

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR (B)
E INMUNOLOGÍA

**FACTORES GENÉTICOS, MOLECULARES Y CÉLULAS IMPLICADAS
EN LA ACEPTACIÓN DEL INJERTO HEPÁTICO:
RELEVANCIA DE LAS MOLÉCULAS COESTIMULADORAS (CD86) Y
PRO-APOPTÓTICAS (CD95 Y CD95L)**

TESIS DOCTORAL
LUIS ALBERTO MARÍN RUBIO
2012

Memoria presentada para optar al título
de Doctor en Biología

Autor: Luis Alberto Marín Rubio

Directores: Dra. María Rocío Álvarez López

Dr. Manuel Muro Amador

Dr. Manuel Miras López

La **Dra. Dña. María Rocío Álvarez López**, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente tesis “Factores genéticos, moleculares y células implicadas en la aceptación del injerto hepático: Relevancia de las moléculas coestimuladoras (CD86) y pro-apoptóticas (CD95 y CD95L)”, ha sido realizado por el Licenciado en Biología D. Luis Alberto Marín Rubio bajo mi dirección, y corresponde fielmente a los resultados. Una vez redactada la presente Memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo la presente en Murcia a 11 de Febrero de 2012

Fdo. Dra. M^a. Rocío Álvarez

El **Dr. D. Manuel Muro Amador**, Facultativo del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente tesis “Factores genéticos, moleculares y células implicadas en la aceptación del injerto hepático: Relevancia de las moléculas coestimuladoras (CD86) y pro-apoptóticas (CD95 y CD95L)”, ha sido realizado por el Licenciado en Biología D. Luis Alberto Marín Rubio bajo mi dirección, y reúne, a mi entender, las condiciones precisas para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo la presente en Murcia a 11 de Febrero de 2012

Fdo. Dr. Manuel Muro Amador

El **Dr. Manuel Miras López**, Jefe de la Sección del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente tesis “Factores genéticos, moleculares y células implicadas en la aceptación del injerto hepático: Relevancia de las moléculas coestimuladoras (CD86) y pro-apoptóticas (CD95 y CD95L)”, ha sido realizado por el Licenciado en Biología D. Luis Alberto Marín Rubio bajo mi dirección, y reúne, a mi entender, las condiciones precisas para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo la presente en Murcia a 11 de Febrero de 2012

Fdo. Dr. Manuel Miras López

*A mis padres,
A mi compañera, Maria Jesús,
Y especialmente a los que se
fueron demasiado pronto.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Rocío Álvarez López, al Dr. Manuel Muro Amador y al Dr. Manuel Miras López por las muchas horas dedicadas a la dirección, redacción y corrección de la presente memoria.

A mis compañeros del Servicio de Inmunología que tanto me han enseñado y que de una u otra forma han colaborado en que esta tesis haya sido posible. Entre ellos, especialmente a mis compañeros de residencia, Jesús, Manolo, Alfredo, Alberto, Rosa, Antonella, Olga, María, Natalia, Carmen y Gema su participación en la recogida de muestras y el marcaje de poblaciones, incluso a las horas más intempestivas, ha sido inestimable, pero sobre todo por haber hecho más llevaderas las interminables horas en el laboratorio. Gracias por vuestra amistad y por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A los facultativos Ana García Alonso y Juan Rosique que me enseñó el desarrollo e interpretación de las técnicas de ELISA realizadas en la presente tesis, así como sus consejos en el análisis crítico de los resultados.

Mención especial al personal técnico que perteneció o pertenece de la Unidad de Citometría, Lina, José Miguel, Toñi y Mari Angeles, que con su buen hacer, su capacidad de trabajo y su simpatía han hecho más fácil la realización de esta tesis. Y al resto de personal del servicio, Mari Carmen, Maria José, Merche, Pepe, Manoli, Fica, Ana y Antonio por su generosa colaboración y su infinita paciencia.

A José Antonio, por las interminables horas de conversación sobre lo humano y lo divino y por todas las vicisitudes que hemos pasado juntos.

A Trini, por su incansable aliento incluso en los momentos más difíciles. Su pasión por la investigación y entusiasmo contagioso siempre me sirvió de ejemplo.

Al personal de UCI y del Servicio de Medicina Digestiva, especialmente a los enfermeros y enfermeras de planta, por su desinteresada colaboración y amabilidad a la hora de realizar las numerosísimas extracciones de muestras.

A todos aquellos que realizando su trabajo y de forma totalmente desinteresada han ayudado a que esta tesis pudiera realizarse; al personal de Radioterapia por irradiar las células para cultivo, al de Banco de Sangre por la cesión de muestras para controles y al de Análisis Clínicos por ayudarme a localizar sueros de pacientes.

A los compañeros del Laboratorio de HLA/BM del Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Salamanca que tanto me han animado a darle el empujón final a la redacción de la presente memoria.

Gracias también a los pacientes y a la inestimable generosidad de los donantes de órganos y sus familiares que hacen que todo esto sea posible y que le dan sentido a esta memoria.

Y sobre todo a María Jesús por estar siempre a mi lado.

La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante.
(Miguel de Unamuno)

Los trabajos contenidos en esta memoria hasta ahora han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- ◆ Marín L, Minguela A, Moya-Quiles MR, Torio A, Muro M, García-Alonso AM, Sanchez-Bueno F, Bru M, Parrilla P, Alvarez-López MR. *Expression of CD95 and apoptosis induction in peripheral blood cells from liver graft recipients*. Transplant Proc. 2002 (34) 280-282
- ◆ Marín L, Minguela A, Torío A, Moya-Quiles MR, Muro M, Montes-Ares O, Parrado A, Alvarez-López MR, García Alonso AM. *Flow cytometric quantification of apoptosis and proliferation in mixed lymphocyte culture*. Cytometry. 2003 (51) 107-118
- ◆ Marín L, Moya-Quiles MR, Miras M, Muro M, Minguela A, Bermejo J, Ramírez P, García-Alonso AM, Parrilla P, Alvarez-López MR. *Evaluation of CD86 gene polymorphism at +1057 position in liver transplant recipients*. Transplant Immunology. 2005; 15:69-74.
- ◆ Marín L, Muro M, Moya-Quiles MR, Miras M, Minguela A, Bermejo J, Sánchez-Bueno F, Parrilla P, Alvarez-López MR. *Study of FAS (CD95) and FASL (CD178) polymorphisms in liver transplant recipients*. Tissue Antigens. 2006 Feb;67(2):117-26.
- ◆ Gómez-Mateo J, Marin L, López-Alvarez MR, Moya-Quiles MR, Miras M, Marin-Moreno I, Botella C, Parrilla P, Alvarez-López MR, Muro M. *TGF-beta1 gene polymorphism in liver graft recipients*. Transplant Immunology. 2006 Dec;17(1):55-7.
- ◆ Marín L, Moya-Quiles MR, Miras M, Minguela A, Bermejo J, Ramírez P, García-Alonso AM, Parrilla P, Alvarez-López MR, Muro M. *Evolution of soluble forms of CD86, CD95 and CD95L molecules in liver transplant recipients*. Transplant Immunology. 2012 Mar;26(2-3):94-100.

Por otro lado, estos trabajos han dado lugar a la redacción de 8 comunicaciones a congresos nacionales y 4 a congresos internacionales.

Igualmente se hace constar que la parte experimental de esta memoria ha sido financiada en parte por los proyectos de investigación del Fondo de Investigaciones sanitarias de la Seguridad Social (FIS):

- ◆ Proyecto FIS 97/0397, titulado: “Estudio prospectivo en bilis y sangre periférica de los mecanismos inmunológicos que regulan el rechazo o aceptación del trasplante hepático”. Años 1997-99.
- ◆ Red de Grupos de Investigación G03/104 (FIS). “Red de Grupos de Inmunología del Trasplante”. Sección de Inmunología. H. U. “Virgen de la Arrixaca”. Murcia. Años 2003-05.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D	HLAs	HLA soluble
AcMo	anticuerpo monoclonal	IC	intervalo de confianza
ADCC	citotoxicidad dependiente de anticuerpos	ICN	inhibidor de calcineurina
ADN	ácido desoxirribonucleico	ICOS	molécula coestimuladora inducible
Ag	antígeno	IFN	Interferón
AICD	muerte celular inducida por activación	Ig	Inmunoglobulinas
APC	células presentadoras de antígeno	IL	Interleucina
ARN	ácido ribonucleico	IL-R	receptor de interleucina
ARNm	ácido ribonucleico mensajero	IMF	intensidad media de fluorescencia
CAM	camptotecina	IP	ioduro de propidio
CBP	cirrosis biliar primaria	kDa	Kilodalton
CD	cluster de diferenciación	LES	lupus eritematoso sistémico
CDs	células dendríticas	LSEC	células endoteliales del sinusoides hepático
CFSE	carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester	MC	medio de cultivo completo
CML	cultivo mixto linfocitario	MHC	complejo mayor histocompatibilidad
cpm	cuentas por minuto	NK	células <i>natural killer</i>
CsA	ciclosporina A	NRA	no rechazo agudo
CTL	linfocitos T citotóxicos	NRC	no rechazo crónico
CTLA	antígeno de CTLs	OR	odd ratio
DMSO	dimetilsulfóxido	pb	pares de bases
EBV	virus de Epstein-Barr	PBMC	células mononucleares de sangre periférica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	PBS	solución tamponada de fosfato
ELISA	enzimo-inmunoanálisis	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
FITC	isotiocianato de fluoresceína	PE	Ficoeritrina
GAS	sitio de activación de INF-gamma	PHA	Fitohemaglutinina
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	PKC	Proteína quinasa C
Gy	Gray	RA	rechazo agudo
HLA	antígeno leucocitario humano	RC	rechazo crónico

Abreviaturas

RFLP	polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción	TM	transmembrana
RT-PCR	PCR en transcripción reversa	TMS	tiempo medio de supervivencia
SEM	error estándar de la media	TNF	factor de necrosis tumoral
SD	desviación estándar	TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral
SNP	polimorfismo de un sólo nucleótido	TOH	transplante ortotópico de hígado
SP	sangre periférica	Treg	linfocitos T reguladores
SSP	cebadores (<i>primers</i>) específicos de secuencia	Ts	linfocitos T supresores
TCR	receptor clonotípico de célula T	VHB	virus hepatitis B
TGF	factor de crecimiento tumoral	VHC	virus hepatitis C
Th	linfocitos T colaboradores	VIH	virus de inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. GENERALIDADES DEL TRASPLANTE: EL TRASPLANTE HEPÁTICO	3
2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS Y FUNCIONALES DEL HÍGADO	5
3. CONCEPTOS BÁSICOS EN LA INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE	7
3.1. Reconocimiento alogénico.....	7
3.1.1. <i>Complejo Mayor de Histocompatibilidad</i>	8
3.1.2. <i>Receptor de Célula T</i>	9
3.1.3. <i>Reconocimiento alogénico directo</i>	9
3.1.4. <i>Reconocimiento alogénico indirecto</i>	11
3.1.5. <i>Principales vías de coestimulación en la respuesta alogénica</i>	12
3.1.5.1. <i>Moléculas coestimuladoras de la familia CD28:B7</i>	13
3.2. Citocinas	15
3.2.1. <i>Paradigma Th1-Th2</i>	16
3.2.2. <i>Principales citocinas implicadas en la modulación de la respuesta inmunitaria</i>	17
3.3. Mecanismos de tolerancia inmunológica	19
3.3.1. <i>Tolerancia central</i>	19
3.3.2. <i>Tolerancia periférica</i>	20
3.3.2.1. <i>Ignorancia</i>	21
3.3.2.2. <i>Deleción/Apoptosis</i>	21
3.3.2.3. <i>Anergia</i>	22
3.3.2.4. <i>Células T reguladoras</i>	23
4. PAPEL DE LA INMUNOLOGÍA EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO	24
4.1. Mecanismos de rechazo	24
4.2. Tolerancia en el TOH	27
4.3. Tratamientos inmunosupresores	28
4.4. Monitorización del trasplante	32
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	35
1. HIPÓTESIS	37
2. OBJETIVOS	38
<u>CAPÍTULO 1 Factores genéticos del receptor y evolución del trasplante hepático: polimorfismo de CD86, CD95, CD95L y citocinas</u>	

Th1 y Th2.	39
1. INTRODUCCIÓN	41
1.1. Polimorfismo de CD86	41
1.2. Polimorfismo de CD95 y CD95L	41
1.3. Polimorfismo de citocinas	42
2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1. Pacientes e inmunosupresión	44
2.2. Diagnóstico de rechazo agudo	44
2.3. Diagnóstico de rechazo crónico	44
2.4. Recolección de muestras y extracción de ADN	44
2.5. Determinación del polimorfismo del gen CD86 en posición +1057	45
2.6. Determinación del polimorfismo en posiciones -670 y -1377 del gen CD95	45
2.7. Determinación del polimorfismo IVS2nt-124 y IVS3nt169 del gen CD95L	46
2.8. Determinación del polimorfismo de citocinas	46
2.9. Análisis estadístico	47
3. RESULTADOS	47
3.1. Características de los pacientes	47
3.2. Rechazo agudo y polimorfismos genéticos	47
3.2.1. <i>Polimorfismo de CD86 y rechazo agudo</i>	47
3.2.2. <i>Polimorfismo de CD95 y rechazo agudo</i>	48
3.2.3. <i>Polimorfismo de CD95L y rechazo agudo</i>	48
3.2.4. <i>Polimorfismo de citocinas y rechazo agudo</i>	48
3.2.5. <i>Análisis multivariante en rechazo agudo</i>	48
3.3. Rechazo crónico y polimorfismos	50
3.3.1. <i>Polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L y rechazo crónico</i>	50
3.3.2. <i>Polimorfismo de citocinas y rechazo crónico</i>	50
3.4. Polimorfismos y supervivencia del injerto	52
3.4.1. <i>Polimorfismo CD86 y supervivencia del injerto</i>	52
3.4.2. <i>Polimorfismo de CD95 y supervivencia del injerto</i>	52
3.4.3. <i>Polimorfismo de CD95L y supervivencia del injerto</i>	52
3.4.4. <i>Polimorfismos de citocinas y supervivencia del injerto</i>	52
3.4.5. <i>Análisis multivariante en supervivencia del injerto</i>	56
4. DISCUSIÓN	57
4.1. Polimorfismo del gen CD86	57
4.2. Polimorfismos en los genes CD95 y CD95L	57

4.3. Polimorfismo de citocinas	59
5. REFERENCIAS	62

CAPÍTULO 2 Factores solubles CD86s, CD95s y CD95Ls en la respuesta temprana frente al injerto hepático **67**

1. INTRODUCCIÓN	69
1.1. CD86 soluble.....	69
1.2. CD95 y CD95L solubles.....	69
2. MATERIALES Y MÉTODOS	70
2.1. Pacientes	70
2.2. Diagnóstico de rechazo agudo	70
2.3. Diagnóstico pre-trasplante de infección por VHB y VHC	70
2.4. Recogida de sueros	70
2.5. Determinación de CD86s, CD95s y CD95Ls	70
2.6. Determinación del polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L	71
2.7. Análisis estadístico	71
3. RESULTADOS	71
3.1. CD86s y rechazo agudo	71
3.2. CD95s y rechazo agudo	71
3.3. CD95Ls y rechazo agudo	71
3.4. Evolución de CD86s, CD95s y CD95Ls en función de la patología de base	71
3.5. CD86s y virus	75
3.6. CD95s y virus	75
3.7. CD95Ls y virus	75
3.8. Valores de CD86s, CD95s y CD95Ls en función de la incidencia de RA y la patología de base	75
3.9. Asociación del polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L y expresión de CD86s, CD95s y CD95Ls	76
4. DISCUSIÓN	78
5. REFERENCIAS	79

CAPÍTULO 3 Cuantificación de apoptosis y proliferación en CML por citometría de flujo **83**

1. INTRODUCCIÓN	85
2. MATERIALES Y MÉTODOS	85

2.1. Muestras de sangre y preparación de células	85
2.2. Tinción con CFSE	86
2.3. Tinción con 7-AAD	86
2.4. Tinción con anticuerpos monoclonales	86
2.5. Preparación y tinción de células estándar	86
2.6. Cultivos celulares	87
2.6.1. Prueba de estabilidad de CFSE	87
2.6.2. Análisis de la interferencia de CFSE en la apoptosis o proliferación	87
2.6.3. Evaluación de la apoptosis experimentada por las células respondedoras en cultivo alogénico	87
2.6.4. Comparación de los métodos basados en el marcaje con CFSE y AcMos para la discriminación de células apoptóticas respondedoras	87
2.6.5. Cuantificación simultanea de células respondedoras apoptóticas y proliferantes	87
2.7. Ensayos de proliferación	87
2.8. Análisis por citometría de flujo	88
2.9. Análisis estadístico	88
3. RESULTADOS	88
3.1. Estabilidad del marcaje con CFSE en cultivo	88
3.2. Análisis de la interferencia de las células irradiadas marcadas con CFSE en la determinación de apoptosis y proliferación	90
3.3. Utilidad del CFSE para la cuantificación de células respondedoras apoptóticas en cultivo alogénico	91
3.4. Aplicación de CFSE para la determinación del número absoluto de células respondedoras apoptóticas y proliferantes en CML	92
4. DISCUSIÓN	93
5. REFERENCIAS	96
CAPÍTULO 4 Monitorización de poblaciones linfocitarias en pacientes sometidos a trasplante hepático: Análisis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la respuesta alogénica y del efecto de inmunosupresores	99
1. INTRODUCCIÓN	101
2. MATERIALES Y MÉTODOS	102

2.1. Pacientes	102
2.2. Monitorización de poblaciones linfocitarias	102
2.3. Anticuerpos monoclonales	102
2.4. Cuantificación de apoptosis espontánea e inducida por PHA	102
2.5. Efecto del tratamiento con anti-CD80, anti-CD86 y CsA en cultivo mixto sobre la proliferación y los niveles de apoptosis linfocitaria	103
2.6. Determinación del polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L	103
2.7. Análisis estadístico	103
3. RESULTADOS	104
3.1. Monitorización de poblaciones linfocitarias en sangre periférica	104
3.2. Asociación del polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L y la expresión de CD86, CD95 y CD95L en células mononucleares de SP	106
3.3. Apoptosis espontánea e inducida por PHA	106
3.4. Monitorización de la proliferación y apoptosis en respuesta alógena <i>in vitro</i> : Efecto del bloqueo con anti-CD80, anti-CD86 y CsA	108
3.4.1. <i>Cultivo primario basal</i>	108
3.4.2. <i>Cultivo primario con CsA</i>	112
3.4.3. <i>Cultivo primario con anti-CD80 + anti-CD86</i>	112
3.4.4. <i>Cultivo primario con anti-CD80 + anti-CD86 + CsA</i>	112
4. DISCUSIÓN	112
5. REFERENCIAS	119
<u>DISCUSIÓN FINAL</u>	121
<u>CONCLUSIONES</u>	133
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	137

*Lo último que uno sabe,
es por donde empezar.
(Blaise Pascal)*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del trasplante: el trasplante hepático.

El trasplante es uno de los grandes logros de la medicina del siglo XX, de modo que en el día de hoy se ha incorporado a la rutina terapéutica en un número cada vez mayor de centros de casi todos los países desarrollados. El amplio desarrollo de esta metodología, en la que células, tejidos u órganos (*injerto*) de un individuo (*donante*), se introducen en un individuo diferente (*receptor*), ha sido posible gracias a una selección más rigurosa de los receptores, a una mejor técnica quirúrgica y anestésica, a los mejores cuidados postoperatorios y los avances de la Inmunología y de la Farmacoterapia, con la aparición de nuevos y más potentes medicamentos inmunosupresores, antibacterianos, antivíricos y antimicóticos.

El trasplante ortotópico de hígado (TOH), consiste en la extirpación del hígado enfermo del paciente y su sustitución, en la misma localización anatómica, por otro sano procedente de un donante cadáver o vivo. Se trata de un procedimiento médico-quirúrgico complejo y sofisticado que precisa de una amplia implicación multidisciplinar en un centro médico avanzado. El primer trasplante hepático se realizó en 1963 por el doctor Thomas Starzl en el Veteran's Hospital de Denver, Colorado y, pese a que el receptor falleció a las cinco horas de la intervención, supuso el primer paso para lo que hoy constituye la mejor y en algunos casos la única alternativa terapéutica de los enfermos con hepatopatías crónicas graves e irreversibles. En España fueron los doctores Carles Margarit y Eduardo Jaurrieta quienes en 1984, en el hospital de Bellvitge de l'Hospitalet, Barcelona, realizaron con éxito la primera intervención. Hoy se efectúa en 24 hospitales de todo el estado y son más de mil los enfermos que anualmente reciben un trasplante hepático en nuestro país.

En el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca el primer TOH se realizó en 1988 y en la actualidad se han efectuado cerca de 881 trasplantes (memoria de la SETH, 2010), (1). Los datos de supervivencia a un año han mejorado significativamente en las últimas décadas pasando del 30% al 70% y se espera que sigan mejorando en las siguientes décadas. En definitiva, se trata de un método terapéutico especialmente importante, máxime si se tiene en cuenta que estos enfermos de otra forma estarían condenados a muerte en días o a lo sumo en meses.

Las principales indicaciones para un TOH, son las enfermedades irreversibles del hígado, ya sean vasculares (síndrome de Budd-Chiari), hepatocelulares (hepatitis vírica, hepatitis producidas por fármacos o iatrogénica y cirrosis alcohólica) o colestásicas (cirrosis biliar, colangitis esclerosante primaria), fallos hepáticos fulminantes (inducidos por virus, fármacos, toxinas o la enfermedad de Wilson), tumores (hepatocarcinoma, colangiocarcinoma y adenocarcinoma) y, por último, enfermedades genéticas metabólicas.

A lo largo de estos años, el hígado ha demostrado ser un órgano inmunológicamente privilegiado. A este respecto, existen numerosas evidencias que describen como algunos receptores hepáticos que han dejado el tratamiento inmunosupresor mantienen la función del aloinjerto lo que indica un fuerte mecanismo de tolerancia. Además, los receptores hepáticos requieren en general, regímenes de inmunosupresión más reducidos que con otros órganos y el propio trasplante de hígado puede conferir protección frente al injerto de otros órganos del mismo donante (2). Asimismo, la incidencia de rechazo es inferior a la de otros órganos. En los años 1990s, el rechazo agudo ocurría aproximadamente en el 60% de los pacientes, si bien no comprometía la supervivencia del injerto y del paciente. Desde el año 2000, la incidencia de rechazo agudo ha disminuido considerablemente, hasta alcanzar tasas que en algunas series representan el 15%. Este descenso se ha visto favorecido por el uso de nuevos agentes inmunosupresores y por la mejora en el manejo del tratamiento (3), pero en contrapartida, el uso de estos agentes se ha asociado al desarrollo de toxicidad, elevado riesgo de infecciones y alta incidencia de ciertos tumores (4,5).

A pesar de todas estas mejoras conseguidas, aún hoy en día, el rechazo es el principal escollo que se presenta en las primeras etapas de estos trasplantes. Por todo esto, el principal objetivo de la inmunológica clínica, en estos momentos, es tratar de profundizar el desarrollo de nuevas estrategias y tratamientos para la inducción en los receptores de un estado de tolerancia específica frente al injerto.

Por ello, es de gran importancia profundizar en el conocimiento de los mecanismos que participan en la respuesta inmunitaria que se desarrolla frente al injerto (respuesta alogénica) y de los factores que pueden modificarla. Controlar estos mecanismos permitiría una mayor previsión sobre la evolución del trasplante y, quizás la aplicación de una terapia preventiva ajustada a los factores de riesgo concurrentes en cada caso.

Para comprender los mecanismos implicados en la regulación local de la respuesta inmune del hígado es necesario conocer las funciones metabólicas y su micro-anatomía.

2. Características histológicas y funcionales del hígado.

El hígado es de gran importancia en cuanto a su actividad metabólica y ejerce una importante acción reguladora sobre el metabolismo general; actúa como *glándula exocrina*, produciendo la bilis que es liberada en el intestino delgado y, como *glándula endocrina*, sintetizando gran variedad de productos (proteínas plasmáticas, colesterol, hormonas, vitaminas etc.) que se vierten directamente al torrente circulatorio. Además, es capaz de regular los niveles de glucosa y aminoácidos en sangre y almacenar sustancias como el hierro para regular el metabolismo de la hemoglobina. Por otro lado, se encarga de inactivar productos tóxicos procedentes del intestino o de la circulación general degradándolos por oxidación e hidroxilación.

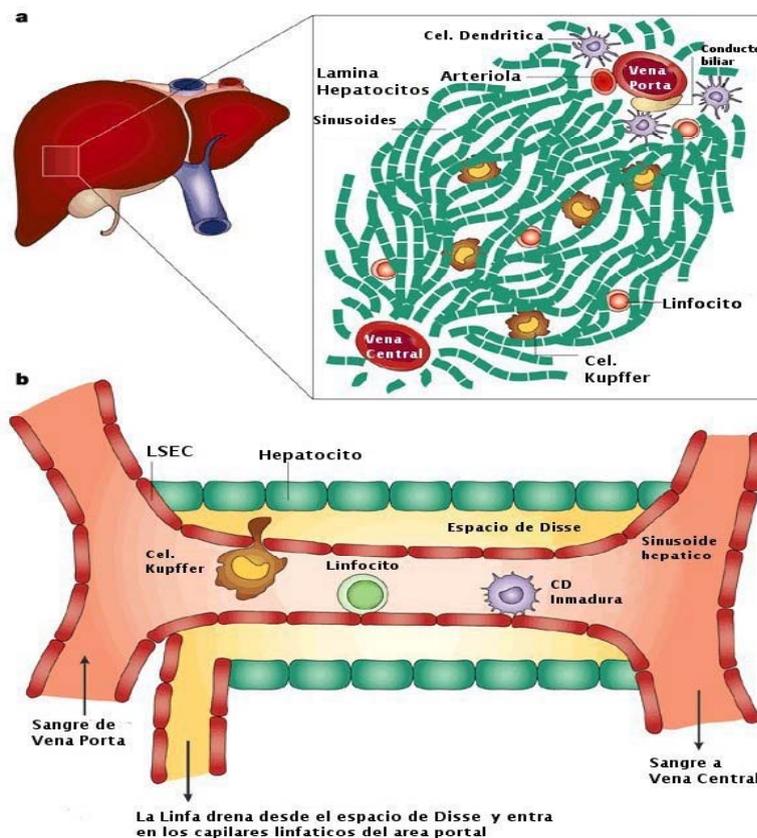


Fig 1. Microambiente hepático. a) Estructura de un lobulillo hepático. El lobulillo está constituido por una rama de la vena porta, una arteriola y un conducto biliar. Desde la vena porta, la sangre fluye hacia la vena central a lo largo de los sinusoides hepáticos. Los sinusoides contienen una población de macrófagos conocidos como células de Kupffer. b) Organización de los sinusoides. Los sinusoides están delimitados por un endotelio fenestrado formado por células endoteliales del sinusoides hepáticas (LSEC). Las células de Kupffer, los linfocitos y las células Dendríticas (CD) inmaduras se localizan en los sinusoides. El espacio sub-endotelial se conoce como espacio de Disse y es por donde los linfocitos salen a los vasos linfáticos. (Modificado de *Nat Rev Immunol.* 2003. 3(1):51-62.)

El hígado se localiza en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, actuando como intermediario entre el tracto intestinal y la circulación sistémica. Recibe sangre procedente de dos vías: a través de la *vena porta* se recolecta sangre proveniente del intestino, rica en nutrientes, antígenos alimentarios, productos bacterianos, toxinas ambientales, etc; a través de la *arteria hepática* entra sangre oxigenada. La sangre de ambos orígenes se mezclan en los *sinusoides hepáticos* y se filtra desde el *espacio porta* hasta la *vena central* que abandona el hígado, pasando durante este proceso por una estructura laminar formada por hepatocitos, esta organización maximiza el intercambio de moléculas entre el espacio sinusoidal y los hepatocitos (Fig 1). Los sinusoides tienen un revestimiento fenestrado constituido por *células endoteliales del sinusoides hepático* (*LSEC*, del inglés, *Liver Sinusoidal Endothelial Cells*), lo que permite que células localizadas en el espacio sinusoidal entren en contacto directo con el tejido conectivo subyacente y los hepatocitos. La sangre, el plasma, los linfocitos y las células dendríticas atraviesan el sinusoides hacia al espacio sub-endotelial conocido como *espacio de Disse*, desde este espacio los linfocitos drenan a los vasos linfáticos situados en el *espacio porta*, desde donde se dirigen a los nódulos linfáticos (6).

Además de las células hepáticas, el hígado contiene una serie de poblaciones celulares con gran interés desde el punto de vista inmunológico: las *células de Kupffer*, *células dendríticas* (CD) y la población de linfocitos residentes. Las células de Kupffer son macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica y se localizan fundamentalmente en los sinusoides aunque pueden desplazarse hacia el espacio de Disse y entrar en contacto con los hepatocitos. Como otros macrófagos se encargan de fagocitar células apoptóticas y microorganismos. Aunque se ha observado que son capaces de actuar como *células presentadoras de antígeno* (APCs, del inglés, *Antigen-presenting Cells*) e interactuar de forma efectiva con los linfocitos T, también parece que pueden ejercer un papel importante en la inducción de tolerancia a ciertos antígenos. Las células dendríticas son APCs profesionales y se han relacionado con el desarrollo de tolerancia frente a ciertos antígenos. La población de linfocitos intrahepáticos esta constituida fundamentalmente por linfocitos CD8⁺ (T citotóxicos, Tc), además de linfocitos CD4⁺ (T colaboradores o *helper*, Th), células NK (del inglés, *Natural Killers*) y NKT (del inglés, *Natural Killers T*) que se encuentran en mayor número que en otros tejidos linfoides. Los linfocitos T intrahepáticos presentan mayoritariamente un fenotipo activado (CD25⁺ y CD69⁺) y existe una proporción

importante de ellos que expresan el receptor de la célula T (TCR) $\gamma\delta$. Las células NKs parecen tener un papel importante en el reclutamiento de linfocitos T debido a su capacidad de liberar citocinas y quimioquinas. Por otro lado, las células NKTs, que expresan mayoritariamente el TCR $\gamma\delta$, parecen estar involucradas en la respuesta a patógenos (2,7).

3. Conceptos básicos en la inmunología del trasplante

La respuesta inmunitaria es un proceso fisiológico en el que de forma secuencial se suceden una serie de eventos complejos encaminados a la erradicación de un agente extraño dentro del organismo. En este proceso intervienen de forma conjunta células especializadas, factores solubles y tejidos. El primer paso de la respuesta adaptativa frente a un antígeno extraño es el reconocimiento por los linfocitos T del antígeno presentado en el contexto de MHC (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*) y su posterior activación. Una vez activado, el linfocito T se diferencia a célula efectora, responsable de orquestar la respuesta inmune hacia el antígeno diana. En el caso del trasplante alogénico, los desencadenantes de la respuesta inmune son *antígenos* (Ags) procedentes de otro individuo y se denominan *aloantígenos*, entre ellos, las moléculas del MHC del donante, que de una manera directa o indirecta, son las principales responsables de este tipo especial de respuesta inmunitaria denominado *respuesta alogénica*.

3.1. Reconocimiento alogénico

Los principios que rigen el reconocimiento alogénico constituyen uno de los principales campos de estudio de la inmunología. De hecho, la identificación de las dianas del rechazo a injertos permitió el descubrimiento del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Dos son las características principales que permiten distinguir la respuesta alogénica de la respuesta inmunitaria normal. La primera es que, en comparación con el reconocimiento convencional de Ags, el reconocimiento alogénico es una de las respuestas inmunitarias más violentas que ocurren *in vivo*, de modo que de un 1-10% de los linfocitos T del organismo responde frente a aloantígenos, mientras que tan solo uno de cada 10.000 linfocitos T responde frente a un determinado patógeno. La segunda característica es que en el trasplante coexisten en el mismo

organismo dos grupos de APCs diferentes (donante y receptor), cada una de ellas facilitando la activación del sistema inmune.

3.1.1. Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El desarrollo de episodios de rechazo agudo temprano, así como el tiempo de supervivencia del injerto ha demostrado depender en gran medida del grado de relación genética entre el donante y el receptor (8,9). Los principales genes responsables de la respuesta alogénica se han denominado genes del MHC que se caracteriza por su alto grado de polimorfismo. En humanos, se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés, *Human Leucocyte Antigens*) y se localizan en el brazo corto del cromosoma 6, subdividiéndose en tres subregiones: *clase I*, *clase II* y *clase III*.

La región de clase I, más cercana al telómero, contiene los loci HLA-A, -B y -C entre otros y sus genes se conocen como genes HLA clásicos. Las moléculas HLA de clase I constan de una cadena pesada α de 45 kDa que se une a una cadena ligera de 12 kDa, la β_2 -microglobulina, que en el hombre es codificada en el cromosoma 15. Estas moléculas se expresan en la mayoría de las células somáticas del organismo y se encargan de la presentación de péptidos de unos 8 a 10 aminoácidos (aas), principalmente de origen endógeno. Las moléculas de clase I son fundamentales para el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos citotóxicos T CD8⁺.

La región de clase II esta situada en posición más centromérica y engloba los genes: HLA-DR, -DQ y -DP. Las moléculas HLA de clase II constan de un heterodímero formado por una cadena α de 31-34 kDa y una cadena β de 26-29 kDa. Se expresan de forma constitutiva en linfocitos B, macrófagos y células dendríticas, son conocidas como *células presentadoras de antígeno* (APCs), mientras que su expresión se puede inducir en otros tipos celulares como linfocitos T activados, endotelio vascular, etc. Estas moléculas se encargan de la presentación de antígenos de 12 a 24 aas, principalmente de origen exógeno y obtenidos por procesos de endocitosis o fagocitosis. El reconocimiento de los antígenos presentados por las moléculas de clase II se realiza por los linfocitos T colaboradores CD4⁺.

Entre la región de clase I y II se localiza la región de clase III donde se hallan un grupo heterogéneo de genes como los genes del *complemento* C4, C2 y Bf, genes tan importantes como los del *factor de necrosis tumoral* (TNF-A y TNF-B), los de la

enzima *21-hidroxilasa* y los que codifican para tres miembros de la familia de las “proteínas de choque térmico” (*heat shock protein*).

3.1.2. Receptor de Célula T

Una vez que el péptido antigénico llega a la membrana plasmática unido a la molécula de HLA, éste debe ser reconocido por el receptor de la célula T (TCR, del inglés, *T Cell Receptor*), un complejo multiproteico encargado del reconocimiento específico del antígeno y de la transmisión de señales al interior del linfocito T. Este sistema está constituido por las moléculas del TCR que le confieren especificidad por el antígeno, las cadenas invariantes del sistema CD3 (γ , δ , ϵ y ζ), los correceptores CD4 o CD8 y la molécula CD45. Existen dos tipos diferentes de TCRs: $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, cada uno de ellos formado por dos cadenas polipeptídicas diferentes con estructura de tipo inmunoglobulina, éstas constan de una región variable en la porción apical y un dominio constante en la región próxima a la membrana celular. La especificidad al antígeno de cada TCR viene determinada por la presencia de tres regiones hipervariables (CDR, del inglés, *Complementarity Determining Regions*) localizadas en el dominio variable. Estas regiones CDR son las encargadas de interactuar directamente con el complejo antígeno-molécula HLA de forma complementaria.

En el caso de la respuesta alogénica, la coexistencia de APCs del donante y del receptor provoca que los linfocitos T del receptor puedan reconocer a los aloantígenos del donante de dos maneras distintas y no excluyentes (Fig. 2): reconocimiento directo e indirecto (10).

3.1.3. Reconocimiento alogénico directo

El concepto de reconocimiento directo se basa en la observación de que los linfocitos T son capaces de reconocer de forma íntegra las moléculas de HLA alogénicas presentes en las APCs del donante, sin necesidad de que sean degradadas en péptidos y presentadas por las moléculas de HLA propias. Para comprender este mecanismo es necesario tener en cuenta que el TCR no reconoce únicamente el péptido, sino que interactúa con el complejo HLA-péptido y que en el proceso de maduración de los linfocitos T CD4 y CD8 que tiene lugar en el timo, se seleccionan aquellos clones capaces de reconocer péptidos extraños presentados por las moléculas de MHC propia en lo que se conoce como *restricción por el MHC* (11,12). Así, en condiciones

normales, frente a un determinado antígeno sólo se activarían un pequeño número de linfocitos capaces de reconocer los péptidos derivados del procesamiento de éste. Sin embargo, en el caso de la respuesta alógena, la combinación de las moléculas de *MHC alógenas + péptido alógeno* se reconocen por el sistema inmune como si se tratara de moléculas de *MHC propias + péptido extraño*. Esto provoca que un gran número de clones de linfocitos T que originalmente reconocerían antígenos extraños presentados por moléculas de MHC propias, interaccionen de forma cruzada frente a moléculas de MHC alógenas. Este mecanismo puede explicar porqué la respuesta alógena es tan violenta e implica a un alto número de clones de linfocitos T.

