en la biopsia de protocolo, demostró que tanto el volumen glomerular medio como el filtrado glomerular son predictores independientes de la supervivencia del injerto. Así pues, clasificamos a nuestros pacientes en función de estas dos variables en 4 grupos. El análisis de supervivencia demostró que la mejor supervivencia la presentaban los pacientes con volumen glomerular medio bajo y filtrado glomerular renal alto, lo que sugiere que habían recibido órganos con suficiente masa renal y que no había sido necesaria una ulterior adaptación en el receptor. Por otra parte, la peor supervivencia la tuvieron los pacientes con elevado volumen glomerular medio y bajo filtrado glomerular, lo que apunta a que en éstos la adaptación glomerular fue insuficiente para proporcionar un filtrado glomerular adecuado. Estos últimos pacientes recibieron los órganos procedentes de donantes de más edad. Las otras dos combinaciones presentaban una supervivencia intermedia.

## Conclusiones

En el trasplante renal la implantación de un solo órgano obliga a una adaptación morfológica y funcional de éste al receptor. La masa renal trasplantada estimada a partir del número total de glomérulos determina la función del injerto. La adaptación glomerular se halla alterada en los pacientes con rechazo subclínico y se acompaña de una mayor progresión de las lesiones crónicas y glomerulosclerosis. Finalmente, el volumen glomerular medio es un predictor independiente de la supervivencia del injerto a largo plazo.

## Progression of histological lesions after renal transplantation

**M. Mengel**

*Alberta Transplant Applied Genomics Center, University of Alberta – Edmonton, Canada.*

Chronic allograft nephropathy (CAN) is the major cause for a still limited long-term function of renal allografts and represents a considerable diagnostic and therapeutic challenge. Clinically it is characterized by a progressive loss of allograft function frequently accompanied by proteinuria at final stages. However, the term CAN was coined by the Banff schema and represents the histological phenotype of various immunological and non-immunological insults to a renal allograft during its course after transplantation. Damage of the allograft already starts during harvest and is proceeded further on by rejection episodes, infections, drug toxicity, etc. If the damage is overwhelming and regeneration capacity of the transplant is exhausted chronic irreversible changes in the various morphological and functional compartments of the allograft manifest. Fibrous tissue accumulates in the interstitium, tubuli become atrophic (together called IFTA (= Interstitial Fibrosis + Tubular Atrophy)), glomerular basement membranes degenerate and accumulate matrix (= Transplant-Glomerulopathy), peritubular capillaries rarefy and degenerate (= Transplant-Capillaropathy), and arteries become narrowed by intimal cell and matrix proliferation (= Transplant-Vasculopathy). Since various pathomechanisms overlap during the evolution of the mixed CAN-phenotype correct ethiological categorization is frequently impossible. Nevertheless, recent results of various research activities contributed to a much better understanding of the pathogenesis and progression of the different lesions making up CAN.

Analysis of protocol biopsies revealed that up to 30% of all allografts show tubular atrophy and interstitial fibrosis to a various extent already at six months after transplantation and that this percentage is continuously increasing over the following 4.5 years. This can also be observed in a comparable percentage of living and diseased donors. Most of these progressively scaring allografts don't impose with clinical overt rejection episodes which might have enforced biopsy and respective treatment. I.e. most of these progressive scaring processes proceed subclinically. Our group from Hannover and other groups (Seron and Moreso - Barcelona, Nankivell and Chapman - Sydney, Cosio and Stegall - Mayo Clinic) were able to show that episodes of subclinical rejection (i.e. histological signs of rejection without clinical overt dysfunction) as detected by protocol biopsies are a significant risk factor for the onset and progression of IFTA. Besides cellular rejection other non-immunological factors (CNI-Toxicity, BK-infection, hypertension, hyperparathyroidism) contribute to progressive interstitial fibrosis and tubular atrophy. However, very recent findings showed that especially the simultaneous presence of active inflammation and IFTA are indicative for an on-going allograft damage and are significantly related to an inferior long-term prognosis. The most compelling observation with this is that also types and quantities of allograft inflammation which are regarded as non-specific or minor by the current Banff classification contribute to this process. Taken together, results from large protocol biopsy programs in several centres revealed that persistent subclinical inflammation, even below the current Banff thresholds for rejection, significantly contribute to the onset and progression of chronic-irreversible allograft damage and hence loss of function. These findings will enforce refinement of the Banff schema.

The incidence of chronic transplant glomerulopathy is also continuously increasing with time after transplantation from 3% (one year after transplantation) to 14% (five years after transplantation). At the recent Banff meeting a discussion came up whether the morphological feature of transplant glomerulopathy (double contours of the peripheral basement membranes + mesangial matrix increase) is specific for chronic immunological damage (= chronic rejection) or if these changes can be observed in transplant also due to non-immunological causes. It was agreed that recurrent or de novo MPGN and thrombotic microangiopathy (HUS) can show identical features. However, most cases should be caused by rejection and hence the question came up whether transplant glomerulopathy is only caused by humoral rejection episodes or can be as well the consequence of T-cell mediated rejection. Recent data from a group from Vienna-Austria (Regele et al.) and from Edmonton (Sis et al.) suggest that the vast majority of transplant glomerulopathy cases is caused by antibody-mediated allograft damage. C4d detection in peritubular capillaries as an indicator of active humoral rejection significantly precedes the onset of chronic transplant glomerulopathy and can frequently be simultaneously observed. C4d therefore, indicates repetitive flames of antibody medi-

ated rejection and shows a high correlation with the presence of donor-specific antibodies in the recipient's serum prior to the onset of transplant glomerulopathy. However, approximately 30% of all cases with chronic transplant glomerulopathy show no evidence of humoral rejection and might therefore represent the consequence of T-cell mediated rejection or other non-immunological patho-mechanisms.

Lamellation of the basement membrane of peritubular capillaries was initially described by Ivanyi et al. and showed a significant association with the presence of chronic transplant glomerulopathy suggesting a similar immunological pathogenesis. This group was able to show in an elegant ultrastructural study that donor-specific antibodies in the circulation of the recipient directly damage the endothelium in the allografts microcirculation. Endothelial cells in peritubular capillaries become apoptotic after complement activation (C4d+) and lose integrity. From this the underlying delicate basement membrane, usually allowing for sophisticated metabolic exchange, is assaulted and degenerate. The morphological correlate of this chronic-degenerative process is a reactive production of basement membrane material leading to multiple layers of basement membrane. Currently this feature is specifically described in allografts and regarded to be diagnostic for chronic rejection, especially when antibodies are involved. However, not all cases with humoral rejection (C4d+) show extensive (>7 layers) lamellation of their peritubular capillary basement membranes.

Large and small size arteries (vasculopathy) and arterioles (arteriolopathy) show progressive remodelling over time in renal allografts. Remodelling processes in arteries impose as intimal fibrous proliferation, while arterioles show hyaline-degenerative changes of the whole vessel wall. Besides rejection various non-immunological factors, namely hypertension in arteries and arterioles and calcineurin inhibitor toxicity in arterioles are responsible for the progression of vascular lesions in renal allografts. It may be assumed that with increased time after transplantation virtually all renal transplants suffer from vascular lesions caused by more than one pathogenetic source.

From animal models it was learned that ongoing T-cell mediated rejection as well as chronic antibody-mediated immune processes cause intimal myofibroblastic proliferation with accumulation of inflammatory cells (predominately macrophages) in the subendothelial space leading to progressive narrowing of the vessels lumen with consecutive loss of the allograft. Based on these experimental data the presence of foam cells and inflammatory cells (T-cells, macrophages) in the intima of narrowed transplant arteries is regarded as a rejection specific morphological hallmark. However, the true incidence of this process is not known since larger arteries are frequently not present in biopsies. Nevertheless, if detected those features are usually related to a worse prognosis. However, hypertension induced chronic-progressive changes in allograft arteries (intimal fibrosis without foam cells and inflammation) are surely more frequent under modern immunosuppression than ongoing immunological vascular damage.

A very frequent finding in renal allografts is arteriolar hyalinosis. Nankivell et al. described it in 100% of their cyclosporine treated allograft recipients ten years after transplantation. Furthermore, this group showed in sequential protocol biopsies from renal allograft recipients that the incidence and severity of arteriolar hyalinosis is significantly correlating with the blood pressure and the cyclosporine level and doses. However, identical morphological changes can be observed in native kidneys from patients with diabetes and/or hypertension. Therefore, the specificity of this lesion is low and its clinical and prognostic relevance needs still to be elucidated.

In summary, recent results especially from large protocol biopsy studies done in several centers contributed to a much better understanding of the patho-mechanisms and natural courses of chronic lesions in renal allografts. This can be the basis for meaningful prospective trials establishing new therapeutic strategies for the amelioration and prevention of progressive allograft loss.



## NUEVOS AVANCES EN LA TÉCNICA QUIRÚRGICA DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

### Laparoscopic left lateral sectionectomy in living donors

**O. Soubrane and L. Haddad**

*Liver Department, Hôpital Cochin, Paris, France.*

Left lateral sectionectomy performed in living donors through open approach is a well standardized procedure, associated with significantly lower complication and mortality rates than right hepatectomy in living donors for adult transplantation. In living donation for liver transplantation in children, optimizing the postoperative course and limiting parietal injury, especially in young donors, remain special concerns. To achieve this goal, laparoscopic left lateral sectionectomy in living donors has been proposed. The minimal experience required to achieve this challenging procedure includes training in both laparoscopic liver resection and liver graft harvesting. The left lateral segment is a favorable anatomical entity for laparoscopic resection because of its anterior position and of a limited number of anatomical variations. This procedure has taken benefit from the availability of new devices and instruments, especially modern transection tools and reliable vascular staplers. Yet, laparoscopic hepatic harvesting probably represents one of the more relevant use of the laparoscopic approach, consisting in exclusive resection without reconstruction, and preserving the abdominal wall in young and healthy donors.

#### Donors and methods

##### *Donors evaluation*

All donors were the recipients' father or mother. All of them had a complete medical evaluation including social status, cardiovascular, pulmonary, and renal assessment. Besides usual blood tests and viral status, donors had screening for coagulation disorders. All were seen by a psychiatrist and interviewed in the Cochin department of clinical ethics (Dr. Veronique Fournier). Donor livers were evaluated by ultrasound, CT-scan and MRI including vascular mapping (portal, arterial and hepatic vein reconstruction) and volume measurement. Arteriography was not used to evaluate donor's vascular anatomy. Biliary imaging was performed using magnetic resonance cholangiography. The grafts were harvested in Cochin Hospital and transplanted by a separate pediatric liver transplant team in Bicetre Hospital. Patients were informed of the innovative nature of the procedure and gave their written consent. All donors gave informed consent according to the French Law called "Bioéthique" (1994 modified in 2004) and the judge of Civilian Court recorded their consent.

##### *Surgical technique*

The liver graft included the left lateral section (i.e. segments 2 and 3), the left branch of hepatic artery and left portal branch, left bile duct and left hepatic vein. No clamping was used during parenchymal transection. Cholecystectomy and intraoperative cholangiography were only performed when an anatomical variation was suspected on preoperative MRI cholangiography. Overall, this procedure can be divided into the three following steps: the first one includes mobilization of the left lateral section and pedicle dissection with control and tape of vascular elements; the second one is represented by parenchymal transection and bile duct section; the third one is the vascular clamping and section and extraction of the liver graft.

The donor was in a supine position with his legs apart. Two monitors were placed over the left and right patient's shoulders. A carbon dioxide pneumoperitoneum was created and maintained at 12 mm Hg. Five trocars (Versaport plus, Tyco healthcare, Norwalk, CT) were inserted. The liver was assessed visually with a 30-degree laparoscope.

*Left lateral section mobilization and left pedicle dissection.* The left lateral section was mobilized by frizzing its falciform and left triangular ligaments using harmonic scalpel (Ultracision, Ethicon Endosurgery, Cincinnati, OH) and monopolar scissors. The left hepatic artery (ies) and left portal vein were dissected free and taped. Arterial and portal branches assigned to the caudate lobe were clipped and divided in order to increase the length of left hepatic artery and portal vein and facilitate their control. These latter were then "terminalized" and prepared to be reimplanted.

*Parenchymal transection.* The parenchymal transection was performed along the right side of the falciform ligament. The deep transection was performed using ultrasonic dissector (Dissectron®, Satelec, Merignac, France) while the superficial section, corresponding to about 2 cm of parenchymal thickness, was done using a harmonic scalpel. Biliostasis and hemostasis of small elements were performed using a bipolar coagulation. Vascular elements larger than 2 mm such as pedicles assigned to segment 4 were dissected using ultrasonic dissector and divided using clips or linear stapler (EndoGIA, Tyco Healthcare, Norwalk, CT) in case of large ones. Large segment IV pedicles were encircled with a little tape. This maneuver allowed to better expose the pedicle and to safely put the clip on it. When liver transection reached the hilar plate, the left bile duct was divided. Its distal end was closed either with a 5/0 absorbable running suture or a secured plastic clip.

*Extraction of the liver graft.* After complete transection, the left hepatic vein was controlled and taped. Then, a 10 cm suprapubic incision without muscular section was made. A 15 mm port was inserted allowing the introduction of a large specimen bag (Endocatch, Tyco Healthcare, Norwalk, CT). The graft was harvested by clipping and dividing the arterial branch first. Its proximal part is locked in with bolt clip (Hem-O-Lock, Weck, Research Triangle Park, NC) while its distal end was clamped with a small bulldog clamp. Then a unilateral linear stapling device was used to divide the portal and hepatic veins. Both elements were cut. The graft was put into the bag and extracted after completing the suprapubic fascia incision but always respecting the muscular integrity. The graft was then flushed with cold preservation solution through the left portal vein and hepatic artery. Bile duct was washed out with preservation solution as well. The suprapubic incision was closed and the pneumoperitoneum re-insufflated to check the quality of both hemostasis and biliostasis on the liver cut surface. Cutaneous incisions were closed and usually no abdominal drainage was used.

## Results

### Donors

The donors were 21 male and 15 female of mean age  $31 \pm 5$  yrs (range: 19-40) with a mean BMI of  $23.2 \pm 3.2$  (range: 16-29). The complete laparoscopic graft harvesting was successfully performed in 33 out of 36 donors (92%). Three donors required conversion into laparotomy because of either left portal vein injury, exposure or bleeding from scissural vein.

No gas embolism or haemorrhage occurred. The mean blood loss was  $50 \pm 56$  ml (range: 0-200 ml) and no patient was transfused. Mean operative time  $273 \pm 68$  min (range: 180-420 min) and significantly decreased with experience.

No donor died. The morbidity rate was 14%. Five donors had complications: bile leak ( $n = 2$ ), wound hematoma ( $n = 2$ ), gallbladder stitch ( $n = 1$ ). The two donors who experienced bile leak were reoperated through laparoscopy to close the leaking bile duct.

Mean hospital stay was  $6 \pm 2$  days and no donor was readmitted in the hospital. All of them returned to work within 3 months following surgery.

### *Liver grafts and recipients*

The median warm ischemia time was 10 min (range: 6-12 min). The mean liver graft weight was  $254 \pm 52$  g. All liver grafts were successfully transplanted. Most of the children recipients were transplanted because of biliary atresia (30 out of 36). Three children died in the postoperative period because of sepsis. Three recipients were retransplanted because of either hepatic artery thrombosis, portal vein thrombosis and Budd-Chiari syndrome.

### **Conclusion**

Laparoscopic left lateral sectionectomy is a safe and reproducible procedure allowing to decrease intra-operative blood loss. Since the donor's abdominal wall is preserved and the morbidity rate low, we consider that the laparoscopic approach might be the technique of choice for left lateral sectionectomy in living donors. The impact on morbidity and quality of life in a larger series of donors, as well as the long-term results in child recipients need further evaluation.

# TRASPLANTE PEDIÁTRICO: TAN LEJOS O TAN CERCA DEL ADULTO

## Peculiaridades y resultados del trasplante cardiaco pediátrico

**C. Maroto**

*Sección de Cardiología Pediátrica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España.*

### Introducción

El trasplante cardiaco pediátrico representa en España el 4% del número total de trasplantes de corazón. La dispersión de centros en todo el mundo hace que solo determinadas instituciones sean verdaderos centros de referencia en este tipo de trasplante. Expondremos las peculiaridades que lo diferencian, en algunos aspectos, del de adultos.

### Peculiaridades

Se refieren a aspectos como indicaciones, contraindicaciones, situación clínica pretrasplante, técnica quirúrgica, inmunosupresión y complicaciones. Existen además algunas otras cuestiones que deben tenerse en cuenta.

#### *Indicaciones*

En las miocardiopatías, en todas sus variantes, las indicaciones son las mismas que en el adulto, incluyendo algunas matizaciones; así, en la miocardiopatía dilatada, en su forma de inicio agudo se preconiza listarlos a los 5 días de asistencia mecánica con tratamiento coadyuvante óptimo sin respuesta y en la crónica la falta de crecimiento y el no poder desarrollar actividades escolares normales.

En cardiopatías congénitas operadas, surgen dos temporalidades: forma aguda, cuando tras cinco días de asistencia y sin presencia de lesiones residuales significativas es imposible el destete mecánico, y forma crónica por fracaso de correcciones fisiológicas (Mustard, Senning...), univentriculares (Glenn, Fontan...), biventriculares (Fallot, Rastelli...) o imposibilidad de corrección univentricular (disfunción del ventrículo sistémico, pequeñas elevaciones de la presión pulmonar...).

Debemos decir que toda cardiopatía congénita es susceptible de tratamiento convencional, salvo algunas excepciones concretas que diremos más adelante.

#### *Contraindicaciones*

Son la hipoplasia extrema o ausencia de arterias o venas pulmonares; la presencia de enfermedades metabólicas con afectación multisistémica o reproducible en el órgano trasplantado o la afectación multiorgánica irreversible secundaria a la propia disfunción cardíaca.

Las anomalías cromosómicas deben analizarse individualmente (recordemos el Síndrome de Down, siempre polémico).

Los factores que afectan la morbimortalidad son los mismos que en el adulto (HIV; hipertensión pulmonar, hepatitis B y C, gradiente transpulmonar, factores psicosociales, etc.).

### *Situación pretrasplante*

Mantener con vida a un niño (sobre todo pequeño) con cardiopatía, operada o no, supone un gran reto a pesar de que cada vez disponemos de mejores fármacos y equipos de asistencia mecánica (ECMO, Berlin Heart, etc.), pero los tiempos medios en lista de espera son muy largos (90 días para menores de 1 año y 30 para mayores de 1 año). Esto obliga a utilizar corazones subóptimos tanto en cuanto a su funcionalidad como a las grandes discrepancias en tamaño (hasta 400%). Incluso, para elevar el número de donantes en el primer año de vida, se trasplantan corazones con incompatibilidad ABO, dadas las características inmunitarias y a través de un procedimiento complejo, pero que se ha demostrado eficaz.

### *Técnica quirúrgica*

Quizás es lo más importante en cuanto al hecho diferencial con el trasplante de adultos, salvo en las miocardiopatías, cuya técnica puede ser estándar o bicava. En presencia de cardiopatías congénitas, el cirujano debe tener gran experiencia en su tratamiento, pues hay dificultades para las conexiones venosas o arteriales, que se magnifican si existen cirugías previas con anastomosis diversas, presencia de material protésico intravascular o incluso dextrocardia.

### *Inmunosupresión*

Se emplea el mismo régimen que en el adulto. Hay que señalar que muchas de las medicaciones no están aprobadas para uso pediátrico, no hay ni fármacos ni presentaciones dosificadas para niños y se ha hecho esencial la colaboración con el Servicio de Farmacia. Un dato fundamental es la tendencia a la supresión precoz de los corticosteroides por sus conocidos problemas generales y su influencia sobre el crecimiento.

### *Complicaciones*

Son las mismas, en general, que en el adulto: diabetes, insuficiencia renal, tumores, infecciones, etc. En cuanto al rechazo, parece ser inferior en el trasplante de neonatos y lactantes. La enfermedad coronaria del injerto se presenta en el 2,5% al año y el 11,5% a los 5 años.

### *Otras cosas a tener en cuenta*

Se refieren al crecimiento somático (demostrado el del órgano) y de ahí la tendencia a la supresión precoz de esteroides. La vacunación es similar a la de los niños no trasplantados, pero está prohibido efectuarla con virus atenuados (por ejemplo, para la poliomielitis se emplea la vacuna tipo Salk y no la Sabin, incluyendo el entorno familiar). Debe prestarse atención y tratar, a veces, profilácticamente los contactos con enfermedades exantemáticas.

La calidad de vida de los niños trasplantados es excelente en todos los aspectos. Quizás los 6 meses siguientes al implante sean los más difíciles, por las posibles complicaciones y la práctica de pruebas complementarias.

## **Resultados de nuestra experiencia**

De los 214 trasplantes cardíacos infantiles efectuados en España desde 1989, 89 (42%) han sido practicados en el HGU Gregorio Marañón de Madrid, distribuidos temporalmente de forma irregular desde 1 a 12 anuales, con una media de 5.

La mortalidad precoz es el punto en que debemos mejorar y la consideramos atribuible al estado previo del paciente y al empleo de órganos subóptimos. Viene a representar cifras cercanas al 25% y aún más en lactantes. A 5 años, la supervivencia actuarial la ciframos en el 50% y a casi 14 años alcanza el 35%.



## Algunos matices sobre futuro y resultados

En nuestra experiencia hasta 1997 no habíamos trasplantado ningún paciente que estuviera operado por cardiopatía congénita; sin embargo, de los 60 practicados desde 1998 hasta la actualidad, 24 sí tenían cirugías previas y con resultados distintos si se han hecho en agudo tras cirugía convencional (100% de mortalidad), o con alguna variedad paliativa específica como puente (25% de mortalidad) o secuelas o complicaciones de cirugías previas (28% de mortalidad) y llama la atención que esto no se corresponde con la experiencia de los grupos de adulto, que casi no acumulan experiencia en este grupo de pacientes, pero que, en nuestra opinión, cada vez les van a llegar con más frecuencia.

## Conclusiones

El trasplante cardíaco pediátrico tiene peculiaridades importantes en varios aspectos, pero sobre todo por lo que respecta a la técnica. No debe considerarse como anecdótico y debe ofrecerse como opción terapéutica.

## Referencias

1. Boucek, M.M., Waltz, D.A., Edwards, L.B. y cols. *Registry of the internacional society for heart and lung transplantation: Ninth official pediatric heart transplantation report- 2006*. J Heart Lung Transplant 2006; 25: 893-903.
2. Groetner, J., Reitchart, A., Bernstein, D. y cols. *Cardiac transplantation in pediatric patients: Fifteen- year of a single center*. Ann Thorac Surg 2005; 79: 53-61.
3. Gajarski, R.J., Mosca, R.S., Ohye y cols. *Use of extracorporeal life support as a bridge to pediatric cardiac transplantation*. J Heart Lung Transplant 2003; 22: 28-34.
4. Jayakumar, K.A., Addonizio, L.J., Kichuk-Chrisant, M.R. y cols. *Cardiac transplantation after fontan or Glenn procedure*. J Am Coll Cardiol 2004; 44: 2065-2072.
5. Michielon, G., Parisi, F., Squitiri, C. y cols. *Orthotopic heart transplantation for congenital heart disease: An alternative for high- risk Fontan candidates?* Circulation 2003; 108(Suppl. II): II 149-155.
6. West, L.J., Phil, D., Pollock-Barziv, S.M. y cols. *ABO- incompatible heart transplantation in infants*. New Eng J Med 2001; 344: 793-800.
7. Leonard, H., Hornung, T., Parry, G. y cols. *Pediatric cardiac transplant: Results using a steroid-free maintenance regimen*. Pediatr Transpl 2003; 7: 59-63.
8. Webwe, S.A. *The current state of, and future prospect for, cardiac transplantation in children*. Cardiol Young 2003; 13: 64-83.

## Trasplante pulmonar pediátrico

### A. Moreno

Unidad de Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

El trasplante pulmonar ha pasado de ser un procedimiento experimental a constituir una opción terapéutica real para los niños con enfermedades pulmonares en fase terminal.

En la última década ha mejorado considerablemente la evolución y el pronóstico de los niños trasplantados de pulmón (1), con avances importantes en la técnica del trasplante, la preservación de los órganos, el manejo perioperatorio y la inmunosupresión.

En España el primer trasplante pulmonar en pacientes adultos se realizó en 1990 y el primer trasplante pediátrico en 1996. El número de trasplantes pulmonares ha aumentado progresivamente desde los 6 practicados en 1990 hasta los 169 del año 2006, y asciende a un total de 1.641 (datos de la Organización Nacional de Trasplantes, disponibles en [www.ont.es](http://www.ont.es)). El volumen de trasplantes pediátricos y el de niños en lista de espera corresponde aproximadamente a un 5% de esta cifra, porcentaje que es comparable al de Estados Unidos (1). Según los datos del registro internacional, en el mundo se realizan entre 60 y 90 trasplantes pulmonares pediátricos al año (2).

## Indicaciones

Las indicaciones generales para el trasplante pulmonar son: insuficiencia respiratoria progresiva con una expectativa de supervivencia corta, en general menor de 1-2 años, agotamiento de otras medidas terapéuticas, ausencia de otra enfermedad grave, capacidad para cumplir un régimen terapéutico complejo, un ambiente social adecuado y deseos por parte de la familia o el niño de aceptar el riesgo del trasplante.

La fibrosis quística constituye la indicación más frecuente para el trasplante pulmonar en los niños a partir, generalmente, de los 8-10 años de edad. Representa en el registro internacional el 36% de los trasplantes en el grupo de edad entre 1 y 10 años y el 72% en los niños entre 11 y 17 años (2). El otro grupo importante lo constituyen las enfermedades vasculares pulmonares (hipertensión pulmonar) y las neumopatías intersticiales crónicas. En los niños menores de 3 años, que suponen en algunos centros un 20% de los trasplantes, las indicaciones principales son las enfermedades vasculares pulmonares (54%) y las neumonitis intersticiales del lactante (35%) (3).

## Selección del paciente

Una de las decisiones más complicadas a las que se enfrentan los equipos de trasplante es valorar el momento adecuado para incluir a un niño con una enfermedad pulmonar crónica en lista de espera. Hay que considerar 4 factores principales: las expectativas de supervivencia, la calidad de vida, el fracaso de otras alternativas terapéuticas y el tiempo que se prevé que el paciente permanecerá en lista de espera.

Se han realizado numerosos estudios en niños con fibrosis quística para identificar las variables pronósticas que nos permitirían estimar su probable supervivencia y orientar la inclusión en la lista de espera de trasplante. Aunque se han desarrollado varios modelos con ayuda del análisis multivariante, ninguno de ellos es suficientemente sensible y específico. Por otro lado, la progresión de la enfermedad es muy variable en los pacientes con fibrosis quística.

En la práctica, la decisión para indicar la realización de un trasplante pulmonar en estos niños se basa en la consideración conjunta de una serie de variables: valor del FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo) menor al 30% respecto al valor teórico, deterioro rápido de la función pulmonar, malnutrición que no responde a una intervención nutricional agresiva, cor pulmonale, hospitalizaciones frecuentes a pesar del tratamiento antibiótico intensivo, intolerancia documentada al ejercicio, hipoxemia ( $pO_2 < 55$  mmHg) y/o hipercapnia ( $pCO_2 > 50$  mmHg), e incremento progresivo de la resistencia a los antimicrobianos de los patógenos pulmonares. Son también de más riesgo los pacientes más jóvenes y los de sexo femenino. Además, es esencial tener en cuenta la calidad de vida de los niños considerando factores como la capacidad para llevar a cabo las actividades diarias (ir al colegio, relaciones sociales), la tolerancia al ejercicio, el tiempo que pasan ingresados en el hospital y los requerimientos de oxígeno y tratamientos antibióticos (4).

En otras patologías, como las neumonías intersticiales o la fibrosis pulmonar, dada su escasa frecuencia no disponemos de datos fácilmente objetivables y validados en los niños, y especialmente en los lactantes. Lo más importante es valorar en estos casos la presencia de una alteración funcional moderada o grave, la necesidad de ventilación mecánica o de aportes muy elevados de oxígeno, la falta de respuesta a los tratamientos realizados y la comparación con la evolución teórica de la enfermedad (3).

En los últimos años, el tratamiento de los pacientes con hipertensión pulmonar primaria ha evolucionado considerablemente por la disponibilidad de nuevos tratamientos médicos. Se han publicado en niños supervivencias similares a las del trasplante pulmonar con el empleo de epoprostenol intravenoso, pero se desconoce todavía el efecto a largo plazo sobre la supervivencia de otros tratamientos como bosentano, sildenafilo, iloprost o teprostinil. Otro factor a tener en cuenta es que algunos pacientes que se han estabilizado con el tratamiento médico pueden posteriormente presentar un empeoramiento muy brusco que no permita incluirlos en lista de trasplante. Actualmente se recomiendan los siguientes criterios para referir a un niño con hipertensión pulmonar a un centro de trasplante: clase funcional III o IV, poca tolerancia al ejercicio (recorrer menos de 350 m en la prueba de caminar 6 minutos), síncope no controlados, hemoptisis o fallo ventricular derecho, y algunos parámetros hemodinámicos (presión media de aurícula derecha  $>15$  mmHg, e índice cardiaco  $<2$  l/min/m<sup>2</sup>).

## Contraindicaciones

Existen diferentes situaciones que pueden hacer desestimar la realización de un trasplante pulmonar, algunas de ellas de modo absoluto y otras de modo relativo (1, 5).

En los pacientes con fibrosis quística, muchos centros consideran la presencia de *Burkholderia cepacia* una contraindicación absoluta para la realización del trasplante, dado que se ha descrito un riesgo de muerte postrasplante precoz del 50%. El análisis molecular ha permitido definir que este mal pronóstico va asociado fundamentalmente a la infección por *B. cepacia* genomovar-3, mientras que la evolución es mejor en otros subtipos de esta bacteria.

Muchos de los criterios estándar de exclusión en los programas de trasplante pulmonar de adultos, como la ventilación mecánica, toracotomía previa, tratamiento con corticoides e incluso oxigenación de membrana extracorpórea, no son aplicables del mismo modo en los niños, y no representan una contraindicación absoluta para el trasplante (3, 6).

Los pacientes cianóticos en los que se han realizado toracotomías previas para procedimientos paliativos deben evaluarse con cuidado antes del trasplante, ya que presentan un riesgo elevado de hemorragia a partir de colaterales de la pared torácica (5).

## El órgano donante

La escasez de órganos donantes es uno de los determinantes principales para la realización de trasplantes de órganos sólidos. El problema de la escasez de órganos es mayor en el caso del pulmón, dado que sólo en un 15-20% de los donantes multiorgánicos se consigue utilizar los pulmones.

Es necesaria la compatibilidad ABO, siendo el pronóstico mejor cuando se emplean donantes ABO idénticos. Otro factor muy importante es la compatibilidad de tamaño entre el receptor y el donante. La mayoría de centros aceptan órganos con un tamaño entre un 10% y un 25% inferior o superior a los valores teóricos del receptor. Aunque en España existe un índice de donación muy elevado, en los últimos años se ha producido un descenso de los donantes fallecidos por accidente de tráfico, unido a un aumento de los donantes fallecidos por hemorragia cerebral. Ello ha traído consigo un envejecimiento de la población donante, lo que limita la disponibilidad de órganos para el trasplante pulmonar y especialmente para los niños y adolescentes. Para compensarlo, en algunos centros se intenta incrementar el número de órganos disponibles con la utilización de donantes a corazón parado, o mediante la realización de trasplantes lobares en niños con pulmones procedentes de pacientes adultos.

En España el porcentaje de pacientes que fallecen en lista de espera antes de poder recibir un trasplante pulmonar está alrededor del 10% (3), situación favorable en comparación con otros países.

## Técnica de trasplante

El trasplante bipulmonar secuencial es la opción preferida en los niños, y es obligado en los casos de enfermedad pulmonar séptica (fibrosis quística, bronquiectasias), debido al riesgo de contaminación del pulmón trasplantado

por el pulmón nativo. En algunos centros pediátricos se utiliza sistemáticamente la circulación extracorpórea durante todo el trasplante, que es obligada en los lactantes y niños pequeños.

Las indicaciones del trasplante unipulmonar en niños son mucho menos frecuentes que en el adulto. Se aconseja realizarlo sólo si el crecimiento somático está casi completado y el órgano ofrecido es de tamaño y calidad perfectas. Podría indicarse en la patología parenquimatosa pulmonar no séptica (fibrosis pulmonar, bronquiolitis obliterante, etc.) y la hipertensión pulmonar.

El trasplante de donante vivo se ha realizado principalmente en pacientes con fibrosis quística en algunos centros de Estados Unidos (7). También se ha propuesto la realización del trasplante lobar procedente de un donante adulto cadáver (6). El trasplante lobar en niños con pulmones de donantes adultos es factible sólo a partir de los 7 años de edad.

El trasplante cardiopulmonar se reserva para los casos de enfermedad vascular pulmonar asociada a cardiopatía congénita no corregible y para los que presentan fallo ventricular izquierdo.

## Inmunosupresión

En cada centro se utilizan regímenes inmunosupresores ligeramente diferentes, pero la mayoría administra un tratamiento triple formado por tacrolímulo o ciclosporina, micofenolato o azatioprina, y corticosteroides (2). Se utilizan con frecuencia también tratamientos de inducción a partir de la aparición de los antagonistas de la interleucina 2, basiliximab o daclizumab (2).

## Complicaciones

Las complicaciones del trasplante pulmonar pediátrico son similares a las del trasplante en adultos: fallo primario del injerto, rechazo agudo, complicaciones quirúrgicas, complicaciones infecciosas, enfermedad linfoproliferativa postrasplante y síndrome de bronquiolitis obliterante.

Como particularidades específicas de los niños con respecto a los adultos podemos destacar las siguientes:

**Complicaciones infecciosas.** La mayoría de niños que reciben un trasplante pulmonar experimentan las infecciones usuales respiratorias y gastrointestinales propias de la infancia sin problemas significativos. Esto es cierto sobre todo si la infección ocurre en un periodo tardío postrasplante. Sin embargo, la infección precoz con virus adquiridos en la comunidad (virus respiratorio sincitial, virus gripal y paragripal, y especialmente adenovirus) puede originar una enfermedad pulmonar grave, habiéndose descrito casos de fallo del injerto.

**Síndrome linfoproliferativo.** La incidencia de enfermedad linfoproliferativa es mayor en los niños (alrededor de un 11%) que en los adultos y está relacionada casi siempre con el virus de Epstein-Barr. Alrededor del 80% de los casos ocurren en los dos primeros años del trasplante. La realización de TC de tórax de control sistemáticas en los niños trasplantados de pulmón hace que se detecten con frecuencia casos asintomáticos. Un enfoque preventivo es la determinación periódica de la carga viral del virus de Epstein-Barr mediante PCR y la disminución de la inmunosupresión en caso de que se observe un aumento. El rituximab, un anticuerpo monoclonal contra antígenos de la superficie de los linfocitos B (anti CD-20) es actualmente el tratamiento de elección, antes de emplear la quimioterapia, que se reservaría para los casos sin respuesta.

**Complicaciones de la vía aérea.** La frecuencia de complicaciones de la vía aérea no es muy diferente de la de los adultos. Actualmente está entre un 10% y un 15% (8).

**Bronquiolitis obliterante.** El síndrome de bronquiolitis obliterante constituye, como en los adultos, la amenaza más importante para la supervivencia a largo plazo de los niños sometidos a trasplante pulmonar.

**Falta de cumplimiento del tratamiento.** Un problema específico de los adolescentes es la falta de adhesión al tratamiento inmunosupresor, que pueden dejar de tomar regularmente y ser una causa de rechazo agudo o crónico. Se debe sospechar en aquellos casos en que los niveles de los fármacos fluctúan mucho, se observan faltas de asistencia a la consulta, rechazo agudo recurrente, depresión o quejas frecuentes relacionadas con ganancia de peso o aspecto cushingoide. Para resolver el problema son esenciales en estos casos el apoyo psicológico y familiar (7).

## Pronóstico y supervivencia

Tras el trasplante pulmonar se produce una mejoría espectacular en la calidad de vida. El 90% de los niños no tienen ninguna limitación en su actividad a los 3 años del trasplante.

En el Children's Hospital de St. Louis, el centro con mayor experiencia mundial pediátrica, sobre 277 trasplantes realizados en 15 años, la supervivencia a los 5 años fue del 55% y a los 10 años es del 40% (8). El retrasplante conlleva una mortalidad superior, con una supervivencia a los cinco años del 25-30%. En nuestro país las cifras de supervivencia en el trasplante pediátrico están entre el 62% y el 70% a los 5 años y el 62% a los 8 años (6, 9, 10).

Los avances alcanzados en los últimos años en las técnicas quirúrgicas y la inmunosupresión hacen que el trasplante pulmonar en los niños sea una realidad. El reto actual es el incremento de la supervivencia a largo plazo y la disminución de la incidencia de rechazo crónico.

## Bibliografía

1. Mallory, G.B., Spray, T.L. *Paediatric lung transplantation*. Eur Respir J 2004; 24: 839-845.
2. Boucek, M.M., Edwards, L.B., Keck, B.M. y cols. *Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Eighth official pediatric report—2005*. J Heart Lung Transplant 2005; 24: 968-982.
3. Moreno, A., Maestre, J., Balcels, J. y cols. *Lung transplantation in young infants with interstitial pneumonia*. Transplant Proc 2003; 35: 1951-1953.
4. Aurora, P. *When should children be referred for lung or heart-lung transplantation?* Pediatr Pulmonol Suppl 2004; 26: 116-118.
5. Huddleston, C., Mendeloff, E., Mallory, G. *Trasplante pulmonar pediátrico*. An Esp Pediatr 2001; 54: 359-371.
6. Álvarez, A., Algar, F.J., Santos, F. y cols. *Pediatric lung transplantation*. Transplant Proc 2005; 37: 1519-1522.
7. Woo, M.S. *An overview of paediatric lung transplantation*. Paediatr Respir Rev 2004; 5: 249-254.
8. Meyers, B.F., de la Morena, M.M., Sweet, S.C. y cols. *Primary graft dysfunction and other selected complications of lung transplantation: A single-center experience of 983 patients*. J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 129: 1421-1429.
9. Ferrer González, J.P., Calvo Medina, V., Jordà, C., Escrivà, J., Ferrer Calvete, J. *Resultados del trasplante pulmonar (TP) en la edad pediátrica*. An Pediatr (Barc) 2005; 62: 28.
10. De la Fuente Juárez, A., Moreno Galdó, A., Maestre, J. y cols. *Trasplante pulmonar pediátrico. Experiencia a los 7 años de funcionamiento del programa*. An Pediatr (Barc) 2005; 62: 215-216.