Sobre la base de este mecanismo, parece lógico pensar que cuanto mayor sea el número de discordancias a nivel de HLA entre donante y receptor, mayor será la

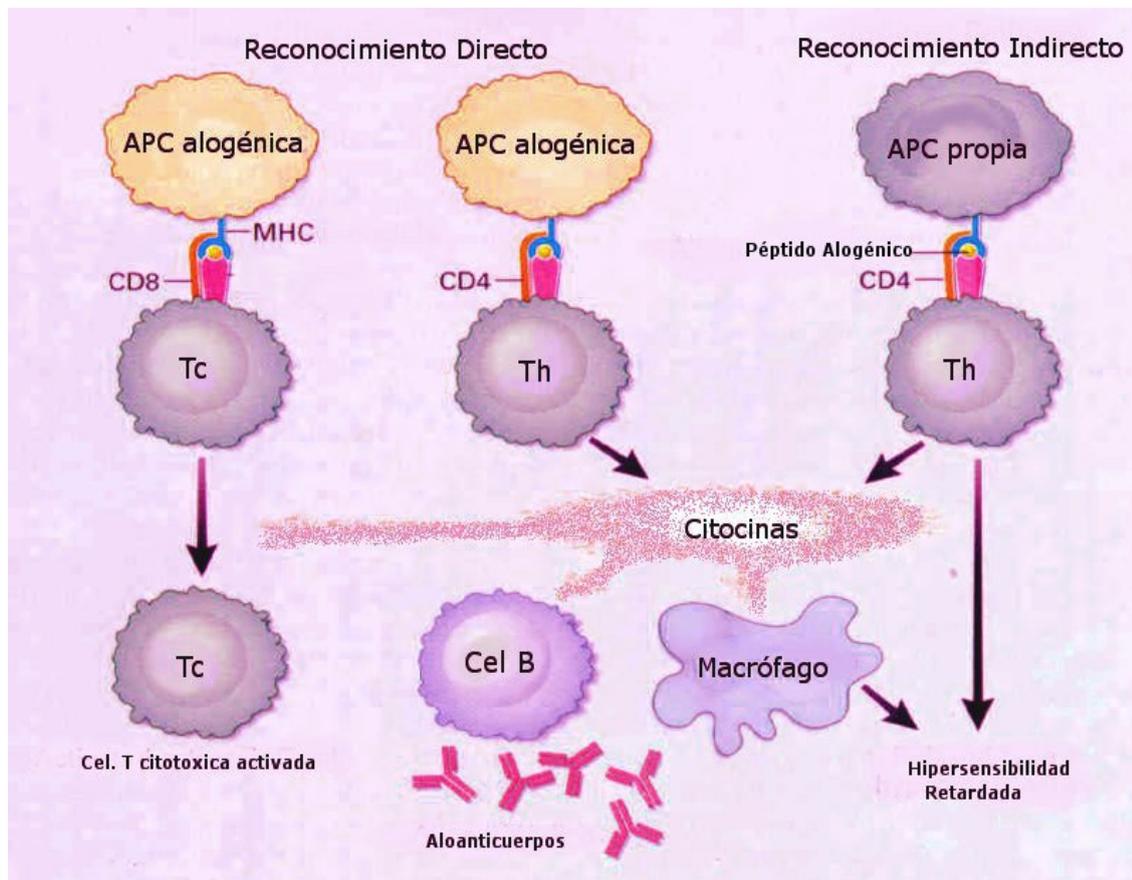


Fig 2. Reconocimiento directo e indirecto. En el reconocimiento directo, los linfocitos T se unen directamente a la molécula de MHC intacta del donante en las células presentadoras de antígeno (APCs) del injerto (izquierda). En el reconocimiento indirecto, las moléculas de MHC procedentes del injerto son captadas y procesadas por las APCs del receptor, los péptidos alógenos son presentados a los linfocitos T del receptor a través de las moléculas de MHC propias (derecha). En ambos casos, los linfocitos CD4 (Th, del inglés *T helper*) activados proliferan y secretan una serie de citocinas que promueven el crecimiento y la activación de los linfocitos CD8 (Tc, T citotóxicos), los linfocitos B y los macrófagos, que causan la destrucción del injerto por lisis directa de las células diana, producción de anticuerpos o mecanismos de hipersensibilidad retardada, respectivamente. (Modificado de *N Engl J Med.* 1998 Jun 18;338(25):1813-21).

frecuencia de linfocitos T capaces de reaccionar frente al injerto y más probable la aparición de rechazo. En el trasplante de riñón se ha demostrado una asociación entre el grado de compatibilidad, particularmente en HLA-DR y HLA-B, con el rechazo agudo y la supervivencia del injerto (13-15), efecto que no es tan evidente en el trasplante de hígado.

3.1.4. Reconocimiento alogénico indirecto

En el caso del *reconocimiento indirecto*, los linfocitos T del receptor reconocen las moléculas HLA del donante una vez procesadas por las APCs del receptor, de hecho, estas células fraccionan los péptidos al igual que otros antígenos bacterianos y los presentan como péptidos extraños en el seno del HLA propio (16-18). Si bien los linfocitos T CD4⁺ activados por la vía indirecta no podrían reconocer directamente las moléculas de HLA del injerto alogénico y, su contribución a la respuesta se debería a que son capaces de promover la activación de células T CD8⁺ citotóxicas aloespecíficas mediante la liberación de interleucinas, o el desarrollo de una respuesta de hipersensibilidad retardada (19).

Existen evidencias de que tanto la vía directa como la indirecta tienen lugar en el trasplante hepático. La vía directa predominaría en el periodo post-trasplante temprano y sería el principal factor implicado en el rechazo agudo. En este sentido, las APCs del donante abandonarían el injerto, y penetrarían en los tejidos linfoides secundarios donde se encontrarían con los linfocitos T induciendo en ellos la capacidad de respuesta aloespecífica (20). Los linfocitos T del receptor, activados a través de esta vía, serían capaces de interactuar directamente con el injerto y desarrollar su función efectora. No obstante, este tipo de reconocimiento estaría limitado en el tiempo, ya que los leucocitos pasajeros procedentes del donante tienen una vida útil limitada. La vía indirecta se generaría por la liberación de aloantígenos provenientes del injerto dañado, o tal vez en el caso del hígado, de moléculas de HLA soluble, que son recogidas y presentadas por las APCs propias, especialmente las CDs (21). Este tipo de reconocimiento se prolongaría en el tiempo y participaría en el desarrollo de episodios de rechazo crónico (22), si bien también se ha descrito su importancia en los mecanismos de tolerancia al injerto (23).

3.1.5. Principales vías de coestimulación en la respuesta alógena

La activación y rápida expansión de los linfocitos T en respuesta a los aloantígenos es un proceso crucial para el desarrollo de los mecanismos de rechazo al injerto o la tolerancia. Este proceso está altamente regulado, implicando múltiples señales diferentes pero interrelacionadas. Inicialmente se propuso el modelo de las “dos señales”, necesarias para la activación completa de los linfocitos T, un modelo que permite explicar el proceso de discriminación entre lo propio y lo ajeno (24). De acuerdo con este modelo, la activación del linfocito T comenzaría con la interacción del TCR con el complejo MHC-antígeno (señal 1), señal que definiría la especificidad de la respuesta inmune, pero que por sí sola sería incapaz de generar una respuesta eficiente. La segunda señal se generaría a través de un grupo de moléculas conocidas como *moléculas coestimuladoras* presentes en la superficie de las APCs. Estas moléculas se unirían a sus correspondientes ligandos expresados en los linfocitos T, generando una señal fundamental para la expansión, supervivencia y diferenciación de los linfocitos T activados en diferentes subpoblaciones funcionales. En ausencia de estas señales coestimuladoras el linfocito T sería incapaz de generar una respuesta eficiente y entraría en un estado de anergia (25), que la hace incapaz de responder cuando es expuesto nuevamente a un determinado antígeno. No obstante este modelo simplifica excesivamente la implicación de cada una de las señales en la activación y diferenciación de los linfocitos T (26,27). Cabe resaltar que la fuerza de interacción a través del TCR tiene un efecto cuantitativo en la activación de los linfocitos T, por lo que, si esta señal es muy intensa, se puede producir la activación en ausencia de una segunda señal. Además, las señales coestimuladoras pueden ser positivas y negativas y el balance entre ambas señales permite maximizar la respuesta inmunitaria y mantener la tolerancia inmunológica, previniendo los fenómenos autoinmunes (Fig. 3).

Aunque las principales vías coestimuladoras descritas han sido las de CD28/B7 y CD40/CD154, tal como se muestra en la figura 3, se han descrito un número creciente de nuevas moléculas coestimuladoras que actuarían de forma jerárquica en la respuesta inmune regulando la activación de los linfocitos vírgenes, efectores y de las células memoria (28-30).

3.1.5.1. Moléculas coestimuladoras de la familia CD28:B7

La familia CD28:B7 fue la primera en describirse y por ello, la mejor conocida. Se trata de una familia constituida por glicoproteínas de membrana tipo I de la súperfamilia de las inmunoglobulinas (Igs). Esta incluye entre otras, las moléculas CD28, CTLA-4 y los ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86).

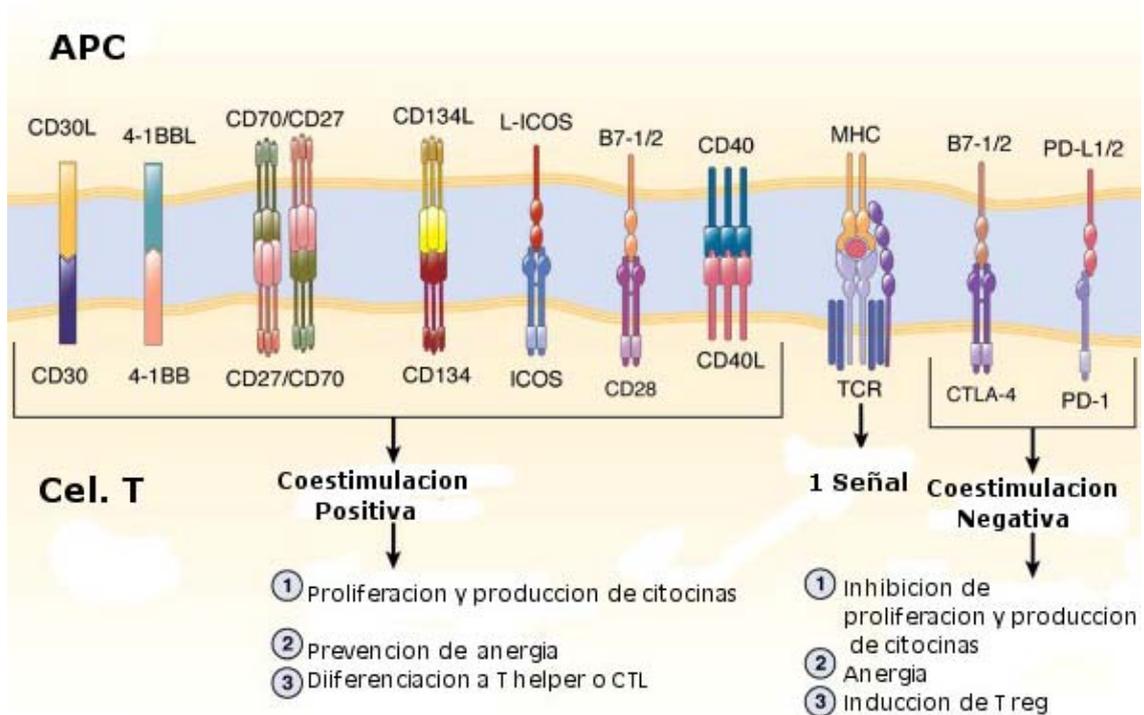


Fig 3. Modelo de las dos señales y moléculas coestimuladoras. La activación de los linfocitos T requiere de 2 señales: la señal 1 consiste en la interacción del TCR con el complejo MHC/péptido, la señal 2 es la unión de las moléculas coestimuladoras con sus respectivos ligandos en las APCs. Las células T que reciben ambas señales proliferan, secretan citocinas y se diferencian en células efectoras. Las principales moléculas coestimuladoras positivas son CD28 y CD40L. Bajo ciertas circunstancias ICOS, CD134, CD30, 4-1BB, CD27 y CD70 también generan una señal positiva. Otras moléculas coestimuladoras, como CTLA-4 y PD-1 generan una señal negativa en las células T provocando una disminución de la proliferación y producción de citocinas y anergia. (Modificado de *Gastroenterology* 2008;134:1789-1801)

CD28 se expresa de forma constitutiva en todos los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes (31), sin embargo una proporción importante de linfocitos T memoria CD8⁺ son negativos para CD28 (32). La expresión de B7-1 es inducible y puede ser expresada en APCs y otra serie de tipos celulares incluyendo linfocitos T activados. Por el contrario, B7-2 se expresa de forma constitutiva en APCs y su nivel de expresión puede ser aumentado tras la activación celular (33). En presencia de estimulación a través del TCR, la unión de CD28 con los ligandos B7 dispara la proliferación, la supervivencia y la producción de citocinas por los linfocitos T activados, de modo que constituye una

vía clave en el desarrollo de la respuesta efectora T. CD28 también facilita la diferenciación hacia linfocitos T colaboradores Th1 y Th2, favoreciendo la producción de anticuerpos por los linfocitos B y la proliferación de linfocitos T previamente activados (34). En linfocitos T vírgenes, la coestimulación a través de CD28 permite la entrada en ciclo celular, estimula la expresión de Interleucina-2 (IL-2) e induce la síntesis de proteínas anti-apoptóticas (35).

CTLA-4 (del inglés, *Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4*) fue el segundo miembro de la familia de CD28 en ser identificado. A pesar de compartir los ligandos, presentan múltiples diferencias. Primero, CTLA-4 se une a los ligandos de B7 con una afinidad 10-20 veces superior a CD28, con preferencia por B7-1 (36). En segundo lugar, la expresión de CTLA-4 es indetectable en la mayoría de los linfocitos T pero se induce tras la activación alcanzando el máximo a las 48-72 h de entrar en ciclo celular (37), ésta se localiza principalmente en el citoplasma y tras la unión del TCR, migra a la zona de interacción entre el linfocito T y la APCs.

Finalmente, la unión de CTLA-4 a los ligandos B7 generan una potente señal inhibitoria, suprimiendo la activación de los linfocitos T e induciendo anergia (34,37), por lo que su actividad inhibidora es fundamental en el desarrollo de tolerancia periférica. Esto es debido a que la señal a través de CTLA-4 inhibe la progresión en el ciclo celular, la proliferación y la síntesis de IL-2 (28). Además, la unión a través de CTLA-4 aumenta la producción de citocinas inhibitorias tales como TGF- β (del inglés, *Transforming Growth Factor- β*) que en ciertas circunstancias puede favorecer la inhibición de la respuesta mediada por CTLA-4 (37). Por otro lado, debido a que presenta mayor afinidad por los ligandos B7 que CD28, cuando la expresión de éstos es limitada, puede provocar una disminución en la señal a través de CD28, lo que nos indica que CTLA-4 es capaz de inhibir la respuesta inmunitaria por diferentes vías.

B7-1 y B7-2 son moléculas con un dominio tipo Ig extracelular y un tallo citoplásmico corto, que presentan una homología entre sí del 26%. Su expresión se ve aumentada tras la activación celular, unión con CD40L y la acción de citocinas tales como IL-4 e INF- γ (38). Ambas moléculas se unen con mayor afinidad a CTLA-4 que a CD28, pero B7-1 particularmente, se une con mayor afinidad a CTLA-4 y CD28 que B7-2. Además, B7-2 se puede expresar en la superficie celular como monómeros, a diferencia de B7-1 que lo hace en forma de dímeros lo que favorece su unión a CTLA-4 ya que esta molécula tiene preferencia por unirse a la forma dimérica. Por el contrario,

CD28 solo es capaz de unirse a B-7 cuando está en forma monomérica, por lo que la molécula B7-2 es más efectiva que B7-1 para la señalización a través de CD28. El patrón de expresión de ambas moléculas apoya estas diferencias de afinidad por sus ligandos; así, B7-2 se expresa constitutivamente a bajo nivel en las APCs y sufre una rápida inducción. Por el contrario, B7-1 está ausente en reposo y su regulación positiva es más lenta, presentando unos niveles de expresión inferiores (38). Todos estos datos parecen indicar que aunque B7-1 y B7-2 contribuyen a las señales coestimuladoras positivas y negativas (a través de CD28 y CTLA-4, respectivamente), B7-2 sería más importante en la inducción de la respuesta inmune a través de la interacción con CD28, mientras que B7-1 ejercería un papel primordial en las señales negativas debido a que presenta una mayor afinidad por CTLA-4 y que ambas se regulan positivamente tras la activación celular (39).

3.2. Citocinas

La fase final del proceso de activación de los linfocitos T consiste en la producción de una gran variedad de citocinas y la expansión clonal de las células efectoras. Esto incluiría la estimulación de linfocitos T citotóxicos, la iniciación de las reacciones de hipersensibilidad retardada a través de los macrófagos, la activación de linfocitos B y la producción de anticuerpos, entre otros procesos. La cascada de producción de citocinas es uno de los mecanismos efectores más importantes tras la activación de los linfocitos T.

Las citocinas se caracterizan por ser proteínas de bajo peso molecular (15-25 kDa), se producen *de novo* cuando comienza la activación celular, presentan una vida media muy corta y sólo son capaces de activar aquellas células que poseen los receptores específicos. La acción de las citocinas es muy potente, ya que pueden actuar a muy bajas concentraciones, y presentan una gran afinidad por sus receptores cuando están presentes en la membrana de la célula diana. Su unión al receptor provoca un cambio en el patrón de síntesis de ARN y proteínas en la célula diana. Generalmente actúan a nivel local, tanto de forma paracrina como autocrina, en el espacio local de reconocimiento antigénico, si bien también pueden ejercer su efecto a distancia. Además, son capaces de desempeñar más de una acción (pleiotropismo) y de actuar con frecuencia sobre distintos tipos celulares. Los principales productores de citocinas son los macrófagos y los linfocitos T, razón por la que actúan como los principales

reguladores de la respuesta inmune innata y específica, respectivamente, si bien otros tipos celulares con y sin actividad inmunológica (células NK, hepatocitos, células endoteliales, fibroblastos etc.) son también capaces de sintetizarlas (40).

3.2.1. Paradigma Th1-Th2

Se ha observado que diferentes subtipos celulares T son capaces de producir diferentes perfiles de citocinas. Así, los linfocitos CD4⁺, principales productores de citocinas, de acuerdo con su patrón de citocinas pueden ser divididos en dos grupos principales, Th1 y Th2. Los linfocitos Th1 producen fundamentalmente las citocinas proinflamatorias e inmunogénicas IL-2, IL-3, INF- γ , TNF- α y GM-CSF, implicadas en la respuesta inmunitaria celular, relacionándose con el rechazo de aloinjertos y en la erradicación de infecciones intracelulares. Por el contrario, los linfocitos Th2 producen principalmente citocinas inmunorreguladoras y supresoras o tolerogénicas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que median en la respuesta humoral y cuya presencia se ha relacionado con la mejor aceptación de aloinjertos, son altamente efectivas en la eliminación de nematodos intestinales pero ineficientes en la erradicación de patógenos intracelulares (Fig.4). El modelo Th1/Th2 propone que bajo la influencia de una serie de factores, incluyendo la presencia de citocinas tales como IL-4 e IL-12, los linfocitos T vírgenes podrían madurar hacia uno de los dos fenotipos, Th1 o Th2 (41). Además, otro aspecto importante de este modelo radica en la capacidad de ambas subpoblaciones para contra-regularse a través de la acción de las respectivas citocinas. Así, el INF- γ producido por los linfocitos Th1 sería capaz de inhibir los clones Th2, mientras que la IL-4 y la IL-10 producida por los Th2, bloquearía la proliferación y la producción de citocinas por parte de los Th1. Aunque este paradigma Th1/Th2 se ha aplicado a múltiples aspectos de la respuesta inmunitaria, existen procesos en los que este modelo no se ajustaría. Una de las excepciones, sería la asociación de altos niveles de INF- γ (una citocina Th1) con aceptación de aloinjertos, pero sólo cuando este incremento ocurre de manera temprana y se mantiene de forma moderada (42,43). De hecho, existen evidencias recientes que parecen indicar que las citocinas Th1 son igualmente necesarias para la inducción de tolerancia o rechazo, existiendo una jerarquía en los factores de crecimiento de los linfocitos T (en lugar de una polarización Th1/Th2) en base a su capacidad para bloquear la tolerancia e inducir el rechazo (44). Por todo esto, en la respuesta final, no solo sería importante el balance de citocinas Th1/Th2, si no

también la cronología y la intensidad de producción de cada una de las citocinas intervinientes (45).

Se han descrito otros subtipos linfocitarios en función de su perfil de citocinas: los linfocitos Th3 son capaces de producir grandes cantidades de TGF- β , una citocina considerada tolerogénica y los linfocitos Th17, productores de altos niveles de la citocina proinflamatoria IL-17 (46).

3.2.2. Principales citocinas implicadas en la modulación de la respuesta inmunitaria

Las APCs, y particularmente las CD, parecen ser cruciales para dirigir la diferenciación hacia el fenotipo Th1 o Th2. En este proceso, la IL-12 es especialmente importante en la producción de linfocitos Th1, mientras que IL-4 participaría en la generación de linfocitos Th2. La infección de las células fagocíticas por patógenos intracelulares aumentaría la producción de IL-12 que a su vez favorecería la producción de INF- γ por parte de las células NKs. Estas dos citocinas dirigen selectivamente la diferenciación hacia linfocitos Th1 e inhiben la respuesta Th2. Por el contrario, el efecto de IL-4 predomina sobre el de IL-12 y por lo tanto, los niveles relativos de IL-4 frente a los de IL-12 e INF- γ parecen fundamentales para determinar la diferenciación hacia Th1 o Th2. IL-4 también disminuye la expresión de la subunidad β del receptor de IL-12 (IL-12R), necesaria para la respuesta inducida a través de IL-12, lo que polariza la respuesta hacia Th2. Por otro lado, IL-4 inhibe la liberación de citocinas inflamatorias tales como IL-1, TNF- α , IL-8 y prostaglandina E₂ (PEG₂) procedentes de macrófagos activados (47).

IL-10 es la citocina inmunomoduladora por excelencia e induce la inhibición de MHC de clase II y disminuye la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en las APCs, por lo que puede prevenir la activación de los linfocitos T y favorecer el desarrollo de tolerancia. Además, inhibe la producción de IL-1 α e IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y contra-regula la producción de IL-12. De hecho, es capaz de inhibir tanto la respuesta Th1 como la Th2 (48). Así, ensayos *in vitro* han demostrado que IL-10 es capaz de convertir las células de Langerhans de potentes inductoras de la respuesta inmune a células tolerogénicas (49). Más aún, se ha observado que las CDs inmaduras expuestas a IL-10 en cultivo alogénico ven reducida

su capacidad para estimular a los linfocitos T CD4 de forma drástica, induciendo un estado de anergia específica de antígeno en los linfocitos T CD4 (50).

TGF-β, al igual de IL-10, presenta múltiples efectos inmunosupresores siendo capaz de inhibir los linfocitos Th1 y Th2, linfocitos B, linfocitos T CD8⁺, macrófagos y células NKs. Actúa bloqueando la progresión en el ciclo celular y puede ejercer un efecto directo en la expresión del gen de IL-2 (51). Además, es capaz de suprimir la expresión de los receptores de IL-12 e IL-2 y regular negativamente la expresión de MHC de clase II en macrófagos (52).

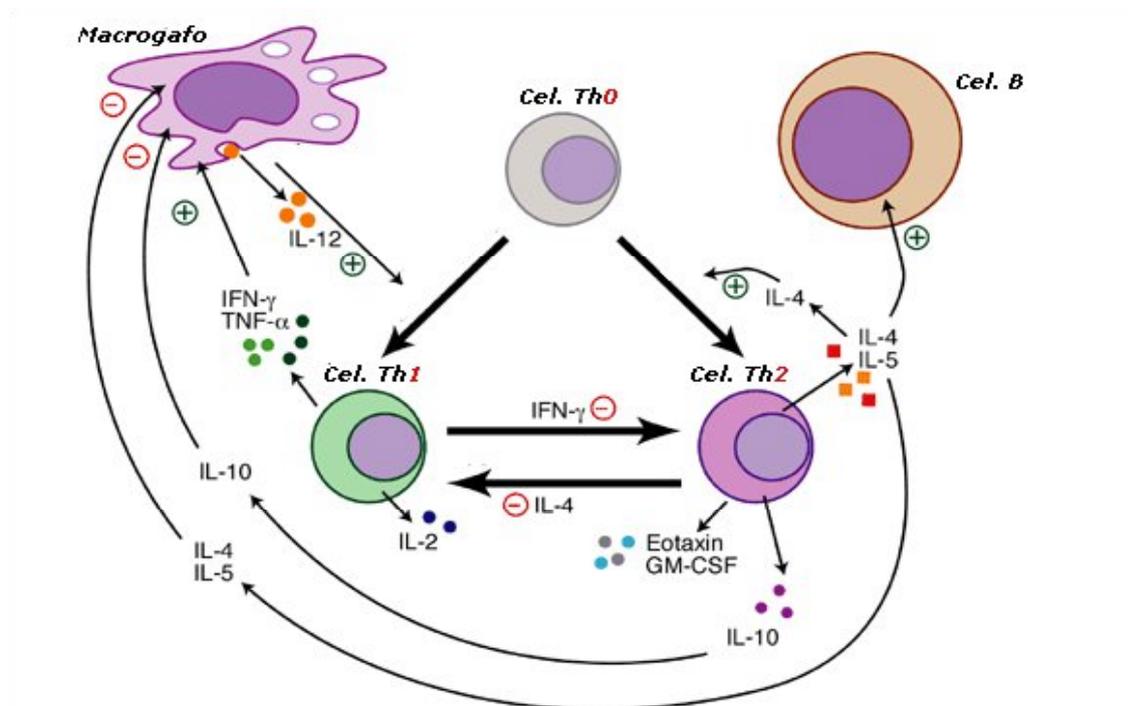


Fig 4. Posibles mecanismos de interacción entre células Th1 y Th2. El modelo indica el perfil de producción de citocinas de cada tipo celular y como se regulan de manera positiva (signo +) o negativa (signo -) entre ellas. Se ha propuesto que los linfocitos Th1 favorecerían la respuesta autoinmune y alérgica, mientras que los linfocitos Th2 promoverían la inducción de tolerancia. (Modificado de *Expert Rev Mol Med.* 2000;2(7):1-20)

IL-2, es responsable de amplificar la respuesta de los linfocitos T activados. Esta citocina es un péptido de 15 kDa que actúa únicamente sobre las células que expresan el receptor de alta afinidad de *IL-2*. Este receptor no se expresa en los linfocitos T en reposo o *resting*, pero aparece pocas horas después de la activación. El número de estos receptores en la célula aumenta por acción del antígeno y de *IL-2*, y a medida que el antígeno es eliminado, el número de receptores también disminuye y por lo tanto su capacidad de respuesta frente a *IL-2*. Los blastos T, producen además un importante

número de otras citocinas, y el efecto proliferativo de IL-2 se ve reforzado por la acción de IL-4 y en cierta extensión por IL-6 que reacciona con el receptor correspondiente en el linfocito T proliferante (53).

3.3. Mecanismos de tolerancia inmunológica

El término tolerancia se utiliza para describir un estado en el que el sistema inmunitario no desarrolla una respuesta frente a un determinado antígeno en ausencia de inmunosupresión. El desarrollo de tolerancia a antígenos propios se puede generar cuando los linfocitos en desarrollo entran en contacto con estos antígenos en órganos linfoides primarios (el timo o la médula ósea), lo que se denomina *tolerancia central*, o cuando los linfocitos maduros entran en contacto con los antígenos propios en tejidos linfoides secundarios (bazo, ganglios, mucosas, piel etc.), denominándose entonces *tolerancia periférica*.

3.3.1. Tolerancia central

El timo es el principal responsable del desarrollo de tolerancia frente a antígenos propios. Los precursores T provenientes de las células madre de la médula ósea maduran en el timo donde aprenden a diferenciar lo propio de lo extraño. Durante la diferenciación de las células T, los precursores $CD4^-CD8^-$ se transforman en linfocitos dobles positivos $CD4^+CD8^+$ y posteriormente en $CD4^+TCR^+$ si interaccionan con moléculas de HLA de clase II, o $CD8^+TCR^+$ si lo hacen con moléculas de HLA de clase I. Cuando los linfocitos T se unen con baja afinidad través del TCR con el complejo péptido-HLA presente en el epitelio tímico se produce un fenómeno de **selección positiva** que permite la supervivencia del linfocito entrando en la circulación y colonizando los órganos linfoides secundarios. Por el contrario, los timocitos capaces de reconocer los antígenos propios con alta avidez son eliminados mediante el proceso conocido como **selección negativa** produciéndose una deleción clonal por mecanismos de apoptosis (54,55). Tanto las células del epitelio tímico medular como las CD del timo pueden mediar la selección negativa, sin embargo, probablemente estas últimas juegan el papel principal en este segundo proceso (56).

3.3.2. Tolerancia periférica

No todos los timocitos autorreactivos son eliminados en el timo, algunos de ellos son capaces de escapar del mecanismo de selección negativa, bien debido a un proceso incompleto de selección negativa o, a que no todos los antígenos periféricos son expresados en el timo. En líneas de ratones transgénicos se ha observado que el 25-40% de los timocitos autorreactivos pueden escapar a la periferia incluso en presencia del antígeno deletéreo (57). Para explicar el fenómeno de inducción y mantenimiento de la tolerancia periférica, se han propuesto una amplia variedad de mecanismos no excluyentes entre sí, incluyendo ignorancia, anergia, apoptosis y regulación, entre otros (Fig. 5). Todo parece indicar que en un sistema complejo y finamente balanceado como el sistema inmune, es necesaria la presencia de un cierto grado de redundancia, de modo que en función de las circunstancias, predomine un mecanismo u otro. Sin embargo, un aspecto importante en la mayoría de los modelos de tolerancia periférica es la importancia de la interacción APC-Linfocito T, revelándose como un proceso dinámico en el que ambas partes se regulan mutuamente.

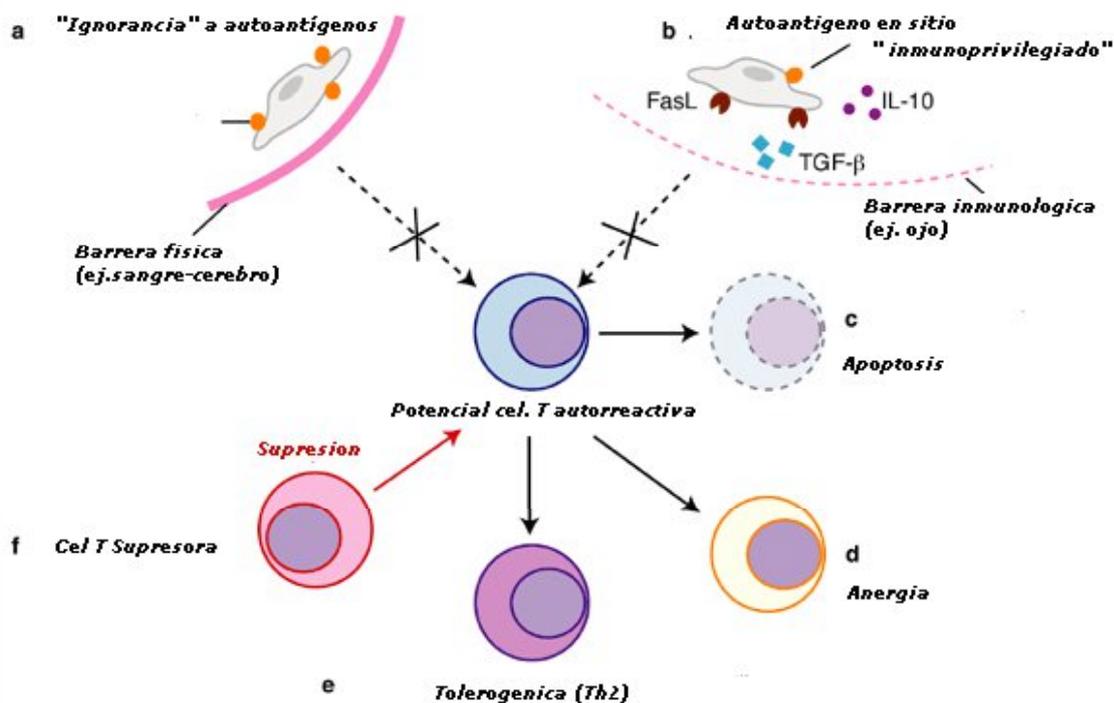


Fig 5. Mecanismos para el desarrollo de tolerancia periférica. a) Los antígenos secuestrados frente a los linfocitos T (como en el cerebro) no pueden provocar la respuesta inmune, por lo que las células T "ignoran" el autoantígeno. b) Algunos antígenos no están separados de los linfocitos T por una barrera física, sino por una barrera funcional en sitios "inmuno-privilegiados" donde la expresión local de citocinas como IL-10 y TGF-β o la expresión de FasL, previene la inducción de la respuesta inmune. c) la eliminación de linfocitos T por deleción activa, d) la conversión a célula no-respondedora "anergia", e) el desarrollo de un fenotipo más tolerogénico como Th2 o f) la supresión activa por el desarrollo de linfocitos T reguladores con actividad supresora. (Modificado de Expert Rev Mol Med. 2000;2(7):1-20)

3.3.2.1. Ignorancia

Es el mecanismo más simple de tolerancia periférica. Según este modelo ciertos autoantígenos se mantendrían ocultos o “secuestrados” para el sistema inmune, siendo incapaces de inducir autorreactividad (58,59). Su verdadero papel en el mantenimiento de tolerancia periférica no está bien definido, ya que existen ciertos antígenos supuestamente escondidos como la insulina, la tiroglobulina y la proteína básica de mielina (MBP) entre otros, que se expresan en tejidos linfoides periféricos y en el timo (60). Además, aunque la exposición a antígenos crípticos puede inducir autoinmunidad (61), los mecanismos de ignorancia no explican el hecho de que no siempre se produzcan reacciones autoinmunes cuando los antígenos “secuestrados” son expuestos, como por ejemplo tras un daño inespecífico.

Una variante de este proceso ocurre cuando los potenciales autoantígenos se localizan en lugares “inmunológicamente privilegiados“, como por ejemplo los ojos, testículos, placenta y cerebro. En estos lugares, las células están protegidas del sistema inmune debido a la expresión de FasL (CD95L) que provocaría la apoptosis del linfocito T efector o por la secreción local de citocinas inmunomoduladoras como IL-10 o TGF- β (62,63).

3.3.2.2. Delección/Apoptosis

En la década de los 90s, varios investigadores demostraron que la delección periférica era un mecanismo de tolerancia en respuesta a superantígenos (64,65). La activación repetida de linfocitos T maduros por antígenos propios, o el reconocimiento de antígenos propios en ausencia de una segunda señal coestimuladora dispara los mecanismos de apoptosis (muerte celular programada) dando lugar a la eliminación de linfocitos T autorreactivos. Este mecanismo se conoce como muerte celular inducida por activación (AICD, del inglés, *Activation-induced Cell Death*). Trabajos recientes muestran que la apoptosis de los linfocitos T autorreactivos puede ocurrir tanto de forma Fas-dependiente como Fas-independiente (66). En el primer caso, la activación repetida de los linfocitos CD4⁺ da lugar a la coexpresión del receptor de muerte Fas (CD95) y su ligando FasL (CD95L). La interacción de FasL con Fas genera una señal a través de Fas, que induce la activación de las caspasas, enzimas citosólicas encargadas de la inducción de apoptosis. Los mecanismos de delección Fas-independientes, se

basarían en el hecho de que la interacción con el antígeno induciría la producción de proteínas pro-apoptóticas que, en el caso de los antígenos extraños, serían contrarrestadas por proteínas anti-apoptóticas favorecidas por la existencia de señales coestimuladoras. En el caso de los antígenos propios estas proteínas anti-apoptóticas estarían ausentes dando lugar a la muerte de la célula por apoptosis.

Los mecanismos de delección parecen importantes en el establecimiento de tolerancia frente a injertos (67). Sin embargo, su significado fisiológico real es difícil de determinar, si bien es cierto que el bloqueo de los mecanismos de apoptosis genera procesos autoinmunes difusos (68). Por otro lado, las células apoptóticas presentan propiedades inmunoregulatoras, favoreciendo la secreción de citocinas como IL-10 y disminuyendo la liberación de IL-12 y TNF- α por parte de los monocitos (69). Además, las células apoptóticas pueden modificar el fenotipo de las CDs de forma que pueden generar tolerancia en los linfocitos T vírgenes (70).