## Resultados a largo plazo del trasplante hepático pediátrico

### P. Jara

Servicio de Hepatología y Trasplante, Hospital Infantil Universitario La Paz, Madrid, España.

El trasplante hepático en niños representa la quinta parte del total de trasplantes. Los centros de mayor actividad, como UCLA o King's College, realizan 40 trasplantes pediátricos al año.



Comparado con el trasplante en adultos, el pediátrico se considera de mejor resultado. Los datos de UCLA (Bussutil y cols., Ann Surg 2005) indican que en receptores de 1 a 18 años de edad la supervivencia a 10 años es del 79% y en adultos de 18 a 55 años es del 68%.

## Enfermedad original y edad

Una de las consideraciones que explican la supervivencia más larga de los niños es la alta proporción de adultos que reciben un trasplante por enfermedades que recurren en el injerto (VHC, VHB). En los niños la indicación más frecuente es la atresia biliar (40-50% de los casos) y el resto corresponde a numerosas enfermedades congénitas o adquiridas, cada una en un bajo porcentaje. Muchas de ellas pueden tener trascendencia en la evolución postrasplante. En la casuística de Estados Unidos y Canadá, reunida en un registro (SPLIT) entre 1995 y 2002, esas indicaciones asociadas a riesgo en la evolución suman un 15% del total de trasplantes (McDiarmid, S., Pediatr Transplant 2004).

Un ejemplo de enfermedad original que complica el resultado del trasplante son las colestasis hereditarias. En el síndrome de Alagille la hepatopatía se resuelve con el trasplante, pero no se modifica el resto de componentes de la enfermedad (cardiopatía y nefropatía). El defecto de FIC1 se acompaña también después del trasplante de diarrea crónica, esteatosis hepática y mal crecimiento. En el defecto de BSEP se presentan episodios graves de disfunción del injerto que semejan la enfermedad original (bilirrubina alta, GGT normal, hepatitis de células gigantes), por lo que se requiere una intensa inmunosupresión. En niños con fibrosis quística es esperable la progresión de la neumopatía e insuficiencia pancreática endocrina. Otro grupo de niños afectados de deficiencias enzimáticas se benefician del trasplante hepático pero tienen la posibilidad de secuelas neurológicas debidas al periodo anterior al trasplante (por ejemplo, en MSUD, defectos de ciclo de la urea) o de progresión del daño en otros órganos (por ejemplo, miocardiopatía en acidemia propiónica y glucogenosis IV, nefropatía en glucogenosis I).

Otro aspecto importante para valorar los resultados a largo plazo es la edad de los niños. Alrededor de un 50% son trasplantados con menos de 2 años. Ello implica que deberán tener primoinfección por agentes virales bajo inmunosupresión. La maduración de órganos, el aprendizaje y el crecimiento también tendrán lugar bajo fármacos potencialmente tóxicos.

El conocimiento de la evolución a largo plazo en los niños tiene como dificultad el hecho de que a partir de una edad del paciente (14-18 años) el seguimiento pasa del centro pediátrico (uno o pocos en cada estado) a especialistas de adultos y la población se dispersa en los numerosos centros de adultos de cada país.

## Supervivencia a largo plazo

Después del trasplante hay un periodo inmediato (0-3 meses) de máximo riesgo de pérdida del injerto y mortalidad; en la serie de Lovaina (467 niños desde 1984 a 1998) se cuantificó en 19% y 13%, respectivamente.

Sin embargo, los vivos a los 3 meses tienen un pronóstico de supervivencia del 90,4% a los 15 años (Wallot, M.A., Liver Transplant 2002). La pérdida tardía (después de 3 meses y hasta más de 15 años) de injertos afecta a un 12,5% de los pacientes. El fallo tardío del injerto, a pesar de la posibilidad de retrasplante, es la causa principal de fallecimiento del paciente a largo plazo.

En la actividad más reciente en el Hospital Infantil La Paz (2004-2006, n = 56 niños) los retrasplantes tardíos suponen el 9% del total de los trasplantes en niños. Aunque la supervivencia después del primer trasplante alcanzó en ese periodo el 98%, la obtenida en el retrasplante tardío es baja, similar a lo comunicado en otras series (alrededor del 60%).

## Motivos de pérdida del injerto

En Lovaina y el Hospital Infantil La Paz, con 27 y 18 casos de pérdida tardía del injerto, respectivamente, el 16-25% se debieron al fallecimiento del paciente con injerto funcionante. En conjunto, la pérdida de injerto deriva principalmente de rechazo que no responde al tratamiento (33%), síndrome linfoproliferativo postrasplante (PTLD) (22%) e infecciones (15%). Otros motivos son la enfermedad original, trombosis vascular o patología biliar.

## Problemas básicos en el seguimiento a largo plazo

### *Síndrome linfoproliferativo postrasplante*

El PTLD es una complicación peculiar del trasplante en niños. El riesgo es determinado por la primoinfección EBV bajo inmunosupresión. En una cohorte de niños trasplantados (HI La Paz 1986-1996) supervivientes más de 3 meses y evaluados en 2006 se observó PTLD en el 13,4%.

El tratamiento consiste en la retirada de anticalcineurínicos, administración de antiviral y, en casos seleccionados, quimioterapia, actitud terapéutica que conlleva un riesgo de rechazo, que en esta serie solamente afectó a un 5,5% (1 caso). En total falleció un 33% de los afectados de PTLD. En los pacientes vivos (67%) no hay signos de enfermedad, pero en el 58% de ellos se tuvo que reintroducir la inmunosupresión completa por ocurrir rechazo agudo.

### *Rechazo*

Hay pocos datos sobre la incidencia de rechazo agudo pasados los primeros 12 meses tras el trasplante. Una serie de 32 pacientes seguidos durante 10 años (Avitzur y cols., Transplantation 2004) lo cuantificó en 0,13 a 0,19 episodios por paciente y año.

El problema principal es la definición de rechazo agudo tardío. Recientemente se han especificado los criterios histológicos (Banff Working Group, Hepatology 2006), en nuestra experiencia, hay muchos episodios de disfunción en los que no se identifica una causa biliar, vascular o viral que tienen en su inicio mínimos hallazgos histológicos (cambios mínimos, citolisis) y que responden al tratamiento empírico con ajuste de la inmunosupresión.

En 2005 efectuamos un estudio detallado de la función del injerto a lo largo de 4 revisiones en 95 niños (trasplante entre 1997 y 2003, estudio a una media de 4,5 años postrasplante). Hubo un 26% de pacientes con “disfunción nueva” no biliar ni vascular, mayoritariamente casos de elevación de ALT con o sin elevación de GGT, y asintomáticos. Un 15% de pacientes (en un año) fueron tratados como rechazo (5% con cambio de inmunosupresor y/o bolos de corticosteroide + 10% con aumento transitorio de la dosis de corticosteroide).

### *Disfunción “ictérica” (idiopática o por rechazo)*

Los episodios de disfunción asintomática son frecuentes, pero es rara la aparición a largo plazo de disfunción nueva que curse con ictericia, en la que se descarta una causa biliar. De 127 niños seguidos durante más de un año en la casuística de 1986-1996 del Hospital Infantil La Paz (seguimiento hasta 2006), hemos observado esa complicación en el 11% de los pacientes. Las biopsias son dudosas en muchos y no todos pueden ser estrictamente filiados como “rechazos”. El pronóstico es malo, con fracaso del injerto en el 43% y persistencia de disfunción crónica en otro 20%.

### *Problemas vasculares y biliares*

Entre 1 y 15 años tras el trasplante, la tasa de complicaciones biliares (estenosis con o sin litiasis) se observó en un 11% de los pacientes (HI La Paz). La tasa de problemas vasculares (estenosis de cava o porta) fue del 5%, y la de trombosis portal del 4%. Mediante radiología intervencionista es posible solucionar eficazmente la mayoría de casos.

## Estado de los pacientes vivos a largo plazo

De los pacientes trasplantados entre 1986 y 1996 en el Hospital Infantil La Paz, 114 fueron evaluados a los 10 años del trasplante. Su edad media era de 14 años (rango: 10-30 años).

En los supervivientes al cabo de 10 años la historia anterior (desde el 12º mes) incluyó el padecimiento de PTLD (9,6%), patología biliar (87%), procesos de disfunción icterica idiopáticos o debidos a rechazo (8,7%), hepatitis autoinmunitaria de novo (1,7%), estenosis vascular resuelta (4,3%) o trombosis portal (3,4%). El 2,7% habían precisado un retrasplante tardío.

A los 10 años del trasplante la función del injerto era rigurosamente normal en el 78%. Hubo un 9,5% con ALT y/o GGT elevadas ligeramente (<100 U/l), un 10,5% con ALT y/o GGT >100 U/l, y solamente el 1,7% presentaban disfunción acompañada de ictericia. En esta serie están incluidos 15 pacientes con infección VHC presumiblemente adquirida en un trasplante realizado antes de 1990; a los 10 años postrasplante, 9 de los 15 mostraban función normal.

La perspectiva del injerto parece buena desde el punto de vista clínico y funcional. Sin embargo, la valoración con biopsia hepática rutinaria indica que puede existir daño poco apreciable mediante la analítica. En Birmingham la biopsia informó lesiones semejantes a una hepatitis crónica en el 64% de los pacientes pediátricos vivos al 10º año; el 91% de los afectados tenían fibrosis portal, y un 15% alcanzaban el estadio de cirrosis. En esa experiencia no observaron diferencias significativas en la cifra de ALT entre afectados de hepatitis crónica y pacientes con biopsia normal. La elevada tasa (80%) de autoanticuerpos positivos en pacientes con hepatitis crónica sugiere que es una lesión inmunomediada (Evans, H.M., Hepatology 2006).

## Efecto tóxico de la inmunosupresión

El empleo de inhibidores de la calcineurina se acompaña de una reducción del filtrado glomerular desde el comienzo de su administración. En el seguimiento a largo plazo se estima que el 5% de los niños presentan insuficiencia renal moderada-grave. En la experiencia del Hospital Infantil La Paz, 2 de 114 pacientes vivos a los 10 años han precisado trasplante renal y otros 2 tienen insuficiencia renal crónica.

Las pautas de inmunosupresión protectora de la función renal (con descenso o retirada de inhibidores de la calcineurina) están indicadas en caso de FG <80 ml/min en la estimación por Cresta. Recientemente fue establecido que un valor de creatinina sérica >1,06 mg/l puede servir de indicador de esa reducción significativa de FG (Samyn, M. y cols., Liver Transplant 2005).

## Kidney transplantation in children and adolescents

M. Giessing<sup>1</sup>, D. Müller<sup>2</sup>, B. Winkelmann<sup>1</sup>, J. Roigas<sup>1</sup> and S. Loening<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Charité University Hospital, Department of Urology (Campus Mitte), Berlin, Germany; <sup>2</sup>Charité University Hospital, Otto Heubner Center for Pediatric and Adolescent Medicine, Department of Pediatric Nephrology (Campus Virchow), Berlin, Germany.

The prevalence of end stage renal disease (ESRD) in children is 4-6/million. Affected children suffer not only from effects of the underlying disease itself but also from many other associated conditions such as nutritional deficits, cardiovascular problems, osteoporosis and lack of growth and development. Hemodialysis (HD) and peritoneal dialysis (PD) must be judged on as bridging methods as they are less beneficial than a kidney transplantation [KTX], which is the best option for treating pediatric ESRD.

## Pediatric renal care and pediatric transplantation

About 170,000 pediatricians work in the 42 European countries, about 850 of them are pediatric nephrologists. There is wide variation in the number of pediatric nephrologists available with 1.1 per one million children in Denmark and 8.8 in Germany. KTX in pediatric recipients is performed by more than half of the European pediatric centers. Interestingly, “pediatric” is defined differently in different countries. While in Great Britain, Ireland and the US age below 18 is the threshold, it is below 16 years in France and the Eurotransplant community and below 15 years in Italy and Spain. Almost all countries have special programs for ESRD children and adolescents that serve to expedite KTX and keep waiting time short.

## Underlying disease in childhood ESRD

About 40% of children suffer from congenital conditions such as aplasia and dysplasia of the kidneys, obstructive uropathy or cystic kidney disease. Focal sclerosing glomerulonephritis (FSGS) accounts for about half of the glomerular disorders in pediatric ESRD which by itself represents about and the latter are the underlying cause of pediatric ESRD in about 25% of cases. Hemolytic uremic syndrome (HUS) is a rare cause of ESRD in childhood and adolescence (~3%) with yet incompletely understood disease-specific implications for KTX. Age distribution in pediatric ESRS is about 40% between 10 and 15 years, and 15%, 20% and 25% for the age groups below 2 years, 2-5 years and 6-9 years.

## Indications/contraindications for pediatric KTX

Indication for pediatric KTX is ESRD. Absolute contraindications are “active” malignancies and a positive cross-match with a current donor, even though boundaries are currently pushed by specific immunosuppressive agents. HIV disease is still considered a contraindication by most investigators. Indispensable prerequisites for pediatric KTX are the existence of a low pressure reservoir and the elimination of obstructive pathologies like posterior urethral valves. Some children (bladder exstrophy, prune belly) require extensive pre-KTX. There is no minimum age for pediatric kidney recipients but mostly transplantation is not performed before the age of 2 years. Most authors prefer a weight above 15-20 kg. *Age matching* influences graft survival. As a consequence of the specific abilities and demands of young kidneys as well as of young recipients, some authors demand a “young for young” program for pediatric KTX. Regarding the *timing of transplantation*, preemptive pediatric KTX was found to improve graft survival only in the pre-mycophenolate era.

## Surgical aspects of pediatric KTX

The *preferred graft site* is extraperitoneal. *Vessel anastomosis* should be performed with absorbable monofil material (polydioxanone) in order to promote growth of the anastomoses and prevent stenosis. For *ureteral anastomosis* most authors prefer the extravesical approach. *Ureteral stenting* should be obligatory.

## Surgical complications in pediatric KTX

Urinary obstruction (1-30%), urinary leakage (0.3-9%) and urolithiasis (1-11%) are the main complications of the urinary system. Lymphoceles may develop in 1-7% and should be operated on laparoscopically. Vascular complications occur especially when the donor kidney is small. Irrespective whether complications are suspected or not, daily monitoring including Doppler ultrasound and serological parameters should be performed in the early phase after KTX.

## Immunosuppression in pediatric KTX

Induction therapy is performed most often by administration of interleukin-2 receptor antibodies. Azathioprine has proved to be inferior to MMF. Both calcineurin inhibitors, cyclosporine A (CsA) and tacrolimus (Tac), are used in pediatric KTX. In the US, Tac has almost replaced CsA even though some authors found an increased number of lymphoproliferative disorders when Tac was used in EBV-negative recipients of EBV-positive donor kidneys. Steroids are still routinely used. Side effects also negatively affect longitudinal growth in children. Overall, protocols reducing or avoiding steroids and CNIs are increasingly applied. Rejection therapy is usually performed as in adults with short steroid boost and switch of the CNI as initial medication. For antibody mediated rejection several concepts exist and new agents are tested with a promising potential for the future. *Non-compliance* is 5-50% in pediatric KTX and must always be taken into consideration when graft function deteriorates.

## Outcome of pediatric KTX

One- and 3-year graft survival rates are about 95% and 90%, recipient survival after 5 and 10 years is about 95% and 90%. Graft and patient survival after living donor kidney transplants is better than after deceased donor organ transplants. Graft survival varies with the *underlying disease* for ESRD. Congenital and structural pathologies have a better outcome than ESRD due to FSGS, HUS or neuropathies with concomitant voiding disorders.

## Infections in pediatric KTX

Pediatric kidney recipients are at high risk for viral (re)infections. The therapeutic strategy, besides administration of antiviral agents in some cases, is to reduce immunosuppression in order to reconstitute the recipient's immune response. Viruses of the *herpes group* represent the largest reservoir. PTLD is the most frequent malignancy after pediatric KTX (75-80%). Alarmingly, the share of pediatric recipients developing a malignant disease has increased more than three-fold over the past 20 years, which may be due to intensified immunosuppression. *Polyomavirus* (BK, JC) infection is becoming more common, possibly due to intensified immunosuppressive strategies.

## Expanding the donor pool for pediatric KTX

No publication on cross-over KTX in pediatric recipients exists and only 3 case reports have been published on pediatric KTX of organs from non-heart beating pediatric donors. ABO-incompatible pediatric KTX from living donors have been performed mainly in Japan and results are encouraging. Laparoscopic donor kidney retrieval found higher share of delayed graft function compared to open donation techniques but the reasons remain unclear and learning curve is essential.

## Conclusions

Kidney transplantation is the best therapy for pediatric ESRD and all efforts must be made to reduce waiting time for ESRD children. Optimal results can only be achieved if the specific requirements of kidney transplantation in children are taken into account rather than treating children and adolescents as "small adults", which can best be assured by close cooperation of pediatric nephrologists, pediatric urologists and pediatric surgeons.



## NOVEDADES EN LA RECIDIVA POSTRASPLANTE HEPÁTICO DEL VHC

### Diagnóstico no invasivo de la recidiva C postrasplante

**J.A. Carrión y X. Forns**

*Servicio de Hepatología, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, España.*

La recidiva de la hepatitis C postrasplante representa el primer problema en la mayoría de programas de trasplante hepático. Se calcula que, en nuestra área geográfica, entre el 25% y el 30% de pacientes con recidiva C desarrollarán una cirrosis hepática a los cinco años del trasplante. Como consecuencia de ello, la supervivencia de injertos y pacientes a largo plazo es significativamente inferior en trasplantados VHC positivos que en VHC negativos.

Todos los receptores de trasplante hepático con ARN-VHC detectable en el momento del trasplante desarrollan una infección crónica. En estos pacientes es especialmente importante monitorizar frecuentemente el daño hepático, aun cuando no se produzcan alteraciones analíticas significativas. La biopsia hepática, particularmente la evaluación del estadio de fibrosis, ha sido hasta ahora la única forma de evaluar la progresión de la enfermedad. Diversos estudios han demostrado que la presencia de fibrosis significativa (F2) al año del trasplante identifica con fiabilidad a los pacientes con riesgo de pérdida de injerto por recidiva C grave. Estos pacientes serían candidatos al tratamiento antiviral.