3.3.2.3. Anergia

Anergia se define como una inactivación funcional de los linfocitos T que ocurre cuando estas células reconocen el antígeno en ausencia de un nivel adecuado de señales coestimuladoras necesarias para la activación de las células T. Normalmente las APCs de tejidos y órganos linfoides secundarios se encuentran en reposo, por lo que los niveles de moléculas coestimuladoras son nulos o muy bajos. Además, las APCs se encuentran procesando y presentando antígenos propios de forma continua, de modo que los potenciales linfocitos T autorreactivos reconocerían estos antígenos, pero en ausencia de una segunda señal coestimuladora, dando así lugar a un estado de anergia en el linfocito T. Así, cualquier proceso que bloquee la coestimulación en presencia del antígeno provocaría el estado de anergia (25). Los linfocitos anérgicos son incapaces de proliferar en ausencia de IL-2 y no suelen producir citocinas, aunque en ciertas circunstancias pueden presentar un fenotipo Th2, secretando IL-4 e IL-5 (71). Sin embargo, las células anérgicas en algunos casos pueden inhibir la acción de células vírgenes y primadas de forma dependiente de antígeno. Este proceso podría ser debido a una competición entre las células anérgicas y las no anérgicas por las citocinas (IL-2, etc.) y la superficie celular de las APCs (72). Además, hay que tener en cuenta que el estado de anergia se puede revertir en condiciones pro-inflamatorias incluyendo un proceso infeccioso (73).

3.3.2.4. Células T reguladoras

Tras el encuentro con el antígeno propio, algunos linfocitos T autorreactivos pueden transformarse en células reguladoras (Treg), capaces de prevenir o suprimir la activación de otros linfocitos autorreactivos potencialmente perjudiciales. Los linfocitos T reguladores se pueden generar en el timo o en órganos linfoides secundarios, aunque el mecanismo que da lugar a la generación de estas poblaciones no se conoce en detalle. En los últimos años se han identificado numerosos marcadores de células supresoras lo que ha permitido aislar estas poblaciones y estudiar su mecanismo de acción *in vitro*.

Los linfocitos T $CD4^+CD25^+$ han sido fuertemente implicados en la inducción y mantenimiento de tolerancia a lo propio (74). Estas células se generan principalmente en el timo (denominadas Treg naturales), requiriendo una selección positiva específica, además, expresan FoxP3, un factor de transcripción necesario para desarrollar los mecanismos implicados con su actividad supresora (75). Para ejercer su actividad inmunosupresora es necesario un contacto célula-célula (76), siendo capaz de inhibir linfocitos T CD4 y CD8, así como a linfocitos vírgenes y de memoria. Varios trabajos parecen indicar que para su activación requieren una interacción antígeno específica, sin embargo su acción supresora se puede ejercer de forma no específica de antígeno (77). TGF- β está fuertemente implicada en el mantenimiento de las Tregs y como mediador de la actividad supresora (78). Además, se han descrito otras poblaciones de linfocitos T reguladores (Treg adaptativos) que se generan a partir de linfocitos T $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ en la periferia tras el contacto antígeno específico (76), especialmente en presencia de TGF- β (79). Otros tipos celulares, las células reguladoras “Tr1” se generarían por estimulación antigénica crónica en presencia de IL-10. Estas células producen altos niveles de IL-10 y pequeñas cantidades de IL-2 (80).

Además de estas poblaciones reguladoras, se han descrito otras poblaciones supresoras T y no-T, capaces de regular negativamente la respuesta inmune. Entre ellas, los linfocitos T $CD8^+CD28^-$ serían capaces de suprimir la respuesta alogénica y la respuesta xenogénica *in vitro* (81). Algunos linfocitos T $CD8^+$ ejercen su función supresora en lo que se conoce como actividad “veto” por la que inactivan los linfocitos T citotóxicos (CTL, del inglés *Cytotoxic T Lymphocyte*) que reconocen los antígenos en la superficie de la célula veto, provocando la inmunosupresión de la respuesta CTL frente a antígenos expresados por la célula veto (82).

4. Papel de la inmunología en el trasplante hepático

4.1. Mecanismos de rechazo

El reconocimiento alogénico produce la activación de diferentes tipos celulares, entre ellos: los linfocitos Th1, que secretan principalmente IL-2 e INF- γ y son los primeros en activarse facilitando la respuesta clonal e inflamatoria que tiene lugar en las primeras etapas post-trasplante, los linfocitos Th2 que secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, se activan de forma más tardía y colaboran en la producción de Igs, los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ o CD4⁺ encargados de la eliminación de células alogénicas, y, por último, los linfocitos B aloantigénicos encargados de la producción de Igs (83).

La respuesta desencadenada por los antígenos HLA, como toda respuesta inmunitaria, presenta dos componentes: el celular y el humoral (84). La respuesta celular ocurre en la mayoría de los casos, es difícil de monitorizar de manera completa y relativamente sensible a los inmunosupresores clásicos. Esta respuesta presenta tres mecanismos principales: a) la activación de efectores T citotóxicos específica a través del TCR; b) la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés, *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*) en la que, en presencia de anticuerpos, la célula efectora con receptores para las Igs reconocen a la célula diana y la elimina de forma independiente del complemento; y c) la actividad citotóxica mediada por células NK, capaces de detectar la ausencia de determinados antígenos de HLA en la célula diana. La respuesta humoral, por el contrario, sólo se observa en una cuarta parte de los receptores de injerto, es relativamente fácil de monitorizar pero es poco sensible a los inmunosupresores clásicos. La capacidad de producir alo-anticuerpos estaría posiblemente relacionada con la incompatibilidad alélica HLA y la presencia o no de señales accesorias que acompañan a la presentación alogénica a los linfocitos T o B.

En trasplante de órganos y también en el TOH, se pueden diferenciar tres tipos de rechazo; hiperagudo o humoral, agudo y crónico (85,86). La clasificación de los distintos tipos de rechazo de órganos se basa en criterios histopatológicos e implican un orden de aparición:

- **Rechazo hiperagudo o humoral:** Esta originado por el ataque inmune debido a la unión al endotelio vascular de anticuerpos preexistentes naturales o inducidos en el receptor que provocan la fijación y activación del complemento (87). Esto provoca la

liberación de factores que promueven la adhesión y agregación de las plaquetas, dando lugar a la obstrucción trombótica de los vasos y la lesión isquémica irreversible del injerto. En el trasplante de hígado, la mayor parte de los casos descritos corresponden a situaciones de incompatibilidad de grupo sanguíneo, ya que este órgano es muy resistente al rechazo hiperagudo mediado por anticuerpos anti-HLA (88,89). Esto podría ser debido a varias causas: la dilución o eliminación transitoria de los anticuerpos preformados debido a la gran cantidad de sangre transfundida durante la intervención, al bloqueo de los alo-anticuerpos por acción de las moléculas de HLA soluble liberadas por el hígado injertado o a la eliminación de los inmunocomplejos por la acción fagocítica de las células de Kupffer del injerto (90). La denominación de rechazo hiperagudo en el contexto del TOH no es del todo correcta ya que no sucede de forma inmediata al implante, sino que, por el contrario, suele manifestarse después de días o incluso después de un rechazo celular. Se caracteriza por el deterioro brusco de la función del injerto después de un periodo corto de buena función hepática.

- **Rechazo agudo (RA):** es el más frecuente y ocurre preferentemente en las primeras semanas después del trasplante, pero también puede presentarse más tardíamente, a lo largo del primer año post-trasplante. Es pues, la principal causa de disfunción inmunológica del injerto en las primeras etapas del post-trasplante, especialmente entre los días 5 y 15. Es un proceso habitualmente reversible mediante el tratamiento con grandes dosis de inmunosupresores. Su presencia se sospecha por cambios enzimáticos (elevación de transaminasas o de las enzimas de colestasis), con o sin aumento de la bilirrubina, y el diagnóstico debe confirmarse histológicamente mediante biopsia hepática. El diagnóstico histológico depende de la presencia de, al menos, dos de los siguientes hallazgos: 1) la presencia de un infiltrado celular mixto en los tractos portales, 2) la infiltración y daño del epitelio biliar de los conductos biliares intrahepáticos y, 3) la inflamación del endotelio venoso en los tractos portales (91). Se ha establecido una clasificación de la gravedad del rechazo en tres grados (leve, moderado o grave) según la intensidad de la inflamación portal y de la necrosis centrolobulillar (92). El RA de aparición tardía (>30 días) es de peor pronóstico, su identificación histológica puede ser difícil porque no siempre están presentes los signos clásicos, la respuesta al tratamiento es peor y la probabilidad de evolución hacia la cronicidad mayor.

El rechazo agudo se origina principalmente por el reconocimiento de determinantes alogénicos del hígado trasplantado, especialmente los del complejo mayor de histocompatibilidad. En el hígado humano, la expresión de antígenos HLA está básicamente confinada a las células sinusoidales (células de Kupffer y endoteliales) que expresan moléculas de clase I y II (93). El epitelio biliar expresa clase I y los hepatocitos son normalmente negativos para clase I y II (94). El mecanismo, comúnmente aceptado, que lleva a la aparición del rechazo agudo comienza con la activación frente a los aloantígenos de linfocitos T CD4⁺ colaboradores y posiblemente también de los CD8⁺. Para que el reconocimiento tenga lugar, es necesario el contacto previo del linfocito T con el tejido alogénico a través del TCR e implica la participación de moléculas coestimuladoras, y factores pro-inflamatorios como IL-1 (95). Esto provoca la liberación de IL-2 y otras citocinas que favorecen el reclutamiento, proliferación, diferenciación y activación de otros linfocitos, entre ellos los T CD8⁺ citotóxicos (96), generándose una respuesta inflamatoria en la que se libera INF- γ y otros factores, aumenta la expresión de HLA y moléculas de adhesión, se facilita el reconocimiento de las células diana y el reclutamiento hacia el foco inflamatorio de monocitos, neutrófilos y eosinófilos donde estas células actúan como células efectoras en el reconocimiento de las células o tejidos diana (97).

- **Rechazo crónico (RC):** ocurre en el 2-5% de los TOHs y suele conducir al fracaso progresivo e irreversible del injerto. En la mayoría de los casos aparece entre los dos a nueve meses post-trasplante. Desde el punto de vista anatomopatológico, las lesiones histológicas del rechazo crónico se clasifican en dos categorías principales: 1) la pérdida de conductos biliares o rechazo ductopénico y 2) la arteriopatía obliterativa y lesiones asociadas o vasculopatía del rechazo (98). Aunque estos dos procesos pueden ocurrir independientemente, con frecuencia coexisten ambos o uno precede al otro. La respuesta al tratamiento inmunosupresor anti-rechazo en este caso es pobre, y la única alternativa terapéutica es el retrasplante. En algunos casos puede controlarse sustituyendo CsA por tacrolimus. La pérdida de los conductos biliares ocurre progresivamente durante las etapas tempranas, en que aparece infiltrado inflamatorio portal asociado al daño de los conductos biliares, pero cuando todavía no hay pérdida de conductos biliares es difícil de distinguirlo del daño que ocurre en el rechazo agudo. En estadios terminales, los conductos biliares pueden haber desaparecido en más del 80%

de los tractos portales menores. El infiltrado inflamatorio con presencia de histiocitos puede aparecer mezclado con tejido fibroso desestructurado (98).

En realidad, se sabe relativamente poco del papel de la inmunidad en el rechazo crónico, aunque se ha aceptado generalmente que la pérdida de conductos biliares es causada fundamentalmente por mecanismos inmunológicos. Entre ellos, se cree que tiene un papel importante la acción de linfocitos T citotóxicos, dado que el predominio de linfocitos CD8⁺ en el infiltrado del rechazo agudo se asocia con un mayor riesgo de progresión hacia el rechazo crónico (99,100). También es posible que participen mecanismos humorales, ya que se ha demostrado una mayor incidencia de rechazo ductopénico en los trasplantes realizados con pruebas cruzadas positivas (101).

4.2. Tolerancia en el TOH

El hígado es un “órgano privilegiado” desde el punto de vista inmunológico, pues muestra una incidencia de rechazo menor al de otros órganos. Además, el hígado es capaz de inducir tolerancia cuando es co-trasplantado con otros órganos, tales como el intestino, riñón, o corazón en modelos animales. En humanos, el trasplante de hígado/riñón se asocia generalmente con una menor frecuencia de rechazo del riñón que en pacientes compatibles en los que únicamente se ha trasplantado el riñón (102). Los mecanismos implicados en la capacidad tolerogénica del hígado no se conocen en profundidad, si bien se han propuesto múltiples factores, incluyendo la inducción de microquimerismo por los leucocitos pasajeros del donante, la producción de proteínas inmunoregulatoras tales como las moléculas de HLA de clase I solubles (HLAs), la delección por apoptosis de linfocitos T específicos del donante y la generación de redes inmunoregulatoras mediadas por linfocitos T supresores (103).

El hígado es capaz de producir grandes cantidades de HLAs. De hecho, de forma inmediata después del trasplante la mayoría de las moléculas de HLAs detectadas en sangre periférica proceden del donante y se ha observado que estas moléculas son capaces de inducir apoptosis en linfocitos T CD8⁺ *in vivo* e *in vitro*, contribuyendo así a aumentar la supervivencia del injerto (104).

El intercambio de leucocitos entre el injerto y el receptor que da lugar a microquimerismo a largo plazo se ha propuesto como un mecanismo básico en la aceptación del injerto hepático (105). Según esta hipótesis, después del trasplante, los leucocitos del donante y del receptor interactuarían de forma bidireccional dando lugar a

la supresión o eliminación de los linfocitos alorreactivos del donante y del receptor. Este modelo fue propuesto por Starzl (105), estimulando la investigación de la migración y reubicación de los *leucocitos pasajeros*. Sin embargo, aunque se ha demostrado ampliamente que el microquimerismo de las células del donante ocurre en humanos durante largos periodos después del trasplante (106), no existen evidencias suficientes que indiquen que este fenómeno es la principal causa de la aceptación del injerto. Recientemente, se ha especulado que las CDs tolerogénicas específicas del hígado, procedentes de precursores derivados de la medula ósea, serían los principales leucocitos pasajeros implicados en la tolerancia al injerto hepático (107). Esta hipótesis es congruente con gran cantidad de datos que indican que, ciertas subpoblaciones de CDs con capacidad tolerogénica son capaces de suprimir la respuesta autoinmune y prolongar la supervivencia del injerto.

Una hipótesis alternativa para explicar el comportamiento tolerogénico del hígado, se basaría en el hecho de que los linfocitos infiltrantes del injerto hepático son rápidamente eliminados por mecanismos de apoptosis, dejando el órgano intacto (108). Estos mecanismos de apoptosis se producirían por dos vías principalmente (7), muerte celular pasiva o AICD. Así, los linfocitos T alogénicos capaces de reconocer aloantígenos en las células endoteliales del sinusoides hepático, en los hepatocitos o en determinadas subpoblaciones de CDs del hígado débilmente inmunógenas, sufrirían una activación parcial con muerte celular posterior por mecanismos pasivos. Por otro lado, en presencia de daño tisular e inflamación, la activación de los linfocitos vírgenes daría lugar a la muerte celular por AICD. En ambos casos, se produciría la eliminación de los linfocitos T alorreactivos y el injerto quedaría exento de daños. Otros posibles mecanismos tolerogénicos pueden incluir la generación de linfocitos T reguladores $CD4^+$ mediada por el reconocimiento alogénico a través de las células endoteliales del sinusoides hepático o por CDs inmaduras específicas del hígado (109). En este sentido, se ha descrito la presencia de linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+$ asociados con aceptación del injerto hepático en modelos experimentales (110).

4.3. Tratamientos inmunosupresores

El desarrollo de nuevos fármacos inmunosupresores y nuevas pautas y protocolos de inmunosupresión ha permitido que el trasplante sea una alternativa terapéutica para aquellos pacientes con enfermedades crónicas y agudas en fase terminal. El principal

objetivo es el de conseguir la tolerancia al injerto con la mínima alteración posible del sistema inmune del paciente. En la actualidad, la aparición de nuevos fármacos inmunosupresores ha modificado el tratamiento inmunosupresor clásico. Conocer los mecanismos de actuación de cada uno de ellos es fundamental para elegir la estrategia de tratamiento en cada momento (Fig. 6).

- **Inhibidores de calcineurina (ICN):** Los ICN como **ciclosporina A (CsA)** y **tacrolimus (FK506)**, son los inmunosupresores fundamentales en el trasplante hepático. La ciclosporina interacciona con una inmunofilina (ciclofilina), formando un complejo que inhibe la calcineurina (111). El complejo fármaco-inmunofilina inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina lo que produce la inhibición de la expresión de una serie de genes incluyendo la IL-2, citocina esencial para el crecimiento y proliferación de células T citotóxicas. Así pues, se trata de un fármaco que inhibe específicamente a los linfocitos T, bloqueando la división dependiente de calcio lo que afecta profundamente el proceso del rechazo. No obstante, la inhibición completa de la respuesta calcio dependiente no es recomendable, ya que impide la expansión de linfocitos T reguladores. Sin embargo, se ha observado que el tratamiento a corto plazo con niveles bajos de CsA es capaz de inducir la tolerancia al injerto en modelos animales (112). El tacrolimus se une a otra inmunofilina, FK-PB12 (del inglés, *FK506-binding protein 12*), creando un complejo capaz de inhibir la calcineurina con una potencia 100 veces superior a la CsA. Los efectos secundarios del FK506 son similares a los de la CsA, si bien se ha descrito que los pacientes tratados con FK506 presentan índices de rechazo a un año, inferiores a los observados con CsA (113).

- **Corticosteroides:** Los corticosteroides han sido y son en la actualidad un componente esencial en todos los protocolos de inmunosupresión. Este anti-inflamatorio no específico entra en la célula por difusión simple donde forma complejos con receptores citosólicos, estos complejos se translocan hacia el núcleo uniéndose con elementos de respuesta a corticoides localizados en la región promotora de diversos genes como los de las citocinas IL-1, IL-2, IL-3 e IL-6 (114). Los esteroides inhiben la maduración de las CD y la actividad de los macrófagos, favoreciendo la producción de CD inmaduras lo que inhibiría la activación de los linfocitos T (115). No obstante, en trasplante hepático el tratamiento con esteroides tiende a ser eliminado debido a sus efectos secundarios (hipertensión, hiperglucemia y diabetes, osteoporosis, enfermedades

infecciosas etc.), aunque se ha observado, sin embargo, que su retirada incrementa el riesgo de sufrir episodios de RA (116).

- **Anti-proliferativos:** Pese a que estos fármacos no se han usado inicialmente en trasplante hepático, donde la inmunosupresión esta basada en el uso de ICN y esteroides, la experiencia en trasplante renal donde existía una alta frecuencia de fallo renal agudo post-trasplante asociada con un alto riesgo de mortalidad, ha llevado a los clínicos a introducir este tipo de sustancias junto con anticuerpos monoclonales en los regímenes de inmunosupresión en trasplante hepático.

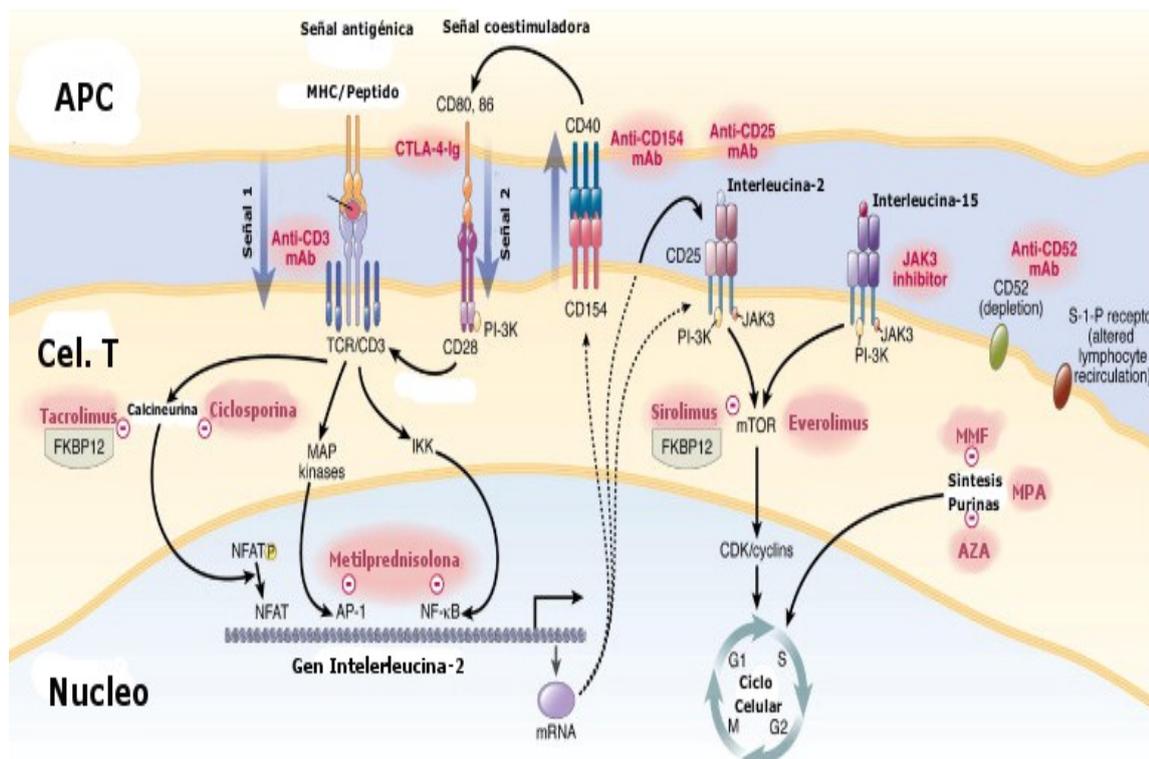


Fig 6. Inmunosupresores y sus sitios de acción. La interacción del TCR con el complejo MHC-péptido genera la primera señal, la interacción de las moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) con sus receptivos ligandos (CD28) generarían la segunda señal. Estas señales activarían las vías de transducción (calcio-calcineurina, MAP-kinasas y PKC-NFκB) que a su vez activarían los factores nucleares NFAT, AP-1 y NFκB. Estas señales inducirían la expresión de CD154, IL-2 y su receptor (CD25). La ciclosporina y el tacrolimus inhiben la calcineurina, afectando a la expresión de genes como IL-2. La diana de los corticosteroides serían los factores de transcripción tales como AP-1 y NFκB provocando la inhibición de ciertas citocinas como IL-1, IL-2, IL3 e IL-6. Los anticuerpos frente al CD25 generarían la inmunosupresión por inhibición competitiva con IL-2, bloqueando las señales de proliferación. Para la replicación de los linfocitos es necesaria la síntesis de purinas y pirimidinas, los antimetabolitos azatioprina (AZA), micofenolato mofetil (MMF) y el ácido micofenólico (MPA) bloquean la síntesis de purinas inhibiendo la proliferación, y diferenciación de los linfocitos T y B. (Modificado de Gastroenterology 2008;134:1789-1801)

La **azatioprina (AZA)** es un análogo de la 6-mercaptopurina. La AZA inhibe la producción y metabolismo de las purinas y altera la síntesis y función del ADN. En la actualidad, su uso se ha limitado debido a su implicación en toxicidad hepática y supresión de la médula ósea. Es capaz de inhibir la activación de los linfocitos T, reduce la producción de anticuerpos y disminuye los niveles de granulocitos y monocitos

circulantes (117). Asociada a CsA y esteroides es eficaz en la prevención del rechazo pero no tiene efecto sobre el rechazo una vez que este se ha establecido.

El **micofenolato de mofetilo (MMF)** inhibe la síntesis de novo de purinas a través de la inhibición de la inosin monofosfato deshidrogenasa. Esto da lugar al bloqueo de la replicación de ADN en linfocitos T y B. Se introdujo en clínica como alternativa a la AZA. La sustitución de AZA por MMF ha demostrado ser muy eficaz en la reducción del RA, aunque no afecta a la supervivencia al año y los tres años de evolución en trasplante renal (118). MMF se ha usado como sustitutivo de los ICN en pacientes con toxicidad renal debidas al uso de ICN, observándose una reducción en la incidencia de RA en los pacientes con monoterapia de MMF (119).

La **rapamicina (sirolimus)** es un antibiótico macrólido relacionado estructuralmente con el tacrolimus pero con un mecanismo de acción totalmente diferente. Se une a la misma inmunofilina que el FK506, pero en lugar de inhibir la transcripción de genes de citocinas, bloquea la señal de transducción independiente de calcio inhibiendo dos enzimas específicas: TOR1 y TOR2 (del inglés, *Targets Of Rapamicyne*) impidiendo el paso de G1 a S en el ciclo celular de los linfocitos T. El mayor interés de este fármaco es que también inhibe la proliferación de células no hematopoyéticas, incluyendo células musculares lisas vasculares (lo que podría ser una potencial ventaja para la prevención del rechazo crónico), y que también parece tener propiedades anticancerígenas (120).

- **Anticuerpos:** Los anticuerpos utilizados en TOH pueden ser monoclonales o policlonales. La terapia con anticuerpos ha sido usada para retrasar la introducción de la terapia de mantenimiento, así como para facilitar la retirada de algún agente inmunosupresor.

Los anticuerpos policlonales provienen de la fracción de gammaglobulinas obtenida de animales inoculados con linfocitos, timocitos o cultivos de linfoblastos de origen humano. Estos provocan la depleción de los linfocitos mediada por complemento o por células, lo que origina una sobre-supresión del sistema inmune incrementando el riesgo de enfermedades infecciosas, síndromes linfoproliferativos y tumores. Entre los efectos secundarios que generan, se incluyen el “síndrome de liberación de citocinas” por parte de los linfocitos que da lugar a fiebre, disnea, taquicardias etc. Se piensa que provocan la eliminación de linfocitos T y B memoria por lo que se han usado de manera frecuente en la fase de inducción en TOH (121).

Los anticuerpos monoclonales más utilizados son los que se dirigen frente al receptor de IL-2 (IL-2R). Existen dos variantes humanizadas, **basiliximab** y **daclizumab**, ambas se unen a la cadena α del IL-2R que se ve incrementada en linfocitos T activados, inhibiendo la proliferación de linfocitos T mediada por IL-2. Ambos agentes presentan pocos efectos secundarios ya que no provocan la depleción de linfocitos ni trombopenia o leucopenia. Su uso se está incrementando ya que permite el retraso en la introducción de ICN (121).

Otra posible diana para el uso de anticuerpos monoclonales es la molécula CD52. Es un marcador de linfocitos T, B, NKs y monocitos. La combinación de anti-CD52 humanizado (**Campath-1H**) con bajas dosis de tacrolimus esta dando buenos resultados en TOH, reduciendo los episodios de RA con respecto a los regímenes estándar (122).

Recientemente, se ha descrito una nueva generación de agentes biológicos capaces de bloquear la interacción entre CD80/86 y CD28 inhibiendo la vía de coestimulación. Entre estos se incluye **belatacept**, una proteína de fusión formada por el fragmento Fc de la inmunoglobulina humana y el dominio extracelular de CTLA-4. Esta molécula ha demostrado su eficacia en trasplante renal (123) e islotes pancreáticos (124) pero no se ha estudiado en TOH. Otros anticuerpos tratan de bloquear la interacción linfocito T/APC a través de la vía CD40/CD154 (**lucatumumab**), si bien estos estudios han sido abandonados debido a la aparición de fenómenos tromboembólicos, probablemente debido a la expresión de CD154 en plaquetas activadas (125).

4.4. Monitorización del trasplante

El desarrollo y validación de ensayos no invasivos capaces de evaluar la respuesta frente al donante, en trasplantes de órganos sólidos, nos permitiría disponer de una herramienta fundamental para detectar de manera temprana los procesos de rechazo, así como la identificación del desarrollo de tolerancia al injerto a largo plazo. Asimismo, nos permitiría estratificar a los receptores del injerto en función de su capacidad para tolerar un trasplante y el posible abandono de la inmunosupresión (121,126).

Varias son las estrategias que se han propuesto para analizar la respuesta alogénica, entre ellas, las más habituales son:

-El análisis de citocinas, bien a nivel de polimorfismo genético, que nos permitiría determinar la capacidad del receptor para producir citocinas pro-inflamatorias (Th1) vs tolerogénicas (Th2) lo que permitiría predecir la capacidad alorreactiva del paciente.

Bien por la determinación de los niveles circulantes en sangre periférica e incluso la capacidad de producción *in vitro* por parte de las células mononucleares de sangre periférica del receptor (127).

-Análisis de precursores de CDs, ya que las CDs pueden estimular a las células Treg favoreciendo el desarrollo de tolerancia al injerto. Como es sabido, las CDs pueden ser de origen monocitoide (pCD1) que induce diferenciación Th1, o plasmocitoide (pCD2) que promueve la diferenciación Th2. Las pCD2 se asocian más frecuentemente con TOH estable que las pCD1, por lo que el ratio pCD2/pCD1 puede ser utilizado como indicador del grado de tolerancia al injerto (128,129).

-Detección de microquimerismo: Si bien la presencia de microquimerismo del donante se ha asociado con el desarrollo de tolerancia, actualmente los resultados son controvertidos (130,131).

-Determinación de poblaciones Treg, ya que se suele asociar un aumento en las poblaciones reguladoras circulantes en sangre periférica con una buena tolerancia al injerto (132).

Son numerosos los estudios desarrollados clásicamente por nuestro laboratorio que confirman la importancia de la monitorización de pre- y post-trasplante de los factores genéticos e inmunológicos que pueden participar en el desarrollo de tolerancia o rechazo al injerto. Entre éstos se incluye la compatibilidad HLA donante/receptor (133-138), el análisis de poblaciones linfocitarias en sangre periférica (139-143) o la cuantificación de factores solubles en suero (HLAs, citocinas, etc) (144,145). En el presente estudio se pretende profundizar en estas metodologías para avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la buena o mala aceptación del injerto hepático, así como en la posible estratificación de los receptores hepáticos en función de su capacidad potencial para desarrollar tolerancia al injerto.

*El experimentador que no sabe lo que está
buscando no comprenderá lo que encuentra.
(Claude Bernard)*

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Es conocido que el hígado es un órgano con menor capacidad para inducir la respuesta alogénica que otros órganos sólidos razón por la cual puede ser relativamente bien aceptado aún en condiciones de baja compatibilidad HLA entre donante y receptor. De hecho el trasplante hepático puede constituir un buen modelo para el estudio de los principales factores que de modo natural contribuye a modular la respuesta alógena *in vivo* en las primeras etapas post-trasplante y que pueden ser corresponsables del especial estado de tolerancia inmunológica que se observa en estos trasplantes. Entre ellos, consideramos que los factores genéticos e inmunológicos implicados en la modulación de la respuesta alogénica pueden ser clave para predecir la buena o mala aceptación temprana de estos injertos y su importancia para el posterior desarrollo de estados de tolerancia operativa o inducida.

Sobre la base de estas premisas se establecieron las siguientes hipótesis:

1. Determinados polimorfismos en moléculas implicadas en la respuesta inmunológica (CD86, CD95, CD95L y citocinas Th1 y Th2) del receptor pueden ser fundamentales para la capacidad de respuesta alogénica y su impacto en la evolución temprana del injerto hepático. A su vez, la activación de los linfocitos T alogénicos por los determinantes alogénicos del injerto, conlleva un aumento en la secreción de factores solubles que median en la potenciación de la alo-respuesta y en la recirculación hacia el órgano injertado. Luego es posible que el análisis de los linfocitos de sangre periférica y de factores solubles como CD86s, CD95s y CD95Ls, puedan servir como método predictivo incruento y rápido de rechazo agudo.
2. Los mecanismos de apoptosis son fundamentales en el desarrollo de tolerancia a alo-injertos, por ello, el estudio de la expresión de marcadores de apoptosis (CD95 y CD95L) y su relación con los niveles de apoptosis inducidos en la respuesta alogénica *in vivo* e *in vitro* puede ser útil para definir indicadores del grado de tolerancia del receptor frente al órgano injertado. Igualmente, el modelo clásico de cultivo mixto linfocitario (CML) para el estudio de la respuesta alogénica *in vitro*, puede ayudar a confirmar y tratar de interpretar los resultados obtenidos en los estudios de trasplante *in vivo*.

2. OBJETIVOS

De acuerdo con estas hipótesis, para el presente trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

1. Analizar el polimorfismo de genes portados por el receptor del injerto hepático que codifican moléculas coestimuladoras (CD86), apoptóticas (CD95 y CD95L) y citocinas como TNF- α , IL-6, INF- γ , IL-10 y TGF- β 1.
2. Monitorizar en sangre periférica las diferentes poblaciones celulares, con especial incidencia en el estudio de la expresión de moléculas de membrana implicadas en mecanismos de coestimulación (CD80, CD86 y CD28) y apoptosis (CD95 y CD95L) y el análisis de sus formas solubles (CD86s, CD95s y CD95Ls) presentes en la circulación de pacientes que presenten buena y mala aceptación temprana del injerto.
3. Diseñar un modelo de estudio *in vitro* que permita determinar de forma simultánea el grado de proliferación y apoptosis de las células inducida por estimulación alogénica, así como la caracterización del fenotipo resultante durante el desarrollo de cultivos mixtos primarios y secundarios.
4. Evaluar si se puede establecer un paralelismo entre los resultados derivados del estudio *in vitro* y lo que acontece al monitorizar estas poblaciones y moléculas durante las etapas tempranas del post-trasplante hepático *in vivo*.

*En lo tocante a la ciencia, la autoridad
de un millar no es superior al humilde
razonamiento de una sola persona.
(Galileo Galilei)*

CAPÍTULO 1

CAPITULO 1

Factores genéticos del receptor y evolución del trasplante hepático: polimorfismo de CD86, CD95, CD95L y citocinas Th1 y Th2.

1. Introducción

El estudio del polimorfismo genético de moléculas inmunoreguladoras capaces de afectar la evolución clínica post-trasplante se ha convertido en un área de gran interés científico, ya que ofrece una posible explicación a la gran heterogeneidad en la evolución del trasplante observada entre distintos pacientes.

En el presente capítulo de la tesis doctoral analizamos el papel en la evolución del trasplante hepático del polimorfismo de moléculas implicadas en la coestimulación (CD86), apoptosis (CD95 y CD95L) y de citocinas Th1 y Th2.

1.1. Polimorfismo de CD86

Los linfocitos T precisan de las señales primarias y secundarias o coestimuladoras proporcionadas por las APCs para ser funcionalmente activas (1). La activación se inicia con la primera señal aportada por la interacción del complejo TCR/CD3 del linfocito con el complejo péptido/MHC en las APCs (señal antígeno específica). La segunda señal es generada por las moléculas coestimuladoras entre las cuales las más estudiadas son dos moléculas distintas de la familia B7 [B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86)] que se expresan en la superficie de las APCs y sus contra-receptores CD28 y CTLA-4 presentes en las células T (2). Como consecuencia de la interacción de estos dos pares de moléculas se produce la expansión clonal y diferenciación de las células T que contribuyen al desarrollo de la respuesta celular aloespecífica *in vivo* (3). En este sentido, en trasplante hepático se ha observado que la expresión de las moléculas de la familia B7 se regula positivamente en los linfocitos B durante los episodios de rechazo agudo (4). Más aún, en modelos animales de trasplante, se ha observado que el bloqueo de las señales coestimuladoras da lugar a un retraso en la aparición de episodios de rechazo agudo y crónico, así como un aumento en la supervivencia del aloinjerto (5-7).

CD86 se expresa de forma constitutiva en monocitos, linfocitos B activados y en menor extensión en linfocitos T activados (8-10). Esta molécula es una glicoproteína de membrana tipo I, miembro de la súperfamilia de las inmunoglobulinas (Igs). Está constituida por dos dominios extracelulares de tipo Ig unidos a un dominio transmembrana y un tallo intracitoplásmico. El gen que codifica la molécula de CD86 humano es un gen de copia única

organizado en ocho exones y localizado en el cromosoma 3q21. Los exones 1 y 2 sufren un proceso de ensamblaje alternativo (*splicing*) y no se traducen, el exón 3 forma el péptido señal, los exones 4 y 5 dan lugar a los dominios extracelulares, el exón 6 da lugar a la región transmembrana, y los exones 7 y 8 son los responsables de codificar el tallo citoplásmico de la molécula de CD86 (11).

En el gen de CD86, se ha descrito un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) en el gen de CD86 en la posición +1057 consistente en una transición de G a A, dando lugar a un intercambio de un residuo de alanina por uno de treonina en el codón 304 localizado en el exón 8 (12); esta transición da lugar a la creación de un sitio potencial de fosforilación nuevo en la región citoplásmica. Se trata de una variante que se encuentra ampliamente representada en la población caucásica con una frecuencia que ronda el 22%. En la población japonesa se ha asociado con la presencia de anticuerpos anti-músculo liso en pacientes con lupus eritematoso sistémico (13).

Diferentes observaciones han sugerido que la molécula CD86, además de estar implicada en los procesos de coestimulación para la activación de los linfocitos T, puede tener un papel en los procesos de señalización en el interior de las APCs. Así, estudios *in vitro* han revelado que la estimulación de linfocitos B humanos con IL-4 y anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-CD40 en presencia de anti-CD86, potencia la proliferación de los linfocitos B y la producción de IgE e IgG4 (14); la estimulación de CD86 regula positivamente la expresión del factor de transcripción Oct-2 de forma dependiente de proteína quinasa C (PKC, del inglés *Protein Kinase C*) y NF- κ B1 (15). Además, su tallo citoplásmico contiene varios sitios susceptibles de ser fosforilados por PKC (16). De esta manera, diferencias en el nivel de fosforilación del tallo citoplásmico de CD86, causados por la sustitución alanina/treonina, podrían afectar a la señal de transducción originada por la molécula CD86 en la APC modificando su capacidad para inducir la respuesta alógena frente al injerto.

1.2. Polimorfismo de CD95 y CD95L

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico esencial para el desarrollo y la homeostasis del sistema inmune (17). En este sentido, se ha observado que su papel es fundamental en el proceso de selección negativa y positiva de linfocitos

inmaduros que tiene lugar en el timo, en la eliminación periférica de linfocitos T citotóxicos (18), y en la lisis de células diana a través de los linfocitos T citotóxicos efectores (19). En trasplante, los procesos de apoptosis son consecuencia de la interacción entre las células inmunocompetentes del receptor con el tejido del injerto, interviniendo tanto en los mecanismos de tolerancia como en los de rechazo del aloinjerto (20). Así, se ha descrito un aumento de la muerte celular por apoptosis de las células epiteliales de los túbulos renales de receptores de riñón con episodios de rechazo agudo y crónico (21), así como la de los hepatocitos durante los episodios de rechazo agudo en trasplante hepático (22). Por el contrario, en modelos animales, el desarrollo de tolerancia al trasplante hepático se ha asociado con un aumento de la apoptosis de los leucocitos del receptor que infiltran el injerto, y el rechazo del riñón con la presencia de bajos niveles de apoptosis de leucocitos infiltrantes del injerto (23).

Una de las vías apoptóticas más importantes es aquella que tiene lugar por la interacción de Fas (Apo-1/CD95) con su ligando, FasL (CD95L o CD178). CD95 es una proteína transmembrana de tipo I (45-kD) perteneciente a la súperfamilia del receptor del TNF (24). Se localiza en el brazo largo del cromosoma 10, región 10q23, y se expresa en células linfoides inmunocompetentes y en tejidos no linfoides tales como el corazón, riñón e hígado; esta expresión se puede ver aumentada por la acción de citocinas tales como interferón- γ (INF- γ) y TNF (25). CD95L es una proteína transmembrana de tipo II (40-kD) perteneciente a la familia del TNF, se localiza en el cromosoma 1q23 (26), se expresa en órganos privilegiados inmunológicamente tales como el testículo y el ojo, en células epiteliales, en linfocitos CTLs y en NKs. Cuando los CTLs o las células NKs reconocen las células diana, se activan y expresan CD95L que induce apoptosis en las células diana. Por el contrario, cuando las células diana expresan CD95L, las CTLs o las NKs mueren por apoptosis.

Varios hallazgos sugieren que la vía CD95/CD95L juega un papel central en la regulación de la respuesta alogénica en el trasplante hepático. Así, en modelos de alotrasplante hepático en ratas se observó que la expresión de CD95L cambia gradualmente de las células infiltrantes del injerto a los hepatocitos a medida que se superaba de forma natural el rechazo y se inducía tolerancia frente al injerto (27). Más aún, la transferencia del gen CD95L en hígado de ratas antes del trasplante prolongó la supervivencia del injerto durante varias semanas de una forma dosis-dependiente (28). Contrariamente, se ha informado que la interacción CD95/CD95L media el daño al hígado durante el rechazo del injerto hepático en ratas (29). Adicionalmente, en trasplante hepático en

humanos, se ha descrito que, durante los episodios de rechazo, hay un incremento en el número de hepatocitos que expresan CD95 y en el porcentaje de hepatocitos apoptóticos (30), así como en la expresión de CD95 en linfocitos T y en los niveles de apoptosis espontánea o inducida por mitógenos (31).

Recientemente, se han descrito dos nuevos polimorfismos en la región flanqueante 5' del gen humano de Apo-1/Fas (32). La primera es una sustitución de A a G localizada en la posición -670 de la región promotora; esta sustitución crea una región sensible a la enzima de restricción MavI que puede ser detectada por técnicas de RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Este polimorfismo se sitúa en la secuencia consenso del sitio de activación de interferón gamma (GAS, del inglés *Gamma-interferon Activation Site*), y por lo tanto, puede ser un sitio para la regulación de la expresión de CD95 (33). Con respecto a este polimorfismo, se ha descrito que el genotipo GG se correlaciona fuertemente con la severidad de la atrofia vellosa en la enfermedad celiaca (34). El segundo polimorfismo es una sustitución de G a A en la posición -1377 dentro de la región silenciadora; éste no crea ni elimina ninguna posición reconocible por encima de restricción, pero altera el sitio de unión del factor de transcripción SP-1 (del inglés, *Specific Protein-1*) (35).

En el gen de CD95L también se han descrito una serie de polimorfismos (36). Aunque no se han detectado posiciones polimórficas en la región codificante, dos polimorfismos han sido detectados en el segundo y tercer intrón del gen. El primero (IVS2nt-124) es una sustitución de A a G en el nucleótido 124 por delante del extremo 5' del tercer exón. El segundo (IVS3nt169) es una delección de una T en la posición 169 por detrás del extremo 3' del tercer exón. Hasta el momento, se desconoce si estas posiciones polimórficas afectan a la expresión del gen CD95L.

1.3. Polimorfismo de citocinas

Las citocinas son proteínas o glicoproteínas inmunomoduladoras capaces de controlar y regular la respuesta inmune. Hay numerosas evidencias que demuestran su papel fundamental en la evolución del órgano transplantado. Las citocinas Th1, donde se incluyen IL-2, INF- γ y TNF- α , se han asociado con la aparición de rechazo agudo del injerto, mientras que las citocinas Th2, tales como IL-4 e IL-10, se han asociado con el desarrollo de tolerancia (37). Otro tipo de citocinas, las Th3 que incluyen el TGF- β 1 pueden ejercer una acción inmunosupresora por inhibición de la secreción de citocinas Th1 (37). Esto hace que el balance de citocinas Th1/Th2 durante el periodo post-trasplante temprano, sea decisivo en la posible aceptación del injerto (37,38). Por todo ello, parece

lógico pensar que diferencias sutiles en los niveles de citocinas del microambiente del injerto, ganglio o bazo, particularmente en el inicio de la respuesta inmune, podrían condicionar la evolución de la respuesta alogénica (39).

La producción de citocinas esta sometida a control genético, describiéndose variantes polimórficas en un amplio número de sus genes (40), estas variaciones se pueden localizar dentro de las regiones codificantes, de los intrones o en la región promotora. Diferentes estudios han mostrado una asociación entre un determinado polimorfismo y el nivel de producción *in vitro* (41-43). En el presente trabajo analizamos las variantes en los genes de las citocinas TNF- α (-308 G/A), INF- γ (+874 T/A), TGF- β 1 (codón 10 T/C y codón 25 G/C), IL-6 (-174 G/C) e IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A), con el fin de determinar su papel en la evolución del injerto hepático. A continuación se describe de forma detallada las características de cada una de estas citocinas.

TNF- α es una citocina pro-inflamatoria con una fuerte actividad inmunomoduladora (43). En humanos es producida por granulocitos, macrófagos, células epiteliales y linfocitos. Se ha descrito que la transición de G a A en la posición -308 de la región promotora provoca un aumento significativo en su transcripción (44). La presencia de este polimorfismo se ha asociado con ciertas enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico o enfermedades reumáticas, entre otras (45,46). Sin embargo, su papel en el trasplante de órganos sólidos es controvertido, pues aunque se ha descrito la asociación con rechazo agudo en trasplante de riñón (47), corazón (48) e hígado (49), estudios más recientes no parecen confirmar la asociación con rechazo agudo en hígado (50,51).

La interleucina-6 (IL-6) es una citocina pleiotrópica implicada en numerosos aspectos de la respuesta inflamatoria. Se produce por un amplio grupo de células y, actúa como mediadora de la respuesta de fase aguda y modula tanto la respuesta inmune local como la sistémica, aunque también parece poseer una actividad anti-inflamatoria e inmunosupresora (52). Se ha descrito la presencia de una variante polimórfica en la posición -174 de la región promotora de gen de IL-6 que da lugar a un cambio de G a C, lo que se traduce en una menor producción de IL-6 tanto *in vivo* como *in vitro* (53). En trasplante de riñón se ha descrito una fuerte asociación del genotipo IL-6 -174 C/C del donante con la incidencia y severidad de los episodios de rechazo agudo (54) mientras que la presencia del alelo C en el receptor se asocia con una menor supervivencia del injerto (55).

INF- γ es producido por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados y células NK activadas, ejerciendo un papel

fundamental en la defensa frente a virus y patógenos intracelulares y en la inducción de la respuesta inflamatoria (56). Se ha descrito la presencia de un polimorfismo localizado en la posición +874 que da lugar a un cambio de T a A; esta posición coincide con un posible sitio de unión de NF- κ B lo que parece afectar al nivel de producción de INF- γ , de forma que la presencia de la variante T se ha asociado con un incremento significativo de su producción. El alelo T se correlaciona de forma absoluta con la presencia del alelo microsatélite (CA) alto productor #2, previamente descrito (41). En trasplante renal, la presencia del genotipo alto productor se ha asociado con la mayor incidencia de episodios de rechazo agudo, especialmente en los individuos tratados con monoterapia de ciclosporina y con una peor función del órgano a largo plazo (57). Asimismo, en trasplante de pulmón se asocia con el mayor desarrollo de fibrosis en el injerto (58).

TGF- β 1 es una citocina multifuncional, sintetizada por un amplio rango de tipos celulares y, por tanto, se distribuye en numerosos tejidos. Se ha implicado en la reducción de la inflamación y recuperación del daño tisular, inmunosupresión, regulación de la proliferación, diferenciación y migración celular y en regulación de la producción de matriz celular (59). Se han descrito dos polimorfismos localizados en la secuencia líder de la proteína TGF- β 1 (60), dando lugar a un cambio de T a C en el codón 10 (+869) y un cambio de G a C en el codón 25 (+915). La presencia del genotipo GG en el codón 25 y al menos un alelo T en el codón 10 parece asociarse con un fenotipo alto secretor, mientras que el genotipo CC en el codón 25 se asocia con un fenotipo bajo productor, el resto de genotipos darían lugar a un fenotipo intermedio (61). En el contexto del trasplante parece estar implicado en dos fenómenos asociados al deterioro del injerto, la aterosclerosis y la fibrosis, dando lugar a la disfunción del injerto a largo plazo, así, se ha observado que el fenotipo alto productor se asocia con fibrosis del injerto en trasplante de pulmón (60) y vasculopatía coronaria tras el trasplante de corazón (62).

La citocina anti-inflamatoria IL-10, es capaz de regular negativamente la activación de los linfocitos T y la expresión de MHC en las células presentadoras de antígeno *in vitro*. También es capaz de inhibir la producción de TNF- α , IL-1, IL-6 y IL-12 en monocitos/macrófagos y de INF- γ en linfocitos T (63). Se han descrito tres SNPs en la región promotora, correspondientes a las posiciones -1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A. La posición -1082 se localiza en el sitio de reconocimiento tipo ETS (del inglés *E-Twenty Six*) y parece afectar a la unión de este factor de transcripción y, por lo tanto, a su nivel de transcripción; el alelo A en -1082 se correlaciona con bajos niveles de producción

de IL-10 *in vitro* (64), mientras que el polimorfismo en las posiciones -819 y -592 no parece afectar la producción de IL-10. Pese a que cabría pensar que debido a la actividad anti-inflamatoria de IL-10, altos niveles de esta citocina podrían tener un efecto protector frente al rechazo agudo, los resultados en trasplante hepático no son concluyentes, ya que se ha observado un aumento en los niveles de IL-10 antes de los episodios de rechazo agudo (65), si bien otros grupos no han detectado diferencias en los niveles de ARNm de IL-10 durante los episodios de rechazo (66). En cuanto a los resultados de nuestro grupo cabe señalar que se ha detectado una elevación de los niveles de IL-10 en los primeros días post-trasplante asociadas a buena aceptación del injerto hepático (67). Sin embargo, los resultados del análisis de polimorfismo de IL-10 en trasplante hepático no han mostrado una asociación clara con la aparición de episodios de rechazo (49,50,68).

2. Materiales y métodos

2.1. Pacientes e inmunosupresión

El estudio se realizó sobre un grupo de receptores de un primer trasplante hepático del Hospital “Virgen de la Arrixaca” de Murcia. Los pacientes dieron su consentimiento informado para la recolección y almacenamiento de sangre, aislamiento de ADN y determinación de polimorfismos genéticos. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del hospital. Los criterios de inclusión de los pacientes fueron: receptores de un primer injerto hepático, disponibilidad de la muestra adecuada y supervivencia superior a una semana después del trasplante. En función de estos criterios se consiguieron genotipar un total de 205 receptores de un primer injerto para el SNP de CD86 en la posición +1057 (G→A). Para los genes CD95 y CD95L se genotiparon 140 receptores para la posición CD95 -670 (A→G), 144 para CD95 -1377 (G→A), 139 para CD95L IVS2nt-124 (A→G) y 140 para CD95L IVS3nt169 (T→delT). Para el polimorfismo de citocinas se consiguieron genotipar 180 receptores para TNF- α (-308 G→A), IL-6 (-174 G→C), INF- γ (+874 T→A) e IL-10 (-1082 G→A, -819 C→T y -592 C→A) y 99 receptores para las posiciones TGF- β 1 (codón 10 T→C y codón 25 G→C).

El periodo de seguimiento máximo fue de diez años (media 7.5 ± 2.5 años). Del total de 205 pacientes estudiados, 13 recibieron una inmunosupresión inicial consistente en OKT3, metilprednisolona y azatioprina durante 14 días. El tratamiento de mantenimiento consistió en esteroides, azatioprina y ciclosporina A. Los 192 pacientes restantes recibieron terapia triple con ciclosporina A o tacrolimus, metilprednisolona y

azatioprina (4). Los episodios de rechazo agudo se trataron con altas dosis de metilprednisolona (bolus de 500 mg) durante 3-5 días.

2.2. Diagnóstico de rechazo agudo

En el diagnóstico de rechazo agudo (RA) se tuvieron en cuenta los criterios clínicos, histológicos y bioquímicos estándar (69,70). La bilirrubina y las enzimas aminotransferasas, fosfatasa alcalina y gammaglutamil transferasas fueron determinadas diariamente. Cuando los niveles de enzimas hepáticas aumentaron, se realizó una ecografía Doppler con el fin de excluir isquemia hepática debida a la oclusión de la arteria hepática o de la vena portal y para establecer la indicación para la realización de la biopsia hepática. El diagnóstico histológico de rechazo agudo celular se basó en la presencia de, al menos, dos de las siguientes características: presencia de un infiltrado celular mixto en los tractos portales, la infiltración y daño del epitelio biliar de los conductos biliares intrahepáticos, y la inflamación del endotelio venoso en los tractos portales (71). Otras causas de disfunción del injerto fueron excluidas. Rasgos histológicos sugestivos de hepatitis viral tales como cuerpos de inclusión por citomegalovirus (CMV), agregados de neutrófilos, inflamación lobulillar, punteados necróticos, cuerpos acidófilos o pérdida de células perivenulares estuvieron ausentes. Estos criterios fueron los mismos que se consideraron en nuestros estudios previos (72).

En este grupo de pacientes únicamente se consideraron aquellos que habían sufrido episodios de rechazo agudo temprano, desarrollado dentro de las 6 primeras semanas post-trasplante (N=202). Los receptores hepáticos se dividieron en dos grupos de acuerdo a la presencia (Grupo RA) o ausencia (Grupo NRA) de episodios de RA.

2.3. Diagnóstico de rechazo crónico

El diagnóstico de rechazo crónico (RC) se basó en la presencia de parámetros histológicos tales como la desaparición de conductos biliares interlobulillares con escasos infiltrados mononucleares, progresando hacia la aparición de tejido fibroso y tractos portales grandes y expandidos (73,74). En aquellos pacientes en los que el rechazo persistió, se aplicó una terapia de rescate basada en el uso de tacrolimus como inmunosupresor o bien se procedió a la realización de un re-trasplante.

Para este estudio, los pacientes fueron divididos en dos grupos en función de la presencia (Grupo RC) o ausencia (Grupo NRC) de rechazo crónico.

2.4. Recolección de muestras y extracción de ADN

Las muestras de sangre periférica se recolectaron

Tabla 1. Características de los pacientes sometidos a trasplante hepático

	Total (n=205)	NRA (n=136)	RA (n=69)	NRC (n=196)	RC (n=9)
Edad (media años \pm SD)	49 \pm 12	50 \pm 12	46\pm13*	49 \pm 12	45 \pm 19
Genero (m/f)	159/46	106/30	53/16	154/42	5/4
Tratamiento Inicial:					
CyA	175 (87.3%)	115	60	166	9
OKT3	13 (6.3%)	6	7	13	0
Tacrolimus	17 (8.3%)	15	2	17	0
Indicación de Trasplante:					
Cirrosis Alcohólica	65 (31.7%)	46	19	61	4
Cirrosis Alcohólica + (VHB o VHC)	22 (10.7%)	10	12*	22	0
Hepatitis crónica activa virus B o C	50 (24.4%)	37	13	50	0
Carcinoma	18 (8.8%)	14	4	15	3*
Amiloidosis	12 (5.9%)	8	4	12	0
Cirrosis Biliar Primaria	12 (5.9%)	7	5	12	0
Enfermedad de Wilson	6 (2.9%)	4	2	6	0
Colangitis Esclerosante Primaria	3 (1.5%)	2	1	0	0
Hepatitis Fulminante	3 (1.5%)	0	3*	2	1
Hepatitis Autoimmune	2 (1%)	1	1	1	1
Otras	12 (5.9%)	7	5	12	0

Las diferencias entre grupos en la indicación para el trasplante, tratamiento y género se calcularon con el test de χ^2 de Pearson y en la edad con el test U de Mann-Whitney. Abreviaturas: NRA, no rechazo agudo, RA, rechazo agudo, RC rechazo crónico, NRC, no rechazo crónico VHB, virus hepatitis B, VHC, virus hepatitis C. * p<0.05

en el periodo pre-trasplante usando tubos Vacutainer estériles (Becton-Dickinson, Mountain View CA, USA). El ADN genómico se obtuvo mediante un método basado en la digestión con proteinasa K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) tal como se ha descrito previamente (75).

2.5. Determinación del polimorfismo del gen CD86 en posición +1057

El análisis del polimorfismo en la posición +1057 de CD86 se realizó por secuenciación directa, tal como se describió previamente (12) con ligeras modificaciones. Brevemente, el exón 8 se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores (*primers*) Ex8/1 (5'-CATGGGAAGGCCAGGCAGAAATAAAGG-3') para la cadena con sentido y Ex8/2 (5'-AGAGAAGAATCTGATCTGGAGGAGGTATTG-3') para la cadena anti-sentido. El volumen de reacción se ajustó a 50 μ l con H₂O. La reacción de PCR se realizó en un termociclador PE 9600 (Perkin Elmer, Boston MA, USA) de la siguiente manera: 4 min. a 94°C, 25 ciclos compuestos de 94°C a 30 s, 60°C a 30 s, y 72°C durante 1 min., seguida de un paso de extensión final de 72°C durante 5 min. Los productos de la PCR se purificaron usando QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc, Valencia CA, USA) de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en ambas direcciones usando los cebadores Ex8/3 (5'-CTCCTCATTGCTGTTCCAATGGCAACC-3') y Ex8/4 (5'-

CATGAGCCATTAAGCTGGGCTTGGCCC-3').

Para la secuenciación se partió de 100 ng de ADN utilizando ABI-PRISM Dye Terminator Cycle Ready Reaction kit (Applied Biosystems) según las condiciones recomendadas. Las muestras secuenciadas se purificaron usando las columnas Centri-Sep (Princeton Separations Inc, Adelphia NJ, USA), se cargaron en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y se analizaron con el programa ABI PRISM Navigator. Los dos alelos, G o A en la posición +1057, se identificaron en función de los picos de fluorescencia detectados en dicha posición.

2.6. Determinación del polimorfismo en posiciones -670 y -1377 del gen CD95

El polimorfismo de CD95 en su posición -670 fue analizado mediante técnicas de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) con la enzima de restricción *Mva*I, tal como se describió previamente (33). Brevemente, se amplificó

una secuencia de 233 pb de la región promotora que incluía la posición polimórfica, utilizando los cebadores MvaIDir (5'-CTACCTAAGAGCTATCTACCGTTC-3') y MvaIRev (5'-GGCTGTCCATGTTGTGGCTGC-3'). Las muestras, una vez preparadas en un volumen final de 25 µL, se amplificaron en un termociclador PE 9600 según el siguiente protocolo: 6 min a 94°C, 30 ciclos compuestos de 30 s a 94°C, 30 s a 62°C, y 1 min a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C. La digestión del producto de PCR se realizó utilizando la enzima de restricción *MvaI* (MBI Fermentas, Canadá) en un volumen final de 25 µL e incubando la mezcla a 37°C durante 2 h. El producto de digestión se visualizó en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) al 3%. La presencia del alelo A da lugar a una banda de 233 pb mientras que el alelo G origina una banda de 189 pb.

El polimorfismo de CD95 en su posición -1377 se analizó utilizando técnicas de amplificación específica de cebadores (PCR-SSP, del inglés *PCR amplifications with Sequence-Specific Primers*), tal como se ha descrito previamente (35). Para ello se utilizaron dos cebadores que cubrían la región entre las posiciones -1399 a -1377 y que presentaban dos discrepancias (*mismatches*) en la posición 3' (F3, 5'-AGTGTGTGCACAAGGCTGGCAAG-3' y F4, 5'-AGTGTGTGCACAAGGCTGGCAAA-3'), junto con un cebador reverso común que cubre las posiciones -1006 a -1029 (F5, 5'-GAACCTGAATTTGGATGAAGTTCC-3'). El cebador F3 es específico para el alelo G en la posición -1377 y F4 es específico para el alelo A. Para analizar cada muestra se realizaron dos reacciones de PCR en tubos diferentes con los cebadores correspondientes. Las muestras, una vez preparadas, se amplificaron en un termociclador PE 9600 según el siguiente protocolo: 6 min a 94°C, 30 ciclos constituidos por 30 s a 94°C, 30 s a 62°C, y 1 min a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 2%. Los productos de amplificación presentaban un tamaño de 393 pb. Si la muestra era homocigota para el alelo G o A únicamente se observan amplificadas en los tubos de reacción con los cebadores específicos correspondientes. La presencia de productos de amplificación en ambos tubos de reacción indica que la muestra es heterocigota para la posición -1377.

2.7. Determinación del polimorfismo IVS2nt-124 y IVS3nt169 del gen CD95L

El polimorfismo de CD95L IVS2nt-124 se determinó generando un sitio de restricción para la enzima *FokI* por técnicas PCR-ACRS (del inglés *PCR-based Amplification-Created Restriction Site*), tal como se describió previamente (76). Para ello, se utilizó un

cebador directo (5140Dir, 5'-GCAGTTCAGACCTACATGAT-3') que contenía una discrepancia que generaba un nuevo punto de restricción artificial para la enzima *FokI* y un cebador reverso (5378Rev, 5'-CCAATTCTCACCTGTACCTTC-3'). Las muestras, una vez ajustadas a un volumen de 25 µL, se amplificaron en un termociclador PE 9600 según el siguiente protocolo: 6 min a 94°C, 30 ciclos compuestos de 30 s a 94°C, 30 s a 62°C, y 1 min a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C. La digestión del producto de amplificación se realizó utilizando la enzima *FokI* (Roche Diagnostics GMBH, Germany) en un volumen final de 25 µL. Los tubos se incubaron a 37°C durante 2 h. Los productos de digestión se visualizaron en un gel de agarosa al 3%. La presencia del alelo A daba lugar a una banda de 239 pb mientras que el alelo G originaba una banda de 210 pb.

De forma similar, el polimorfismo de CD95L IVS3nt169 se determinó amplificando la región de interés generando un lugar de restricción para la enzima *HincII*, tal como se describió previamente (76). Para ello, se utilizó un cebador directo (6247Dir, 5'-AGGAAAGGACTTCAAAGCCTA-3') y un cebador reverso (6231Rev, 5'-TTGATGCATCACAGAATTTTCGTC-3') que contenía una discrepancia que generaba un nuevo punto de restricción para la enzima *HincII*. La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 25 µL y se amplificó en un termociclador PE 9600 según el siguiente protocolo: 6 min a 94°C, 30 ciclos compuestos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, y 30 s a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C. El producto de amplificación se digirió utilizando la enzima *HincII* (MBI Fermentas, Canadá) en un volumen final de 25 µL. Los tubos se incubaron a 37°C durante 2 h. Los productos de digestión se visualizaron en un gel de agarosa al 3%. La presencia del alelo T daba lugar a una banda de 162 pb mientras que la presencia del alelo delT originaba una banda de 185 pb.

2.8. Determinación del polimorfismo de citocinas

La determinación de los polimorfismos de las citocinas TNF-α (-308 G/A), IL-6 (-174 G/C), INF-γ (+874 T/A), TGF-β1 (codón 10 T/C y codón 25 G/C) e IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A) se realizó con el kit comercial Cytokine Genotyping Tray (One Lambda, Inc. CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Este kit está basado en técnicas de PCR-SSP para la detección de las distintas posiciones polimórficas referenciadas. Las mezclas de reacción se ajustaron a un volumen de 10 µL y se amplificaron en un termociclador PE 9600 según el siguiente protocolo: un ciclo de 130 s a 96°C y 1 min a 63°C, 9

ciclos de 10 s a 96°C y 1 min a 63°C y finalmente 20 ciclos de 10 s a 96°C, 50 s a 59°C y 30 s a 72°C. Los amplificadores se visualizaron en un gel de agarosa al 2% y la interpretación de los resultados se realizó en función de los productos específicos amplificados y detectados mediante electroforesis.

2.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v10.0 software (SPSS Inc, Illinois, USA). Las diferencias en género, tratamiento inmunosupresor, patología de base, y distribución genotípica de los diferentes polimorfismos estudiados entre los grupos considerados se realizó mediante el test de χ^2 de Pearson. Las diferencias entre los grupos en la edad de los receptores hepáticos se analizó con el test U de Mann-Whitney. La asociación de cada genotipo, alelo o haplotipo con la incidencia de rechazo agudo o crónico se analizó con el test de χ^2 de Pearson y el test exacto de Fisher. La distribución haplotípica de las posiciones polimórficas de cada gen estudiado y el test de equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó con el programa Arlequin (Universidad de Ginebra, Suiza, <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>). Las Odds Ratios (OR) y el intervalo de confianza del 95% (IC) se calcularon para estimar el riesgo relativo de cada genotipo, alelo o haplotipo para cada uno de los factores estudiados (supervivencia del injerto, rechazo agudo y crónico). Cuando un alelo, genotipo o haplotipo estaba ausente en alguno de los grupos de estudio, la OR se calculó añadiendo 0.5 a cada valor. La supervivencia acumulada del injerto se calculó mediante el análisis de tablas de vida de Kaplan Meier, y la significación estadística de las diferencias entre las curvas de supervivencia de los grupos se evaluó mediante el test log-rank. El test multivariante de regresión logística se usó para ajustar un modelo que permitiera predecir la asociación de cada uno de los polimorfismos alélicos estudiados y otros factores pronóstico con los episodios de rechazo agudo y crónico. El análisis multifactorial de Cox se realizó para investigar el impacto de cada uno de los polimorfismos genéticos estudiados y otros factores pronóstico en la supervivencia de injerto hepático. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Características de los pacientes

Las características del grupo total de trasplantados hepáticos se muestran en la Tabla 1. Las frecuencias genotípicas de los diferentes polimorfismos analizados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, dentro de la población de receptores hepáticos. La incidencia de RA alcanzó el 33.7%. El 95.5% de los

episodios de RA tuvieron lugar dentro de las primeras seis semanas post-trasplante (media 14.3±8.8 días); únicamente 3 pacientes desarrollaron episodios de RA después de este periodo. La incidencia de RC en el grupo estudiado fue del 4.3% y la supervivencia después de un periodo de seguimiento de 10 años fue del 55.9%, con un tiempo de supervivencia medio de 6.4 años (95% IC=5.8-7.1 años). La principal indicación para el trasplante hepático fue la cirrosis alcohólica (31.7%), hepatitis crónica de origen viral (24.4%) o ambas (10.7%) que reunidas alcanzaban el 66.8% de las indicaciones para el trasplante hepático. Como se puede observar, la edad media de los receptores era de 49±12 años, siendo la mayoría de ellos (77.6%) varones.

3.2. Rechazo agudo y polimorfismos genéticos

El análisis global de las diferentes características de los pacientes y su asociación con la aparición de RA reveló (Tabla 1) que la edad de los pacientes que habían sufrido de episodios de RA era significativamente inferior a la de los pacientes del grupo NRA (46±13 vs 50±12 años, $p=0.032$). Asimismo, se observó que la proporción de pacientes cuya indicación para el trasplante fue de cirrosis alcohólica y hepatitis crónica por VHB o VHC (17% vs 7%, $p=0.033$), así como los pacientes con hepatitis fulminante (4% vs 0%, $p=0.037$) era significativamente superior en el grupo de RA.

Los resultados de los distintos polimorfismos de CD86, CD95, CD95L y citocinas Th1 y Th2 se estudiaron en los grupos de RA y NRA, a fin de determinar si podían influir positiva o negativamente en la mayor o menor alorreactividad y por tanto, en la aparición de rechazo.

3.2.1. Polimorfismo de CD86 +1057 y rechazo agudo

El análisis del efecto del polimorfismo CD86 +1057 (G/A) en la incidencia de rechazo agudo (Tabla 2) reveló la existencia de diferencias significativas en la distribución de frecuencias genotípicas entre ambos grupos (RA vs NRA) ($p=0.034$). En un análisis más detallado se observó la ausencia del genotipo AA en el grupo RA, mientras que en el grupo NRA se presentaba en un 8.8% de los pacientes (12/136). El estudio comparativo de la presencia del genotipo AA frente al resto de genotipos, demostró la existencia de diferencias altamente significativas ($p=0.009$, OR=0.07, 95% IC=0.004-1.23) entre los grupos RA y NRA, indicando un efecto protector del genotipo AA frente a la aparición de RA.

El análisis de la distribución de frecuencias alélicas de CD86 +1057 en ambos grupos (Tabla 2), también mostró diferencias significativas entre ellos ($p=0.046$,

OR=0.06, 95% IC=0.342-1.975), así, el alelo A se encontraba con una frecuencia mayor (25.7%) en el grupo NRA que en el grupo RA (16.7%), indicando que la presencia del alelo A en los receptores hepáticos puede favorecer la aceptación del injerto.

3.2.2. Polimorfismo de CD95 y rechazo agudo

La distribución genotípica y alélica de los polimorfismos de CD95 en las posiciones -670 y -1377 se resumen en la Tabla 2. Como se puede observar, el análisis univariante revela la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y alélica del polimorfismo de CD95 -670 entre los grupos RA y NRA. Resultados similares se observaron cuando se analizó el polimorfismo de CD95 -1377. Por tanto, en estos análisis no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos. Estos datos indicarían que los polimorfismos en las posiciones -670 y -1377 del gen de CD95 no parecen ejercer un papel significativo en la incidencia de RA.

Asimismo, con el fin de determinar si la combinación de genotipos o los haplotipos extendidos para ambas posiciones podían ejercer un efecto en la incidencia de episodios de RA, se compararon las frecuencias de los genotipos combinados y haplotipos en la población de pacientes RA y NRA (Tabla 2), no detectándose diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0.917$). No obstante, cabe señalar que el haplotipo AA estaba ausente en el grupo NRA, mientras que su frecuencia en el grupo RA era del 3.6%, si bien estas diferencias no alcanzaban la significación estadística ($p=0.070$).

3.2.3. Polimorfismo de CD95L y rechazo agudo

En la Tabla 2 se resume el análisis comparativo de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos CD95L IVS2nt-124 e ISV3nt169 en función de la incidencia de RA; como se puede observar estos polimorfismos no parecen influir en el desarrollo de RA en los receptores hepáticos. Asimismo, el estudio de genotipos combinados y frecuencias haplotípicas tampoco mostró diferencias significativas entre el grupo NRA y RA (Tabla 2). Además, se observó que algunas combinaciones genotípicas estaban ausentes, principalmente debido a la falta del haplotipo G/delT en ambos grupos de pacientes.

3.2.4. Polimorfismo de citocinas y rechazo agudo

En el análisis comparativo entre los grupos RA y NRA de las frecuencias genotípicas, alélicas y el fenotipo secretor de los polimorfismos de TNF- α -308, IL-6 -174 e INF- γ +874 (Tabla 3) demostró que estas posiciones polimórficas tampoco parecen influir en la

mayor o menor aparición de RA en los receptores de un primer injerto hepático.

El efecto del polimorfismo de IL-10 en la incidencia de RA se analizó de forma individual para cada una de las tres posiciones polimórficas de la región promotora (-1082, -819 y -592), tanto a nivel genotípico como de frecuencias alélicas (Tabla 4). Los resultados no revelaron la existencia de diferencias significativas entre los grupos de receptores con episodios de RA y aquellos que no sufrieron RA. Similares resultados se observaron cuando se analizó el efecto del genotipo combinado, considerando las tres posiciones polimórficas, los haplotipos extendidos y el fenotipo secretor, en la aparición de episodios de RA (Tabla 4).

Finalmente, el análisis del polimorfismo de TGF- β 1 en sus dos posiciones (codón 10 y codón 25) en la incidencia de rechazo agudo se resumen en la Tabla 4. Los datos indican que ninguna de las dos posiciones polimórficas analizadas de forma individual parece afectar a la incidencia de rechazo agudo en los receptores de un primer injerto hepático. Asimismo, cuando se analizó el efecto del genotipo combinado, el fenotipo secretor y los haplotipos combinados en ambas posiciones (Tabla 4), se observó que el genotipo combinado, tampoco se asociaba significativamente con la aparición de rechazo agudo, si bien el genotipo T/T G/C estaba ausente en el grupo de pacientes que presentaron episodios de RA, mientras que se observó en el 13% (9/69) de los receptores del grupo NRA con unos valores próximos a la significación ($p=0.056$). Cuando estudiamos el efecto de los haplotipos extendidos para las dos posiciones, también se detectó la ausencia del haplotipo TC en el grupo de pacientes RA, mientras que en la población con buena aceptación del injerto este haplotipo representó el 10.5% del total de haplotipos (14/138), siendo estas diferencias significativas ($p=0.012$), lo que parece indicar que este haplotipo ejercería un efecto protector frente al RA. Sin embargo, al analizar el efecto del fenotipo secretor no se observaron diferencias significativas.

3.2.5. Análisis multivariante en rechazo agudo

Realizamos un análisis multivariante de regresión logística con el fin de establecer un modelo estadístico que permitiera predecir la aparición de episodios de RA, incluyendo entre otras, las variables que habían resultado significativamente asociadas con RA en el análisis univariante; respectivamente el genotipo CD86 +1057, la presencia del haplotipo TC de TGF- β 1 (codón 10 y 25), año del trasplante, edad, sexo, patología de base y tratamiento inmunosupresor. Nuestros datos revelaron que los pacientes con indicación para el trasplante debida a hepatitis

Tabla 2. Frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos de CD86 (+1057), CD95 (-670 y -1377) y CD95L (IVS2nt-124 y IVS3nt169) en los grupos de receptores NRA, RA, NRC y RC.