La práctica de una biopsia hepática ha sido y es todavía el “patrón oro” para la evaluación del grado de lesión hepática (inflamación y fibrosis) causada por diferentes enfermedades crónicas del hígado. Aunque es evidente que la biopsia hepática es necesaria para efectuar un diagnóstico adecuado, su valor para establecer el grado de daño (particularmente cuando se trata del seguimiento de enfermedades hepáticas crónicas) es discutible. Las limitaciones de la biopsia hepática en este aspecto son las siguientes:

1. Se trata de un método invasivo, no exento de riesgos. El 20% de pacientes presentan dolor y en una proporción baja pero no despreciable (0,5%) pueden producirse complicaciones graves (hemorragia, hemobilia). La aceptación del procedimiento es mala por parte de los enfermos. Finalmente, el precio de una biopsia es alto.
2. Desde un punto de vista meramente técnico, los problemas derivados de la interpretación de una biopsia hepática son varios. En primer lugar, el examen histológico no está exento de variabilidad intra e interindividual, incluso cuando se utilizan sistemas validados para clasificar el grado de actividad necroinflamatoria y el estadio de fibrosis. No hay que olvidar, además, que la biopsia representa un pequeñísimo fragmento del hígado y que, por tanto, existen errores de muestra (que aumentan proporcionalmente al menor tamaño de la muestra). De hecho, la medición del gradiente de presión portal parece más fiable que la biopsia como método para evaluar el daño hepático (en particular la fibrosis): al recoger la presión de un lóbulo hepático, evita el problema inherente al pequeño tamaño de una biopsia. De hecho, nuestro grupo ha demostrado recientemente que la presencia de hipertensión portal (gradiente de presión portal  $\geq 6$  mmHg) al año del trasplante es más fiable que la evaluación de la fibrosis en una biopsia hepática para identificar a los pacientes con riesgo de progresión de la enfermedad.
3. Finalmente, la biopsia hepática da una visión estática de la enfermedad y no puede predecir cuál va a ser su evolución a medio o largo plazo.

Por estos motivos, en los últimos años se ha producido una explosión en el campo del diagnóstico no invasivo de la fibrosis hepática. El diagnóstico no invasivo de la fibrosis hepática debería utilizar marcadores que fueran fáciles de obtener, reproducibles y finos a la hora de diferenciar entre estadios de fibrosis. Sería de importancia capital que estos marcadores fueran capaces de captar los cambios que se producen en el tiempo y que, por tanto, pudieran distinguir las fases diferentes de la enfermedad. Dado que existen evidencias sobre la reversibilidad de la fibro-

sis hepática, estos marcadores deberían también ser útiles para la monitorización de los cambios en la fibrosis hepática que se producen tras la administración de tratamiento antiviral.

## Diagnóstico no invasivo de la fibrosis hepática mediante marcadores serológicos de rutina

Desde un punto de vista teórico, la utilización de análisis de rutina como marcadores indirectos del grado o estadio de fibrosis hepática es muy atractiva. La mayoría de métodos basados en tests de rutina identifican o excluyen con mayor o menor fiabilidad la existencia de enfermedad hepática avanzada. En pacientes con hepatitis C crónica se han propuesto varios índices que combinan diferentes marcadores, como la edad del paciente, la cifra de plaquetas, la relación AST/ALT, el tiempo de protrombina, el colesterol sérico y el test de resistencia a la insulina, entre otros. El principal problema de estos índices en pacientes trasplantados es que las variables que se utilizan pueden modificarse por causas que no tienen relación con la progresión de la enfermedad. Así, la cifra de colesterol y el test de resistencia a la insulina (HOMA) pueden alterarse debido al tratamiento inmunosupresor; la plaquetopenia puede reflejar hipertensión portal residual o ser secundaria al uso de fármacos; la elevación de AST o GGT puede estar en relación con el rechazo o con alteraciones de la vía biliar. Por tanto, es difícil aplicar los modelos de pacientes inmunocompetentes a pacientes trasplantados. Recientemente, Belloch y cols. han publicado un estudio en el que demuestran la eficacia de un índice basado en parámetros tan fáciles de obtener como la relación albúmina/proteínas totales, la AST, el tiempo de protrombina y el tiempo transcurrido desde el trasplante. Aunque se trata de un método fiable, tiene el inconveniente de que identifica la presencia de fibrosis en fases ya muy avanzadas (F3 y F4).

## Diagnóstico no invasivo de la fibrosis hepática mediante marcadores de fibrogénesis

Un método alternativo para estimar la fibrosis hepática de un modo no invasivo es determinar las concentraciones séricas de sustancias implicadas directamente en la síntesis de sustancias de la matriz extracelular, un proceso denominado “fibrogénesis”. Aunque la fibrosis hepática es un proceso reparativo local, en casos de fibrosis avanzada algunas de las sustancias biológicas implicadas en dicho proceso alcanzan niveles elevados en la sangre periférica. Dichas sustancias comprenden enzimas implicadas en la síntesis o degradación del colágeno, proteínas de la matriz extracelular, moléculas resultantes del metabolismo del colágeno y citocinas profibrogénicas. Estos marcadores son particularmente útiles en pacientes con fibrosis de grados III y IV, en los que la actividad fibrogénica suele ser mayor. Entre los marcadores más utilizados hasta el momento están los inhibidores de las metaloproteinasas (como TIMP-1), el propéptido N-terminal del colágeno tipo III (PIIINP) y el ácido hialurónico, así como citocinas profibrogénicas (TGFβ1). Recientemente, Rosenberg y cols. han publicado un estudio muy extenso que analiza la utilidad de la combinación de varios marcadores de fibrogénesis para predecir la fibrosis hepática. El estudio incluyó una cohorte de más de 1.000 pacientes con diversas enfermedades crónicas del hígado. Los autores identificaron un algoritmo que combina la edad y las concentraciones séricas de procolágeno III, ácido hialurónico y TIMP-1 que predice con gran fiabilidad el grado de fibrosis que revela la biopsia hepática. El área bajo la curva fue aceptable para la hepatitis C (0,77), buena en la esteatohepatitis no alcohólica (0,87) y excelente en la hepatopatía alcohólica (0,94). Desgraciadamente, la aplicación de estos marcadores no ha sido validada en cohortes grandes de pacientes receptores de trasplante hepático y es, por tanto, pronto para recomendar su utilización.

## Diagnóstico no invasivo de la fibrosis mediante métodos de imagen

Otra de las aproximaciones racionales para estimar el grado de fibrosis hepática es mediante la utilización de técnicas de imagen. La ultrasonografía, la TAC o la resonancia magnética son capaces de detectar cambios en el parénquima hepático cuando existe fibrosis significativa. Dado el menor coste de la ecografía, ésta es la técnica ideal

desde un punto de vista teórico. Cuando hay cirrosis, la heterogeneidad del parénquima y la presencia de nodularidad y signos de hipertensión portal (esplenomegalia, aumento del tamaño de la vena porta, circulación colateral, hipertrofia del lóbulo caudado) ayudan sin duda a realizar su diagnóstico. Sin embargo, la ecografía es todavía poco útil para identificar pacientes con estadios inferiores (F2-F3). Los resultados de la utilización de *doppler* son quizás más interesantes: dado que la presencia de fibrosis grave se asocia a anormalidades en el flujo vascular hepático, la velocidad del flujo en los vasos hepáticos se ha podido correlacionar con el grado de fibrosis. De modo similar, la aplicación de programas de análisis de imagen sofisticados que evalúan los cambios en la heterogeneidad del parénquima hepático durante las fases de relleno vascular parecen incrementar la capacidad de la TAC para identificar diferentes estadios de fibrosis.

En los últimos años, ha sido sin duda la elastografía transitoria (ET) o Fibroscan la técnica que más ha revolucionado el campo del diagnóstico no invasivo de la fibrosis. Esta técnica utiliza una sonda que actúa a la vez como agente emisor y receptor. La sonda se constituye por una porción que emite un pulso elástico de vibración y un transductor que es capaz de emitir y recibir una onda de ultrasonidos. La onda de ultrasonidos atravesará el tejido hepático alcanzando una profundidad en un tiempo que dependerá de la rigidez del parénquima hepático. Es decir, la velocidad de transmisión se relaciona con el grado de rigidez o elasticidad del órgano. La ventaja de este método es su rapidez y el hecho de que el volumen de tejido que se evalúa sea aproximadamente 100 veces superior al de la biopsia hepática. Se han realizado ya numerosos estudios que han comparado los hallazgos en biopsias hepáticas (particularmente el estadio de fibrosis) con la rigidez hepática medida mediante ET. Su utilidad para identificar pacientes con fibrosis significativa o cirrosis en el caso de infección crónica por el VHC está bien demostrada. La combinación de dicha técnica con otros métodos no invasivos (como el Fibrotest) incrementa de forma significativa el poder diagnóstico. Recientemente, la aplicación de la elastografía transitoria en pacientes trasplantados hepáticos con recurrencia de la infección por VHC ha confirmado su utilidad en la práctica clínica. En una cohorte de 124 pacientes trasplantados que fueron sometidos a 169 biopsias hepáticas y a 129 estudios hemodinámicos se evaluó la fiabilidad de la ET para identificar la presencia de fibrosis significativa (F2-F4) y de hipertensión portal (gradiente de presión portal  $\geq 6$  mmHg). Se constató una excelente asociación entre el estadio de fibrosis y la rigidez hepática y, lo que quizás es más importante, una buena correlación entre el gradiente de presión portal y los valores de rigidez hepática. Las áreas bajo la curva para el diagnóstico de fibrosis significativa ( $F \geq 2$ ) y de hipertensión portal (HVPG  $\geq 6$  mmHg) fueron de 0,90 y 0,93, respectivamente. La técnica tiene una buena reproducibilidad, pero también adolece de algunas limitaciones, como su difícil aplicación en pacientes obesos y su falta de especificidad para distinguir entre esteatosis y fibrosis. La combinación de la ET y la resonancia magnética en contraste de fases, que evalúa (mediante las imágenes proporcionadas por la resonancia magnética) la propagación de ondas en el tejido, podría solventar las limitaciones de la ET.

## Resumen

Hay que recordar que en pacientes receptores de trasplante hepático con una recidiva de la infección por el VHC es importante realizar una biopsia para descartar otras patologías. Sin embargo, durante el seguimiento de estos pacientes, la evaluación del estadio o gravedad de la fibrosis requiere de controles frecuentes. Para ello, es imprescindible disponer de métodos fiables, rápidos, económicos y que no impliquen la práctica de una maniobra invasiva. Actualmente, la aplicación de marcadores serológicos en pacientes trasplantados para la evaluación de la gravedad de la recidiva es todavía prematura. La medición de la elasticidad hepática aporta información relevante e identifica correctamente a los pacientes con fibrosis significativa e hipertensión portal. Por tanto, y a falta de validación en otros estudios, ésta parece una técnica excelente para el seguimiento de estos pacientes.

## Referencias

1. Cadranel, J.F., Rufat, P., Degos, F. *Practices of liver biopsy in France: Results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL)*. *Hepatology* 2000; 32: 477-481.

2. Bedossa, P., Dargere, D., Paradis, V. *Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C*. Hepatology 2003; 38: 1449-1457.
3. Forns, X., Bataller, R. *Can we identify liver fibrosis in HCV-infected patients without a liver biopsy*. Current Hepatitis Reports 2003; 2: 145-151.
4. Forns, X., Ampurdanes, S., Llovet, J.M. y cols. *Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model*. Hepatology 2002; 36: 986-992.
5. Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Pieroni, L. y cols. *Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: A prospective study*. Lancet 2001; 357: 1069-1075.
6. Wai, C.T., Greenon, J.K., Fontana, R.J. y cols. *A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology 2003; 38: 518-526.
7. Sud, A., Hui, J.M., Farrell, G.C. y cols. *Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index*. Hepatology 2004; 39: 1239.
8. Bataller, R., Brenner, D.A. *Liver fibrosis*. J Clin Invest 2005; 115: 209-218.
9. Benlloch, S., Berenguer, M., Prieto, M. y cols. *Prediction of fibrosis in HCV-infected liver transplant recipients with a simple noninvasive index*. Liver Transpl 2005; 11: 456-462.
10. Rosenberg, W.M., Voelker, M., Thiel, R. y cols. *Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study*. Gastroenterology 2004; 127: 1704-1713.
11. Ziol, M., Handra-Luca, A., Kettaneh, A. y cols. *Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology 2005; 41: 48-54.
12. Castera, L., Vergniol, J., Foucher, J. y cols. *Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C*. Gastroenterology 2005; 128: 343-350.
13. Carrion, J.A., Navasa, M., Bosch, J. y cols. *Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation*. Liver Transpl 2006; 12: 1791-1798.

## BRONQUIOLITIS OBLITERANTE, LA ASIGNATURA PENDIENTE

---

### Preventive strategies and rescue therapy for OB in lung transplantation

---

**P.A. Corris**

*Institute of Cellular Medicine, School of Clinical Medical Sciences, Newcastle University and Freeman Hospital, United Kingdom.*

Lung transplantation has evolved as a successful therapeutic option for patients with advanced pulmonary disease however the long term results are limited by patients developing chronic graft dysfunction called obliterative bronchiolitis (OB).

This is characterised pathologically by epithelial injury leading to a fibroproliferative response that occludes the airway and functionally by progressive airway obstruction.

Approximately 50% of patients who survive 5 years following lung transplantation will have developed this allograft dysfunction to some degree and it leads to both morbidity and mortality, now recognised as the main cause of late death.

It used to be regarded as a manifestation of chronic graft rejection and whilst the main risk factors include persistent severe acute vascular and acute airway rejection, it is now recognised that a number of epithelial insults may lead to disorganised repair and ultimately OB.

These include severe primary graft dysfunction, viral infections, bacterial infections, gastro oesophageal reflux disease, oxidant injury and possibly premature senescence.

Whilst initial approaches to prevention and treatment of OB were focussed on alloimmune mechanisms it is now recognised that preservation of the innate immune system and other anti inflammatory approaches are important.

### Prevention of OB

Initial approaches have focussed on induction therapy and improved control of acute vascular rejection. To date there is no convincing evidence that reductions in episodes of acute vascular rejection have impacted on the prevalence of OB. There is no convincing evidence to choose between cyclosporine/tacrolimus nor azathioprine/mycophenolate. There is no evidence to support the use of cytolytic therapy as induction though a trial of Campath is underway. Similarly the results of an International Study of Tacrolimus vs Cyclosporine is awaited.

The de novo use of everolimus after anastomotic healing has not shown a statistically significant reduction in prevalence of OB at 3 year.

Nebulised cyclosporine has been shown in one randomised placebo controlled study to reduce the development of OB but there were several methodological problems which made full interpretation of the data difficult in this study.

It is apparent that whilst the introduction of newer immunosuppressives has been associated with the reduction in episodes of acute rejection there has been no commensurate fall in OB.

More recent approaches to prevention have recognised the link between viral and bacterial infections and OB.

These have included more effective prophylaxis against CMV and the use of nebulised anti pseudomonal agents in patients post transplant whose lungs may become colonised.

There are no data to show efficacy.

Statins too have been shown to potentially reduce the development of OB but the evidence is based on a retrospective observational study with no randomised placebo controlled data



## Treatment of OB

### *Alloimmune mechanisms*

A number of different approaches have been tried but there is a paucity of controlled trials.

There is evidence that the rate of loss of lung function in patients with OB may be abrogated by switching those on cyclosporine to tacrolimus, giving total lymphoid irradiation or photophoresis.

There are small uncontrolled trials reporting success with the use of cyclophosphamide and methotrexate but it is not clear how many negative responses go unreported.

### *Antifibrotic mechanisms*

Both everolimus and sirolimus have been tried given in vitro evidence of inhibition of fibroblast function. In general no significant responses have been reported.

### *Other mechanisms*

Several groups have demonstrated that gastroesophageal reflux is associated with an increased risk of OB and that early fundoplication may prevent progressive OB. Once again there is a paucity of randomised controlled studies in this area.

There are a number of studies reporting experience in the use of the macrolide azithromycin in treating patients with OB. Patients with high numbers of neutrophils in their bronchoalveolar lavage fluid appeared to show functional improvements in terms of FEV1 and this therapy is the first to demonstrate improvements rather than stabilization of function.

Controlled trials are underway to establish in more detail which patients benefit and they are accompanied by laboratory studies determining mechanisms of action.

## Summary

Prevention and treatment of OB remains one of the most important challenges in lung transplantation and international collaborative randomised studies are required.

At present it seems appropriate to consider the use of statins and azithromycin with a switch from cyclosporine to tacrolimus when appropriate.

Since most patients with OB will die of lung infections and sepsis, reduction in immunosuppression rather than an increase seems good advice in patients with advanced disease.

## Humoral rejection and its relevance in lung transplantation

**M.R. Zamora**

*University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, USA.*

The role of humoral immunity and antibody-mediated rejection (AMR) have been increasingly recognized as a form of rejection following solid organ transplantation and is well-described after renal, cardiac and probably liver trans-

plantation (1). The existence of humoral rejection following lung transplantation continues to be debated. Yousem (2) first reported that patients who failed to respond to steroid therapy of acute cellular rejection had a greater percentage of B cells in the graft infiltrating mononuclear cells than those who did respond. He postulated that these B cells may have been part of a humoral rejection process. Since then, a growing body of evidence suggests that humoral immunity plays an important role in acute lung allograft rejection and the development of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). Airway epithelial cells as well as the vascular endothelium appear to be important targets in the alloimmune response. Jaramillo et al. (3) found that lung transplant recipients with BOS developed *de novo* anti-epithelial cell antibodies which preceded the onset of BOS by 22.5 months. Lung transplant recipients with pre-existing anti-MHC antibodies, or those who develop *de novo* anti-MHC class I antibodies have an increased risk of BOS, early allograft failure and death (4-8). Palmer et al. (9) then found that development of *de novo* Class II antibodies were also associated with BOS and lower survival after lung transplantation. Animal models have been utilized to show that anti-HLA class I antibodies induce obliterative airways disease by induction of growth factors, apoptosis of epithelial cells and chemotaxis of inflammatory cells (10). Taken together, these findings support a role for humoral mechanisms in the pathogenesis of acute and chronic lung allograft rejection.

A recent consensus conference on AMR defined the criteria for AMR as evidence of graft dysfunction, tissue injury with capillary endothelial cell swelling and/or necrosis, neutrophilic septal infiltration, macrophages in capillaries and fibrin deposition, evidence for antibody/complement deposition/activation and serologic evidence of donor-specific antibodies (11). The classification scheme for cardiac allograft rejection has undergone revision to incorporate AMR based on these criteria. The search for pathologic evidence of AMR in lung transplantation has been difficult. In a prospective study of acute lung rejection utilizing immunofluorescent techniques, Saint Martin et al. (12) were unable to demonstrate antibody deposition or complement activation. Badesch et al. (13) then described 5 cases of pulmonary capillaritis, known to occur in autoimmune lung diseases, as a possible form of humoral rejection in lung transplant recipients. Histologically, these cases had evidence of neutrophilic infiltration with septal necrosis, fibrin deposition  $\pm$  alveolar hemorrhage but only one case had evidence of antibody deposition in a linear fashion along the capillaries. Finally, Magro et al. (14) described 22 patients with a septal capillary injury syndrome as a common form of lung rejection. Biopsies revealed septal necrosis and alveolar hemorrhage with evidence of antibody deposition and complement activation. Anti-HLA antibodies were not identified but most patients had evidence for circulating anti-endothelial cell antibodies. These cases differ from the Badesch series in several important respects: the injury pattern occurred in virtually all their patients, was pauci-immune, that is, few inflammatory cells were present; and showed granular deposition of complement in the endothelial cell nuclei or cytoplasm. These authors later confirmed that their patients with putative humoral rejection did not produce anti-HLA antibodies but in fact did produce antibodies to antigenic targets of endothelial cell origin (15). Recently, Astor et al. (16) reported on 40 cases of pulmonary capillaritis in lung transplant recipients. This form of rejection was steroid resistant in 57% of cases but most responded to plasmapheresis suggesting a potential role for AMR in these patients.

It should be noted that the use of C4d as a diagnostic marker of AMR in lung transplant recipients is controversial. Magro (17) reported that C4d deposition was a marker of acute rejection and the degree of humoral rejection but was not related to the presence of anti-HLA antibodies. Complement deposition was also seen in the airways of patients with BOS prompting these authors to speculate that C4d may be a marker for the presence of BOS. Conversely, Miller (18) found significant elevation of C4d in bronchoalveolar lavage fluid directly correlated with the presence of circulating anti-HLA antibodies. Wallace (19) found no evidence of specific C4d staining in lung biopsies with acute or chronic rejection.

We recently sought to determine whether patients with pulmonary capillaritis following lung transplantation, do indeed meet the criteria for AMR (20). Paraffin embedded tissue from transbronchial or open lung biopsies from 22 lung transplant patients with pulmonary capillaritis was stained for CD3 (T cells), CD20 (B cells), CD68 (macrophages) or CD38 (plasma cells) and CD31 (endothelial cells). Tissue sections were also stained for antibody and complement deposition (IgG, C3, C4d C1q) (special acknowledgement to Dr. Cynthia Magro). Serum was analyzed for the presence of donor-specific, anti-HLA antibodies.

We found that the graft infiltrating cells consisted of T (65-95% of cells) and B (10-35%) lymphocytes, rare macrophages and no plasma cells. In cases of isolated capillaritis, T and B cells were found in the septum. In cases

of capillaritis with concomitant acute cellular rejection, they were found in the septum as well as in a perivascular location. Macrophages were found in the septum or in the walls of larger blood vessels. Antibody deposition or complement activation was found as follows: IgG 5/21 (24%), C3d 7/8 (88%) and C4d 2/12 (16%). Circulating anti-HLA antibodies were only found in 5/21 (24%). Three patients with pulmonary capillaritis had evidence of graft dysfunction, tissue injury, evidence of antibody deposition and circulating anti-HLA antibodies; thus fulfilling all the criteria for AMR. From these results, we concluded that 1) because PC is effectively treated by plasmapheresis, it is likely that humoral factors trigger this pathology; 2) infiltrating graft mononuclear cell phenotypes are consistent with antibody-mediated mechanisms, and 3) a subset of pulmonary capillaritis patients meet all the diagnostic criteria for antibody-mediated rejection. However, it remains to be determined whether all capillaritis cases involve AMR, whether other humoral factors beyond antibodies are involved in the pathogenesis and, finally, whether other forms of lung transplant rejection besides pulmonary capillaritis are antibody-mediated.

Taken in total, the available evidence supports the likelihood of AMR following lung transplantation and that humoral mechanisms likely play an important role in the development of acute rejection and bronchiolitis obliterans syndrome. However, more studies are required to determine whether the previously described pathologic lesions do in fact represent humoral rejection in lung transplantation. Recognition of the role for humoral mechanisms in lung allograft rejection have important therapeutic implications. Plasmapheresis, with or without intravenous immunoglobulin, has been shown to be effective at removing preformed antibodies and in the treatment of AMR in other solid organ transplants. It is also effective in lung transplant recipients with pulmonary capillaritis. The use of immunosuppressive agents targeting B cells may be very important in the prevention of *de novo* antibody production and the control of other humoral mechanisms in lung transplant rejection.

## References

1. Colvin, R.B., Smith, R.N. *Antibody-mediated organ-allograft rejection*. Nat Rev Immunol 2005; 5: 807-817.
2. Yousem, S.A. et al. *Can immunohistological analysis of transbronchial biopsy specimens predict responder status in early acute rejection of lung allografts?* Hum Pathol 1994; 25: 525-529.
3. Jaramillo, A. et al. *Activation of human airway epithelial cells by non-HLA antibodies developed after lung transplantation: a potential etiologic factor for bronchiolitis obliterans syndrome*. Transplantation 2001; 71: 966-976.
4. Lau, C.L. et al. *Influence of panel reactive antibodies on posttransplant outcomes in lung transplant recipients*. Ann Thorac Surg 2000; 69: 1520-1524.
5. Smith, M.A. et al. *Effect of development of antibodies to HLA and CMV mismatch on lung transplant survival and development of bronchiolitis obliterans*. Am J Thorac Surg 1998; 116: 812-820.
6. Sundaresan, S. et al. *HLA-A locus mismatches and development of antibodies to HLA after lung transplantation correlate with the development of bronchiolitis obliterans syndrome*. Transplantation 1998; 65: 648-653.
7. Jaramillo, A. et al. *Development of ELISA-detected anti-HLA antibodies precedes the development of bronchiolitis obliterans syndrome and correlates with progressive decline in pulmonary function after lung transplantation*. Transplantation 1999; 67: 1155-1161.
8. Hadjiiladis, D. et al. *Pre-transplant panel reactive antibody in lung transplant recipients is associated with significantly worse post-transplant survival in a multicenter study*. J Heart Lung Transplant 2005; 24(Suppl. 7): S249-254.
9. Palmer et al. *Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome*. Transplantation 2002; 74: 799-804.
10. Maruyama, T. et al. *Induction of obliterative airway disease by anti-HLA Class I antibodies*. Am J Transplant 2005; 5: 2126-2134.
11. Takemoto, S.K. et al. *National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation*. Am J Transplant 2004; 4: 1033-1041.

12. Saint Martin, G.A. et al. *Humoral (antibody-mediated) rejection in lung transplantation*. J Heart Lung Transplant 1996; 15: 1217-1222.
13. Badesch, D.B. et al. *Pulmonary capillaritis: A possible histologic form of acute pulmonary allograft rejection*. J Heart Lung Transplant 1998; 17: 415-422.
14. Magro, C.M. et al. *Humorally mediated posttransplantation septal capillary injury syndrome as a common form of pulmonary allograft rejection: A hypothesis*. Transplantation 2002; 74: 1273-1280.
15. Magro, C.M. et al. *Evidence that humoral allograft rejection in lung transplant patients is not histocompatibility antigen-related*. Am J Transplant 2003; 3: 1264-1272.
16. Astor, T.L. et al. *Pulmonary capillaritis in lung transplant recipients: Treatment and effect on allograft function*. J Heart Lung Transplant 2005; 24: 2091-2097.
17. Magro, C.M. et al. *Use of C4d as a diagnostic adjunct in lung allograft biopsies*. Am J Transplant 2003; 3: 1143-1154.
18. Miller, G.G. et al. *Acute humoral rejection of human lung allografts and elevation of C4d in bronchoalveolar lavage fluid*. Am J Transplant 2004; 4: 1323-1330.
19. Wallace, W.D. et al. *C4d staining of pulmonary allograft biopsies: An immunoperoxidase study*. J Heart Lung Transplant 2005; 24: 1565-1570.
20. Zamora, M.R. et al. *Pulmonary Capillaritis: A form of humoral rejection in lung transplant recipients?* Transplantation 2006; 82(1 Suppl. 2): 275-276.

## DONANTE EN ASISTOLIA

### Ethical and legal issues in non-heart-beating organ donation

**M.A. Bos**

*Health Council of The Netherlands, Medical Ethics Committee of the Eurotransplant Foundation.*

#### Introduction

The worldwide imbalance between the demand for transplantable organs and their supply is increasing. The usual source of organs has been either the living (kidney) donor or the brain-dead (but heart beating) donor. In particular the number of heart-beating (HB) donors has reached a plateau or is even diminishing in many countries. Use of living donors is on the increase in many countries, but cannot satisfy the growing need for renal, and in particular extra-renal donor organs. Out of necessity therefore, there has been since the 1990's an international drive to re-start the procurement of organs (especially kidneys and livers) from non-heart beating organ donors (NHBD). This procedure may result in a desirable outcome for the patient and his family, when progression to brain death does not take place and conventional and intended organ retrieval from a heart beating donor is thereby prevented. Follow-up studies of recipients of NHBD organs have further shown that the survival results are satisfactory and comparable to those of transplants with HB donor organs. The procurement of NHBD organs therefore constitutes a valuable additional source of transplantable organs. However, this practice may raise concerns with both the medical professionals and the public, and may jeopardise support for the current donation and transplant programme. Steps should be taken to enhance the confidence of those involved by focusing on the ethical, legal and social aspects of NHB donation and educate all parties. This should result in (national) guidelines that are ethically as well as legally justifiable.

#### General ethical framework for NHBD

The successful introduction and growth of a NHB donation program hinges on the careful and explicit adherence to human and medical core values. The following ethical framework should support the implementation of an NHBD policy:

- Respect for the life and dignity of the individual. The human body can be used as a source of tissues and organs to serve the health of other human beings, but the dead body should always be treated with care and respect; The care of the dying patient must not be compromised by the desire/need to retrieve the organs. Decisions about the dying patient and the dead body must be guided by the individuals beliefs and values.
- Optimal end-of-life care. The first responsibility of health care providers is to provide for the well being of the dying patient, regardless of the potential for donation. This includes not only physical but also psychological, emotional and spiritual well being.
- *Respect for patient autonomy.* Decisions about end-of-life care should be based on the known values and beliefs of the patient, and they should be consistent with his view of a meaningful end to life. This may or may not include organ donation.
- *Support for the grieving family.* Support of the bereaved family should be provided, whether or not organ donation occurs. This support should continue through all phases of dying: before, during and after withdrawal of life-sustaining therapy.



- *Public trust and avoidance of conflicts of interest.* Conflicts of interest and dual commitments may arise in a NHBD setting, and it is important to recognize and neutralize them. The main area for conflict is with the team caring for the (dying) patient and those responsible for the procurement process.
- *Respect for professional integrity.* Professionals involved with end of life care as well as those responsible for donation and transplantation are guided by their own values and professional standards as articulated by their respective organizations. Decision making in the context of NHBD should be free from considerations of professional loyalty, prestige or personal gain.

## General legal framework for NHBD

Current legislation on organ donation, including guidelines and regulations concerning the determination of death, as well as rules for consent, are now generally applicable to the situation of donation after establishing brain death (HB donors). This means that the specific situation with NHB donation is not always adequately covered and that certain legal rules are subject to interpretation. Sometimes there is the need for (extensive) legislative review. An important principle is the so-called 'Dead donor rule': the requirement that the death of the patient should be established beyond any doubt before organs can be procured, and that the patient must not die as a consequence of this retrieval. The determination of death in the context of NHBD should never violate this principle.

## The NHBD setting and process

The procurement of NHB donors involves two different patient conditions or settings:

- **Controlled NHB donation:** donation may be considered in a (dying) patient when death is anticipated, but has not yet occurred. These are generally patients in ICU, who are on life-sustaining therapy. (The controlled setting includes the category III patients according to the Maastricht criteria).
- **Uncontrolled NHB donation:** donation is considered after death has occurred (on the street, in the ER) but was not anticipated. (The uncontrolled setting includes Maastricht categories I, II and IV).

In general a NHBD setting occurs when a potential donor does not (yet) fulfill brain death criteria (diagnosis and confirmatory tests).

## Legal aspects of NHB donation

Three issues stand out as being particularly important when considering the legal impact of using NHB donors:

- *Determination of death.* Most countries do not have a precise statutory definition of death incorporated in the legislation itself. In many countries the law states that a prospective organ donor's death may be determined by either cardiopulmonary or neurological criteria, i.e. a person is dead when that individual satisfies the medical criteria for either circulatory/respiratory arrest or brain death. The precise criteria and procedure for this diagnosis are left to the medical profession. The Harvard Commission (1968) has introduced the (philosophical) notion that there is only one essential standard or definition for establishing death: the irreversible loss of whole brain function. Therefore there does not exist a dichotomy between HB donors and NHB donors in respect to the death criterion: both die of irreversible loss of brain function, but this condition is diagnosed in different ways. Criteria for diagnosing circulatory arrest include: cessation of function, absence of pulse, respiration, heartbeats, and responsiveness as measured by confirmatory tests. A further legal issue is that this cessation of function should be *irreversible* beyond doubt: this means that this situation should exist for an appropriate period of observation. Protocols and opinions differ on this issue, but there is international consensus that 'not less than 2 minutes of

hands-off observation and no more than 5 minutes is to be recommended' (Society of Critical Care Medicine, IOM). A national NHBD protocol in The Netherlands states that 'there should be a 5 minute interval between asystole and the start of organ preserving measures'. The hands-off interval rules out that there could be a spontaneous resuming of function (autoresuscitation). In observing these rules the dead-donor-rule is not violated.

- *Obtaining valid consent.* A universal legal requirement for organ retrieval is (informed) consent. Depending on the legal system this can be based on the opting-out (presumed consent) principle or on the opting-in (explicit consent) principle. Consent may be given either by the patient himself (donor card, donor registration, living will) or –in the absence of this– by the family. Organ procurement in the NHBD setting follows the same rules as in the HBD setting: procurement cannot take place without a valid consent. In the controlled (cat. III) setting this poses no problem, since death is anticipated, the withdrawal of life-support is planned and there is time for consultation with the next-of-kin; however in the uncontrolled setting (cat. I and II) there is a time constraint that has to do with the pressing need for organ-preservation measures. This may complicate obtaining timely consent from the family.
- *Organ preservation in the absence of family consent.* Uncontrolled NHB donors (cat. I and II) are generally not ventilated at the time of their death and therefore organ preservation is urgently needed after death to limit damage from warm ischemia. This is usually done by starting in-situ preservation (ISP) with a special DTBL catheter. However, if consent cannot be established at the time of death, and the family is not present to take a decision on this, legislation usually rules out organ retrieval as well as measures to prepare for procurement (e.g. organ preservation in the body). Some countries (i.c. The Netherlands) have introduced legislation take make it possible to start organ preservation in this situation, in order to preserve the option of donation by family consent until the family arrives. In case of family refusal, the preservation is stopped and procurement does not occur.

## Ethical aspects of NHB donation

A number of ethical issues and problems arise in the context of NHB donation, depending on the type of donor and the setting.

### *Uncontrolled NHB donors (cat. II)*

These patients die in the hospital after an (unsuccessful) effort at resuscitation. It is important to note that the decision to terminate resuscitation is a medical decision, based on clinical experience, and is taken totally independent from the decision to initiate organ donation.

The official declaration of death in these patients follows after observing a 5 minutes hands-off interval after circulatory arrest. After this organ preserving measures (cannulation, ISP) are allowed.

### *Controlled NHB donors (cat. III)*

These are patients who are in hospital (mostly neurological ICU and often on ventilation) and are diagnosed with a fatal condition (infaust prognosis) but who do not proceed to full brain death. A decision is then taken (if the law permits this) to withdraw or withhold all life-sustaining therapy since continuation of therapy would amount to futile treatment. This decision can be taken on the basis of a living will or advance directive from the patient himself, or a consensual decision taken by the medical team and the family. Again, this decision is part of the end-of-life care for dying patients, and is totally independent from a consideration for donation. In other words: the decision to withdraw life-support is made on its own merit, and not for the purpose of organ retrieval. Only after this withdrawal decision has been taken, can organ procurement be considered. Two further issues should be decided in this process: a) The appropriate time and place (ICU or operating room) for the actual withdrawal and wait for cir-

culatory arrest should be determined. The ethical issue here is to fully cooperate with the family to give ample time for saying farewell to the deceased loved one. Also the final stages of the dying process should be guided by the treating physician while the donation team stays out of sight. b) An estimation should be made of the expected time from withdrawal to circulatory arrest (1-2 hours). However, family should be informed that if this period is exceeded, the donation will not take place and the patient will be taken back to the ward.

#### *The administration of transplant related medication and measures before death*

In controlled (cat. III) NHB donors several types of medication (vasodilators, anti-coagulants, anti-oxidants) may be administered before the onset of circulatory arrest, with the aim of preserving and protecting organ viability during the dying phase, thus for the benefit of the organ recipient. Whether this is ethically justified depends on the willingness and decision to donate by the donor or his family. In some countries (e.g. The Netherlands) the rule is that these measures can only be taken before death has occurred, when there is consent from the donor himself. The idea behind this is, that a person who consents to donation will also consent to any intervention that will enhance the outcome of the transplant, and that this will serve both the recipient and the donor/family. When consent for donation depends on the family, organ protecting and preserving measures are only allowed after circulatory arrest. The legislation in The Netherlands additionally requires that:

- Organ protecting medication must not conflict or prohibit normal care (for the dying)
- Should not give pain or discomfort to the patient
- Should not mutilate or change the appearance of the patient

There has been an intensive debate on the issue that some medications given to dying patients after withdrawal of life-support may have in fact the unintended side effect of hastening the (inevitable) death of the donor (e.g. heparin, vasodilators). Here is an example of the 'principle of double effect'. Indeed, since the intent and wishes of the patient and/or his family are to donate organs after death, the possible hastening of death does not violate or conflict with the dead donor rule: the principle of double effect sustains the beneficial act of organ donation.

### **Allocation of NHBD organs**

A further ethical issue that merits attention is the way NHBD organs are allocated to patients on the waiting list. Most countries have a national or regional allocation system: organs from so-called standard criteria donors (SCD) are offered to and accepted by transplant centres on a regular basis. Organs from extended criteria donors (ECD) however may be handled a bit differently in that centres may have a choice to accept or refuse these offers for their patients. The issue here is whether organs from NHB donors are viewed as falling into the ECD category or not. In the early days of NHBD (1980's and 90's) these organs were often classified as ECD or being of 'marginal quality', because of their high percentage of non-function and delayed graft function. However, since then follow-up studies have shown that the outcome of NHBD transplants at 3 and 5 years is very similar to that of SCD organs. This is certainly the case for NHB organs from controlled (cat. III) donors. Countries such as The Netherlands, UK and USA now have the policy to allocate NHBD organs to patients on the waiting list through the regular system. Patients, when put on the waiting list are informed that they may be offered a NHBD kidney and they have the right to decide beforehand if they want to be eligible for such an offer or not. However, they will not be told at the time a kidney is actually offered if the donor was NHBD, nor do they have the right to refuse such an offer.

#### *Educating the media and the public*

A final issue that needs discussion is how the public and the media perceive NHB donation and how education can positively influence this. The first target for an education program of course is the hospital staff itself: NHB dona-

tion differs in many respects from 'regular' HB donation (time pressure, withdrawal of life-support, organ preserving interventions) and hospital staff may at first have reservations that need to be overcome.