Gen	Frecuencias Genotípicas					Frecuencias Alélicas y Haplotípicas					
	NRA n (%)	RA n (%)	NRC n (%)	RC n (%)	p	NRA n (%)	RA n (%)	NRC n (%)	RC n (%)	p	
CD86 +1057	G/G	78 (57.4)	46 (66.7)	119 (60.7)	5 (55.6)	0.633	G	202 (74.3)	303 (72.3)	14 (77.8)	I
	G/A	46 (33.8)	23 (33.3)	65 (32.2)	4 (44.4)		A	70 (25.7)	89 (22.7)	4 (22.2)	
	A/A	12 (8.8)	0 (0)	12 (6.1)	0 (0)	0.009*					
CD95 -670-1377	G/G	13 (14.4)	9 (19.6)	21 (16.3)	1 (14.3)	0.892	G-G	70 (38.9)	101 (39.1)	7 (50.0)	0.775
	G/G G/A	8 (8.9)	3 (6.5)	10 (7.8)	1 (14.3)		G-A	19 (10.6)	24 (9.3)	1 (7.1)	
	G/G A/A	2 (2.2)	0 (0)	2 (1.6)	0 (0)		A-G	91 (50.6)	130 (50.4)	6 (42.9)	
	G/A G/G	36 (40.0)	16 (34.8)	48 (30.2)	4 (57.1)		A-A	0 (0)	3 (1.1)	0 (0)	
	G/A G/A	7 (7.8)	4 (8.7)	11 (8.5)	0 (0)						
	G/A A/A	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
CD95 -670	A/A G/G	24 (26.7)	12 (26.1)	35 (23.1)	1 (14.3)						
	A/A G/A	0 (0)	2 (4.3)	2 (0)	0 (0)						
	A/A A/A	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
CD95 -1377	A/A	26 (27.7)	14 (30.4)	39 (29.3)	1 (14.3)	0.689	A	97 (51.6)	48 (52.2)	6 (48.9)	0.588
	A/G	45 (47.9)	20 (43.5)	61 (45.9)	4 (57.1)		G	91 (48.4)	127 (47.7)	8 (57.1)	
	G/G	23 (24.5)	12 (26.1)	33 (24.8)	2 (28.6)						
CD95L	G/G	78 (81.3)	39 (81.3)	111 (81.0)	6 (85.7)	0.923	G	172 (89.6)	87 (90.6)	13 (92.9)	I
	G/A	16 (16.7)	9 (18.8)	24 (17.5)	1 (14.3)		A	20 (10.4)	9 (9.4)	1 (7.1)	
	A/A	2 (2.1)	0 (0)	2 (1.5)	0 (0)						
IVS2nt-124	A/A T/T	48 (53.3)	22 (45.8)	66 (50.4)	4 (57.1)	0.874	A-T	133 (73.9)	65 (67.8)	11 (78.6)	0.707
	A/A T/delT	18 (20.0)	12 (25.0)	29 (22.1)	1 (14.3)		A-delT	24 (13.3)	17 (17.7)	1 (7.1)	
	A/A delT/delT	1 (1.1)	1 (2.1)	2 (1.5)	0 (0)		G-T	23 (12.8)	14 (14.6)	2 (14.3)	
	A/G T/T	19 (21.1)	9 (18.8)	26 (19.8)	2 (28.6)		G-delT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	A/G T/delT	4 (4.4)	3 (6.3)	7 (5.3)	0 (0)						
	A/G delT/delT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
IVS3nt169	G/G T/T	0 (0)	1 (2.1)	1 (0.8)	0 (0)						
	G/G T/delT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	G/G delT/delT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	G/G T/delT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	G/G delT/delT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
	A/A	68 (74.7)	35 (72.9)	98 (74.2)	5 (71.4)	I	A	159 (87.4)	82 (85.4)	12 (85.7)	I
A/G	23 (25.3)	12 (25.0)	33 (25.0)	2 (28.6)		G	23 (12.6)	14 (14.6)	2 (14.3)		
G/G	0 (0)	1 (2.1)	1 (0.8)	0 (0)							
CD95L IVS2nt169	T/T	68 (73.9)	32 (66.7)	94 (70.7)	6 (85.7)	0.673	T	159 (86.4)	79 (82.3)	13 (92.9)	0.702
	T/delT	23 (25.0)	15 (31.3)	37 (27.8)	1 (14.3)		delT	25 (13.6)	17 (17.7)	1 (7.1)	
	delT/delT	1 (1.1)	1 (2.1)	2 (1.5)	0 (0)						

Las diferencias genotípicas y haplotípicas entre grupos se calcularon con el test χ^2 de Pearson. * La asociación de cada genotipo, haplotipo o alelo con rechazo agudo o crónico se analizó con el test exacto de Fisher. Abreviaturas: NRA, no rechazo agudo, RA, rechazo agudo, RC rechazo crónico, NRC, no rechazo crónico.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas, alélicas y fenotipo secretor de los polimorfismos de TNF- α (-308), IL-6 (-174) e INF- γ (+874) en los grupos de receptores NRA, RA, NRC y RC.

Gen		Frecuencias Genotípicas, Alélicas y Fenotípicas					
		NRA n (%)	RA n (%)	p	NRC n (%)	RC n (%)	p
TNF- α -308	G/G	91 (75.8)	38 (66.7)	0.427	125 (73.1)	7 (77.8)	0.899
	G/A	27 (22.5)	18 (31.6)		43 (25.1)	2 (22.2)	
	A/A	2 (1.7)	1 (1.8)		3 (1.8)	0 (0)	
Alelos	G	209 (87.1)	94 (82.5)	0.26	293 (85.7)	16 (88.9)	1
	A	31 (12.9)	20 (17.5)		49 (14.3)	2 (11.1)	
Fen. Secretor	Bajo	91 (75.8)	38 (66.7)	0.21	125 (73.1)	7 (77.8)	1
	Alto	29 (24.2)	19 (33.3)		46 (26.9)	2 (22.2)	
IL-6 -174	G/G	58 (48.3)	25 (43.9)	0.850	79 (46.2)	6 (66.7)	0.426
	G/C	51 (42.5)	26 (45.6)		75 (43.9)	2 (22.2)	
	C/C	11 (9.2)	6 (10.5)		17 (9.9)	1 (11.1)	
Alelos	G	167 (69.6)	76 (66.7)	0.624	233 (68.1)	14 (77.8)	0.449
	C	73 (30.4)	38 (33.3)		109 (31.9)	4 (22.2)	
Fen. Secretor	Bajo	109 (90.8)	51 (89.5)	0.789	154 (90.1)	8 (88.9)	1
	Alto	11 (9.2)	6 (10.5)		17 (9.9)	1 (11.1)	
INF- γ +874	T/T	31 (25.6)	16 (28.1)	0.485	46 (26.7)	2 (22.2)	0.715
	T/A	70 (57.9)	28 (49.1)		92 (53.5)	6 (66.7)	
	A/A	20 (16.5)	13 (22.8)		34 (19.8)	1 (11.1)	
Alelos	T	132 (54.5)	60 (52.6)	0.82	184 (53.5)	10 (55.6)	1
	A	110 (45.5)	54 (47.4)		160 (46.5)	8 (44.4)	
Fen. Secretor	Bajo	31 (25.6)	16 (28.1)	0.485	46 (26.7)	2 (22.2)	0.715
	Intermedio	70 (57.9)	28 (49.1)		92 (53.5)	6 (66.7)	
	Alto	20 (16.5)	13 (22.8)		34 (19.8)	1 (11.1)	

Las diferencias genotípicas y fenotípicas entre grupos se calcularon con el test χ^2 de Pearson. La asociación de cada alelo con rechazo agudo o crónico se analizó con el test exacto de Fisher. Abreviaturas: NRA, no rechazo agudo, RA, rechazo agudo, RC rechazo crónico, NRC, no rechazo crónico, Fen, fenotipo.

fulminante o cirrosis alcohólica con presencia de VHB o VHC mostraban una asociación independiente con la aparición de RA ($p=0.03$, $OR=9.0$, $IC\ 95\%=2.1-38.3$). Por otro lado, cada incremento de 10 años en la edad del receptor en el momento del trasplante tenía un efecto protector en la aparición de RA ($p=0.052$, $OR=0.7$, $IC\ 95\%=0.4-1.0$). La presencia del haplotipo TC en TGF- $\beta 1$ (codón 10 y 25) mostró un efecto protector en la aparición de RA, si bien estos resultados fueron próximos a la significación estadística ($p=0.087$, $OR=0.3$, $IC\ 95\%=0.1-1.2$). Por el contrario, el genotipo CD86 +1057 ($p=0.661$), no se asociaba de manera independiente con la aparición de RA.

3.3. Rechazo crónico y polimorfismos

El estudio de las características de los pacientes en función de la incidencia de RC (Tabla 1) no mostró diferencias con respecto al género, edad y tratamiento inmunosupresor entre los pacientes que desarrollaron o no RC. Tan solo se observó que los pacientes cuya indicación para el trasplante fue carcinoma presentaban una incidencia de RC significativamente

superior que el resto de pacientes (16% vs 3% $p=0.034$).

3.3.1. Polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L y rechazo crónico

El análisis de frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los polimorfismos en las posiciones +1057 de CD86, -670 y -1377 de CD95 y ISV2nt-124 e ISV3nt169 de CD95L entre los grupos NRC y RC se muestran en la Tabla 2. Nuestros resultados no pudieron demostrar la implicación de ninguno de ellos en la mayor o menor incidencia de rechazo crónico. No obstante, cabe destacar que el genotipo AA en la posición +1057 de CD86 no se encuentra presente en la población de RC, mientras que dentro de la población NRC constituye el 6.1% (12/196), si bien, debido al bajo número de casos de rechazo crónico las diferencias no son significativas, no pudiéndose afirmar que dicho fenotipo tenga algún efecto en la incidencia de rechazo crónico.

3.3.2. Polimorfismo de citocinas y rechazo crónico

Al igual que para el caso del rechazo agudo, se

Tabla 4. Frecuencias genotípicas, haplotípicas, alélicas y fenotipo secretor de los polimorfismos de IL-10 (-1082, -819 y -592) y TGF-β1 (Codón 10 y Codón 25) en los grupos de receptores NRA, RA, NRC y RC.

Gen	Frecuencias Genotípicas y Fenotipo Secretor						Frecuencias Alélicas y Haplotípicas					
	NRA n (%)	RA n (%)	p	NRC n (%)	RC n (%)	P	NRA n (%)	RA n (%)	P	NRC n (%)	RC n (%)	P
IL-10	GCC/GCC	22 (18.3)	12 (21.1)	0.976	34 (19.9)	1 (11.1)	GCC	105 (43.8)	0.888	53 (46.5)	3 (33.3)	0.81
	GCC/ACC	34 (28.3)	15 (26.3)		45 (26.3)	4 (44.4)	ATA	67 (27.9)		30 (26.3)	5 (55.6)	
	GCC/ATA	27 (22.5)	14 (24.6)		41 (24.0)	1 (11.1)	ACC	68 (28.3)		31 (27.2)	1 (11.1)	
	ACC/ACC	7 (5.8)	3 (5.3)		11 (6.4)	0 (0)						
	ACC/ATA	20 (16.7)	10 (17.5)		28 (16.4)	2 (22.2)						
ATA/ATA	10 (8.3)	3 (5.3)		12 (7.0)	1 (11.1)							
IL-10-1082	G/G	22 (18.3)	12 (21.1)	0.884	34 (19.9)	1 (11.1)	G	105 (43.8)	0.648	53 (46.5)	7 (38.9)	0.637
	G/A	61 (50.8)	29 (50.9)		86 (50.3)	5 (55.6)	A	135 (56.2)		61 (53.5)	11 (61.1)	
	A/A	37 (30.8)	16 (28.1)		51 (29.8)	3 (33.3)						
IL-10-819	C/C	63 (52.5)	30 (52.6)	0.749	90 (52.6)	5 (55.6)	C	173 (72.1)	0.853	84 (73.7)	13 (72.2)	1
	C/T	47 (39.2)	24 (42.1)		69 (40.4)	3 (33.3)	T	67 (27.9)		30 (26.3)	5 (27.8)	
	T/T	10 (8.3)	3 (5.3)		12 (7.0)	1 (11.1)						
IL-10-592	C/C	63 (52.5)	30 (52.6)	0.749	90 (52.6)	5 (55.6)	C	173 (72.1)	0.853	84 (73.7)	13 (72.2)	1
	C/A	47 (39.2)	24 (42.1)		69 (40.4)	3 (33.3)	A	67 (27.9)		30 (26.3)	5 (27.8)	
	A/A	10 (8.3)	3 (5.3)		12 (7.0)	1 (11.1)						
Fen. Secretor	Bajo	37 (30.8)	16 (28.1)	0.884	51 (29.8)	3 (33.3)			0.81			
	Intermedio	61 (50.8)	29 (50.9)		86 (50.3)	5 (55.6)						
	Alto	22 (18.3)	12 (21.1)		34 (19.9)	1 (11.1)						
TGF-β1	T/T G/G	23 (33.3)	10 (35.7)	0.420			TG	82 (59.1)	0.098	36 (64.3)		
	T/T G/C	9 (13.0)	0 (0)	0.056*			TC	14 (10.5)	0 (0)	0 (0)	0.012*	
	T/T C/C	1 (1.5)	0 (0)				CG	33 (24.3)		15 (26.8)		
	T/C G/G	23 (33.3)	13 (46.4)				CC	9 (6.2)		5 (8.9)		
	T/C G/C	6 (8.7)	3 (10.7)									
Codón 10	T/C C/C	1 (1.5)	0 (0)									
	C/C G/G	3 (4.4)	1 (3.6)									
	C/C G/C	2 (3.0)	0 (0)									
C/C C/C	1 (1.5)	1 (3.6)										
Codón 25	T/T	33 (47.8)	10 (35.7)	0.472			T	96 (69.6)	0.5	36 (64.3)		
	T/C	30 (43.5)	16 (57.1)				C	42 (30.4)		20 (35.7)		
	C/C	6 (8.7)	2 (7.1)									
Fen. Secretor	Bajo	49 (71.0)	24 (85.7)	0.29			G	115 (83.3)	0.185	51 (91.1)		
	Intermedio	17 (24.6)	3 (10.7)				C	23 (17.7)		5 (8.9)		
	Alto	3 (4.3)	1 (3.6)									
Fen. Secretor	Bajo	5 (7.2)	1 (3.6)	0.312								
	Intermedio	18 (26.1)	4 (14.3)									
	Alto	46 (66.7)	23 (82.1)									

Las diferencias genotípicas, haplotípicas y fenotípicas entre grupos se calcularon con el test χ^2 de Pearson. * La asociación de cada genotipo, fenotipo, haplotipo o alelo con rechazo agudo o crónico se analizó con el test exacto de Fisher. Abreviaturas: NRA, no rechazo agudo, RA, rechazo agudo, RC rechazo crónico, NRC, no rechazo crónico, Fen, Fenotipo.

realizó un estudio comparativo entre los grupos RC y NRC de las frecuencias genotípicas, alélicas, haplotípicas y el fenotipo secretor de los polimorfismos TNF- α -308, IL-6 -174, INF- γ +874 (Tabla 3) y de IL-10 en las posiciones -1082, -819 y -592 (Tabla 4), no observándose diferencias significativas entre ambos grupos.

El papel de los polimorfismos de TGF- β 1 en la aparición de RC no se analizó debido a que solo se detectaron dos casos de RC en el grupo de estudio (2/99).

3.4. Polimorfismos y supervivencia del injerto

El análisis univariante del efecto de la edad, sexo, indicación para el trasplante, tratamiento inmunosupresor y la presencia de episodios de RA y RC en la supervivencia del injerto reveló que los pacientes con indicación para el trasplante de CBP y enfermedad de Wilson presentaban una mejor supervivencia del injerto que el resto de patologías de base (TMS=9.9 años, S=91.7%, $p=0.018$) y (TMS=10 años, S=85.7%, $p=0.087$) respectivamente; si bien esta última no alcanzó significación estadística. Más aún, si agrupamos las enfermedades de base autoinmune, tales como la CBP y la colangitis esclerosante, se observaba que estos pacientes presentaban una mejor supervivencia del injerto (TMS=9.9 años, S=88.9%, $p=0.007$). También se observó que los pacientes de sexo masculino presentaban una peor supervivencia del injerto que las mujeres, si bien estas diferencias no alcanzaban la significación estadística (TMS=6 años, S=51.5% vs TMS=7.8 años S=70.8%, $p=0.06$). Este resultado se podría explicar debido a que la frecuencia de las patologías autoinmunes es superior en las mujeres que en los hombres (27.1% vs 3.1%).

3.4.1. Polimorfismo CD86 +1057 y supervivencia del injerto

El análisis del efecto del genotipo CD86 +1057 en la supervivencia del injerto, reveló que los receptores que presentaban el genotipo AA (Fig. 1a) tenían un mayor grado de supervivencia después de 10 años de seguimiento (83.3%) que aquellos con el genotipo GG (56.5%) o GA (49.3%). Además, el tiempo medio de supervivencia del injerto en los pacientes con genotipo AA fue de 9 años (95% IC=6.8-11.2 años), mientras que para los del genotipo GG fue de 6.5 años (95% IC=5.6-7.4 años) y para los del genotipo GA fue de 5.8 años (95% IC=4.7-7.0 años). Estas diferencias en la supervivencia del injerto alcanzaron diferencias significativas cuando se compararon los genotipos AA y GA ($p=0.048$), mientras que las diferencias entre el genotipo AA y GG no alcanzaron la significación estadística ($p=0.080$).

3.4.2. Polimorfismo de CD95 y supervivencia del injerto

En el estudio de la supervivencia del injerto en función del genotipo CD95 -670, se observó que los receptores con el genotipo AA (Fig. 1b) mostraban una supervivencia (S=40%) y un tiempo medio de supervivencia del injerto (TMS=4.72 años) a los 10 años de seguimiento, significativamente inferior ($p=0.011$), que los pacientes que presentaba el genotipo GA (S=63.1%, TMS=6.82 años). Estas diferencias entre los genotipos AA y GA ya se manifestaban en el primer año de seguimiento (S=67.5% vs 84.6%, TMS= 9.5 vs 10.9 meses, $p=0.034$), viéndose incrementadas a lo largo del periodo de estudio. Los valores de supervivencia del genotipo AA también fueron inferiores a los del grupo de receptores con genotipo GG (S=54.3%, TMS=6.05 años), si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.227$). Asimismo, estas diferencias seguían siendo significativas ($p=0.018$) cuando comparamos la supervivencia de los pacientes con genotipo AA y los que no tenían este genotipo (S=60% TMS=6.6 años), indicando un posible efecto negativo del genotipo AA en la supervivencia del injerto. Por el contrario, la posición -1377 no parece tener ningún efecto en la supervivencia a largo plazo del injerto hepático (Fig. 1c).

El estudio del efecto combinado de los genotipos y el análisis de haplotipos deducidos no mostró diferencias significativas en la supervivencia del injerto (Tabla 5).

3.4.3. Polimorfismo de CD95L y supervivencia del injerto

Igualmente, se estudio el efecto del polimorfismo de CD95L en la supervivencia del injerto. El estudio univariante para cada uno de los genotipos de las posiciones IVS2nt-124 (Fig. 1d) e IVS3nt169 (Fig. 1e) del CD95L no reveló diferencias significativas. El estudio del efecto combinado de los genotipos y el análisis de haplotipos deducidos tampoco mostró diferencias significativas entre los pacientes que habían perdido el injerto y los que no (Tabla 5).

3.4.4. Polimorfismos de citocinas y supervivencia del injerto

El estudio del efecto del genotipo y el fenotipo secretor de los polimorfismos de TNF- α -308 (Fig. 2a y 2b) e INF- γ +874 (Fig 2c) parece indicar que estos factores no afectan a la supervivencia del injerto. Similares resultados se observaron cuando se analizaron los polimorfismos de TGF- β 1, tanto de forma individual (Fig 2d y 2e), como considerando los genotipos combinados y los haplotipos extendidos

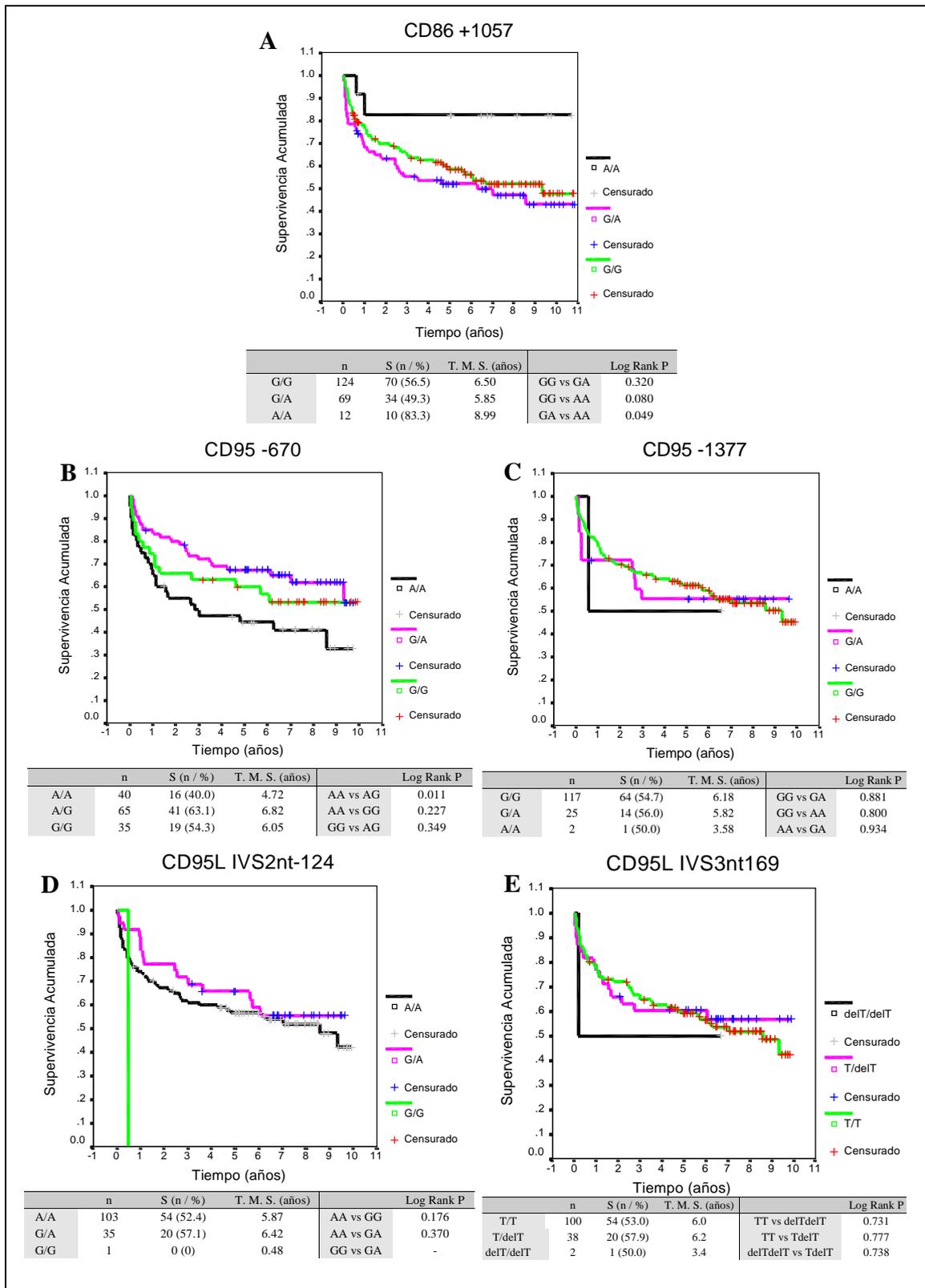


Fig. 1. Supervivencia acumulada del injerto en función del genotipo: A) CD86 +1057, B) CD95 -670, C) CD95 -1377, D) CD95L IVS2nt-124 y E) CD95L IVS3nt169.

Tabla 5. Análisis de genotipos combinados y haplotipos para las posiciones -670 y -1377 de CD95 y ISV2nt-124 e ISV3nt169 de CD95L, en función de la supervivencia del injerto hepático tras 10 años de seguimiento.

Gen	Frecuencias Genotípicas				Frecuencias Haplotípicas			
	Perdida del Injerto			p	Perdida del Injerto			p
	No	Si			No	Si		
n (%)	n (%)		n (%)	n (%)				
CD95	G/G G/G	12 (16.2)	10 (16.1)	0.574	G-G	105 (70.9)	93 (72.7)	0.655
-670 -1377	G/G G/A	6 (8.1)	5 (8.1)		G-A	23 (15.5)	18 (14.1)	
	G/G A/A	1 (1.4)	1 (1.6)		A-G	20 (13.5)	17 (13.3)	
	G/A G/G	32 (43.2)	20 (32.3)		A-A	0 (0)	0 (0)	
	G/A G/A	7 (9.5)	4 (6.5)					
	G/A A/A	0 (0)	0 (0)					
	A/A G/G	15 (20.3)	21 (33.9)					
	A/A G/A	1 (1.4)	1 (1.6)					
	A/A A/A	0 (0)	0 (0)					
CD95L	A/A T/T	36 (48.6)	34 (53.1)	0.392	A-T	105 (70.9)	93 (72.7)	0.936
IVS2nt-124	A/A T/delT	17 (23.0)	13 (20.3)		A-delT	23 (15.5)	18 (14.1)	
IVS3nt169	A/A delT/delT	1 (1.4)	1 (1.6)		G-T	20 (13.5)	17 (13.3)	
	A/G T/T	16 (21.6)	12 (18.8)		G-delT	0 (0)	0 (0)	
	A/G T/delT	4 (5.4)	3 (4.7)					
	A/G delT/delT	0 (0)	0 (0)					
	G/G T/T	0 (0)	1 (1.6)					
	G/G T/delT	0 (0)	0 (0)					
	G/G delT/delT	0 (0)	0 (0)					

Las diferencias genotípicas y de frecuencias haplotípicas entre grupos se calcularon con el test χ^2 de Pearson.

para las dos posiciones (Tabla 6), así como el fenotipo secretor (Fig. 2f).

Cuando se analizó el efecto del polimorfismo de IL-6 -174 en la supervivencia de un primer injerto hepático (Fig. 3a), se observó que el genotipo GC presentaba una supervivencia (52.0%) y un tiempo medio de supervivencia (5.54 años) inferiores al genotipo GG (S=62.4%, TMS=6.81 años) con unos valores próximos a la significación estadística (p=0.060). No obstante, cuando analizamos la supervivencia en función del genotipo, estratificada en años, observamos que desde el primer año, las diferencias entre el genotipo GC y GG (S= 68.8% v 81.2%, TMS= 6.3 v 10.7 meses, respectivamente) eran significativas (p=0.043) y se mantenían a lo largo de los 9 primeros años de seguimiento, decayendo en el último año. Conviene mencionar el comportamiento de la curva de supervivencia acumulada para los receptores con genotipo CC que durante los tres primeros años presenta un comportamiento semejante a los receptores con genotipo GG, pero a partir del cuarto año decae el índice de supervivencia presentando unos valores semejantes a los del grupo GC. No obstante, si consideramos la presencia del alelo C (GC + CC) observamos un comportamiento semejante al observado al considerar el genotipo GC vs GG, si bien las diferencias significativas se empiezan a detectar a partir del segundo año post-trasplante (p=0.047). Sin embargo, en el análisis del fenotipo secretor de IL-6 y su efecto en la

supervivencia del injerto no se observaron diferencias significativas entre los grupos alto y bajo secretor (Fig. 3b).

El efecto individual del polimorfismo en las posiciones -1082, -819 y -592 de IL-10 en la supervivencia del injerto se muestra en las Figuras 4a, 4b y 4c, respectivamente. Pese a que este análisis no mostró diferencias significativas para los distintos genotipos, se observó que los pacientes con el genotipo A/A en la posición -1082, T/T en la posición -819 y A/A en la posición -592, presentan un menor índice de supervivencia (S=43.6%, S=38.5% y S=38.5%, respectivamente) y un menor tiempo medio de supervivencia (TMS=5.3, TMS=4.0 y TMS=4.0 años, respectivamente) que el resto de genotipos. Sin embargo, el análisis de los genotipos combinados para las tres posiciones polimórficas en función de la pérdida del injerto (Tabla 6) reveló que el genotipo GCC/ATA se presentaba con una frecuencia superior en los individuos que no habían sufrido pérdida del injerto siendo estas diferencias significativas (29.4% vs 15.4%, p=0.033, OR=0.4) cuando se comparaban con resto de genotipos. Estos datos parecen indicar un efecto protector de dicho genotipo frente a la pérdida del injerto. Estos datos se confirmaron con el análisis de supervivencia acumulada del injerto hepático en función de la presencia del genotipo GCC/ATA en el receptor (Fig. 4d), demostrándose que éstos receptores presentan un mayor índice de supervivencia del injerto (S=71.4% v 52.2%) y un mayor tiempo medio de

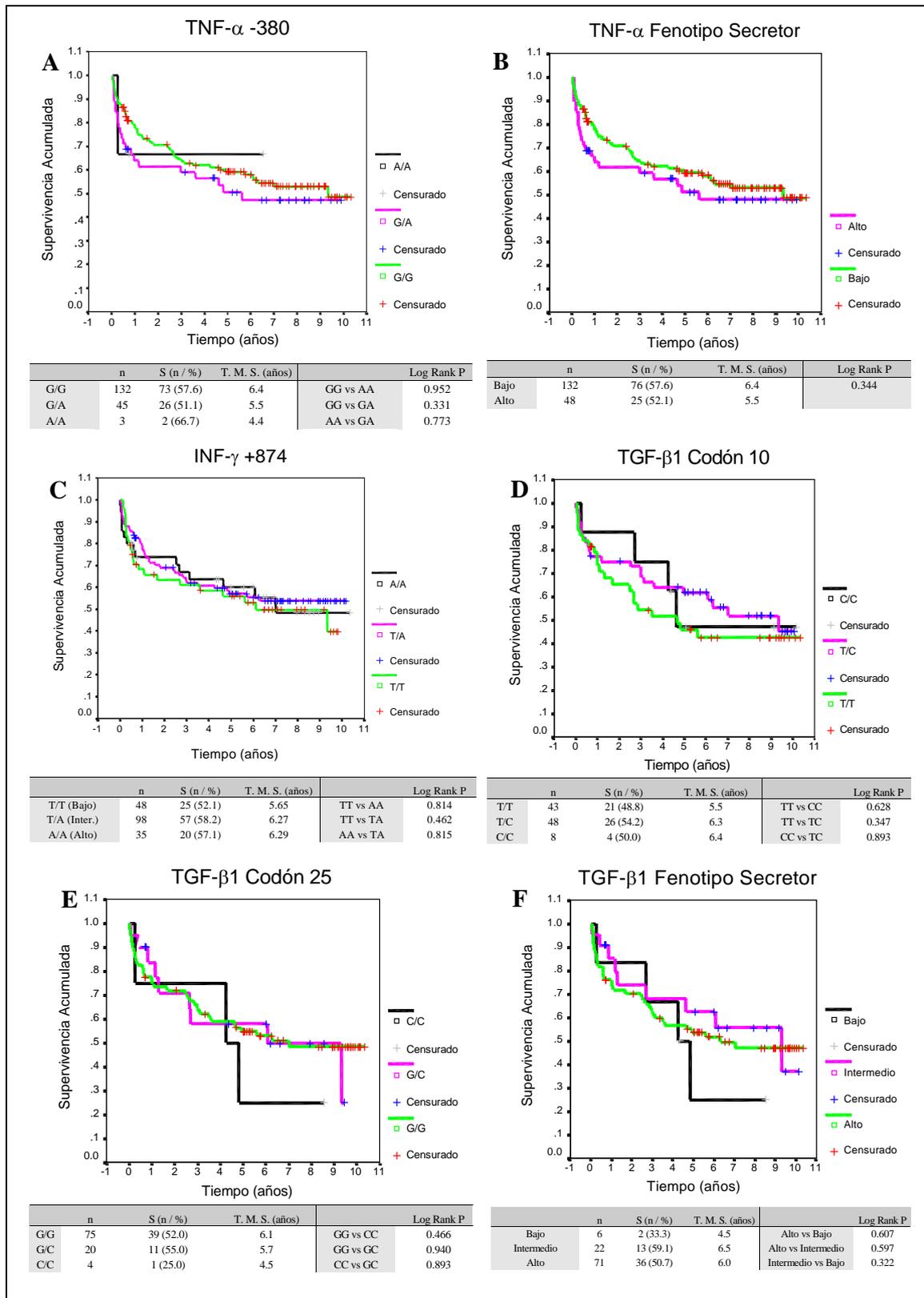


Fig. 2. Supervivencia acumulada del injerto en función del genotipo y fenotipo secretor: **A)** genotipo TNF- α -380, **B)** fenotipo secretor de TNF- α , **C)** genotipo INF- γ +874 y fenotipo secretor, **D)** genotipo TGF- β 1 codón 10 y **E)** codón 25 y **F)** fenotipo secretor de TGF- β 1 .

Tabla 6. Análisis de genotipos combinados y haplotipos para los codones 10 y 25 de TGF-β1 y las posiciones -1082, -819 y -592 de IL-10, en función de la supervivencia del injerto hepático tras 10 años de seguimiento .

Gen		Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Haplotípicas			
		Pérdida del Injerto		p	Pérdida del Injerto		p	
		No n (%)	Si n (%)		No n (%)	Si n (%)		
TGF-β1	T/T G/G	16 (31.4)	17 (35.4)	0.596	T-G	60 (58.5)	59 (61.5)	0.671
Codón 10	T/T G/C	5 (9.8)	4 (8.3)		T-C	8 (8.2)	7 (7.3)	
Codón 25	T/T C/C	0 (0)	1 (2.1)		C-G	29 (28.8)	22 (22.9)	
	T/C G/G	20 (39.2)	18 (37.5)		C-C	5 (4.6)	8 (8.4)	
	T/C G/C	5 (9.8)	4 (8.3)					
	T/C C/C	1 (2.0)	0 (0)					
	C/C G/G	3 (5.9)	1 (2.1)					
	C/C G/C	1 (2.0)	1 (2.1)					
	C/C C/C	0 (0)	2 (4.2)					
	IL-10	GCC/GCC	22 (21.6)	13 (16.7)	0.108	GCC	99 (48.5)	62 (39.7)
-1082 -819 -592	GCC/ACC	25 (24.5)	24 (30.8)		ATA	53 (26.0)	45 (28.9)	
	GCC/ATA	30 (29.4)	12 (15.4)	0.033	ACC	52 (25.5)	49 (31.4)	
	ACC/ACC	6 (5.9)	5 (6.4)					
	ACC/ATA	15 (14.7)	15 (19.2)					
	ATA/ATA	4 (3.9)	9 (11.5)					

Las diferencias genotípicas y de frecuencias haplotípicas entre grupos se calcularon con el test χ^2 de Pearson.

supervivencia (TMS=7.6 v 5.7 años) que aquellos receptores que no portaban dicho genotipo ($p=0.022$). Estas diferencias ya demostraron ser significativas a partir de los 5 años de seguimiento ($p=0.048$) incrementándose la significación a lo largo del tiempo post-trasplante. Sin embargo, en el análisis del papel de los haplotipos extendidos (Tabla 6) y del fenotipo secretor (Fig. 4e) en la supervivencia del injerto no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos.

3.4.5. Análisis multivariante en supervivencia del injerto

Con el fin de determinar los factores que influían de forma independiente en la supervivencia del injerto hepático tras 10 años de seguimiento, se realizó un análisis multifactorial de Cox. En este modelo se incluyeron variables tales como la edad, sexo, tratamiento inmunosupresor, año del trasplante, patología de base, presencia de episodios de RA y RC, así como factores genéticos que habían sido asociados en el análisis univariante, tales como el genotipo AA en CD86 +1057, el genotipo AA en CD95 -670, el genotipo GCC/ATA de IL-10 (-1082, -819 y -592) y el genotipo GC de IL-6 -174. En este modelo, las variables que se asociaron de forma independiente con la evolución del injerto se podían dividir en *aquellas que favorecían la supervivencia del injerto hepático*: patología de base de origen autoinmune ($p=0.016$, OR=0.176, IC 95%=0.04-0.73), genotipo AA en CD86 +1057 ($p=0.054$, OR=0.142, IC 95%=0.02-1.03) y el genotipo GCC/ATA de IL-10 (-1082, -819 y -592)

($p=0.038$, OR=0.497, IC 95%=0.26-0.96) y *aquellas que disminuían la supervivencia del injerto*: el genotipo AA en CD95 -670 ($p=0.054$, OR=1.7, IC 95%=0.99-2.87) y el genotipo GC de IL-6 -174 ($p=0.096$, OR=1.5, IC 95%=0.93-2.58). Si consideramos la presencia del alelo C de IL-6 -174 en el modelo, en lugar del genotipo GC, vemos que este factor se aleja de la significación estadística ($p=0.112$, OR=1.5, IC 95%=0.91-2.55) indicando su peor capacidad en la predicción de la evolución del injerto. Cuando se analizó la supervivencia estratificada en años, se observó que en el primer año tan solo presenta diferencias significativas el genotipo GC de IL-6 -174 ($p=0.05$, OR=2.0, IC 95%=1.0-4.2) aunque estas diferencias se perdían progresivamente a lo largo de los 10 años de seguimiento. En el caso del efecto del genotipo AA en CD95 -670 las diferencias significativas se apreciaban a partir del segundo año ($p=0.047$, OR=1.8, IC 95%=1.0-3.5) y aumentaban ligeramente a lo largo del tiempo de seguimiento, decayendo al final del estudio. El efecto de la patología de base de origen autoinmune se manifiesta a partir del tercer año de seguimiento ($p=0.038$, OR=0.12, IC 95%=0.02-0.88) incrementándose progresivamente con el tiempo. El papel del genotipo GCC/ATA de IL-10 se manifiesta a partir del sexto año de seguimiento ($p=0.049$, OR=0.49, IC 95%=0.25-0.99) aumentando posteriormente de forma progresiva, mientras que el efecto del genotipo AA en CD86 +1057 aumentaba lentamente en el tiempo y sólo alcanzaba valores próximos a la significación al final del estudio.

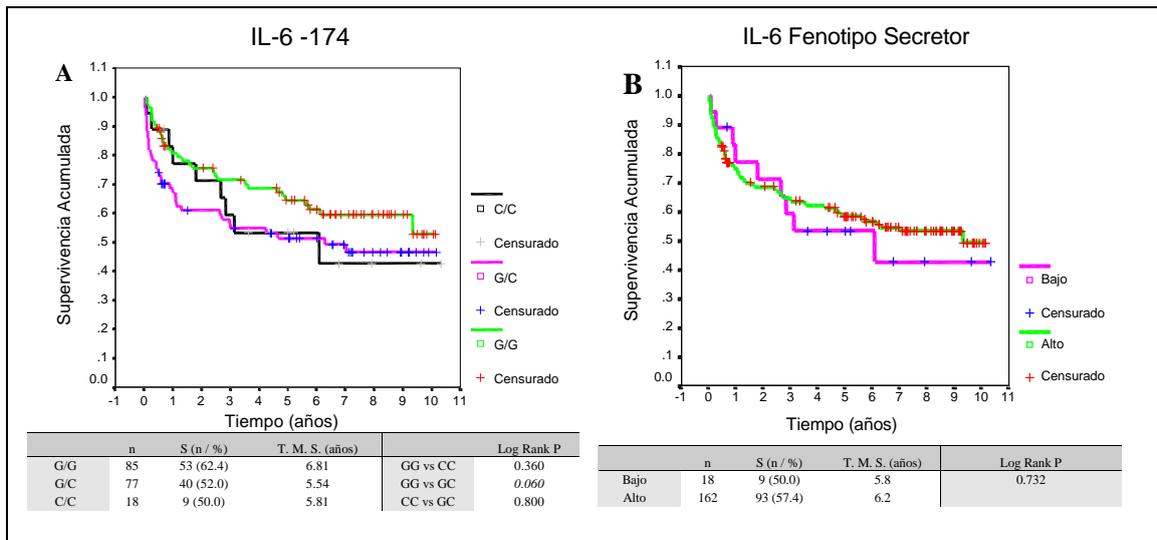


Fig. 3. Supervivencia acumulada del injerto en función del polimorfismo de IL-6: A) genotipo IL-6 -174 y B) fenotipo secretor.

4. Discusión

Los resultados del presente trabajo indican que la evolución del injerto hepático puede estar influenciada por los factores genéticos del receptor, entre los que se incluyen el polimorfismo en moléculas implicadas en la respuesta aloinmunitaria (citocinas, moléculas implicadas en la segunda señal de reconocimiento antigénico y moléculas implicadas en apoptosis).

4.1. Polimorfismo en posición +1057 del gen CD86

Como se deriva de los resultados del análisis univariante, los pacientes portadores del genotipo AA en CD86 +1057 tienen una mayor predisposición para aceptar un injerto hepático, que se traduce en una ausencia de episodios de RA y una mayor supervivencia del injerto. Sin embargo, el análisis multivariante parece indicar que este factor no es un buen predictor de la aparición de RA, probablemente debido a la baja frecuencia de este genotipo (5.9%) en la población de pacientes trasplantados, coincidiendo con las frecuencias descritas en otras poblaciones europeas (12). En la misma línea, el polimorfismo de CD86 +1057 no se pudo asociar con la aparición de RC, algo que podría venir condicionado por la baja frecuencia de episodios de RC (4.3%), razón por la que es difícil de establecer si este polimorfismo no influye o confiere un riesgo reducido en del desarrollo de rechazo crónico. Sin embargo, es preciso destacar que el test de Cox si confirmó su asociación de forma independiente con una mayor supervivencia del injerto.

Se sabe que el polimorfismo CD86 +1057 origina un cambio alanina/treonina en el codón 304,

localizado en el tallo citoplásmico de CD86 (12,13), esta sustitución genera un potencial sitio de fosforilación en la región citoplásmica. Por ello, es tentador pensar que este alelo puede influir en el envío de señales de transducción al interior de la célula e incluso modificar los niveles de expresión de CD86 en membrana. En este sentido, hay varios hallazgos que indican que CD86 puede tener una capacidad de enviar señales al interior de las APCs. Así, se ha observado que CD86 se fosforila tras la activación de los linfocitos B (77). Por otro lado, en modelos animales, la estimulación con lipopolisacáridos de linfocitos B normales y de pacientes con linfoma en presencia de anticuerpos anti-CD86, da lugar a la diferenciación de los linfocitos B y a la producción de IgG1 e IgG2a (78), mientras que la estimulación de linfocitos B humanos con IL-4 más anti-CD40 y anti-CD86 da lugar a un incremento en la producción de IgE e IgG4 y la proliferación de los linfocitos B (14). Más aún, la estimulación a través de CD86 incrementa los niveles nucleares de NF- κ B1 y RelA fosforilado, dando lugar a la elevación de Oct2 y su unión con el amplificador (*enhancer*) 3'IgH, de forma dependiente de la proteína quinasa C (15). Estos datos nos permiten pensar que diferencias en los niveles de fosforilación de tallo citoplásmico de CD86 podrían afectar su capacidad de enviar señales de transducción a través de CD86 en las APC. Según esto, aquellos pacientes portadores del genotipo AA podrían presentar una menor capacidad para generar una respuesta alogénica, permitiendo una mejor evolución del trasplante hepático.

4.2. Polimorfismos en los genes CD95 y CD95L

La vía CD95/CD95L se encuentra implicada en la aceptación o rechazo del injerto hepático (27-31), por

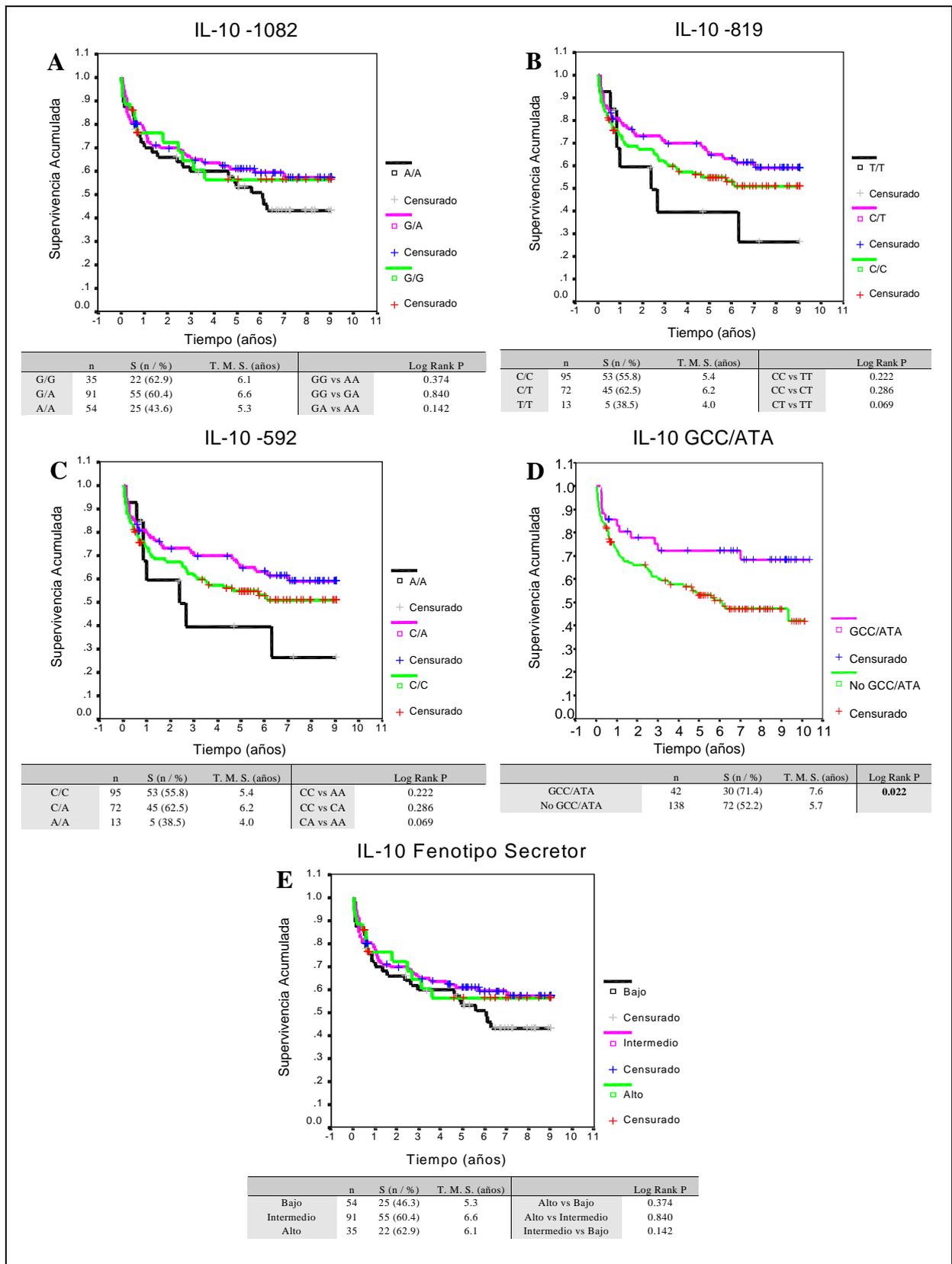


Fig 4. Supervivencia acumulada del injerto en función del genotipo de: **A)** IL-10 -1082, **B)** IL-10 -819, **C)** IL-10 -592, **D)** el genotipo combinado IL-10 GCC/ATA y **E)** el fenotipo secretor de IL-10.

ello, es lógico pensar que las posibles variaciones genéticas en estos genes puedan influir en sus niveles de expresión, su capacidad de unión al ligando o su función final. Sin embargo, hasta este momento no se había estudiado el posible papel del polimorfismo de CD95 y CD95L en la evolución del trasplante hepático.

El principal hallazgo de este trabajo ha sido la demostración de que los polimorfismos de CD95 y CD95L condicionan la supervivencia del injerto hepático. De hecho, tal como se deduce de los resultados presentados en esta memoria, en los pacientes portadores del genotipo CD95 -670 AA, la supervivencia del injerto es estadísticamente menor que en los portadores de otros genotipos, estas diferencias ya se manifiestan desde el primer año post trasplante.

Por el contrario, nuestros datos no revelaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas o genotípicas de las variantes de CD95 y CD95L entre los pacientes que sufren episodios de rechazo agudo o crónico. Los genotipos combinados y los haplotipos de las variantes de CD95 y CD95L tampoco se asociaron con la incidencia de RA y RC. Tan sólo cabe destacar que el haplotipo CD95 (-670A/-1377A) estaba ausente en el grupo de pacientes que no experimentaban episodios de RA, mientras que, la frecuencia en el grupo RA es del 3.6%. Sin embargo, hay que considerar la baja frecuencia del alelo A en la posición -1377, por lo que la presencia de tan solo un paciente con este alelo en el grupo de RA podría modificar de forma importante la estimación haplotípica, provocando un cambio importante en el análisis; por ello, este dato debe ser confirmado en un serie mayor de receptores.

El polimorfismo en la región promotora de CD95 -670 (32), origina una sustitución de G por A (TTCCAGGAA) en el sitio de unión GAS (TTCC2-4GAA) dentro de la región *enhancer* (79), de modo que puede influir en la expresión del CD95. En este sentido, los elementos GAS están implicados en la señalización por INF- γ y INF- α (80) a través de la unión de homodímeros fosforilados de STAT1 (del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription*). INF- γ provoca la fosforilación de STAT1 en un residuo de tirosina por las quinasas Janus 1 y 2. Posteriormente STAT1 fosforilado forma homodímeros y se transloca al núcleo donde induce la transcripción de los genes que contienen las regiones GAS (81). Teniendo en cuenta que se ha descrito que CD95 se regula positivamente por la acción de INF- γ , y STAT1 (82), y los resultados expuestos en esta memoria parecen indicar un posible efecto perjudicial del genotipo AA en la supervivencia del injerto, parece lógico pensar que los individuos portadores de la variante CD95 -670A en la secuencia GAS

(TTCCAGAAA) en homocigosis puedan tener una transcripción reducida de CD95 dependiente de INF, lo que originaría una baja capacidad para desencadenar los mecanismos de delección por apoptosis.

Por otro lado, es bien conocido que los aloinjertos hepáticos son especialmente tolerogénicos, aunque las bases de esta tolerancia inmunológica no se conocen totalmente. Uno de los posibles mecanismos que ha sido implicado en este fenómeno es el proceso de la delección de precursores citotóxicos T alorreactivos en el hígado. Así, los linfocitos T que penetran en el injerto tras ser aloactivados por los aloantígenos presentes en el tejido hepático podrían ser eliminados por los mecanismos de delección intrahepáticos, y por lo tanto, no podrían atacar el injerto (83). En este sentido, una expresión reducida de CD95 en los linfocitos T activados debida a la presencia del genotipo CD95 -670 AA podría redundar en una disminución de los mecanismos de delección por apoptosis, dando lugar a su acumulación en el injerto hepático que favorecería el daño del tejido injertado. En cualquier caso, este fenómeno solo tendría efecto a largo plazo afectando a la supervivencia del injerto, ya que este genotipo no parece tener papel en la aparición de episodios de rechazo agudo. No obstante, se trata de un efecto a considerar, pues la reducción de la supervivencia se traduce en un peor aprovechamiento de los órganos injertados.

4.3. Polimorfismo de citocinas

Son numerosos los estudios que han descrito la existencia de asociación entre el perfil de citocinas post-trasplante y la buena o mala aceptación del injerto (37). En trasplante hepático, nuestro grupo ha descrito previamente que el balance de las citocinas Th1/Th2 durante el periodo post-trasplante temprano parece ser decisivo en la aceptación del injerto. Así, los pacientes con un perfil predominante del tipo Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) en las primeras 24-48 h post-trasplante mostraban una mejor aceptación del injerto que los pacientes con un perfil Th1 (INF- γ) predominante y la reducción de citocinas Th3 (TGF- β 1) podía favorecer el rechazo del injerto (38). Estas evidencias han propiciado la realización de numerosos estudios orientados a determinar el polimorfismo de citocinas y su posible papel en la evolución del trasplante (84-86). Desafortunadamente, no existe consenso entre los diferentes estudios realizados en trasplante; varios pueden ser los motivos que den lugar a estas discrepancias: diferencias en los protocolos de inmunosupresión, en la patología de base, el tipo de órgano transplantado, variabilidad genética de las poblaciones estudiadas o a la realización de estudios con un bajo número de pacientes, que limitaría la validez de los análisis estadísticos. A esto hay que unir el hecho de que no exista una asociación clara entre el

polimorfismo de una citocina y su nivel de expresión *in vitro*, debido en parte a diferencias en el tipo celular utilizado, a los protocolos de cultivo o al hecho de que las muestras de pacientes se comporten de manera distinta a la de los individuos sanos (87).

La ventaja de los resultados del estudio de polimorfismos de citocinas en el presente trabajo, es que se han obtenido en un número amplio y homogéneo de pacientes sometidos a trasplante hepático (n=180 receptores para TNF- α , IL-6, INF- γ e IL-10 y n=99 para TGF- β 1), tratados mayoritariamente con triple terapia inmunosupresora. Además, su estudio no solo ha contemplado su papel en la incidencia de RA, sino también su posible efecto en la incidencia de RC y la supervivencia del injerto en un periodo de seguimiento de 10 años.

Por tanto, en esta serie el análisis comparativo de las frecuencias genotípicas, alélicas y el fenotipo secretor de los polimorfismos de TNF- α -308, IL-6 -174, INF- γ +874 entre los grupos RA y NRA, ha revelado que estas posiciones polimórficas no afectan a la incidencia de episodios de RA. Resultados similares han obtenido al analizar de forma individual las frecuencias alélicas y genotípicas de las tres posiciones polimórficas (-1082, -819 y -592), así como los genotipos combinados, las frecuencias haplotípicas y el fenotipo secretor de IL-10. Igualmente, para TGF- β 1, ni el análisis individual de las dos posiciones polimórficas (codón 10 y codón 25), ni el fenotipo secretor se ha podido asociar con la aparición de rechazo agudo. Sin embargo, es importante destacar que para esta citocina, el genotipo T/T G/C y el haplotipo TC están ausentes en el grupo de RA, razón por la cual podrían considerarse que estas combinaciones genotípicas pudieran proteger de la aparición de RA. Concretamente para el haplotipo TC, esta asociación se mantuvo próxima a la significación en el análisis multivariante (p=0.087, OR=0.3). Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en un meta-análisis recientemente publicado, en el que se estudió la asociación del polimorfismo de citocinas, con la incidencia de RA partiendo de otros 7 estudios publicados previamente (88). En dicho estudio, a diferencia del presente trabajo, tan solo se detecta una asociación significativa del alelo A en IL-10 -1082 con una menor incidencia de RA, si bien, esta asociación solo se describió en uno de los artículos incluidos en el meta-análisis (89), estudio realizado con un tamaño de muestra significativamente inferior (n=89) al del presente trabajo (n=180). Estos datos parecen indicar que el alelo IL-10 -1082 A ejercería un efecto moderado en la respuesta alogénica que tiene lugar en el post-trasplante temprano. Por otro lado, al igual que en el presente trabajo, dichos autores tampoco encontraron asociación entre los polimorfismos de TGF- β 1 (codón 10 y codón 25) analizados

individualmente y la incidencia de RA. De acuerdo con estas observaciones y según nuestro conocimiento, el presente trabajo ha sido el primero en el que se realiza un análisis del efecto del genotipo combinado y de los haplotipos de TGF- β 1 en la incidencia de RA. Resulta difícil predecir el efecto que el haplotipo TC (codón 10 y codón 25) puede ejercer en la expresión de TGF- β 1, pero, se sabe que estos polimorfismos se localizan en la secuencia del péptido señal, dando lugar a un cambio en la secuencia de la proteína: Leu/Pro y Arg/Pro, respectivamente y según esto, el haplotipo TC daría lugar a la presencia de las variantes Leu-Pro en el péptido señal. El primer paso para la activación de TGF- β 1 es la eliminación del péptido señal hidrofóbico a nivel del codón 29. Por lo tanto, el cambio en el codón 25 de un aminoácido cargado positivamente (Arg) por otro neutro no polar (Pro), en la secuencia próxima a la zona de rotura, podría tener un papel fundamental en el proceso de activación de TGF- β 1, mientras que el cambio de un aminoácido no polar (Leu) por otro no polar (Pro) en el codón 10 sería menos relevante (59).

Por otro lado, una de las características de TGF- β 1 es su capacidad inmunosupresora y de inducción de tolerancia. En este sentido, se ha descrito que ratones con el gen del TGF- β inactivado (TGF- β -*knockout*) sufren enfermedades autoinmunes severas con producción de autoanticuerpos (90) y, además, la administración de anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β anula la inducción de tolerancia frente al injerto en modelos *in vivo* de trasplante de corazón en ratas (91). Por ello, en el contexto del trasplante cabe pensar que la producción de TGF- β 1 se puede asociar a una menor incidencia de rechazo agudo. Por el contrario, debido a su actividad fibrogénica, es posible que su alta producción a largo plazo se asocie al desarrollo de rechazo crónico del injerto, tal como se ha descrito para la fibrosis de pulmón (92), desarrollo de vasculopatía coronaria (62) y fallo renal (93). Según esta información, cabe pensar que la variante TC (codón 10 y codón 25) de TGF- β 1, que da lugar a la combinación Leu-Pro en el péptido señal, podría favorecer la activación local de TGF- β 1, ejerciendo su papel inmunosupresor y, en consecuencia, disminuyendo la incidencia de rechazo agudo en trasplante de hígado.

Por otra parte, en el presente trabajo, no se ha podido detectar una asociación entre los polimorfismos de citocinas y la incidencia de RC. No obstante, debido a que la frecuencia de episodios de RC es muy baja (4.3%), el poder estadístico del análisis está muy limitado, por lo que no se puede descartar que alguno de los polimorfismos analizados puedan conferir un riesgo bajo en la aparición de RC. Además, este análisis no pudo realizarse para los polimorfismos de TGF- β 1 debido a que solo se

detectaron dos casos de RC en el grupo de estudio (2/99).

Un aspecto importante del presente trabajo es el de analizar el papel de los polimorfismos de citocinas en la evolución del trasplante hepático a largo plazo (10 años), sobre todo debido a la escasa literatura que existe al respecto. De manera importante, en la presente serie se ha demostrado, tanto por análisis univariante como multivariante, que los receptores con el genotipo GG en la posición -174 de IL-6 presentan una supervivencia superior que los portadores del genotipo GC, lo que es evidente desde el primer año post-trasplante y manteniéndose a lo largo de 9 años de seguimiento. Además, los pacientes con el genotipo CC presentan un comportamiento particular, ya que durante los primeros 3 años post-trasplante su tasa de supervivencia es semejante a los receptores con genotipo GG, mientras que a partir del cuarto año post-trasplante siguen un patrón similar al grupo de receptores con genotipo GC. Aunque los resultados del análisis estadístico son equivalentes, tanto si tenemos en cuenta el genotipo GC como la presencia del alelo C (GC + CC) en la posición -174 de IL-6, el análisis multivariante parece indicar que la presencia del genotipo GC en el receptor hepático puede predecir mejor la supervivencia del injerto. El papel del polimorfismo -174 de IL-6 en la evolución a largo plazo del injerto ha sido descrito previamente en estudios realizados en trasplante renal; así, se ha observado que el genotipo GG presenta una mayor supervivencia del injerto que los receptores portadores del alelo C (GC + CC). Así, la presencia del alelo C, confiere a sus portadores un riesgo 3.7 veces superior para la pérdida del injerto (55). Desgraciadamente, los autores de este trabajo no abordan los estudios sobre supervivencia considerando independientemente cada genotipo, por lo que no es posible conocer con exactitud el comportamiento de los receptores portadores del genotipo CC. Otros trabajos en trasplante renal también confirman el papel del polimorfismo de IL-6 -174 del receptor al describir una frecuencia aumentada del genotipo CC en los receptores con nefropatía crónica del injerto (94). También se ha descrito la importancia del genotipo IL-6 -174 del donante en trasplante de riñón, advirtiéndose que en el grupo de pacientes con nefropatía crónica del injerto la prevalencia del genotipo CC del donante estaba aumentada y la del genotipo GG disminuida (95). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual el genotipo de IL-6 ejerce su papel, es posible que sea debido a una producción o actividad diferencial de esta citocina. En este sentido, se ha descrito una asociación entre el polimorfismo -174 de IL-6 y el nivel de producción de IL-6 *in vitro* e *in vivo* (53), según la cual, el alelo C daría lugar a una menor producción de IL-6 comparada con el alelo G. Considerando estos datos, los receptores con niveles

elevados de IL-6 (GG) presentarían una mejor aceptación del injerto que los que presenta unos niveles bajos de IL-6 (GC+CC). Aunque a primera vista estos resultados parecerían contradictorios, hay que tener en cuenta el doble papel de IL-6 en la respuesta inmune: por un lado, actuaría como citocina pro-inflamatoria, favoreciendo la producción de proteínas de fase aguda y dirigiendo la transición de inflamación aguda a crónica, a través del cambio en la naturaleza del infiltrado leucocitario (de neutrófilos polimorfonucleares a monocitos/macrófagos) y la activación de linfocitos T y B (96) y, por otro lado, considerando su actividad inmunosupresora, mediante su capacidad de controlar los niveles de otras citocinas pro-inflamatorias (52) y de suprimir la activación/maduración de las células dendríticas lo que conduce a la alteración de la respuesta de los linfocitos T (97). Además, el polimorfismo de IL-6 -174 se localiza cerca del sitio de unión del receptor de glucocorticoides siendo capaz de reprimir su activación transcripcional (53). También se ha descrito que las terapias inmunosupresoras que incluyen el uso de esteroides y ciclosporina, son capaces de alterar la transcripción del gen de IL-6 (98,99), lo que puede conferir una capacidad de respuesta al tratamiento diferente en cada paciente en dependencia clara del genotipo de IL-6. Por último, hay que tener en cuenta que el genotipo de IL-6 del donante también podría afectar a la evolución del trasplante hepático, tal como se ha descrito en otros tipos de trasplante (95).

En el presente trabajo, también hemos observado una asociación entre la supervivencia del injerto hepático y el genotipo de IL-10 del receptor en las posiciones -1082, -819 y -592. Aunque esta asociación no se detecta al analizar de forma independiente cada una de las variantes, sino al considerar los genotipos combinados, de modo que los pacientes con genotipo GCC/ATA en IL-10 (-1082, -819 y -592) presentan mayor supervivencia del injerto que el resto de genotipos. Es importante hacer notar que en todo caso estas diferencias se manifiestan a largo plazo, a partir del quinto año post-trasplante tal como demuestra tanto el análisis univariante como en el multivariante, por lo que puede considerarse que este genotipo tiene valor predictivo sobre la supervivencia del injerto. Conceptualmente, IL-10 se considera como una citocina tipo Th2 capaz de inhibir la producción de citocinas Th1, razón por la que ha sido implicada en procesos de tolerancia a aloinjertos. Así, IL-10 participa en el mantenimiento de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ y en la inducción de células T reguladoras tipo 1 (100). Por otro lado, IL-10 también puede facilitar la tolerancia de forma indirecta interfiriendo en la actividad de las células dendríticas, así, en modelos de ratón se ha descrito que células dendríticas transfectadas con el gen de IL-10 son capaces de inducir tolerancia en injerto de islotes

pancreáticos y prolongar la supervivencia de los receptores, inhibiendo la proliferación de las células T (101). Además, en modelos de trasplante hepático en ratas en los que se han aplicado protocolos de inmunosupresión retardada (administración de FK506 48 h después de la reperusión), se ha observado que la IL-10 producida por macrófagos tisulares en los periodos tempranos de la reperusión es capaz de aumentar la supervivencia del injerto hepático y, que cuando declina la IL-10 endógena, la administración de IL-10 exógena mejora la supervivencia del injerto (102). Aunque desconocemos el efecto biológico que el genotipo GCC/ATA de IL-10 pueda tener en los niveles de producción de dicha citocina, se ha descrito que el genotipo IL-10 -1082-GG o el haplotipo GCC muestran una producción de IL-10 elevada tras la estimulación *in vitro*, mientras que los que presentan el genotipo IL-10 -1082-GA o IL-10 -1082-AA producen respectivamente, niveles intermedios o bajos (103-105). Sin embargo, esta asociación no es concluyente, ya que otros autores no han observado dicho efecto (106) o, incluso han descrito el efecto contrario (87). No obstante, es posible especular que la producción de IL-10 por las potenciales células reguladoras pueda verse afectada por el polimorfismo en la región promotora (-1082, -819 y -592), condicionando la respuesta alógena y, por tanto, la evolución del trasplante hepático.

En resumen, se puede concluir que, entre otros factores, el polimorfismo de CD86, CD95, CD95L y citocinas, puede condicionar la respuesta alógena y en consecuencia la evolución del trasplante hepático, tanto a corto plazo, por su impacto en la incidencia de rechazo agudo, como a largo plazo, mejorando o disminuyendo la supervivencia del injerto. En cualquier caso, el conocimiento del perfil genético del receptor hepático puede ser de ayuda para predecir la buena o mala aceptación del injerto y que, también puede servir de criterio para modificar los protocolos terapéuticos, ajustándolos a las características individuales del receptor. Además, este tipo de estudios ayuda a conocer el posible efecto que las variantes genéticas tienen en el comportamiento de los genes asociados y de sus interrelaciones con otros genes implicados en la respuesta inmunitaria.

5. Referencias

1. Bretscher P. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunol Today* 1992;13:74-76.
2. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 2001;19:225-252.
3. Swain SL, Croft M, Dubey C et al. From naive to memory T cells. *Immunol Rev* 1996;150:143-167.
4. Minguela A, Marin L, Torio A et al. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 costimulatory molecules are mainly involved in acceptance or rejection of human liver transplant. *Hum Immunol* 2000;61:658-669.
5. Ossevoort MA, Ringers J, Kuhn EM et al. Prevention of renal allograft rejection in primates by blocking the B7/CD28 pathway. *Transplantation* 1999;68:1010-1018.
6. Kirk AD, Tadaki DK, Celniker A et al. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* 2001;72:377-384.
7. Kim KS, Denton MD, Chandraker A et al. CD28-B7-mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection: differential role of B7-1 in initiation versus progression of graft arteriosclerosis. *Am J Pathol* 2001;158:977-986.
8. Abe K, Takasaki Y, Ushiyama C et al. Expression of CD80 and CD86 on peripheral blood T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 1999;19:58-66.
9. Wolthers KC, Otto SA, Lens SM et al. Increased expression of CD80, CD86 and CD70 on T cells from HIV-infected individuals upon activation in vitro: regulation by CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1996;26:1700-1706.
10. Jeannin P, Herbault N, Delneste Y et al. Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J Immunol* 1999;162:2044-2048.
11. Jellis CL, Wang SS, Rennett P et al. Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86). *Immunogenetics* 1995;42:85-89.
12. Delneste Y, Bosotti R, Magistrelli G, Bonnefoy JY, Gauchat JF. Detection of a polymorphism in exon 8 of the human CD86 gene. *Immunogenetics* 2000;51:762-763.
13. Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2000;1:428-434.
14. Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S et al. CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *J Biol Chem* 1997;272:15613-15619.
15. Podojil JR, Kin NW, Sanders VM. CD86 and beta 2-adrenergic receptor signaling pathways, respectively, increase Oct-2 and OCA-B expression and binding to the 3'-IgH enhancer in B cells. *J Biol Chem* 2004;279:23394-23404.
16. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* 1999;19:1-24.
17. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:548-554.
18. Mogil RJ, Radvanyi L, Gonzalez-Quintal R et al. Fas (CD95) participates in peripheral T cell deletion and associated apoptosis in vivo. *Int Immunol* 1995;7:1451-1458.
19. Lowin B, Mattman C, Hahne M, Tschopp J. Comparison of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8:57-63.
20. Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance. *Transplantation* 1998;65:869-875.
21. Ito H, Kasagi N, Shomori K, Osaki M, Adachi H. Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling. *Transplantation* 1995;60:794-798.

22. Laine J, Etelamaki P, Holmberg C, Dunkel L. Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1997;63:101-105.
23. Sharland A, Yan Y, Wang C et al. Evidence that apoptosis of activated T cells occurs in spontaneous tolerance of liver allografts and is blocked by manipulations which break tolerance. *Transplantation* 1999;68:1736-1745.
24. Itoh N, Yonehara S, Ishii A et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233-243.
25. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-795.
26. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J et al. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 1994;6:1567-1574.
27. Pan TL, Goto S, Lin YC et al. The fas and fas ligand pathways in liver allograft tolerance. *Clin Exp Immunol* 1999;118:180-187.
28. Li XK, Okuyama T, Tamura A et al. Prolonged survival of recipient rats with Fas-ligand-transfected liver allografts by using HVJ-liposome. *Transplant Proc* 1998;30:943.
29. Hiroyasu S, Shiraishi M, Koji T et al. Analysis of the Fas system and Bcl-2 in rat liver allograft rejection. *J Surg Res* 1999;84:204-211.
30. Rivero M, Crespo J, Mayorga M et al. Involvement of the Fas system in liver allograft rejection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1501-1506.
31. Marin L, Minguela A, Moya-Quiles MR et al. Expression of CD95 and apoptosis induction in peripheral blood cells from liver graft recipients. *Transplant Proc* 2002;34:280-282.
32. Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 1997;34:577-582.
33. Huang QR, Danis V, Lassere M, Edmonds J, Manolios N. Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:645-651.
34. Wu J, Alizadeh BZ, Veen TV et al. Association of FAS (TNFRSF6)-670 gene polymorphism with villous atrophy in coeliac disease. *World J Gastroenterol* 2004;10:717-720.
35. Huang QR, Manolios N. Investigation of the -1377 polymorphism on the Apo-1/Fas promoter in systemic lupus erythematosus patients using allele-specific amplification. *Pathology* 2000;32:126-130.
36. Bolstad AI, Wargelius A, Nakken B, Haga HJ, Jonsson R. Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2000;27:2397-2405.
37. Gorczynski RM. Role of cytokines in allograft rejection. *Curr Pharm Des* 2001;7:1039-1057.
38. Minguela A, Torio A, Marin L et al. Implication of Th1, Th2, and Th3 cytokines in liver graft acceptance. *Transplant Proc* 1999;31:519-520.
39. Callard R, George AJ, Stark J. Cytokines, chaos, and complexity. *Immunity* 1999;11:507-513.
40. Bidwell J, Keen L, Gallagher G et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun* 2001;2:61-70.
41. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863-866.
42. Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9465-9470.
43. Teramoto K, Tanaka Y, Kusano F et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha gene during allograft rejection following rat liver transplantation. *Liver* 1999;19:19-24.
44. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-399.
45. Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS et al. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994;24:191-195.
46. Verweij CL, Huizinga TW. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms and rheumatic diseases. *Br J Rheumatol* 1998;37:923-926.
47. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 1999;56:281-288.
48. Turner D, Grant SC, Yonan N et al. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 1997;64:776-779.
49. Bathgate AJ, Pravica V, Perrey C et al. The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Transplantation* 2000;69:1514-1517.
50. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ et al. Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection. *Liver Transpl* 2002;8:603-611.
51. Jazrawi SF, Zaman A, Muhammad Z et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms and the risk of rejection after liver transplantation: a case control analysis of 210 donor-recipient pairs. *Liver Transpl* 2003;9:377-382.
52. Xing Z, Gaudie J, Cox G et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-320.
53. Fishman D, Faulds G, Jeffery R et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376.
54. Marshall SE, McLaren AJ, McKinney EF et al. Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 2001;71:469-476.
55. Muller-Steinhardt M, Hartel C, Muller B, Kirchner H, Fricke L. The interleukin-6 -174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int* 2002;62:1824-1827.
56. Billiau A, Heremans H, Vermeire K, Matthys P. Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update. *Ann N Y Acad Sci* 1998;856:22-32.
57. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P et al. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation* 2001;71:674-677.

58. Awad M, Pravica V, Perrey C et al. CA repeat allele polymorphism in the first intron of the human interferon-gamma gene is associated with lung allograft fibrosis. *Hum Immunol* 1999;60:343-346.
59. Syrris P, Carter ND, Metcalfe JC et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)* 1998;95:659-667.
60. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P et al. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998;66:1014-1020.
61. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol* 1998;6:193-197.
62. Densem CG, Hutchinson IV, Cooper A, Yonan N, Brooks NH. Polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene correlates with the development of coronary vasculopathy following cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:551-556.
63. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
64. Kube D, Platzer C, von KA et al. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 1995;7:1-7.
65. Platz KP, Mueller AR, Rossaint R et al. Cytokine pattern during rejection and infection after liver transplantation--improvements in postoperative monitoring? *Transplantation* 1996;62:1441-1450.
66. Bishop GA, Rokahr KL, Napoli J, McCaughan GW. Intra-graft cytokine mRNA levels in human liver allograft rejection analysed by reverse transcription and semiquantitative polymerase chain reaction amplification. *Transpl Immunol* 1993;1:253-261.
67. Minguela A, Torio A, Marin L et al. Implication of soluble and membrane HLA class I and serum IL-10 in liver graft acceptance. *Hum Immunol* 1999;60:500-509.
68. Fernandes H, Koneru B, Fernandes N et al. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation* 2002;73:1886-1891.
69. Mor E, Solomon H, Gibbs JF et al. Acute cellular rejection following liver transplantation: clinical pathologic features and effect on outcome. *Semin Liver Dis* 1992;12:28-40.
70. Adams DH, Neuberger JM. Patterns of graft rejection following liver transplantation. *J Hepatol* 1990;10:113-119.
71. Wiesner RH, Ludwig J, Krom RA, Hay JE, van Hoek B. Hepatic allograft rejection: new developments in terminology, diagnosis, prevention, and treatment. *Mayo Clin Proc* 1993;68:69-79.
72. Ontañón J, Muro M, Garcia-Alonso AM et al. Effect of partial HLA class I match on acute rejection in viral pre-infected human liver allograft recipients. *Transplantation* 1998;65:1047-1053.
73. Muro M, Llorente S, Marin L et al. Acute vascular rejection mediated by HLA antibodies in a cadaveric kidney recipient: discrepancies between FlowPRA, ELISA and CDC vs luminex screening. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:223-226.
74. Adams DH, Neuberger JM. Treatment of acute rejection. *Semin Liver Dis* 1992;12:80-88.
75. Muro M, Alvarez-Lopez MR, Torio A et al. HLA-DRB1 and -DQB1 polymorphism in liver recipients: relationship between HLA-DQB1*0302 allele frequency and acute rejection. *Hum Immunol* 1997;56:70-76.
76. Pinti M, Troiano L, Nasi M et al. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and FasL (CD178) in human longevity: studies on centenarians. *Cell Death Differ* 2002;9:431-438.
77. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-258.
78. Suvas S, Singh V, Sahdev S, Vohra H, Agrewala JN. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem* 2002;277:7766-7775.
79. Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol* 1994;24:3057-3062.
80. Shuai K. Interferon-activated signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:253-259.
81. Gao J, Morrison DC, Parmely TJ, Russell SW, Murphy WJ. An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1997;272:1226-1230.
82. Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 1998;58:2832-2837.
83. Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 2000;174:47-62.
84. Marshall SE, Welsh KI. The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation. *Genes Immun* 2001;2:297-303.
85. Akalin E, Murphy B. Gene polymorphisms and transplantation. *Curr Opin Immunol* 2001;13:572-576.
86. Poli F, Piccolo G, Scalapogna M. Genetic polymorphisms influencing therapy and susceptibility to rejection in organ allograft recipients. *BioDrugs* 2002;16:11-17.
87. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl* 2003;9:170-181.
88. Warle MC, Metselaar HJ, Hop WC, Tilanus HW. Cytokine gene polymorphisms and acute liver graft rejection: a meta-analysis. *Liver Transpl* 2005;11:19-26.
89. Warle MC, Metselaar HJ, Hop WC et al. Early differentiation between rejection and infection in liver transplant patients by serum and biliary cytokine patterns. *Transplantation* 2003;75:146-151.
90. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998;16:137-161.
91. Josien R, Douillard P, Guillot C et al. A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest* 1998;102:1920-1926.
92. El-Gamel A, Awad M, Sim E et al. Transforming growth factor-beta1 and lung allograft fibrosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;13:424-430.
93. Baan CC, Balk AH, Holweg CT et al. Renal failure after clinical heart transplantation is associated with the TGF-beta 1

- codon 10 gene polymorphism. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:866-872.
94. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J et al. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol* 2005;14:49-52.
95. Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM et al. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation--impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol* 2008;18:344-348.
96. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006;8 Suppl 2:S3.
97. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004;173:3844-3854.
98. Yoshimura N, Kahan BD, Oka T. The in vivo effect of cyclosporine on interleukin-6 gene expression in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1991;23:958-960.
99. Schmidt SC, Hamann S, Langrehr JM et al. Preoperative high-dose steroid administration attenuates the surgical stress response following liver resection: results of a prospective randomized study. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007;14:484-492.
100. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F et al. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001;166:5530-5539.
101. Zhu H, Qiu W, Lei P et al. IL-10 gene modified dendritic cells inhibit T helper type 1-mediated alloimmune responses and promote immunological tolerance in diabetes. *Cell Mol Immunol* 2008;5:41-46.
102. Yang ZF, Ngai P, Lau CK et al. Induction of long-term liver allograft survival by delayed immunosuppression is dependent on interleukin-10. *Liver Transpl* 2007;13:571-578.
103. Turner DM, Williams DM, Sankaran D et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-8.
104. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM et al. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526-530.
105. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin CE et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 2001;72:1444-1450.
106. Cartwright NH, Keen LJ, Demaine AG et al. A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. *Transpl Immunol* 2001;8:237-244.