The next phase is that the general public and the media must be approached and convinced that NHBD does not conflict with the usual donation practice, that there is a careful procedure to declare death, and that the quality of end-of-life care is in no way sacrificed. It must be made clear that NHB donation can be practised with the full support and comfort to families, and that the wishes of both the donor and the next-of-kin will be fully honoured. It is of utmost importance that the media support the message that NHBD is a valuable additional source of transplantable organs that saves lives and gives good quality of life.

## Trasplante renal de donante en asistolia: resultados en riñón

### **A.I. Sánchez-Fructuoso**

*Servicio de Nefrología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.*

Los programas de extracción de órganos en asistolia reflejan el esfuerzo de un equipo trasplantador por aumentar el número de donantes. Esta necesidad viene suscitada por el desequilibrio cada vez mayor entre las necesidades de órganos y el número de donantes efectivos. Así, cada año aumenta un 20% el número de pacientes en lista en la United Network for Organ Sharing y, lo que es más grave, la mortalidad de estos sujetos está en torno al 6% anual.

Gracias al programa de asistolia, el número de donantes efectivos en nuestro centro se ha triplicado desde 1994, incrementándose año tras año el porcentaje de órganos obtenidos. Ello ha llevado a una reducción de la lista de espera a un número tan escaso que en ocasiones tenemos que derivar órganos, al no disponer de receptores. Es más, actualmente estamos trasplantando un porcentaje cada vez mayor de sujetos en situación de prediálisis y el tratamiento de la nefropatía crónica de trasplante evolucionada es en gran parte de los casos el retrasplante.

Nuestro grupo comenzó a obtener órganos de donantes en asistolia (DA) en 1989 y, tras un periodo inicial en el que los resultados no fueron muy buenos, pero que nos sirvió para conocer cuáles son las características que debe cumplir un sujeto para ser DA, iniciamos una segunda etapa de extracción en asistolia en la que los resultados obtenidos son similares o incluso, en algunos aspectos, superiores a los logrados con los donantes en muerte cerebral. El DA supone actualmente entre el 60% y el 70% de nuestros donantes. Para mantener los órganos utilizamos *bypass* cardiopulmonar con circulación extracorporea, oxigenación externa y perfusión en normotermia y/o hipotermia. El protocolo de Maastricht requiere que el diagnóstico de muerte por parada cardíaca sea realizado por un médico independiente del equipo de trasplante tras 10 minutos de cesación del masaje cardíaco externo y de la ventilación artificial.

Además de los requisitos clásicos del donante de órganos en general, nuestros criterios, coincidentes con los de la mayoría de grupos, incluyen:

- 1) Tiempo máximo de oligoanuria previo a la parada: 60 min.
- 2) Tiempo máximo de isquemia caliente (desde el inicio de la parada hasta el comienzo de la perfusión): 180 min.
- 3) Tiempo máximo en bomba de perfusión: 240 min.
- 4) Edad del donante  $\leq 55$  años.

Es importante ser estricto en el cumplimiento de estas condiciones y rigurosos en el manejo del paciente para conseguir que el programa sea exitoso.

Desde enero de 1989 hasta junio de 2006, hemos trasplantado 420 riñones de donantes en asistolia: 330 (78,6%) del tipo I, 68 (16,1%) del tipo II, 6 (1,8%) del tipo III, 4 (1,2%) del tipo IV, y 12 (3,5%) del tipo V. Los donantes tipo V se obtuvieron en los primeros años del programa y, al observar que los resultados eran malos, desde 1994

los hemos descartado. Efectivamente, estos injertos presentaban muy mala supervivencia a corto y largo plazo. El motivo fundamental es que estos donantes que sufren muerte cardíaca en la UCI suelen haber tenido antes de la parada definitiva una hemodinámica mala, incluso paradas cardíacas previas de las que el paciente se recuperó, y todo ello aumenta la isquemia caliente real e incrementa de manera importante no solo las posibilidades de necrosis tubular aguda, sino del temible daño endotelial severo y la consiguiente microangiopatía trombótica tras la reperusión de los riñones. Realmente la viabilidad de los riñones de DA, que indefectiblemente están expuestos a un periodo más largo de lo habitual de isquemia caliente, es el factor probablemente más importante a la hora de valorar resultados.

Clásicamente los DA se han considerado como subóptimos. Sin embargo, recientemente hemos publicado un análisis retrospectivo en el que comparamos la evolución de trasplantes de donantes menores de 60 años en muerte cerebral y donantes de edad  $\geq 60$  años en muerte cerebral frente a trasplantes de DA. Nuestros resultados confirman hallazgos previos de nuestro grupo en cuanto a que no existen diferencias ni en la función renal ni en la supervivencia del injerto entre los trasplantes de DA y los procedentes de donantes jóvenes en muerte encefálica. Los riñones procedentes de donantes ancianos, como era de esperar, presentan peores resultados.

Los trasplantes de DA presentan una mayor incidencia de retraso en la función inicial del injerto (60,6% vs 19% en donantes en muerte cerebral). Este hallazgo se describe en todos los trabajos sobre este tipo de trasplantes. Para evitar o reducir la necrosis tubular aguda es importante disminuir el tiempo de isquemia fría, mantener al receptor en un buen estado de hidratación y evitar o usar dosis bajas de inhibidores de la calcineurina, por su efecto nefrotóxico en el postrasplante inmediato. Durante estos años, nuestro grupo ha utilizado distintos protocolos de inmunosupresión. Inicialmente el protocolo se basó en terapia de inducción con introducción retrasada de ciclosporina, pero tuvimos una alta incidencia de infecciones oportunistas (fundamentalmente citomegalovirus) que llevaron a una mala supervivencia del paciente y del injerto. Una pauta con un anticuerpo monoclonal frente al receptor de IL-2 asociada a dosis bajas de tacrolimus, micofenolato y corticosteroides nos ha dado excelentes resultados, al igual que a otros grupos.

Pese a lo complicado que puede ser por el manejo del sujeto, el retraso en la función inicial del injerto no supone menor supervivencia en nuestra serie de DA, a diferencia de lo que nos ocurre en la muerte cerebral. La respuesta a este hallazgo no está clara. Nosotros creemos que la necrosis tubular aguda postrasplante puede ser reflejo de una muerte cerebral explosiva, con gran estímulo simpático e inflamatorio, que condicione una mala supervivencia del injerto a largo plazo. El DA no sufre el proceso de muerte cerebral que, en muchas ocasiones, es sumamente deletéreo y causante en muchas ocasiones de disfunción del órgano.

Teniendo en cuenta que, como hemos venido diciendo anteriormente, aproximadamente un 60-70% de los trasplantes no funcionan de inicio, es muy importante el diagnóstico de rechazo. Desgraciadamente, en el momento actual no disponemos de ninguna prueba no invasiva para su detección, por lo que es habitual realizar biopsias sistémicas cada 5-7 días hasta que la función renal comienza a mejorar.

Un hallazgo muy interesante con estos trasplantes es que presentan menor incidencia de rechazo vascular que los trasplantes de donantes en muerte encefálica, de manera que hemos demostrado a través de análisis de regresión de Cox que la muerte cerebral es un factor de riesgo para presentar rechazo vascular. Ello nos conduce a la hipótesis de que factores asociados con la muerte cerebral pueden disparar mecanismos de respuesta inmunitaria aloespecífica. De hecho, se ha informado de que la muerte cerebral puede ser un factor de riesgo para la viabilidad de los órganos a trasplantar, entre otras cosas porque este proceso se asocia con complejas alteraciones hemodinámicas, neurohumorales e inmunitarias. En ratas se ha demostrado que la muerte cerebral induce un aumento llamativo de la expresión mRNA de productos derivados de linfocitos y macrófagos a las pocas horas, desencadenándose un proceso de rechazo agudo acelerado de una forma mucho más rápida que si se trasplantan órganos de ratas vivas anestesiadas y no sometidas al proceso de la muerte cerebral. Todos estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la estimulación de la inmunidad inespecífica y el daño que produce el proceso de muerte encefálica pueden desencadenar respuestas inflamatorias en el donante y ser importantes en la patogénesis del rechazo.

En conclusión, los donantes en asistolia (fundamentalmente los de tipo I o II) suponen una importante fuente de órganos que debe tenerse en cuenta. Los resultados obtenidos son similares a los comunicados en donantes jóvenes en muerte cerebral. Basándonos en nuestros resultados, proponemos un cambio de actitud en el tratamiento de la parada cardíaca irreversible con vistas a aumentar la donación.



## **NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN INMUNOSUPRESIÓN**

### **Pirfenidone: An anti-fibrotic agent with a potential therapeutic role in managing chronic allograft dysfunction**

**A. Dosanjh**

*UCSD School of Medicine, La Jolla, California, USA.*

#### **Introduction**

Pirfenidone (PFD), a substituted pyridine, 5 methyl-1-phenyl-2(1H), has oral bioavailability, hepatic metabolism and a serum half life of 2-3 hours. The drug has been established as an effective anti-fibrotic agent, with anti-inflammatory properties. In several studies, PFD controlled inflammation and tissue damage associated with ischemia and reperfusion. PFD reduces the biomarkers of local and systemic inflammation and fibrosis based on experimental models of cardiac, renal and pulmonary fibrosis. The exact mechanisms are not fully elucidated, however PFD is a potent inhibitor of TGF-beta, and thus has downstream effects on matrix deposition. PFD inhibits p38-gamma MAP kinase and results in lower expression of collagen, fibronectin and alpha SM-actin.

In chronic allograft dysfunction, initial injury to the epithelium is followed by a pro-fibrotic reaction which results in matrix deposition and fibrosis of the transplanted organ. The use of PFD in heterotopic and orthotopic models of lung transplantation was associated with local and systemic changes limiting fibrosis in the airway allograft.

Clinically, development of fibrosis often heralds the onset of a decline in function and subsequent mortality. A variety of immunosuppressive regimens have been used to attempt to control chronic rejection. Thus far, no clinical trial has utilized PFD in these transplant drug regimens. PFD has been used in several human clinical phase II and III clinical trials and is currently under phase III investigation for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis.

The process of fibrosis, a common endpoint in chronic graft dysfunction, can be divided into three stages: 1) an initial inflammatory response, 2) tissue injury and 3) subsequent restoration and repair. PFD may help to limit these aspects of the fibrotic response. Pirfenidone has actions that suppress TNF $\alpha$ , a key regulator of the inflammatory response in allograft rejection. In addition, PFD's direct action on TGF $\beta$  expression, even after transcription is activated, is another cellular effect which could have possible beneficial clinical consequences in the transplantation setting.

#### **Mechanism of action**

Oral absorption is estimated at 80% and the serum half life is 2-3 hours. PFD's actions as an anti-fibrotic agent are largely attributable to its inhibition of p38-gamma MAP kinase. In addition, PFD may regulate translational silencers such as TIA-J. The result is an inhibition of fibrotic factors most notably, TGF1. As a consequence, downstream synthesis of extracellular matrix proteins, such as fibronectin, elastin and collagen are reduced. Other studies have also elucidated the ability of PFD to scavenge oxygen radicals, to decrease NO production and to down regulate arginase, an enzyme induced by TGF and involved in collagen synthesis.

#### **Proliferation studies**

The role of PFD as an anti-fibrotic agent has been well established in several studies. In chronic lung allograft dysfunction or obliterative bronchiolitis, fibrosis of the airway lumen follows epithelial denudation. In studies conducted on human lung fibroblasts, PFD slowed proliferation in a dose dependent manner. Lung fibroblasts grown in the presence of conditioned media from bronchial epithelial cells slowed their proliferative response in the presence of PFD. This effect appeared to be related to the increase in cellular apoptosis in the G1/G0 phase of cell growth. Similarly, in vitro studies of rat renal fibroblasts showed that PFD effects proliferation and activation.

## Attenuation of ischemia and reperfusion injury

Pirfenidone has been used in several animal models of ischemic-reperfusion injury. These studies indicate that PFD lowers TNF concentrations in tissue. This reduction of local expression of TNF correlated with less tissue damage, edema and hypotension.

In a rat model of partial hepatic ischemia, PFD at a dose of 300 mg/kg was administered following LPS. In the PFD treated animals, lower liver enzyme levels and lower cytokine-induced neutrophil chemoattractants were found in serum and liver tissue following reperfusion. PFD limited the damage from ischemia-reperfusion injury, and this effect could have implications for controlling acute transplantation injury as well.

## PFD in transplantation models

Pirfenidone was initially investigated in a rat model of obliterative bronchiolitis using heterotopic tracheal transplantation. In this model the resultant airway lesion is indistinguishable from the histologic lesion of chronic progressive lung allograft rejection. In this experimental model, the initial injury occurred in the first seven days after transplantation, in the absence of CSA. Pirfenidone was given to recipient rats at a dose of 600 mg/kg/day of nearly continual administration. With the combined use of CSA and PFD the resultant lesion was less organized, and there was lower local production of TGF when compared to the monotherapy PFD and CSA groups. The CSA-PFD airway luminal supernatant fluid was found to inhibit the proliferation of lung fibroblasts, in the presence of conditioned media from bronchial epithelial cells.

Subsequently, a murine heterotopic transplantation model studied the effect of PFD without the use of any immunosuppressive agent. The mice receiving PFD (0.5%) early in the course versus later in the post transplantation course, had delayed onset of luminal obliteration of the airway. The heterotopic tracheal transplantation model has its limitations though, since the smaller airways are not transplanted. These studies established the use of PFD as a modifying agent in the setting of *in vivo* transplantation. Another lung transplantation model showed that animals receiving a combination of PFD and rapamycin had more protection against the development of obliteration, than either agent used alone. Beneficial effects were only observed if PFD was administered early in the course, suggesting that in part PFD may be limiting early inflammatory damage to the epithelium. All these *in vivo* studies of PFD demonstrated that PFD is most effective when used early in the course, suggesting its effect in limiting immune mediated and inflammatory triggers to fibrosis may be one possible cellular mechanism of its actions.

Thus far, the safety profile of the drug appears to be associated with no long term toxicity and there are no contraindications to administering the drug. Based on available cellular, biochemical, *in vivo* and clinical trial information, PFD may prove a useful adjunctive therapy in the management of transplant patients.

## Treatment with the JAK-3 inhibitor CP-690,550 in renal transplantation

C. Baan<sup>1</sup>, W. Weimar<sup>1,2</sup>, R. Gaston<sup>2</sup>, D. Brennan<sup>2</sup>, R. Mendez<sup>2</sup>, J. Pirsch<sup>2</sup>, S. Swan<sup>2</sup>, M. Pescovitz<sup>2</sup>, G. Ni<sup>3</sup>, C. Wang<sup>3</sup>, G. Chan<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, The Netherlands, <sup>2</sup>A3921007 Study Group, <sup>3</sup>Pfizer, Global Research and Development, Ann Arbor, MI, USA.

### Abstract

To prevent allograft rejection, most currently prescribed immunosuppressive drugs nonspecifically target T-cell activation, clonal expansion or differentiation into effector cells. It is recognized that immunosuppressive drugs

such as cyclosporine and tacrolimus prevent rejection but on the other hand they often lead to unwanted side-effects including increased susceptibility to infections and development of tumours. Some of these drugs are also associated with non-immunological complications including an increase in cardiovascular risk factors.

CP-690,550, the small drug molecule developed by Pfizer, is a new conceptual form of immunosuppression that selectively targets cells of the immune system. CP-690,550 is an inhibitor of JAK3, a signaling kinase for the  $\gamma_c$  cytokine receptor. Blockade of JAK3 may affect the induction, differentiation and clonal expansion of allo-reactive T-cells but may also impair the induction of specific immune regulatory T-cells, i.e. CD25+ Tregs.

### *Objectives of the A3921007 study*

- I. To evaluate the safety and tolerability of CP-690,550 when administrated as a multiple dose regimen to stable renal transplants receiving mycophenolate mofetil (MMF) with or without calcineurin inhibitors (CNIs).
- II. To evaluate the effect of CP-690,550 on gene expression and lymphocyte subsets when administrated as a multiple dose regimen to stable renal transplant recipients receiving MMF.

### *Results and conclusions*

We show that that treatment with CP-690,550 is safe and well tolerated when administered at up to 30 mg BID with MMF for 29 days in stable kidney transplant recipients. In addition, immune monitoring revealed that the numbers of circulating CD19<sup>+</sup> B-cells increased and those of CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cells and regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T-cells decreased during treatment with CP-690,550.

## **Introduction**

In the generation of immune responses against allografts cytokines play a crucial role. Cytokines of the IL-2 family (i.e. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21) regulate T-cell proliferation, differentiation, cell death and are involved in immune regulation. In clinical organ transplantation, many studies have reported that expression of cytokines of the IL-2 family are associated with allograft rejection, thereby showing that these cytokines are involved in acute anti-donor responses. IL-2 is the key cytokine in different phases of an immune response. It acts as a growth factor for not only for allo-reactive T-cells but also for CD25+ immune regulatory cells. Furthermore, IL-2 potentates Fas mediated activation induced cell death of T-cells.

Cytokines of the IL-2 family share the common  $\gamma_c$ -chain ( $\gamma_c$ , CD132) of the IL-2R complex, while IL-2 and IL-15 also share the  $\beta$ -chain of the IL-2R complex (CD122). For IL-2 and IL-15, signalling is mediated through receptors containing  $\beta/\gamma_c$  chains. The common  $\gamma_c$ -chain acts as the signalling receptor for IL-4, IL-7, IL-9, and IL-21. Following binding of cytokines of the IL-2 family to their receptors, receptor-activated Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT) are activated. STAT proteins function as nuclear transcription factors. JAK3 is not only involved in IL-2R  $\gamma_c$ -chain signaling but also directly associates with the CD3- $\zeta$  chain, showing the involvement of JAK3 in T-cell Receptor signaling (1). Until today 4 JAKs and 5 STATs have been described.  $\gamma_c$ -dependent cytokines are the only cytokines that activate JAK3. JAK3 deficiency causes severe combined deficiency (SCID) which is characterized by an absence in T-cells and NK-cells. Normal numbers of B-cells are found that have abnormal function.

The central role of JAK3 in the activation pathway of cytokines of the IL-2 family makes it an interesting target for immunosuppressive drugs. Blockade of JAK3 may affect the induction, differentiation and clonal expansion of allo-reactive T-cells but may also affect the induction of specific immune regulatory T-cells, i.e. CD25+ Tregs. Based on theoretical arguments it can be speculated that with the blockade of JAK3 different aspects of anti-donor responses are affected. Indeed the studies by Changelian et al. in experimental transplant models and by *in vitro* stu-

dies showed that CP-690,550, (a chemical modification of CP-351,664) an antagonist of JAK3 significantly improved graft survival and suppressed human T-cell proliferation induced by IL-2,  $\alpha$ CD3 plus  $\alpha$ CD28 (2).

## Objectives of the a3921007 study

- I. To evaluate the safety and tolerability of CP-690,550 when administrated as a multiple dose regimen to stable renal transplants receiving mycophenolate mofetil (MMF) with or without calcineurin inhibitors (CNIs).
- II. To evaluate the effect of CP-690,550 on gene expression and lymphocyte subsets when administrated as a multiple dose regimen to stable renal transplant recipients receiving MMF.