*Si buscas resultados distintos,
no hagas siempre lo mismo.
(Albert Einstein)*

CAPÍTULO 2

CAPITULO 2

Factores solubles CD86s, CD95s y CD95Ls en la respuesta temprana frente al injerto hepático.

1. Introducción

El papel de las moléculas CD86, CD95 y CD95L es fundamental para el inicio y control de la respuesta inmunológica por lo que sus niveles de expresión pueden condicionar la mayor o menor capacidad de respuesta alogénica de los receptores de un trasplante hepático. En humanos, se ha descrito la presencia de estas moléculas en forma soluble (CD86s, CD95s y CD95Ls), el hecho de que su función no sea totalmente conocida hace difícil entender su papel en los mecanismos de coestimulación y apoptosis. No obstante, estas moléculas pueden ejercer su actividad por diferentes mecanismos: uniéndose a sus ligandos y bloqueando su activación, activando directamente los receptores de membrana o uniéndose a las formas solubles de su ligandos evitando que éstos se unan a su receptor de membrana (1).

1.1. CD86 soluble

CD86 soluble se genera principalmente por mecanismos de procesamiento alternativo (*splicing*) del ARNm (CD86 Δ TM) a nivel del exón 6, lo que da lugar a la pérdida del dominio transmembrana, si bien es posible que en ciertas condiciones se genere por la liberación de la forma unida a membrana. Esta forma soluble mantiene en su estructura dominios de la familia de las inmunoglobulinas (*Ig-like*) responsables de la unión al ligando. Así, se ha observado que la molécula CD86 Δ TM recombinante es capaz de unirse a CD28 y CTLA-4, y de coestimular linfocitos T de forma CD28 dependiente. Además, potencia la proliferación y producción de citocinas en linfocitos T estimulados a través de anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-CD3. También se ha descrito su capacidad para incrementar la activación de células T memoria estimuladas con un antígeno específico, detectándose un incremento en la proporción de células T memoria productoras de INF- γ específicas del virus de la gripe tras estimularlas con el péptido flu M1 (2). Se ha observado que la producción de ARNm CD86 Δ TM se restringe a monocitos no activados, sugiriendo que CD86s puede estar implicado en las fases iniciales de la respuesta inmune en las que tiene lugar la activación de las células T memoria. No obstante, el inicio de una respuesta inmunitaria específica requiere de la expresión exclusiva de CD86 de membrana, para generar una señal coestimuladora potente en los linfocitos T vírgenes (2). Los análisis de RT-PCR revelan que los transcritos de CD86s se

expresan en monocitos normales, células dendríticas y algunas células tumorales, pero no en células T, B y NK normales (3). También, se ha descrito la presencia de CD86s en el plasma de individuos normales, observándose niveles elevados en ciertas situaciones patológicas tales como leucemia (3-5), en individuos con asma durante los periodos de exacerbación (6) y en procesos autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) (7).

1.2. CD95 y CD95L solubles

CD95 soluble presenta diversas isoformas producidas por *splicing* alternativo del ARNm en las que se pierde la región transmembrana. Estas variantes mantienen los primeros 49 aminoácidos en posición N-terminal de la proteína madura responsables de su actividad funcional (8,9). CD95s es capaz de bloquear la unión de CD95 de membrana con su ligando (CD95L), inhibiendo así la apoptosis vía CD95/CD95L (10). Estudios previos han demostrado un aumento en la producción de CD95s en diversos procesos malignos como cáncer renal (11), cervical (12) y en enfermedades autoinmunes como LES (10). Asimismo, se ha observado un aumento respecto a controles sanos de CD95s en los pacientes con hepatopatías crónicas tales como cirrosis crónica por virus C o B, hepatocarcinoma, hepatitis autoinmune, cirrosis alcohólica y cirrosis biliar primaria (CBP), entre éstos, los pacientes con hepatocarcinoma, cirrosis por virus C y CBP muestran niveles superiores al resto (13-15).

CD95L soluble se genera por la rotura proteolítica del CD95L de membrana a través de la acción de metaloproteinasas de la matriz celular (16). Esta molécula es capaz de formar trímeros (17) y actuar como agente citotóxico causando apoptosis en las células que expresan CD95, aunque también se ha sugerido que tienen capacidad para inhibir la apoptosis mediada por CD95L de membrana en linfocitos T de sangre periférica (18). CD95Ls es producido por linfocitos T activados (19) y monocitos activados (20,21). Como ocurre con CD95, se ha observado el aumento en los niveles solubles de CD95L en diferentes estados patológicos como carcinoma de esófago (22) o carcinoma de vejiga (23), en enfermedades autoinmunes como hipertiroidismo de Graves (24) o en el líquido sinovial de enfermos con artritis reumatoide (25), también se han observado niveles elevados en pacientes con hepatitis crónica por virus B (14) y en otras hepatopatías crónicas como hepatitis autoinmune, CBP, cirrosis alcohólica y

cirrosis por virus C (13).

Son pocos los estudios en los que se analiza el papel de CD95s y CD95Ls en trasplante hepático, si bien se ha observado que los niveles de CD95s están aumentados en los receptores hepáticos con episodios de rechazo agudo (26,27) o receptores con recurrencia de hepatitis por virus C post-trasplante (28), no observándose diferencias en los niveles de CD95Ls.

El presente trabajo se planteó para determinar los niveles de las moléculas solubles CD86s, CD95s y CD95Ls, antes y después del trasplante hepático, con el fin de valorar su posible papel en el desarrollo de episodios de rechazo agudo.

2. Materiales y métodos

2.1. Pacientes

Se estudiaron un total de 69 trasplantes hepáticos realizados desde 1996 a 1998 en el Hospital U. Virgen de la Arrixaca de Murcia. Los criterios de inclusión de los pacientes en el estudio fueron: receptores de un primer trasplante hepático, disponibilidad de muestra y supervivencia superior a un mes, periodo de tiempo en el que se realizó el estudio. Las indicaciones para el trasplante mantenían una distribución semejante a la del estudio global del capítulo anterior: cirrosis alcohólica (28%), hepatitis crónica por virus B o C (32%), cirrosis alcohólica y vírica (10%), carcinoma (7%), amiloidosis (1%), cirrosis biliar primaria (4%), enfermedad de Wilson (3%), colangitis esclerosante (3%), hepatitis fulminante (1%), hepatitis autoinmune (1%) y otros (9%).

Del total de 69 receptores estudiados, 2 pacientes recibieron una inmunosupresión inicial consistente en OKT3, metilprednisolona y azatioprina durante 14 días. El tratamiento de mantenimiento consistió en esteroides, azatioprina y ciclosporina A. Los 67 pacientes restantes recibieron terapia triple con ciclosporina A o tacrolimus, metilprednisolona y azatioprina, tal como se describió previamente (29). Los episodios de rechazo agudo se trataron con altas dosis de metilprednisolona (bolus de 500 mg) durante 3-5 días.

2.2. Diagnóstico de rechazo agudo

El diagnóstico de rechazo agudo se realizó considerando los criterios clínicos, histológicos y bioquímicos estándar (30) descritos en el capítulo anterior y previamente publicados por nuestro grupo de investigación (31). En este grupo de pacientes únicamente se consideraron aquellos que habían sufrido episodios de rechazo agudo temprano, desarrollado dentro de las 6 primeras semanas post-trasplante. Los pacientes se dividieron en dos grupos,

de acuerdo a la presencia (RA) o ausencia (NRA) de episodios de rechazo agudo a lo largo del periodo estudiado. La incidencia de RA fue del 34.8% (24/69), con un tiempo de aparición promedio de 13.2 días.

2.3. Diagnóstico pre-trasplante de infección por VHB y VHC

La presencia de VHB y VHC pre-trasplante se evaluó en todos los pacientes sometidos a trasplante hepático. Los antígenos virales de VHB y los anticuerpos anti-VHC se analizaron en muestras de suero tal como se describe previamente (32). La infección por VHB se determinó analizando la presencia de los antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg) por técnicas radioinmunológicas (Sorin Biomedica, Perugia, Italia) y la hepatitis C por métodos de enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Ortho Pharmaceutical, Emeryville, CA) que permitía la detección de anticuerpos anti-VHC utilizando los antígenos recombinantes c22-3, c200 y NS5. Todos los casos VHC positivos fueron confirmados por técnicas de biología molecular RT-PCR (REAL, C.E. Durviz, Valencia), según las indicaciones del fabricante. En función de estos datos, los receptores se dividieron en dos grupos: aquellos en los que la indicación del trasplante era hepatitis vírica activa (VS), incluyendo VHB y VHC, y aquellos que presentaron otra patología de base (VN). La incidencia de hepatitis viral crónica en el grupo de estudio fue del 43.5% (30/69).

2.4. Recogida de sueros

Las muestras de suero se obtuvieron a partir de 10 mL de sangre periférica recolectada en tubos secos apirogenos (Venoject, Terumo Europe), en el periodo pre-trasplante, durante la segunda semana post-trasplante (7-14 días) y en la tercera semana post-trasplante (15-21 días). El coágulo se dejó formar durante una hora a temperatura ambiente. Inmediatamente, los tubos se centrifugaron a 1.000xg durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante. Las muestras de suero se alicuotaron (1 mL) en tubos de congelación de 2 mL (Greiner, Labotechnik) y se guardaron a -20°C hasta su uso.

2.5. Determinación de CD86s, CD95s y CD95Ls

La cuantificación de CD86s, CD95s y CD95Ls en suero se realizó por técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA) utilizando los kits comerciales sCD86 ELISA Kit, sCD95 (APO1/Fas) ELISA Kit y Soluble Fas-L ELISA Kit (Diacclone Research, UK) respectivamente, según las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se realizaron por duplicado y la lectura final de la placa se llevó a cabo con un espectrofotómetro

(Anthos Labtec Instruments, Austria) a una longitud de onda primaria de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 620 nm.

2.6. Determinación del polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L

El análisis del polimorfismo de los genes CD86 (CD86 +1057), CD95 (CD95 -670 y -1377) y CD95L (IVS2nt-124 y IVS3nt169), se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior.

2.7. Análisis estadístico

Los valores obtenidos en las mediciones de CD86s, CD95s y CD95Ls para cada uno de los grupos se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM), la comparación de los valores obtenidos en los distintos grupos se realizó por medio del test U de Mann-Whitney. La comparación de los valores de CD86s, CD95s y CD95Ls en función del polimorfismo alélico de los respectivos genes se realizó utilizando el test de Kruskal-Wallis. El test multivariante de regresión logística se usó para ajustar un modelo que permitiera predecir la asociación de cada una de las variables analizadas con los episodios de rechazo agudo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS v10.0 (SPSS Inc, Illinois, USA), fijando la significación estadística para $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. CD86s y rechazo agudo

En la figura 1A se resumen los resultados obtenidos en el análisis de CD86s en los grupos RA y NRA durante el primer mes post-trasplante. Como se puede observar, los niveles en suero previos al trasplante de CD86s en el grupo RA resultaron significativamente superiores a los receptores del grupo NRA (1007 \pm 82 U/mL vs 739 \pm 46 U/mL, $p=0.006$). Este dato parece indicar que niveles elevados de CD86s en el periodo pre-trasplante pueden favorecer la aparición de episodios de RA en los receptores hepáticos. En la segunda semana post-trasplante, se observa una caída brusca del CD86s en suero, tanto en los pacientes del grupo RA y NRA (387 \pm 24 U/mL vs 324 \pm 20 U/mL); esta disminución fue significativa en ambos grupos ($p < 0.001$), si bien los niveles de CD86s en los pacientes del grupo RA permanecieron significativamente superiores a los del grupo NRA ($p=0.036$), coincidiendo con el periodo de mayor incidencia de episodios de rechazo agudo. En la tercera semana post-trasplante, los niveles de CD86s siguen disminuyendo significativamente en los pacientes del grupo NRA (283 \pm 15 U/mL, $p < 0.001$),

por el contrario, se mantienen en el grupo RA (363 \pm 47 U/mL), si bien la diferencias con el grupo NRA no alcanzan la significación en este periodo.

3.2. CD95s y rechazo agudo

Los resultados del estudio de evolución de CD95s en transplantados hepáticos se muestran en la figura 1B. Los datos indican que no existen diferencias significativas en los niveles de CD95s entre los receptores del grupo NRA y RA (247 \pm 27 pg/mL vs 265 \pm 36 pg/mL) en las muestras previas al trasplante. En la segunda semana post-trasplante se produce una ligera elevación en los niveles de CD95s en ambos grupos (NRA, 303 \pm 23 pg/mL; RA, 328 \pm 28 pg/mL), si bien, este aumento solo es significativo en el grupo NRA ($p=0.017$). No obstante, las diferencias entre ambos grupos no son significativas. En la tercera semana post-trasplante, no se aprecian cambios significativos en los niveles séricos de CD95s en ambos grupos (NRA, 314 \pm 29 pg/mL; RA, 359 \pm 47 pg/mL).

3.3. CD95Ls y rechazo agudo

La figura 1C muestra los niveles de CD95Ls en relación a la incidencia de RA a lo largo del primer mes post-trasplante. Los resultados muestran que los niveles de CD95Ls en el periodo pre-trasplante son ligeramente superiores en los receptores del grupo RA que en los del grupo NRA (392 \pm 76 pg/mL y 303 \pm 48 pg/mL, respectivamente), si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas. Como ocurría con la molécula CD86s, en la segunda semana post-trasplante se observa una caída estadísticamente significativa en los niveles séricos de CD95Ls en ambos grupos (NRA, 113 \pm 19 pg/mL, RA; 145 \pm 28 pg/mL, $p < 0.001$). Aunque los valores de CD95Ls son ligeramente superiores en el grupo RA que en el grupo NRA, diferencias que no fueron estadísticamente significativas. En la tercera semana post-trasplante, los niveles de CD95Ls apenas sufren variaciones, pues únicamente se observa una ligera disminución en el grupo de RA (NRA, 118 \pm 22 pg/mL; RA, 103 \pm 31 pg/mL), pero tampoco en este caso las diferencias resultan estadísticamente significativas.

3.4. Evolución de CD86s, CD95s y CD95Ls en función de la patología de base

Como hemos observado, los niveles serológicos pre-trasplante de las moléculas analizadas, especialmente CD86s, pueden condicionar la aparición de episodios de rechazo agudo. Es interesante, por lo tanto, determinar si existe alguna patología primaria del hígado que altere los niveles séricos de CD86s, CD95s y CD95Ls.

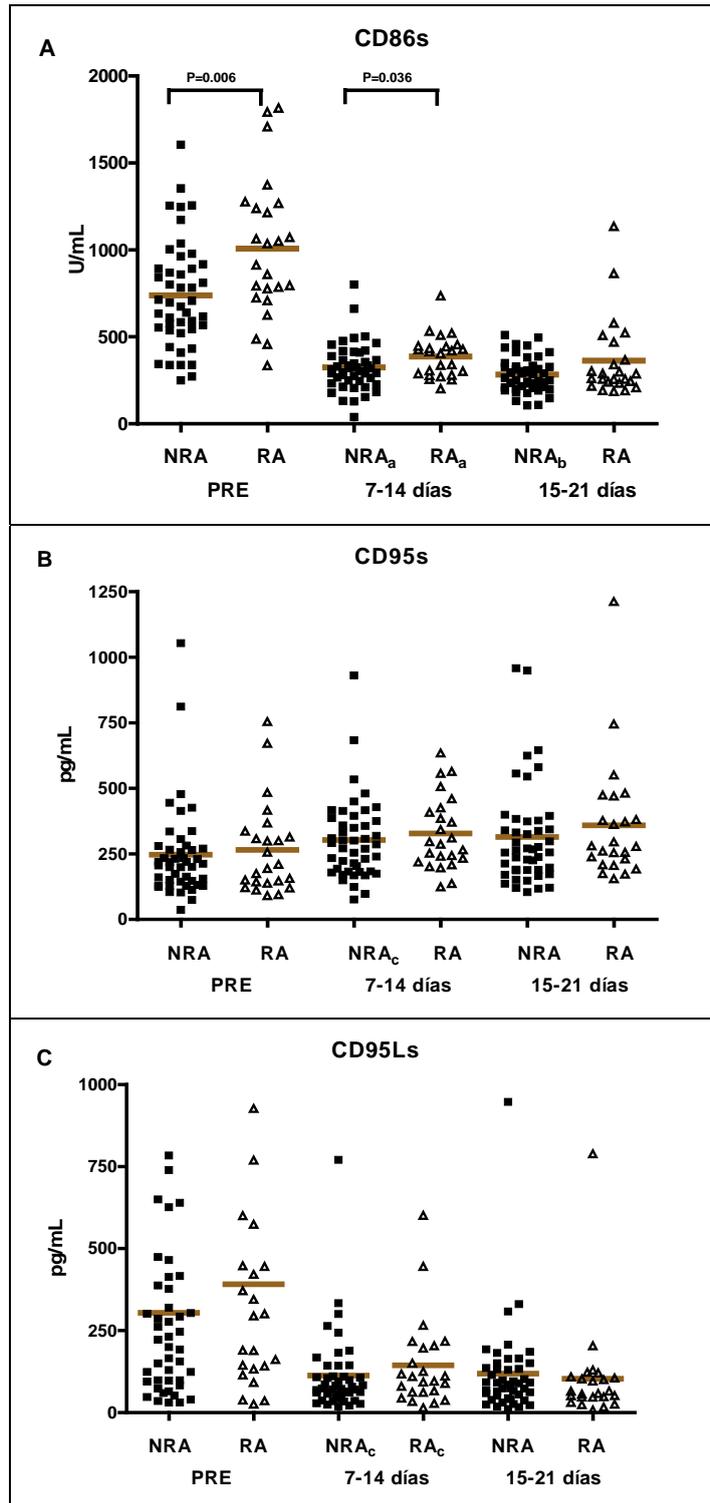


Fig.1. Niveles de CD86s, CD95s y CD95Ls en los grupos RA y NRA. A) CD86s, a, diferencias entre pre-trasplante y 2ª semana $p < 0.001$. b, diferencias entre la 2ª y 3ª semana $p < 0.001$. B) CD95s, c, diferencias entre pre-trasplante y la 2ª semana $p = 0.017$. C) CD95Ls, d, diferencias entre pre-trasplante y la 2ª semana; $p < 0.001$.

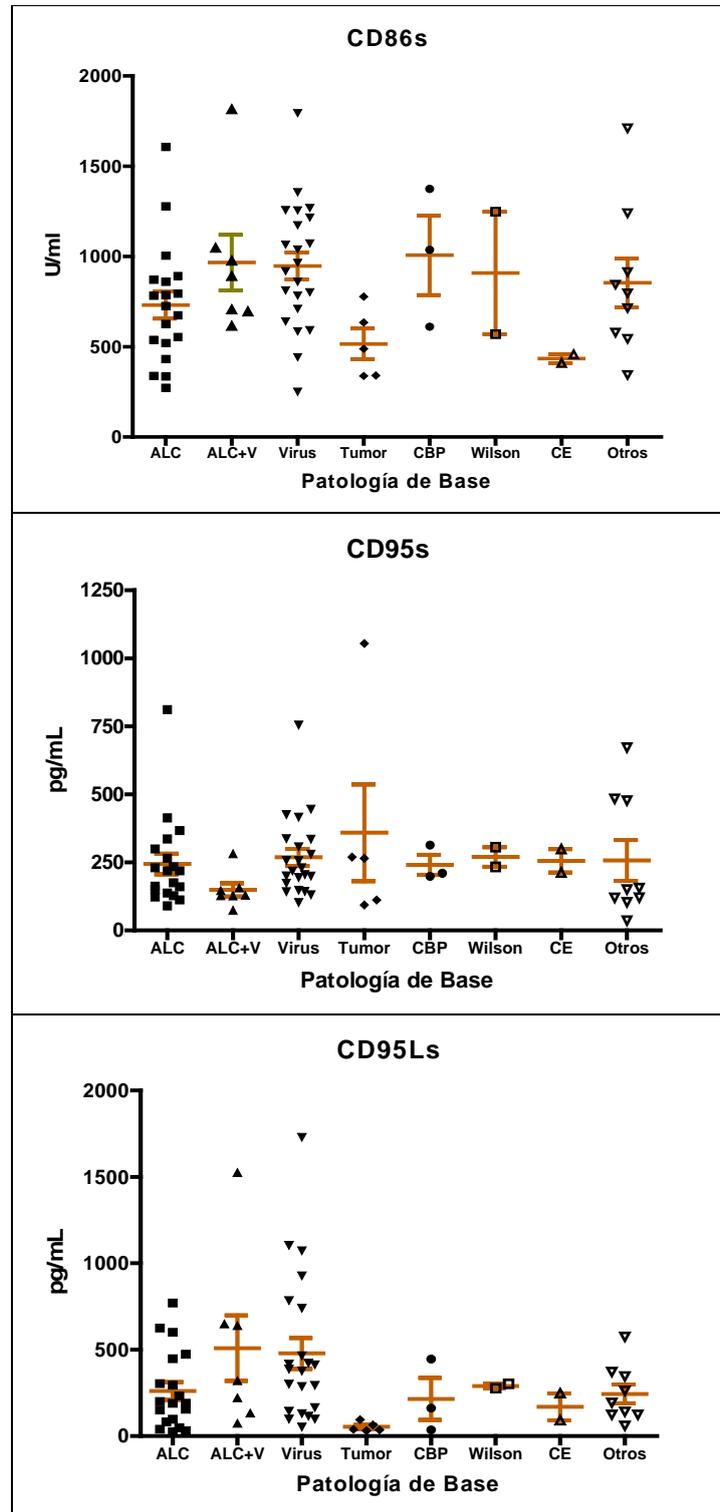


Fig.2. Expresión basal de CD86s, CD95s y CD95Ls en las distintas patologías de base (media±SEM). ALC, cirrosis alcohólica; ALC+V, cirrosis alcohólica y VHC y/o VHB; Virus, VHC y/o VHB; Tumor, hepatocarcinoma; CBP, cirrosis biliar primaria; CE, colangitis esclerosante.

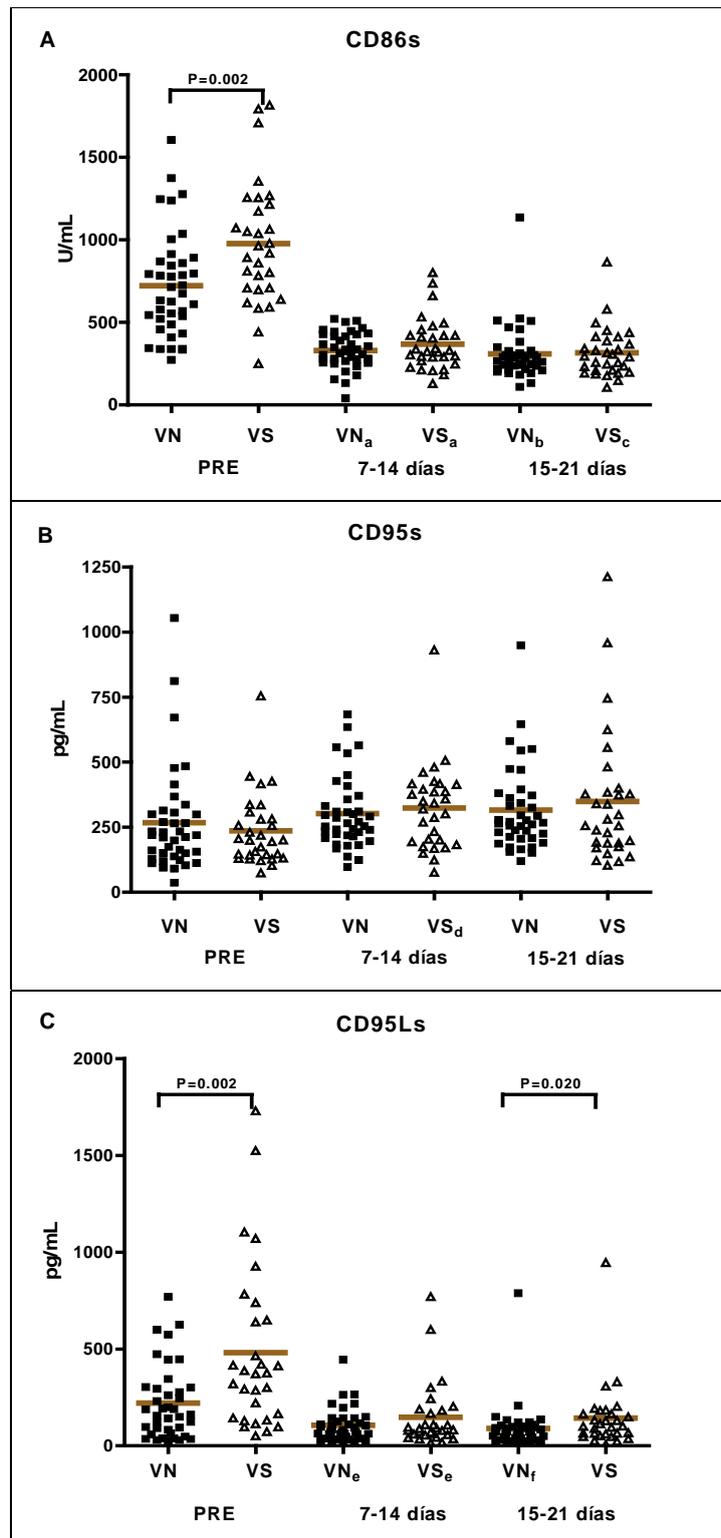


Fig.3. Niveles de CD86s, CD95s y CD95Ls en los grupos VS y VN. A) CD86s, a' diferencias entre pre-trasplante y 2ª semana; $p < 0.001$, b y c, diferencias entre 2ª y 3ª semana; $p = 0.004$, $p = 0.016$ s. B) CD95s, d, diferencias entre pre-trasplante y 2ª semana; $p = 0.011$. C) CD95Ls, e, diferencias entre pre-trasplante y 2ª semana $p < 0.001$, f, diferencias entre 2ª y 3ª semana; $p = 0.049$.

En la figura 2 se muestran los niveles basales de estas moléculas en función de la patología de base. Es importante destacar que los pacientes con presencia de infecciones VHC y/o VHB presentan unos niveles elevados de CD86s y CD95Ls, pero no muestran diferencias importantes en los valores de CD95s entre los diferentes grupos analizados. Debido a estos resultados y a que las infecciones crónicas producen una activación continuada del sistema inmunológico, dividimos a los receptores hepáticos en dos grandes grupos atendiendo a la patología de base: aquellos que presentaban infecciones crónicas por VHC o VHB (VS) y los que presentaba otro tipo de patología de base (VN). El grupo VS está constituido por un total de 30 receptores hepáticos de los cuales 18 (60%) son VHC+, 7 (23%) presentan cirrosis alcohólica VHC+ y/o VHB+, 4 (13%) son VHC+ y VHB+ y 1 (3%) es VHB+. El grupo VN está integrado por 39 receptores, de los cuales 19 (49%) padecían cirrosis alcohólica, 5 (13%) hepatocarcinoma, 3 (8%) cirrosis biliar primaria, 2 (5%) colangitis esclerosante, 2 (5%) enfermedad de Wilson y 8 (21%) con otras patologías. Cuando se analizó la incidencia de RA en función de estos dos grupos establecidos de acuerdo a la presencia o ausencia de infecciones, no se observan diferencias significativas: en el grupo VS la incidencia de RA es del 30% (9/30) mientras que en el grupo VN la incidencia es del 38.5% (15/39). Esto parece indicar que las infecciones crónicas por VHC o VHB no constituyen un claro factor de riesgo para la aparición de episodios de RA.

3.5. CD86s y virus

En la figura 3A se resumen los resultados del análisis de CD86s en función de la presencia de infecciones crónicas pre-trasplante. Los resultados muestran como los pacientes del grupo VS presentan unos niveles de CD86s en suero en el pre-trasplante significativamente superiores a los del grupo VN (VS, 977±69 U/mL; VN, 722±51 U/mL, $p < 0.002$). Al igual que ocurría en el análisis anterior en función del RA, en la segunda semana se observa una caída significativa ($p < 0.001$) en los niveles de CD86s en ambos grupos (VS, 368±29 U/mL; VN, 330±18 U/mL), pese a que los niveles medios eran superiores en el grupo VS, estas diferencias no fueron significativas. En la tercera semana post-trasplante, se sigue observando una disminución significativa en los valores de CD86s, tanto en el grupo VS (315±28 U/mL, $p < 0.016$) como en el grupo VN (308±27 U/mL, $p < 0.004$), que llegaron a ser muy similares en ambos grupos. Tal como se puede observar, hay una serie de siete pacientes en el grupo VN con unos valores elevados de CD86s (> 1000 U/mL), grupo en el que la distribución de patologías de base es: cirrosis alcohólica (n=3), CBP (n=2), enfermedad de Wilson

(n=1) y hepatitis autoinmune (n=1). Precisamente se trata de un grupo en el que la incidencia de RA es muy elevada (4/7, 57%).

3.6. CD95s y virus

Los resultados del análisis de expresión sérica de CD95s en los grupos VS y VN a lo largo del tiempo se muestran en la figura 3B. Los niveles pre-trasplante de CD95s son similares en ambos grupos (VS, 235±25 pg/mL; VN, 267±33 pg/mL). Frente a lo observado para CD86s, en la segunda semana post-trasplante se observa un ligero aumento de CD95s en ambos grupos (VS, 323±30 pg/mL; VN, 302±22 pg/mL), si bien, estas variaciones fueron estadísticamente significativas sólo en el grupo VS ($p = 0.011$). En la tercera semana post-trasplante, los niveles de CD95s en el grupo VN apenas sufrían variaciones (316±26 pg/mL), mientras que en el grupo VS se observaba un ligero incremento (349±47 pg/mL), si bien no estadísticamente significativo.

3.7. CD95Ls y virus

Los datos de CD95Ls en suero en los grupos VS y VN se representan en la figura 3C. En dicha figura, se puede observar como los pacientes del grupo VS presentan unos niveles de CD95Ls significativamente superiores y que llegan a duplicar los del grupo VN (VS, 482±78 pg/mL; VN, 221±31 pg/mL; $p = 0.002$). En la segunda semana post-trasplante, los niveles se reducen significativamente ($p = 0.001$) en ambos grupos (VS, 147±31 pg/mL; VN, 106±14 pg/mL). Pese a que los valores de CD95Ls fueron ligeramente superiores en el grupo VS que en el grupo VN, dichas diferencias no alcanzaron la significación estadística. En la tercera semana post-trasplante, mientras en el grupo VS CD95Ls no varía (143±31 pg/mL), en el grupo VN sigue disminuyendo de manera significativa (90±20 pg/mL, $p = 0.049$). Debido a esto, los niveles de CD95Ls en la tercera semana post-trasplante resultaron significativamente superiores en el grupo VS comparados con los del grupo VN ($p = 0.020$).

3.8. Valores de CD86s, CD95s y CD95Ls en función de la incidencia de RA y la patología de base

A la vista de los resultados obtenidos al considerar de forma independiente la incidencia de RA (RA vs NRA) y la patología de base (VS vs VN), se analizaron también los niveles de las moléculas CD86s, CD95s y CD95Ls en suero valorando conjuntamente la presencia de RA y la patología de base. Para ello se establecieron cuatro grupos: NRA/VN (n=24), NRA/VS (n=21), RA/VN (n=15) y RA/VS (n=9), que se compararon dos a dos: NRA/VN vs NRA/VS y RA/VN vs RA/VS.

Tabla 1. CD86s, CD95s y CD95Ls en función de la incidencia de rechazo agudo y la patología de base

Día	Rechazo Agudo	Virus	CD86s (U/mL)	CD95s (pg/mL)	CD95Ls (pg/mL)
Pre	No	No	652±64	273±46	177±30
		Si	838±61*	218±22	448±87§
	Si	No	832±78	258±42	290±60
		Si	1300±129°	277±68	560±168
2ª-Semana	No	No	307±22	287±27	83±11
		Si	343±35	321±39	147±37
	Si	No	365±27	327±39	143±29
		Si	425±47	330±43	148±59
3ª-Semana	No	No	274±19	318±39	74±10
		Si	294±24	310±45	170±43‡
	Si	No	362±62	311±31	117±49
		Si	364±74	440±114	81±20

* VS vs VN en NRA; p=0.01, §, VS vs VN en NRA; p=0.002, °, VS vs VN en RA; p=0.010, ‡ VS vs VN en NRA; p=0.009.

Los resultados de este análisis comparativo entre grupos, se resumen en la tabla 1. Como se puede observar, en el periodo pre-trasplante, tanto los pacientes del grupo NRA/VS como los del RA/VN presentan niveles de CD86s en el periodo pre-trasplante significativamente superiores que los de los grupos NRA/VN y RA/VN (p=0.011 y p=0.010, respectivamente). Sin embargo, mientras los pacientes del grupo NRA/VS comparados con los del grupo NRA/VN presentan un incremento significativo de CD95Ls en el pre-trasplante (p=0.002), en los del grupo RA/VS los niveles de CD95Ls son estadísticamente comparables a los del grupo RA/VN. Tomados estos resultados en conjunto, se puede concluir que, los pacientes de los grupos NRA/VS, RA/VN y RA/VS tienen niveles de CD86s elevados en el pre-trasplante, pero a diferencia de los otros dos grupos, los del grupo NRA/VS presentan unos niveles de CD95Ls proporcionalmente más elevados, lo que parece relacionarse con el hecho de que los pacientes de este último grupo presenten una menor incidencia de episodios de RA.

El análisis de estas moléculas en el periodo post-trasplante, muestra que en la comparación de grupos NRA/VN vs NRA/VS y RA/VN vs RA/VS, no se observan diferencias significativas, con la excepción de una elevación significativa de CD95Ls en el grupo

NRA/VS en la tercera semana post-trasplante respecto al grupo NRA/VN (p=0.009).

Asimismo, se realizó un análisis multivariante con el fin de confirmar cuáles de estos factores están independientemente relacionados con la aparición de episodios de RA. Para ello se consideraron los niveles séricos CD86s, CD95s y CD95Ls tanto del periodo pre- como post-trasplante, junto con la patología de base, analizada de forma global o considerando la infección crónica por VHC o VHB (VS vs VN). Los resultados de este análisis confirman que tan solo los niveles de CD86s en el periodo pre-trasplante (p=0.005, OR=2.1, IC 95%=1.27-3.47) (OR calculada para incrementos de 250 unidades de CD86s) se puede asociar de forma independiente con la aparición de episodios de RA.