## Results

### *Objective I. Evaluation of the safety and tolerability of CP-690,550*

#### Methods

This was a randomized, placebo-controlled, subject- and investigator-blinded study. Eligible subjects were at least 6 months post-transplant and were receiving stable dosages of MMF. 3 sequential cohorts (n=8 each) were randomized to escalating CP dosages of 5 mg-30 mg twice daily (BID) or placebo (PBO). An additional subsequent cohort (n=4) also received CP 30 mg BID. Altogether 6 subjects were assigned to CP 5 mg BID, 6 to CP 15 mg BID, 10 to CP 30 mg BID and 6 to PBO. In all subjects, CP or PBO was superimposed on stable immunosuppressive regimens. Most of the subjects randomized to CP 5 mg BID and 15 mg BID also received CNIs, but subjects randomized to CP 30 mg BID were not on concomitant CNIs. Subjects received CP or PBO for 29 days and were followed for 28 days thereafter. MMF and steroid dosages remained unchanged in the treatment period.

#### Results

27 of the 28 enrolled subjects completed this study. The most prevalent adverse events were infections (3/6 in PBO patients and 12/22 in combined CP cohorts) and gastrointestinal disorders (2/6 in PBO patients and 7/22 in combined CP cohorts). Most adverse events were mild-moderate in severity and were manageable with routine medical care. There were no changes in blood pressure, heart rate, QTc interval, serum glucose, hepatic or renal function compared to PBO. At CP 15 mg and 30 mg BID, nadir median hemoglobin was observed 14 days after the last CP dose with a 10-13% decrease from predose baseline. This change in hemoglobin was reversible as demonstrated by the rapid recovery of reticulocyte count after the end of CP treatment. There were no apparent effects on the cell counts of neutrophils, platelets or monocytes. There were trends suggestive of increased blood CD19+ cell count and decreased CD56+ cell count at the end of treatment but no apparent effects on CD3+, CD4+ and CD8+ cell counts.

#### Conclusions

These findings indicate that CP is safe and well tolerated when administered at up to 30 mg BID with MMF for 29 days in stable kidney transplant recipients.

### *Objective II. Analysis of the peripheral immune parameters during treatment with CP-690,550*

CP-690,550 is an inhibitor of JAK3 associated with the common gamma chain ( $\gamma_c$ ) of cytokine receptors of the IL-2 family. Members of this family, including IL-2, -4, -7, -9, -15 and -21, play pivotal roles in lymphocyte activa-

tion, differentiation, and death. Based on these features, inhibition of JAK3, which is expressed by immunocompetent cells only, is expected to be immunosuppressive. In this study, lymphocyte subsets, gene expression levels of T-cell activation molecules and IFN- $\gamma$  production by PBMC were analyzed in stable renal allograft recipients.

## Material and methods

As part of a Phase 1 dose-escalation trial, 8 stable kidney transplant recipients on mycophenolate mofetil 500-1000 mg bid and prednisolone 5-7.5 mg daily were treated with CP-690,550 30 mg bid orally for 29 days. On day 1 (before 1<sup>st</sup> dose), day 15, day 29 (before last dose) and day 57, we measured lymphocyte subsets and gene expression levels in peripheral blood samples by flow cytometry and RT-PCR, respectively. IFN- $\gamma$  production capacity was ascertained in mitogen activated PBMC.

## Results

Significant changes in the cell counts of circulating lymphocytes were observed following CP-690,550 treatment. The absolute numbers of CD19<sup>+</sup> B-lymphocytes increased (twofold,  $p=0.006$ ), while those of NK-cells (CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) and of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright+</sup> T-cells decreased during exposure to CP-690,550 (by 54% (mean)  $p<0.001$  and by 38% (mean)  $p=0.04$ , respectively). In addition, in the presence of CP-690,550, the IFN- $\gamma$  production capacity of PBMC was reduced by 41% (mean) compared to pre-dose baseline ( $p=0.02$ ). All studied immune parameters were recovered to pretreatment levels by day 57. No significant changes in IL-2, IL-15, IL-21, CD25 (IL-2R  $\gamma$ -chain), CD132 ( $\gamma_c$ ), SOCS3, FOXP3 and granzyme B mRNA expression levels were found following CP-690,550 treatment.

## Conclusion

The numbers of circulating CD19<sup>+</sup> B-cells increased and those of CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cells and regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright+</sup> T-cells decreased during treatment with the JAK3 inhibitor CP-690,550. In addition, the IFN- $\gamma$  production capacity of PBMC was inhibited. These findings are consistent with a role of JAK3 in the homeostasis and function of lymphocyte subpopulations.

## References

1. Nashan, B. *Review of T-cell activation: Impact of Janus kinase 3 inhibition*. Transplantation 2003; 15: 1783-1785.
2. Changelian, P.S., Flanagan, M.E., Ball, D.J. et al. *Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor*. Science 2003; 31: 875-878.



## OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE ÓRGANOS: CÓMO INCREMENTAR LA SEGURIDAD Y CALIDAD DE LOS ÓRGANOS

### Enfermedades infecciosas en donantes extranjeros. Protocolo de evaluación serológica y microbiológica

G. Garrido, R. Matesanz y B. Miranda

*Organización Nacional de Trasplantes, Madrid, España.*

La población extranjera en nuestro país ha crecido de forma muy importante en los últimos años, constituyendo actualmente, según datos del padrón del año 2006, el 8,7% de la población española. La mayor parte de esta población extranjera procede de Europa (41%) y en segundo lugar de América (36%), especialmente de Latinoamérica. Entre los donantes de órganos y tejidos se ha observado también este aumento en la presencia de donantes extranjeros. De hecho, el porcentaje de donantes extranjeros en el año 2006 fue del 8,4%. Entre estos donantes hay una mayor representación de europeos y americanos, frente a africanos y asiáticos, que en la población extranjera en general.

La existencia de donantes extranjeros puede tener importantes repercusiones en los receptores de órganos, ya que estos donantes pueden tener enfermedades infecciosas importadas (generalmente tropicales y parasitarias) de carácter asintomático que podrían ser transmitidas a los receptores con las consiguientes consecuencias perniciosas. Por este motivo la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) organizó un grupo de expertos que elaboraron una serie de recomendaciones sobre la actitud a seguir ante un donante extranjero. Estas recomendaciones están recogidas en el “Documento de consenso de selección del donante respecto a la transmisión de enfermedades infecciosas” que se puede encontrar en la página web [www.ont.es](http://www.ont.es).

La recomendación final del grupo de expertos reunidos estableció un protocolo de actuación en el que se recomendaba la determinación urgente del HTLV y del *Trypanosoma cruzi* (este último cuando se vaya a trasplantar el corazón) y la determinación diferida del resto de gérmenes (hongos y parásitos). Además, se recomendaba la realización de un estudio para conocer la prevalencia real de estas enfermedades en este tipo de donantes.

Por este motivo, en colaboración con el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal y los Coordinadores Hospitalarios de Trasplantes, y bajo la dirección de la ONT, se llevó a cabo un estudio para determinar la prevalencia de enfermedades infecciosas importadas en donantes de órganos procedentes de un país extranjero.

El diseño ha sido un estudio de prevalencia de periodo. El periodo estudiado ha sido desde 1998 hasta 2005.

La población estudiada han sido todos los donantes de órganos en España que cumplieran los criterios de inclusión desde el año 1998 hasta 2005.

Las variables de estudio se dividían en administrativas y microbiológicas. Las variables administrativas eran: edad, sexo, país de procedencia y causa de muerte. Desde el punto de vista microbiológico se determinó la presencia por serología de HTLV I y II, hongos (histoplasmosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis y blastomycosis) y parásitos (malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis americana, oncocercosis, filariasis linfática, hidatidosis, esquistosomiasis, cisticercosis, amebiasis, fasciolosis y tripanosomiasis africana).

Finalmente se estudiaron 112 sueros, lo que supone un 27% de todos los donantes extranjeros que habían sido incluidos en el estudio. Dada la baja tasa de respuesta se investigaron las características principales de los donantes estudiados (edad, sexo, país de procedencia y causa de muerte) y no se encontraron diferencias con el resto de donantes incluidos en el estudio y que no habían aportado suero.

Los resultados microbiológicos encontrados fueron los siguientes:

1. HTLV I y II: todos los resultados fueron negativos. Se encontraron dos casos que fueron falsos positivos.
2. Hongos: todos los resultados fueron negativos.
3. Parásitos:
  - Malaria: 3 casos fueron positivos a IgG (en 2 de ellos el donante procedía del África subsahariana y en el tercero la procedencia era desconocida). Uno de ellos transmitió la enfermedad a un receptor (renal).
  - Tripanosomiasis americana: 1 caso positivo a IgG (el donante era boliviano). En este caso no se implantó el corazón por no ser válido y no hubo transmisión de la enfermedad.
  - Esquistosomiasis: 2 casos positivos (uno procedía del África subsahariana y el otro de Europa). No hubo transmisión de la infección.
  - Leishmaniasis y tripanosomiasis africana: ningún caso positivo

## Conclusiones

1. Existe un incremento de la donación de ciudadanos extranjeros de forma pareja al incremento de la población extranjera en nuestro país.
2. Este incremento de donantes extranjeros hace necesaria la realización de un cribado de determinadas enfermedades, según el país de origen del donante.
3. En el estudio realizado (a pesar de su baja tasa de respuesta) no hemos encontrado serología positiva para HTLV y solo se ha encontrado serología positiva de forma aislada para paludismo y tripanosomiasis americana.

## Hospitales participantes

H. Carlos Haya, H. Santa Creu i Sant Pau, H. General de Valencia, H. General Yagüe, H. Infanta Cristina, H. Puerta del Mar, H. Clínic i Provincial, H. de Navarra, H. Son Dureta, H. Juan Canalejo, H. Nª. Sra. de la Candelaria, H. Nuestra Señora de Sonsoles, H. Obispo Polanco, H. Ramón y Cajal, H. Tortosa Verge de la Cinta, H. Universitario de Getafe, H. Virgen de la Arrixaca y H. Virgen de La Salud.

## Mantenimiento fisiológico del donante de órganos en muerte encefálica. Influencia de las catecolaminas y de los iones séricos del donante sobre los resultados del trasplante

**F. Caballero**

*Servicio de Obtención de Órganos y Tejidos para Trasplante, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.*

## Introducción

La muerte encefálica implica el cese irreversible y permanente de todas las funciones encefálicas. Los donantes de órganos en muerte encefálica y a corazón latente presentan habitualmente una serie de características o epifenó-

menos entre los que destacan, por orden de frecuencia, la hipotensión arterial sistémica (100%), hipotermia (90-100%), diabetes insípida (40-90%), trastornos hidroelectrolíticos y de la coagulación (CID). Estos epifenómenos asociados a la muerte encefálica son frecuentemente simultáneos. Todos los donantes requieren un control clínico médico y de enfermería muy estrecho para su correcto mantenimiento hemodinámico y ventilatorio. El resultado del inadecuado mantenimiento del donante significa la pérdida de donantes, la pérdida de órganos, la alteración funcional y estructural de los órganos que se trasplantan, el incremento de la morbimortalidad de los receptores, y una disminución de la supervivencia del injerto y del paciente.

## Monitorización de las constantes vitales del donante

En primer lugar, se debe asegurar la monitorización continua de la presión arterial (catéter radial), del ECG y de la saturación arterial de O<sub>2</sub>. Es obligatorio colocar dos vías venosas (una de ellas central). Debemos confirmar que los parámetros de ventilación mecánica en el donante son correctos. También deben estar sondados (sonda gástrica y urinaria). Es obligatoria la monitorización al menos horaria de la diuresis, de la temperatura corporal central y de la presión venosa central (PVC).

## Objetivos del mantenimiento del donante de órganos

El concepto principal es realizar mantenimientos que consigan un correcto estado hemodinámico e hidroelectrolítico en el donante. Los objetivos más importantes del mantenimiento serán conseguir una presión arterial media superior a 65 mmHg, una presión venosa central (PVC) que oscile entre 8 y 10 mmHg, una diuresis de 1-2 ml/kg/h, una PaO<sub>2</sub> superior a 100 mmHg (con la menor fracción inspiratoria de oxígeno), una saturación arterial de oxígeno del 100%, natremia 135-145 mEq/l, caliemia 3,5-4,5 mEq/l, pH arterial 7,35-7,45, Hb mayor de 10 g/dl y una temperatura corporal central de aproximadamente 37° C.

## Trastornos hemodinámicos. Hipotensión arterial sistémica

El tratamiento inicial de la hipotensión del donante consiste en la repleción del volumen deficitario que éste presenta con el aporte de sueros glucosados y salinos, que ajustaremos en función de la diuresis y de la PVC. Las catecolaminas de elección en caso de hipotensión arterial prolongada son la noradrenalina (dosis de 0,1-0,5 µg/kg/min) asociada a dopamina (dosis de 2-8 µg/kg/min). El tratamiento de la diabetes insípida se debería hacer con desmopresina, ya que carece de poder vasoconstrictor y de efectos perjudiciales sobre la función renal. La administración de desmopresina potencia la acción de las catecolaminas al incrementar la sensibilidad de la vasculatura a éstas, lo que permite reducir las dosis de catecolaminas. El mantenimiento del donante con catecolaminas y/o desmopresina no influye en la supervivencia del injerto renal y hepático a corto ni a largo plazo, y su uso combinado es generalmente la única forma de conseguir mantenimientos prolongados del donante con la adecuada perfusión y función de los órganos. La función y supervivencia del injerto renal a corto y largo plazo no se ve afectada negativamente por mantenimientos prolongados del donante, e incluso se han obtenido resultados superiores.

## Trastornos hidroelectrolíticos

Es obligatoria la monitorización periódica (al menos cada dos horas) de los iones séricos y del equilibrio ácido-base del donante, así como el tratamiento y la corrección precoz de todas las alteraciones bioquímicas. El aporte de fluidos se debe mantener de forma continua en el donante. El ritmo de perfusión de los fluidos se ajustará en función de los parámetros hemodinámicos (presión arterial y PVC) y la diuresis horaria. La administración de sueros glu-

cosados permitirá preservar los depósitos intrahepáticos de glucógeno. La perfusión de sueros salinos se realizará según la osmolaridad plasmática y la natremia. La hipernatremia es frecuente en el donante y su etiología es multifactorial. Concentraciones séricas de sodio a 160 mEq/l se relacionan con disfunción primaria del injerto hepático. El tratamiento de la hipernatremia se realizará según su origen: líquidos hipotónicos y/o desmopresina en perfusión continua endovenosa. La hipocaliemia es un déficit habitual en el donante que se corregirá con aporte adicional de potasio junto con la perfusión de sueros para evitar trastornos del ritmo cardíaco y asistolia. La administración endovenosa lenta de potasio, magnesio y fosfato no presenta ningún riesgo relevante cuando la diuresis está conservada. La hiperglucemia es muy frecuente en el donante de órganos. Las glucemias superiores a 10 mmol/l pueden tratarse con insulina exógena por vía endovenosa.

## Equipo médico-enfermera de mantenimiento del donante de órganos

El mantenimiento hemodinámico y ventilatorio de estos donantes desde la muerte encefálica hasta la extracción de órganos debe ser realizado por un equipo médico-enfermera especializado, con estrecha y exclusiva atención al donante. En julio de 1993, en el hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) de Barcelona se creó el equipo de enfermería de mantenimiento del donante de órganos. Este equipo lo forman siete enfermeras de la plantilla del hospital que desarrollan su trabajo habitual en distintas unidades de críticos y realizan turnos de guardia de localización permanente. Cuando un paciente evoluciona a muerte encefálica, una enfermera del equipo releva a la enfermera que hasta entonces había sido responsable del paciente y se dedica en exclusiva al mantenimiento del donante. Este equipo del HSCSP ha llevado a cabo desde enero de 1994 hasta diciembre de 2006 el mantenimiento de 503 donantes reales de órganos, a partir de los cuales se han generado 1774 órganos para trasplante: 984 riñones, 445 hígados, 167 corazones, 124 pulmones, 52 páncreas y 2 intestinos delgados. Los resultados obtenidos durante este periodo son excelentes: 0% asistolias irreversibles durante el mantenimiento de 503 donantes reales de órganos, tasa de 3,5 órganos generados por donante, función renal inmediata >80% del total de trasplantes de riñón y ningún injerto renal nunca funcionando.

## Conclusiones

Un adecuado mantenimiento del donante de órganos en muerte encefálica y a corazón latiente se traduce en un incremento significativo del número de donantes y de órganos humanos viables para trasplante. La pérdida de donantes por asistolia irreversible durante el mantenimiento o por fallo multiorgánico puede reducirse al cero absoluto. El mantenimiento del donante con catecolaminas puede mejorar la supervivencia del injerto renal y hepático a corto y largo plazo.

## Máquinas de perfusión-oxigenación extracorpórea de órganos. Evaluación y mejora de la viabilidad

**J.R. Núñez Peña**

*Banco de Tejidos, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.*

Durante muchos años, la gran preocupación de la comunidad trasplantadora ha sido la escasez de órganos y se ha realizado una gran esfuerzo colectivo para incrementar las tasas de donación y mejorar los procedimientos de mantenimiento de los donantes y las técnicas de extracción-trasplante. Este esfuerzo ha permitido un incremento muy

significativo en las cifras de trasplante de los diferentes órganos, así como en la supervivencia a medio y largo plazo tanto de los pacientes como de los injertos.

Sin embargo y como consecuencia de la consolidación de los trasplantes como una terapéutica eficaz y en ocasiones única para un gran número de patologías, es necesaria la utilización de los denominados “donantes marginales o subóptimos”. Este hecho conlleva la optimización de los sistemas de preservación de órganos con objeto de incrementar la seguridad y calidad de los mismos, intentando minimizar al máximo los fenómenos de isquemia-reperusión y, en consecuencia, la eventual malfunción primaria.

Desde principios del siglo xx se sabe que la isquemia tisular y, en consecuencia, la anoxia es determinante de la transformación del metabolismo aeróbico celular en otro de carácter aneróbico que, en síntesis, conlleva un incremento de la concentración de lactato e hipoxantinas, con la consecuente acidificación y muerte celular. La mejor alternativa pasaba por la disminución de la temperatura tisular, pues es conocido que el descenso de 10° C determina un enlentecimiento metabólico de aproximadamente 1,5-2 veces.

Sin embargo, a temperaturas tan bajas como 1° C aún persiste una importante actividad metabólica, lo que hizo que Sir Alexis Carrel, junto con el ingeniero Charles A. Lindbergh, desarrollará en 1937 el denominado “suero oxigenado”, que permitía preservar los tejidos viables durante periodos más largos de tiempo. Pero no fue hasta la década de los 50-60, con el desarrollo de las soluciones de preservación, inicialmente la denominada “solución de Collins”, posteriormente modificada a Eurocollins, la solución de Wisconsin y, más recientemente, la solución de Celsior y de Perfadex, entre otras muchas, que se hizo posible avanzar en el trasplante minimizando el daño de la isquemia. A pesar de todo, el llamado “tiempo de isquemia fría” sigue siendo el principal inconveniente en el daño celular, lo que obliga a disminuirlo al máximo para garantizar la mejor viabilidad de los órganos.

El desarrollo de nuevos sistemas que permitan mantener ex vivo la oxigenación y nutrición tisular posibilitaría evaluar la función del órgano tras el explante, aumentar el periodo pretrasplante optimizando la selección del receptor, disminuir el daño de la isquemia e incluso tratar médicamente órganos inicialmente no válidos hasta su posible recuperación funcional, aumentando de esta manera el *pool* de órganos válidos.

En este sentido, uno de los órganos que más frecuentemente se descarta para trasplante tras la evaluación del donante en muerte encefálica es el corazón. En España muchos corazones de donantes de menos de 45 años no se utilizan para trasplante. Así, durante el año 2005, se registraron 470 donantes de órganos de menos de 40 años, y mientras que de ellos se llevaron a cabo 429 extracciones efectivas de hígado, solo 237 corazones fueron finalmente extraídos y trasplantados. Las principales causas por las que no se realizó extracción cardiaca fueron los antecedentes del donante, la administración de altas dosis de catecolaminas durante el periodo de mantenimiento o la parada cardiaca del donante. Sin embargo, en 61 casos no existían estas contraindicaciones y el motivo de la no utilización del corazón radicaba en una disfunción ventricular izquierda severa demostrada ecocardiográficamente (ventrículo hipocinético o fracción de eyección inferior a un 45%).

Esta disfunción miocárdica parece estar relacionada con el curso natural de la muerte encefálica y representa en el momento actual una causa excluyente absoluta para la utilización de estos corazones para trasplante.

El desarrollo del proceso de muerte cerebral se acompaña de una gran número de cambios fisiopatológicos que se conocen con el nombre de “tormenta del sistema nervioso autónomo”. Tras unos escasos minutos de excesiva actividad parasimpática que acompaña a la muerte encefálica, el organismo reacciona intentando vencer el incremento de la presión intracraneal mediante una intensa vasoconstricción y, consecuentemente, un aumento de la presión arterial. La parálisis progresiva de las vías simpáticas de la médula espinal determina un descenso de la actividad simpática con disminución progresiva de las resistencias vasculares sistémicas (inferiores al 50% de los valores basales), produciéndose en este periodo inestabilidad hemodinámica, hipotensión e hipoperfusión de los órganos abdominales. En este mismo periodo es frecuente la aparición de trastornos endocrinológicos del tipo de diabetes insípida por alteración del eje hipotalámico-hipofisario o aquellos relacionados con la secreción de tironina o con el metabolismo insulínico.

Toda esta liberación de catecolaminas, junto con la inestabilidad hemodinámica y la presencia de sustancias vasoactivas y citocinas, determina una serie de efectos adversos en diversos órganos, con aparición de disfunción cardiaca, alteración de la integridad de la membrana alveolocapilar con edema pulmonar, fenómenos de apoptosis en los hepatocitos y respuesta inflamatoria renal.



Sin embargo, permanecen sin aclarar cuáles son los mecanismos exactos y determinantes del daño orgánico en estas circunstancias. Su conocimiento permitiría establecer estrategias para tratar de recuperar algunos de los casos en los que los órganos han de ser descartados para trasplante.

En lo que se refiere específicamente a la disfunción miocárdica que aparece con diferente intensidad tras la muerte encefálica y que en un 20-25% de los casos es de gran severidad y que excluye de manera absoluta su utilización para trasplante, las causas que la determinan son prácticamente desconocidas.

La respuesta anómala a las catecolaminas es un hecho habitual en los últimos estadios del fallo cardiaco, bien como resultado de un trastorno en la densidad de los receptores o bien como consecuencia de una transmisión inadecuada de los estímulos. Este mecanismo puede influir en una respuesta cardiaca insuficiente como la que acontece en el fallo cardiaco agudo, tal y como sugiere la menor respuesta a los agonistas beta.

Se ha propuesto que un mantenimiento intensivo (oxigenación y mejora de la perfusión) del donante podría mejorar la función ventricular izquierda, como se ha demostrado mediante estudios ecocardiográficos en pacientes con hemorragia cerebral masiva, y finalmente el corazón podría ser válido para trasplante, pero no se conoce en qué tipo de donantes se podría conseguir una mejoría de la función ventricular con este tratamiento intensivo.

Sin embargo, poder predecir qué tipo de donantes requerirían de un intenso mantenimiento con objeto de obtener corazones viables, cuál sería el periodo de tiempo adecuado para hacerlo sin que este afecte la posible viabilidad de otros órganos, si es posible definir una exploración o determinación analítica fiable en cuanto a la posible reversibilidad de la disfunción miocárdica, o cuál es el tratamiento hemodinámico o farmacológico más adecuado para conseguirlo, son aspectos que en el momento actual constituyen una gran incógnita.

La posibilidad de estudiar la evolución de la función cardiaca y la realización de estudios analíticos, ecocardiográficos y hemodinámicos, utilizando un sistema de preservación portátil con sangre oxigenada y normotermia es una oportunidad para tratar de aclarar todos los interrogantes planteados anteriormente. Además, probablemente permita la recuperación funcional de un gran número de corazones para ser trasplantados, todo ello sin interferir con la viabilidad de otros órganos, dado que este procedimiento se realiza en situación extracorpórea con corazón latiente.

El estudio, aún en su fase de desarrollo y con resultados preliminares, tiene el objetivo global de evaluar la evolución de la función miocárdica en condiciones controladas de oxigenación, perfusión y aporte de nutrientes básicos de los corazones extraídos de donantes multiorgánicos en muerte encefálica que han mostrado tener una disfunción miocárdica severa en el estudio ecocardiográfico, mediante un sistema de perfusión pulsátil extracorpórea. Al mismo tiempo y como objetivos específicos, se han propuesto:

- Definir las condiciones de reversibilidad (casos en los que revierte y grado de recuperación) de la función miocárdica y el tiempo necesario para la recuperación, mediante evaluación ecocardiográfica seriada.
- Evaluar la estabilidad de la recuperación de la función miocárdica.
- Definir el perfil de los donantes en los que es previsible que la disfunción miocárdica revierta.
- Cuantificar los valores predictivos de reversibilidad, tanto clínicos como bioquímicos del donante, y los relacionados con las características funcionales y morfológicas del corazón.
- Definir el mejor manejo hemodinámico y farmacológico de esta situación.

El procedimiento consiste básicamente en la extracción cardiaca de corazones inicialmente descartados para trasplante por presentar hipocinesia, contusión o mala fracción de eyección, y evaluarlos ex vivo durante un periodo de 8 horas con estudios ecográficos y analíticos seriados.

Al tratarse de un sistema de perfusión-oxigenación extracorpórea, el órgano se mantiene en condiciones “similares” a su situación postrasplante, evaluándose su función, eventual recuperación o deterioro en el tiempo y su viabilidad para ser trasplantado en la clínica.

Los resultados preliminares permiten ser optimistas en cuanto a la utilización de este procedimiento para la evaluación no solo cardiaca sino de otros órganos, una vez estén disponibles los kits de perfusión adaptados a las conexiones vasculares de hígado, pulmón y riñón. Una vez demostrada su eficacia, su utilización permitirá no solo la recuperación de órganos inicialmente no válidos, sino la disminución “a mínima” del periodo de isquemia fría, los

fenómenos adversos de la isquemia-reperfusión y la disfunción primaria al tratarse de órganos “testados” antes de su implante.

Probablemente este nuevo sistema de preservación de órganos sea el inicio de una nueva etapa en el mundo del trasplante y un método más fisiológico en la preservación de órganos.



## CARLES MARGARIT IN MEMÓRIAM

### Conferencia de clausura a cargo del Dr. Josep Lloveras

En primer lugar quería manifestar mi agradecimiento a los organizadores de este congreso por haberme dado el privilegio de representar a la Societat Catalana de Trasplantament en esta presentación del Dr. Carles Margarit con motivo de concederle a título póstumo la Medalla de Oro de esta Sociedad.

Por mi especial vinculación con la Societat y la Fundació Catalana de Trasplantament, que Carles Margarit presidió durante los últimos cuatro años antes de su prematura muerte, tuve la ocasión de colaborar muy estrechamente con él y de compartir ilusiones y proyectos.

Con mis palabras quisiera poder dar una pincelada de lo que el Dr. Margarit representó para la comunidad de trasplante de este país y su contribución a la proyección internacional de la misma, pero también que valieran para poder mostrar mi afecto por él y por su familia.

Carles murió el 9 de diciembre de 2005, a los 55 años, sepultado por un alud mientras esquiaba en el Pico de la Carabassa, en los Pirineos, junto con unos amigos y familiares entre los que se encontraba su hijo Pau.

El Dr. Carles Margarit i Creixell era Profesor Titular de Cirugía de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de la Unidad de Cirugía Hepato-Bilio-Pancreática y del Programa de Trasplante Hepático de Adultos y Niños del Hospital Universitario de la Vall d'Hebron de Barcelona. Nacido en 1950, hijo de un renombrado cirujano torácico, a quien siempre se refería con admiración, y con quien hizo su primera formación en cirugía, obtuvo su licenciatura en Medicina por la Universidad de Barcelona en 1973, el Doctorado por esta misma Universidad en 1986 y el título de Profesor de Cirugía en 1995. En 1982-83, como complemento de su formación, estuvo con el Dr. Fortner en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center de Nueva York y posteriormente con el Dr. Thomas Starzl en la Universidad de Pittsburgh, experiencias que marcaron profundamente su trayectoria profesional.

En febrero de 1984 realizó, en el Hospital de Bellvitge, junto con el Dr. Eduardo Jaurieta, el primer trasplante hepático de España y organizó el primer Programa de Trasplante Hepático de Adultos. También fue pionero con el primer Programa de Trasplante Hepático Pediátrico, que empezó en 1985. A lo largo de los 20 años de actividad de los programas en los que participó, realizó alrededor de 800 trasplantes hepáticos.

De todas maneras, no quería, en este homenaje que le tributa la Societat Catalana de Trasplantament, ceñirme a valorar su trayectoria y realizaciones profesionales, sino también decir algo sobre su personalidad, que sin duda resulta inseparable de su obra.

De Carles quisiera empezar explicando un recuerdo, que tengo registrado de forma bien precisa, de hace unos veinte años –seguramente debía ser en la segunda mitad de los años ochenta– y que puede ser ilustrativo de alguna de las características de su manera de ser. La casualidad hizo que nos encontrásemos mientras esquiábamos en La Masella. Estuvimos hablando un rato. De hecho poco, porque él estaba por su labor; quiero decir que él estaba allí para esquiar, para nada más, para bajar pistas sin parar. Tenía una técnica perfecta y un estilo elegante, y se notaba que lo sabía. Pero era de los que no lo hacía por lucir; era para hacerlo bien, para hacerlo perfecto. Nada más. Así de preciso. Sin retórica.

Algunos años después, en 1993, comiendo en un bar de playa en la isla de Rodas, durante un Congreso de la Sociedad Europea de Trasplante, desenterrando recuerdos del bachillerato, nos descubrimos un pasado con algunas coincidencias y con algún buen conocido en común, como el arquitecto que haría la maravillosa casa donde siguen viviendo su esposa Lluïsa y sus hijas. Desde entonces nos quedó un punto de complicidad que acompañó nuestra relación, que de todas maneras fue fundamentalmente profesional.

Más adelante tuvimos ocasión de colaborar en algunas actividades, como la organización del Congreso de la Sociedad Europea de Trasplante que se celebró en Barcelona en 1989, pero fue sobre todo a partir de 1994 para la

preparación del Congreso de la Transplantation Society de 1996 en Barcelona. Recuerdo que, buscando imágenes para el audiovisual de la ceremonia de inauguración que sugirieran y simbolizaran el trasplante, Carles propuso los "castellers", y recuerdo, además, cómo defendió esa alegoría de aquella manera que le caracterizaba: con convicción incontestable. Y como después pude comprobar tantas otras veces, Carles convencía transmitiendo el propio convencimiento más que con muchos argumentos. Y no es una crítica, ya que transmitir el propio convencimiento puede ser, en determinados momentos y proveniente de determinadas personas, uno de los más grandes argumentos. Sin duda, los "castellers" representaban una combinación de fuerza, determinación, riesgo y cálculo, que son elementos que resultan necesarios para poder levantar con éxito un "castell". Y también porque para poder levantarlos se requiere una base sólida y la suma de muchos esfuerzos.

En los "castells", Carles Margarit se debía reconocer. Los "castells" son osados y frágiles. Requieren precisión, tenacidad y mucho entrenamiento, y nunca se puede perder la tensión. Y además, la culminación con éxito nunca está asegurada y se tiene que contar con algunos fracasos. Son estructuras casi imposibles de realizar. Y son efímeros. Conseguido el objetivo, se tiene que volver a empezar si se quiere levantar otro. Sólo duran unos instantes. Instantes que pueden ser de gran belleza, pero que sólo quedan inscritos en la memoria de quienes los han levantado y de unos pocos más. Es un trabajo como el de los músicos: una misma pieza, cada vez que se interpreta, suena un poco diferente... Y, ciertamente, a veces puede llegar a ser sublime.

Me parece que la fascinación de Carles por hacer posible aquello que aparentemente es casi imposible encontró su plasmación en el trasplante hepático. Releyendo el libro de Teresa Pous *Volver a vivir*, encontré las palabras entusiasmadas de Carles cuando descubrió en Pittsburgh cómo a través de un trasplante hepático volvían a la vida enfermos desahuciados, personas sin ninguna esperanza. Carles Margarit le decía literalmente a Teresa Pous: "Era hacer posible lo imposible. Era una verdadera resurrección de personas condenadas a una muerte casi inmediata. Salvar a aquellas personas producía tanta felicidad que no se puede expresar".

Carles había hecho el bachillerato en los jesuitas y creo que algunos de sus principios encontraron en él un terreno propicio. Y me refiero a la disciplina, la autoexigencia, el rigor, la austeridad, la tenacidad, el abrazar los retos, la eficacia y la implicación: la mística y la ascética del esfuerzo. Y también la divisa: "Ad maiorem"; es decir: más y más. Ir a más. Ir más allá... Divisa que no sólo presidió su actividad profesional, sino también otras pasiones de su vida, como el montañismo u otros deportes duros, como correr el maratón.

Daniel Batlle, que fue compañero de bachillerato y de facultad y amigo muy estimado de Carles Margarit, el día del entierro de Carles me dijo, metafóricamente, que él no hubiese acabado la carrera de Medicina si no hubiera sido por la disciplina que le pedía su compañero y amigo, y por la fuerza que ponía y comunicaba. Con ello, Daniel Batlle no hacía nada más que explicarme la imagen que quería dar de Carles, el homenaje que hacía al amigo y lo que me quería decir: que Carles empujaba a los de su alrededor a pedirse lo que él se exigía a sí mismo.

Y seguramente fue así, comunicando energía y determinación y no escatimando esfuerzos ni esquivando las dificultades, como Carles Margarit realizó su trayectoria profesional. Movilizó personas y equipos, a los cuales tuvo la capacidad de contagiar la voluntad de ir más allá, de cambiar el curso de lo que se basa en las previsiones razonables, y de conseguir resultados. Y, ciertamente, consiguió, más allá de su notable actividad pionera, que su trabajo y el de su equipo contribuyeran de forma relevante a hacer avanzar el trasplante hepático, tanto de adultos como infantil, sobre todo en las áreas de las técnicas quirúrgicas, de la inmunosupresión y la preservación.

Yo no soy cirujano y no estoy capacitado para valorar adecuadamente sus aportaciones técnicas, pero sí que en sus publicaciones destacan los trabajos de técnicas de reducción hepática, el trasplante hepático segmentario y el *split* de donante adulto para niños. Carles Margarit, a pesar de haberse dedicado fundamentalmente a la actividad clínica, fue un apasionado de la cirugía experimental y encabezó varias líneas de investigación al respecto. También publicó un número importante de artículos sobre innovaciones en las resecciones tumorales. Su producción científica se concretó en 200 publicaciones y más de 600 comunicaciones a congresos nacionales e internacionales. Por ejemplo, el año anterior a su desaparición publicó 13 artículos, 10 de los cuales en revistas extranjeras, lo cual nos da, además, un parámetro de que la muerte se lo llevó en pleno vigor de su actividad. Por lo que se refiere a los proyectos de investigación clínica que había dirigido, específicamente en el campo del trasplante, sobresalen los relacionados con la inmunobiología del rechazo, la inmunosupresión, la lesión de isquemia-reperfusión, el manejo de las infecciones por citomegalovirus y por el virus de la hepatitis C y los estudios sobre morbimortalidad y calidad de vida.



Sus conocimientos y su importante producción científica lo llevaron a ser muy considerado dentro de la comunidad trasplantadora internacional, siendo repetidamente invitado a dar conferencias y a participar en los foros más acreditados de todo el mundo. Fue referente para la formación de especialistas en trasplante hepático tanto a nivel del estado español como de otros países, y bien podemos decir que de esta manera también contribuyó a la iniciación de algunos programas de trasplante hepático de América Latina. A lo largo de los años, 58 especialistas de 13 países diferentes realizaron estancias en su departamento.

Sin duda su prestigio contribuyó muy significativamente a afianzar el buen crédito del que goza el trasplante hepático de nuestro país. Fue miembro fundador de la International Society for Diseases of the Esophagus, de la World Association for Hepato-Pancreato-Biliary Diseases, de la European Liver Transplant Association y también uno de los socios fundadores, en 1984, de la Societat Catalana de Trasplantament, la cual además presidió, junto con la Fundació Catalana de Trasplantament, durante los cuatro últimos años previos a su fallecimiento, y donde dejó una impronta muy importante. Ciertamente, con su capacidad de liderazgo, consiguió hacerlas ir más allá, incrementando sus actividades científicas y aumentando el número de becas concedidas anualmente. Bajo su presidencia, los congresos de 2003 y de 2005 superaron las ediciones anteriores y consolidaron su presencia en el ámbito del trasplante de órganos de toda España.

Para terminar, quisiera decir que, aun teniendo bien presente que a Carles Margarit la vida le fue quitada antes de hora, quiero creer que, a pesar de todo, la duración de la vida no es lo más importante, sino cómo se han vivido los años que a cada uno le han sido dados. Lo que es valioso es que el viaje haya sido fértil y que cada cual lo haya hecho suyo y le haya dado sentido. Y lo que es más preciado es no sólo el hecho de que uno haya vivido con sentido, sino que el sentido del viaje de uno mismo haya llegado a los demás y que los demás lo hayan podido hacer suyo. Y a mí me parece que este es el caso de Carles Margarit. Y esto es lo que trasciende de él mismo.

Cuando muere el mal gobernante, deja un vacío; el buen gobernante deja añoranza pero también deja relevo, aunque no esté directamente en sus manos, y deja el impulso del camino trazado. Creo que Carles Margarit ha dejado mucha añoranza pero también un importante legado y además ocupa para siempre un lugar destacado en la historia médica de este país y particularmente de nuestra Societat y de nuestra Fundació Catalana de Trasplantament.