3.9. Asociación del polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L y expresión de CD86s, CD95s y CD95Ls

En la figura 4 se muestra el estudio comparativo de la expresión basal de CD86s, CD95s y CD95Ls en función del polimorfismo de los respectivos genes, CD86 (CD86 +1057), CD95 (CD95 -670 y -1377) y CD95L (IVS2nt-124 y IVS3nt169). Los datos indican una ausencia de asociación entre los niveles serológicos de las moléculas CD86s, CD95s y CD95L

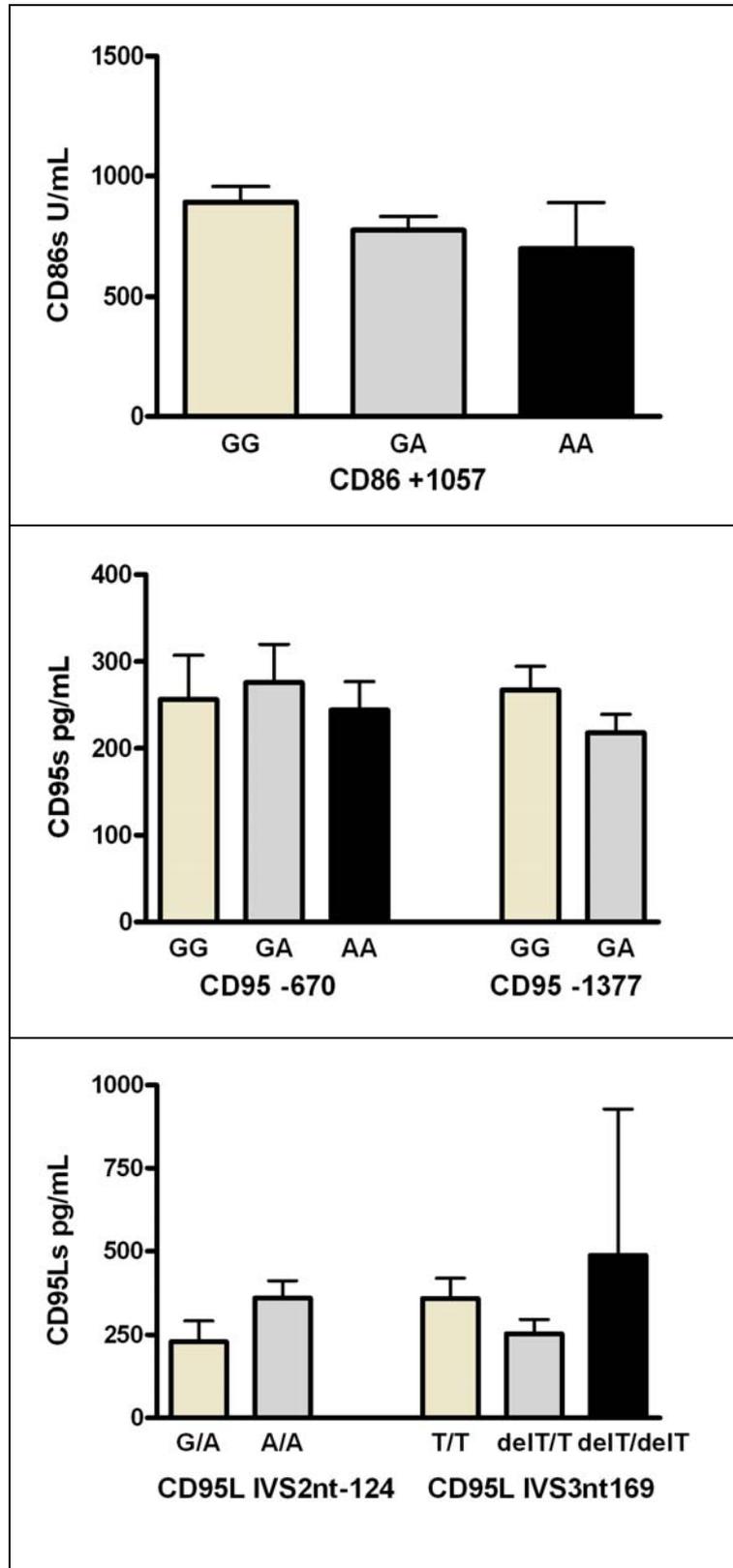


Fig.4. Expresión basal de CD86s, CD95s y CD95Ls de acuerdo con los polimorfismos de los respectivos genes.

y las variantes genéticas estudiadas. No obstante, es conveniente considerar que en la serie estudiada no se encontraron pacientes portadores de las variantes AA de CD95 -1377, ni de GG para CD95L IVS2nt-124. Además, de la variante delT/delT de CD95L IVS3nt169 solo hay dos casos y ambos presentan valores de CD95Ls muy dispares (927 y 48 pg/mL, respectivamente). Tampoco se detectaron diferencias significativas cuando se realizó el análisis de los valores de CD86s, CD95s y CD95Ls obtenidos en la segunda y tercera semana post-trasplante.

4. Discusión

En el presente trabajo se analizan por primera vez de forma conjunta los niveles de expresión de las formas solubles de moléculas implicadas en la coestimulación (CD86s) y en los mecanismos de apoptosis (CD95s y CD95Ls) en pacientes sometidos a trasplante hepático, considerando tanto los niveles basales (pre-trasplante) como su evolución a lo largo del primer mes post-trasplante.

Nuestros resultados indican que los pacientes que sufren episodios de RA parten de unos niveles basales de CD86s significativamente superiores que los receptores del grupo NRA. A lo largo del periodo post-trasplante se observa una disminución generalizada de los niveles de CD86s. Esta disminución puede ser debida a los efectos del tratamiento inmunosupresor, lo que está en línea con lo descrito previamente para la expresión de CD86 de membrana en linfocitos B (33) y en células dendríticas (34-36). Sin embargo, en los receptores del grupo RA la disminución de los niveles post-trasplante de CD86s es más reducida, comportamiento que puede justificarse por diferentes causas tales como, al hecho de que partan de niveles basales de CD86s más elevados, un posible aumento de los niveles séricos de CD86s durante los episodios de rechazo agudo o incluso una menor sensibilidad al tratamiento inmunosupresor.

Tal como se ha descrito previamente, ciertas patologías como leucemia, LES y asma, pueden provocar un aumento en los niveles de CD86s (3-7). En el presente trabajo describimos por primera vez que los receptores con infecciones crónicas por virus hepatotróficos (VHC y VHB) presentan unos niveles de CD86s significativamente superiores al resto de patologías, si bien se puede observar de forma individual como pacientes con otro tipo de patologías de base pueden presentar niveles elevados de CD86s. El significado biológico de CD86s *in vivo* y el efecto que los niveles elevados de esta molécula pueden tener en la evolución del injerto hepático es desconocido, sin embargo, se ha descrito que la molécula CD86s parece

tener un efecto coestimulador tras unirse a su co-receptor CD28 (2,37), ejerciendo un papel fundamental en la activación del sistema inmunitario. Según estos datos, cabe especular que los receptores con niveles basales de CD86s elevados serían más sensibles al desarrollo de una respuesta alógena robusta y, por lo tanto, al desarrollo de episodios de RA. No obstante, otros estudios han indicado un efecto inhibitorio de CD86s en la respuesta inmunitaria que se justifica por una unión preferencial con CTLA-4, que se traduciría en señales negativas al interior del linfocito T (38). Estos datos, junto a nuestros resultados en trasplante, sugieren que en realidad el efecto final en la respuesta inmune se vería condicionado por el balance de las señales positivas y negativas generadas por CD86s en el linfocito T. No obstante, es posible que el mayor estado de activación que comporta la respuesta alógena propicie la sobre-expresión de CD28 en linfocitos T y su interacción con CD86s, redundando finalmente en un aumento de la activación.

CD86s es producido de forma constitutiva por monocitos y células dendríticas (3), además en pacientes con asma, se ha observado una correlación entre los niveles de CD86s y el número de linfocitos, eosinófilos y monocitos de sangre periférica pero no en neutrófilos (6). Sin embargo, en nuestro grupo de estudio no observamos tal correlación (datos no mostrados) lo que indicaría que la producción de CD86s podría ser debida a la acción de un reducido número de células de sangre periférica o a la actividad de células localizada en tejidos linfoides secundarios.

Aunque los niveles de CD95s en el periodo pre-trasplante fueron similares en los pacientes con episodios de RA y los pacientes con trasplante estable, a lo largo del periodo de seguimiento, se observó un ligero aumento, si bien no significativo, en los niveles de CD95s entre los dos grupos estudiados. Es preciso destacar que estos resultados no coinciden con los descritos previamente, en los que se observaba un aumento de CD95s en aquellos pacientes sometidos a trasplante hepático que sufrían episodios de RA (26,27). Estas discrepancias pueden ser debidas al hecho de que en esos trabajos se estudien trasplantes con donantes vivos, al predominio de distintas patologías de base en la serie incluidas o incluso al tipo de tratamiento empleado en ambos trabajos, principalmente FK506.

Con respecto a CD95Ls, los pacientes con una mayor incidencia de RA presentan niveles pre-trasplante de CD95Ls ligeramente superiores que los pacientes estables. La marcada disminución de los niveles de CD95Ls observada tanto en el grupo de RA como en el de NRA, se mantiene a lo largo de todo el periodo de estudio. Como ocurría para CD86s, este efecto puede ser debido al tratamiento

inmunosupresor, dado que se ha descrito una disminución de CD95L de membrana tras el tratamiento con CsA, FK506 o glucocorticoides (39,40); no obstante, también se ha observado el aumento en la expresión de CD95L y CD95 en monocitos tras el tratamiento con glucocorticoides en forma dosis dependiente (41). El análisis de la expresión basal de CD95Ls en función de la patología de base, revela que los pacientes con infecciones crónicas por VHB y VHC presentan unos niveles significativamente superiores al resto de patologías, tal como se ha descrito en estudios previos (13,14). Además, el hecho de que en la tercera semana post-trasplante los pacientes del grupo VN presenten valores inferiores que los del grupo VS que se mantienen a lo largo del tiempo, podría indicar bien una mayor sensibilidad al tratamiento del grupo VN, o bien una posible reactivación inmunológica dentro del grupo VS. Así pues, dado que CD95Ls se produce principalmente en linfocitos T (19) y en monocitos activados (20,21) por rotura proteolítica del CD95L de membrana a través de la acción de metaloproteinasas (16), cabe pensar que niveles elevados de CD95Ls son indicadores del grado de activación del sistema inmunitario, por lo que es lógico pensar que los pacientes con infecciones crónicas o procesos autoinmunes puedan presentar niveles elevados de esta molécula. A pesar de que su papel fisiológico es controvertido, CD95Ls se ha descrito como una molécula con actividad inductora de apoptosis en células que expresan CD95 (17,42). Por lo tanto, si se considera que CD95L sea capaz de inducir tolerancia específica por apoptosis y delección clonal de linfocitos T específicos de antígeno (43,44), se puede inferir que los pacientes con niveles elevados de CD95Ls pueden presentar una respuesta reducida frente a los aloantígenos del donante hepático, debido a un proceso de delección clonal por apoptosis de los linfocitos T alorreactivos. No obstante, otros trabajos asignan a CD95Ls un papel anti-apoptótico por su capacidad para competir con CD95L de membrana por la unión con CD95 (18). Además, conviene considerar que CD95Ls puede ejercer un papel en la patogenia del daño tisular induciendo la destrucción del epitelio pulmonar en pacientes con daño pulmonar agudo (45), fallo hepático y muerte en ratones inoculados con *Propionibacterium acnes* (46), y en enfermedades reumáticas (47), por lo que, los niveles elevados pre-trasplante podrían favorecer el daño en el tejido hepático trasplantado. Así, su papel final en la evolución del injerto hepático dependerá del balance entre ambos efectos.

Considerando los resultados globalmente, podemos pensar que de forma conjunta pueden coexistir señales que contribuyan a potenciar la respuesta alógena, en la que estaría implicada la molécula CD86s, y señales inductoras de la tolerancia al injerto mediante

mecanismos de apoptosis, entre las que se encontraría CD95Ls. El balance entre estas dos moléculas podría condicionar, al menos en parte, la aceptación del injerto hepático, de tal modo que ciertos pacientes con niveles elevados de CD86s no sufrirían episodios de RA, cuando presenten simultáneamente una elevación en los niveles de CD95Ls. Por otro lado, el análisis multivariante reveló que tan solo los niveles basales de CD86s se asocian significativamente con la mayor incidencia de episodios de rechazo agudo. Sin embargo, no ha sido posible demostrar que las variantes genéticas de CD86 (CD86 +1057), CD95 (CD95 -670 y -1377) y CD95L (IVS2nt-124 y IVS3nt169) condicionen una mayor o menor expresión de las respectivas formas solubles.

En resumen, podemos decir que los niveles pre-trasplante de CD86s y CD95Ls median en el proceso de respuesta alógena, repercutiendo en la mejor o peor aceptación del injerto hepático. Así, su determinación sérica podría ser de ayuda para la indicación de tratamientos inmunosupresores personalizados, que selectivamente contribuyan a mejorar la buena aceptación del injerto hepático. Asimismo, un mejor conocimiento de los mecanismos de acción de estas moléculas podría ayudar a proponer su uso como posibles agentes inductores de la tolerancia al injerto, e incluso ser la base para el desarrollo de nuevos fármacos que permitan controlar la expresión de estas moléculas para reducir el grado de respuesta alógena.

5. Referencias

1. Heaney ML, Golde DW. Soluble cytokine receptors. *Blood* 1996;87:847-857.
2. Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP et al. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity* 2000;13:303-312.
3. Hock BD, Patton WN, Budhia S et al. Human plasma contains a soluble form of CD86 which is present at elevated levels in some leukaemia patients. *Leukemia* 2002;16:865-873.
4. Hock BD, McKenzie JL, Patton WN et al. The clinical significance of soluble CD86 levels in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2003;98:1681-1688.
5. Hock BD, Drayson M, Patton WN et al. Circulating levels and clinical significance of soluble CD86 in myeloma patients. *Br J Haematol* 2006;133:165-172.
6. Shi HZ, Xie ZF, Deng JM, Chen YQ, Xiao CQ. Soluble CD86 protein in serum samples of patients with asthma. *Thorax* 2004;59:870-875.
7. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:989-994.
8. Cascino I, Papoff G, Eramo A, Ruberti G. Soluble Fas/Apo-1 splicing variants and apoptosis. *Front Biosci* 1996;1:d12-d18.

9. Papoff G, Cascino I, Eramo A et al. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *J Immunol* 1996;156:4622-4630.
10. Cheng J, Zhou T, Liu C et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;263:1759-1762.
11. Kimura M, Tomita Y, Imai T et al. Significance of serum-soluble CD95 (Fas/APO-1) on prognosis in renal cell cancer patients. *Br J Cancer* 1999;80:1648-1651.
12. Aguilar-Lemarroy A, Romero-Ramos JE, Olimon-Andalon V et al. Apoptosis induction in Jurkat cells and sCD95 levels in women's sera are related with the risk of developing cervical cancer. *BMC Cancer* 2008;8:99.
13. Tortorella C, Sacco R, Orlando P et al. sICAM-1, sCD95 and sCD95L levels in chronic liver diseases of different etiology. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000;22:19-33.
14. Song le H., Binh VQ, Duy DN et al. Variations in the serum concentrations of soluble Fas and soluble Fas ligand in Vietnamese patients infected with hepatitis B virus. *J Med Virol* 2004;73:244-249.
15. El Bassiouny AE, El-Bassiouni NE, Nosseir MM et al. Circulating and hepatic Fas expression in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Medscape J Med* 2008;10:130.
16. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 1995;182:1777-1783.
17. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995;14:1129-1135.
18. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997;186:2045-2050.
19. Tanaka M, Suda T, Haze K et al. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996;2:317-322.
20. Kiener PA, Davis PM, Rankin BM et al. Human monocyte cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J Immunol* 1997;159:1594-1598.
21. Brown SB, Savill J. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol* 1999;162:480-485.
22. Kozłowski M, Kowalczyk O, Sulewska A et al. Serum soluble Fas ligand (sFasL) in patients with primary squamous cell carcinoma of the esophagus. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:199-204.
23. Mizutani Y, Hongo F, Sato N et al. Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. *Cancer* 2001;92:287-293.
24. Wang CY, Zhong WB, Chang TC, Tsai YF. Circulating soluble Fas ligand correlates with disease activity in Graves' hyperthyroidism. *Metabolism* 2002;51:769-773.
25. Hashimoto H, Tanaka M, Suda T et al. Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:657-662.
26. Wang YL, Zhang YY, Li G et al. Correlation of CD95 and soluble CD95 expression with acute rejection status of liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2005;11:1700-1704.
27. Seino K, Kayagaki N, Yamaguchi N et al. Soluble forms of CD95 and CD95 ligand after living related liver transplantation. *Transplantation* 1999;67:634-636.
28. Crespo J, Rivero M, Mayorga M et al. Involvement of the fas system in hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000;6:562-569.
29. Minguela A, Marin L, Torio A et al. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 costimulatory molecules are mainly involved in acceptance or rejection of human liver transplant. *Hum Immunol* 2000;61:658-669.
30. Mor E, Solomon H, Gibbs JF et al. Acute cellular rejection following liver transplantation: clinical pathologic features and effect on outcome. *Semin Liver Dis* 1992;12:28-40.
31. Adams DH, Neuberger JM. Patterns of graft rejection following liver transplantation. *J Hepatol* 1990;10:113-119.
32. Ontañón J, Muro M, Garcia-Alonso AM et al. Effect of partial HLA class I match on acute rejection in viral pre-infected human liver allograft recipients. *Transplantation* 1998;65:1047-1053.
33. Jirapongsananuruk O, Leung DY. The modulation of B7.2 and B7.1 on B cells by immunosuppressive agents. *Clin Exp Immunol* 1999;118:1-8.
34. Piemonti L, Monti P, Allavena P et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999;162:6473-6481.
35. Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW et al. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1807-1812.
36. Lee JI, Ganster RW, Geller DA et al. Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. *Transplantation* 1999;68:1255-1263.
37. Rennett P, Furlong K, Jellis C et al. The IgV domain of human B7-2 (CD86) is sufficient to co-stimulate T lymphocytes and induce cytokine secretion. *Int Immunol* 1997;9:805-813.
38. Flo J, Tisminetzky S, Baralle F. Codelivery of DNA coding for the soluble form of CD86 results in the down-regulation of the immune response to DNA vaccines. *Cell Immunol* 2001;209:120-131.
39. Brunner T, Yoo NJ, LaFace D, Ware CF, Green DR. Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. *Int Immunol* 1996;8:1017-1026.
40. Strauss G, Osen W, Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol* 2002;128:255-266.
41. Schmidt M, Luger N, Luger A et al. Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol* 2001;166:1344-1351.
42. Sieg S, Smith D, Kaplan D. Differential activity of soluble versus cellular Fas ligand: regulation by an accessory molecule. *Cell Immunol* 1999;195:89-95.
43. Zhan HG, Mountz JD, Fleck M, Zhou T, Hsu HC. Specific deletion of autoreactive T cells by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen-presenting cells. *Immunol Res* 2002;26:235-246.
44. Vacchio MS, Hodes RJ. Fetal expression of Fas ligand is necessary and sufficient for induction of CD8 T cell tolerance to

- the fetal antigen H-Y during pregnancy. *J Immunol* 2005;174:4657-4661.
45. Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP et al. Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J Immunol* 1999;163:2217-2225.
46. Tanaka M, Suda T, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S. Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *J Immunol* 1997;158:2303-2309.
47. Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y et al. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997;40:1126-1129.

*Lo verdadero es siempre sencillo,
pero solemos llegar a ello por
el camino más complicado.
(George Sand)*

CAPÍTULO 3

CAPITULO 3

Cuantificación de apoptosis y proliferación en CML por citometría de flujo.

1. Introducción

Antes de abordar la monitorización celular de la respuesta alógena *in vivo* en el contexto del trasplante hepático, se decidió poner a punto un método citométrico que nos permitiera de forma simultánea, cuantificar los niveles de proliferación y apoptosis que tiene lugar en el modelo clásico de cultivo alógeno *in vitro*. Esto nos permitiría contextualizar los resultados obtenidos de la monitorización *in vivo* con los con los derivados de los experimentos *in vitro*. La puesta a punto y validación de este método se describe en el presente capítulo.

La apoptosis o muerte celular programada, a diferencia de la muerte por necrosis, es un proceso metabólicamente activo, que juega un papel fundamental en la regulación del desarrollo de tejidos y órganos durante la embriogénesis, así como en el recambio celular de tejidos adultos, incluyendo el sistema inmunitario (1). Así, por ejemplo, es primordial en la selección negativa de células T inmaduras en el timo, en la deleción periférica de linfocitos T maduros y en la muerte de células diana por linfocitos T citotóxicos (2,3). En trasplante alógeno se ha demostrado su participación en la interacción entre el injerto y el receptor, implicándose tanto en el rechazo del injerto como en su tolerancia (4).

En este sentido, son numerosas la técnicas basadas en la citometría que se han desarrollado para medir la apoptosis. Estas técnicas están basadas generalmente en la detección de las múltiples alteraciones estructurales que tienen lugar en la célula durante la apoptosis, tales como la contracción celular y la pérdida de integridad de la membrana. La disminución del tamaño celular es fácil de detectar a través del análisis de los parámetros tamaño (FSC, del inglés *forward scatter*) y granularidad (SSC, del inglés *side scatter*) (5), mientras que la pérdida de la integridad de la membrana se puede analizar utilizando colorantes fluorescentes como la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) capaz de unirse al ADN. Este colorante puede usarse de forma combinada con anticuerpos monoclonales (AcMos) para obtener un marcaje doble o triple de antígenos de membrana, lo que permite la caracterización fenotípica rápida y simple de las células apoptóticas dentro de una mezcla heterogénea de células (6,7).

El cultivo mixto linfocitario (CML) se ha usado ampliamente para estudiar la respuesta alógena *in vitro* (8), especialmente con respecto a la inmunología del trasplante. Así, por ejemplo, en el CML en una

sola dirección, los linfocitos del receptor son estimulados utilizando los linfocitos del donante HLA incompatible irradiados o tratados con mitomicina (9). En este modelo, las células estimuladoras mantienen su capacidad de presentar aloantígenos y secretar citocinas, pero han perdido su capacidad de proliferar, muriendo por apoptosis después de pocos días en cultivo. La detección de células apoptóticas después de la estimulación alógena *in vitro* requiere de un método capaz de distinguir las células respondedoras apoptóticas de las células estimuladoras dentro de una mezcla heterogénea de células. Hasta el momento, un pequeño número de técnicas, tales como el test de JAM, permiten la determinación de apoptosis en CML, pero son pruebas que consumen mucho tiempo y requieren un alto grado de manipulación de las muestras (10). También se han descrito métodos basados en el uso de AcMos que permiten detectar diferencias fenotípicas entre las células respondedoras y estimuladoras (11), sin embargo, este abordaje se ve limitado por la disponibilidad de AcMos apropiados y por la capacidad de éstos para unirse a la célula apoptótica, que ha perdido la integridad de su membrana. Sin embargo, estas limitaciones han podido ser superadas mediante el uso de un fluorocromo verde, el 5-6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE), que puede ser retenido por la célula durante varias semanas sin afectar a su viabilidad (12). Este fluorocromo ha sido usado ampliamente para el seguimiento de la migración de los linfocitos *in vivo* durante varias semanas, así como para la detección de células proliferantes y su historial de divisiones *in vivo* e *in vitro* (13).

El objetivo de este apartado de la presente tesis fue diseñar un método que permita de forma simultánea la cuantificación en valores absolutos y la caracterización fenotípica, tanto de las células proliferantes como de las apoptóticas bajo diferentes condiciones de cultivo, con el fin de estudiar la contribución de los mecanismos de apoptosis en el desarrollo de la respuesta alógena. Para este fin, describimos una nueva estrategia citofluorométrica basada en el uso combinado de células estandarizadas junto con el marcaje con CFSE, 7-AAD y AcMos.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras de sangre y preparación de células

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) de donantes sanos se aislaron usando un

gradiente de densidad con Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway), se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK) suplementado con L-glutamina 1 mM (Life Technologies, Grand Island, NY), 1% penicilina/estreptomina (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) y suero humano AB al 10% inactivado con calor (Sigma, St. Louis, MO) a esta mezcla la denominaremos medio completo (MC). Los cultivos autólogos control se realizaron cocultivando PBMCs autólogas irradiadas (A*) y no irradiadas (A). Igualmente las PBMCs se usaron como células respondedoras (R) o como estimuladoras irradiadas (S*) en cultivos mixtos alogénicos. Además, en algunos CMLs, se usaron como células estimuladoras líneas celulares B transformadas con virus de Epstein-Barr (EBV) tales como LG-2 y JY.

2.2. Tinción con CFSE

La tinción con CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) se realizó tal como se describe previamente, con ligeras modificaciones (13). El CFSE se disolvió con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 5 mM como solución de almacenaje y se mantuvo a -20°C hasta su uso. Las líneas celulares B y las PBMCs se ajustaron a $1-5 \times 10^7$ células/mL en PBS. El CFSE se añadió a 1 ml de células en suspensión a una concentración final de $0.2 \mu\text{M}$ cuando se usaron como estimuladoras (S*-CFSE) y a $1 \mu\text{M}$ cuando se usaron como respondedoras (R-CFSE). Dado que el CFSE a altas concentraciones es tóxico, se probaron diferentes concentraciones entre 5 nM y $5 \mu\text{M}$, eligiendo la que producía un marcaje óptimo a la concentración mas baja. Tras añadir el CFSE, los tubos se incubaron a 37°C durante 10 min. en agitación continua. Después del periodo de incubación, las células se lavaron tres veces con MC y se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

2.3. Tinción con 7-AAD

El método de determinación de apoptosis esta basado en la incorporación de 7-AAD de acuerdo a las indicaciones descritas previamente, con ligeras modificaciones (7). Brevemente, las células recogidas de los cultivos se resuspendieron en PBS con $20 \mu\text{g/mL}$ de 7-AAD (Calbiochen, San Diego, CA), se incubaron en oscuridad a 4°C durante 20 min, se centrifugaron y se resuspendieron en $500 \mu\text{l}$ de PBS.

2.4. Tinción con anticuerpos monoclonales

Se utilizaron anticuerpos de ratón frente a una serie de antígenos humanos y conjugados con diferentes fluorocromos: Anti-CD4-APC, anti-CD8-PE (Becton Dickinson BD, San Jose, CA), y anti-HLA-A2,-28-

FITC o biotilado anti-HLA-A1,-36 (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA). La presencia de AcMo biotilado se reveló utilizando estreptavidina-PE como segundo reactivo (Serotec Ltd., Oxford, England). Antes del marcaje, las células obtenidas en los cultivos se lavaron en una solución de PBS conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) al 1% y azida sódica al 0.1% (Merck, Darmstadt, Germany), y se resuspendieron a una concentración final de 1×10^6 células/mL. Posteriormente, alícuotas de $100 \mu\text{l}$ se incubaron con $20 \mu\text{l}$ del AcMo correspondiente, durante 15 min. a 4°C en la oscuridad, se lavaron con PBS, y se revelaron con estreptavidina-PE cuando fue necesario.

2.5. Preparación y tinción de células estándar

La preparación y marcaje de las células estándar se realizó siguiendo una estrategia descrita previamente (14) con algunas modificaciones. Brevemente, se usaron líneas celulares de linfocitos B linfoblastoides transformados por EBV como fuente continua de células homogéneas, después de eliminar los restos celulares; las células recuperadas se lavaron dos veces con PBS estéril (Biomerieux SA, Marcy L'Etoile, France), se resuspendieron a una concentración de $10-20 \times 10^6$ células/mL y se fijaron toda la noche en paraformaldehído al 1% (Vorquímica SL, Spain). Estas células posteriormente se lavaron y marcaron con $0.01 \mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio (IP) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) durante al menos 2 hrs a 4°C , se lavaron dos veces, se resuspendieron a 6×10^4 células/mL en PBS, y se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su uso. Previamente a cada experimento, la calidad de la tinción de las células estándar se monitorizó midiendo la fluorescencia del IP con el fin de verificar que en el diagrama de puntos de FL3 (fluorescencia roja) vs FL2 (fluorescencia amarilla), la intensidad de fluorescencia de las células estándar alcanzaba valores entre 10^3 y 10^4 . Inmediatamente antes de la recolección de las muestras celulares de los cultivos, $50 \mu\text{l}$ de la suspensión de PBS conteniendo 30.000 células estándar se añadieron a cada pocillo mezclando suavemente. El número absoluto de células de cada subpoblación celular se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\text{N}^{\circ}\text{absoluto de células} = \text{n}^{\circ}\text{ cel. estándar} \times \frac{\text{n}^{\circ}\text{ eventos de subpoblación celular}}{\text{n}^{\circ}\text{ eventos cel. estándar}}$$

donde el número de células estándar es siempre 30.000 y el número de eventos de la subpoblación celular y de las células estándar (siempre 3.000) representa el recuento de estas células obtenidas por citometría, a

partir del cual se puede obtener el número real de cada subpoblación en la muestras.

El número exacto de células estándar añadido a cada pocillo se validó siempre por medio del recuento simultaneo con un analizador automático (Sysmex, Toa Medical Electronic Co, Japan).

2.6. Cultivos celulares

Se diseñaron diferentes tipos de cultivos para establecer el poder de discriminación del método y su utilidad para la determinación de la apoptosis y/o proliferación de las células respondedoras en cultivos autólogos o alogénicos. Con este fin, las células respondedoras o las estimuladoras irradiadas (25Gy) (PBMC, LG-2 o JY) se ajustaron a 1×10^6 células/mL en MC, se mezclaron en proporción 1:1, y se cultivaron en placas de 96 pocillos con fondo redondo en estufas de cultivo con atmósfera del 5% de CO₂ a 37°C durante diferentes periodos de tiempo en función del tipo de cultivo.

2.6.1. Prueba de estabilidad de CFSE: Para evaluar la estabilidad del CFSE en las células en cultivo, PBMCs autólogas marcadas con CFSE 1 μ M (A·CFSE) se mezclaron con células autólogas no marcadas (A) durante 7 días. Todos los experimentos (n=10) se realizaron por triplicado y el porcentaje de apoptosis y las proporciones de células marcadas y no marcadas se determinaron en muestras recogidas a 0 hrs e intervalos de 24 hrs hasta el día 7 de cultivo.

2.6.2. Análisis de la interferencia de CFSE en la apoptosis o proliferación: Para valorar la posible interferencia de las células irradiadas y marcadas con CFSE en la inducción de apoptosis y proliferación se diseñaron tres series diferentes de cultivos: a) una serie de cuatro cultivos control utilizando células A no irradiadas cultivadas con MC únicamente, MC con camptotecina (CAM) (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo) a 30 μ g/mL como inductor de apoptosis, MC con 20 U/mL de IL-2 (Pharmingen, San Diego, CA) y MC con PHA (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) a 1/500; b) la segunda serie de cultivos se realizó de forma similar a la anterior pero utilizando mezclas celulares (A+A*); y c) la tercera serie de cultivos era similar a la anterior, pero se mezclaron células autólogas con células irradiadas marcadas con CFSE (A+A*·CFSE). La apoptosis se midió utilizando 7-AAD en muestras tomadas a las 0 hrs y a intervalos de 24 hrs hasta el final del periodo de cultivo. La proliferación se determinó por el método clásico de incorporación de timidina [³H], tal como se describe en el apartado 2.7. Todas estas series de cultivos se incubaron durante 3 días y se realizaron por triplicado.

2.6.3. Evaluación de la apoptosis experimentada por las células respondedoras en cultivo alogénico: Se

analizó el nivel de apoptosis de las células R en una serie de cultivos unidireccionales (n=3), en los que las PBMCs se estimularon con linfocitos irradiados y marcados con CFSE alogénicos (S*·CFSE) o autólogos (A*·CFSE). El nivel de apoptosis, determinado según el protocolo descrito previamente, se comparó con los niveles detectados en cultivos realizados de forma simultanea, donde PBMCs se estimularon con células S* o A* no marcadas con CFSE. En todos los casos, la proliferación se determinó por el método clásico de incorporación de timidina [³H] y los resultados se expresaron en cpm.

2.6.4. Comparación de los métodos basados en el marcaje con CFSE y AcMos para la discriminación de células apoptóticas respondedoras: Se diseñaron dos series de experimentos para comparar el poder de discriminación del método basado en CFSE, con respecto al basado en el uso de AcMos anti-HLA (11), para determinar la apoptosis de las células respondedoras en cultivos alogénicos. Para estos experimentos, se utilizaron células R y S con, al menos, una incompatibilidad en HLA de Clase I. Así, las células alogénicas portadoras de HLA-A1 (HLA-A1⁺) y negativas para HLA-A2 (HLA-A2⁻) se cultivaron con dos líneas celulares B homocigotas para HLA-A2 (LG-2 y JY) e irradiadas actuando como estimuladoras S* o S*·CFSE.

La primera serie de estos cultivos se realizó añadiendo 30 μ g/mL de CAM al MC, y la segunda se realizó en ausencia de CAM. Ambos tipos de cultivos se realizaron en triplicado y se incubaron durante 5 días. Las muestras se recolectaron a las 0 hrs y cada 24 hrs a lo largo de los 5 días de cultivo, se marcaron con AcMos anti-HLA-A1+A36, y anti-HLA-A2+A28, y se determinó el porcentaje de apoptosis de las células R y S con 7-AAD.

2.6.5. Cuantificación simultanea de células respondedoras apoptóticas y proliferantes: El método de marcaje con CFSE también se aplicó para analizar su utilidad en la cuantificación simultanea de apoptosis y proliferación en las células R. Para ello, se realizaron cultivos de 7 días utilizando células R·CFSE y R (n=6) mezcladas con células S* o A*, las muestras se recolectaron a 0 hrs y cada 24 hrs a lo largo del periodo de cultivo. Antes de la recolección de la muestra, se añadió a cada pocillo 50 μ l de PBS conteniendo 30.000 células estándar marcadas con IP, se homogeneizaron suavemente y se marcaron con una mezcla de AcMos anti-CD4-APC, anti-CD8-PE y 7-AAD. En todos los casos se analizó la proliferación utilizando timidina [³H].

2.7. Ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación se realizaron con el método clásico de incorporación de timidina [³H]

durante 18 hrs, añadiendo a cada pocillo 1 μ Ci de timidina [3 H] (Movareck Biochemicals, Brea, CA). Después de ser recolectadas en filtros de fibra de cristal, la incorporación de timidina [3 H] al ADN se analizó con un contador de centelleo β , y los datos se expresaron como la media de cpm de cultivos triplicados.

2.8. Análisis por citometría de flujo

Las muestras se adquirieron dentro de los 30 min. posteriores al marcaje, en un citómetro FACSCalibur (BD) con doble láser (488 nm láser azul, 635 nm láser diodo rojo). La fluorescencia de CFSE (491 nm excitación, 518 nm emisión) se midió en el canal FL1 (filtro de paso de banda 530/30 nm), PE (488-565 nm excitación, 578 nm emisión) e IP (536 nm excitación, 617 nm emisión) se midieron en el canal FL2 (filtro de paso de banda 585/42 nm), 7-AAD (440 nm excitación, 650 nm emisión) se midió en el canal FL3 (filtro de paso largo 670 nm) y APC (650 nm excitación, 660 nm emisión) en el canal FL4 (filtro de paso de banda 661/16 nm). Se recolectaron un mínimo de 20.000 eventos totales de cada muestra. En aquellos experimentos en los que se determinó el número absoluto de células, y con el fin de conseguir una buena reproducibilidad de los datos, las muestras que contenían las células estándar se adquirieron en una región de recuento 7-AAD/IP (Fig. 1A) hasta conseguir un número fijo de células estándar (3.000 eventos en nuestro caso). La adquisición de los datos y el análisis posterior se realizó utilizando el programa CELLQuest (BD).

El análisis multíparamétrico se realizó mediante el programa PAINT-A-GATE (BD). En primer lugar, los linfocitos se seleccionaron utilizando una región en FSC/SSC, posteriormente se utilizó una segunda región definida en el diagrama de puntos 7-AAD/FSC para descartar los cuerpos apoptóticos y restos celulares ($7\text{-AAD}^{\text{low}}\text{FSC}^{\text{low}}$) (Fig. 1B), y finalmente, una tercera región se definió en 7-AAD/CFSE para discriminar las células CFSE^+ y CFSE^- obtenidas en los CML. En este análisis, se utilizaron diferentes estrategias dependiendo de si eran marcadas con CFSE las células S o las R. Así, tal como muestra la figura 1C, cuando se marcan las células S, es posible determinar la apoptosis experimentada por las células R ($\text{CFSE}^-/7\text{-AAD}^+$) incluidas en la región G2 (CFSE^-), después de excluir las $\text{S}^*\text{-CFSE}$ contenidas en la región G3 (CFSE^+). Contrariamente, cuando se marcan las células R con CFSE ($\text{R}\cdot\text{CFSE}$), es posible discriminar el total de células 7-AAD^+ apoptóticas (Ap) de 7-AAD^- apoptóticas o vivas (L) (Fig. 1D). En un análisis posterior de las poblaciones Ap y L, utilizando un diagrama de puntos FSC/CFSE, es posible distinguir tres subpoblaciones dentro del grupo de células apoptóticas (Fig. 1E): 1) $\text{CFSE}^{\text{high}}$, células

no proliferativas respondedoras apoptóticas (A1), 2) CFSE^{dim} , células proliferativas respondedoras apoptóticas (A2), y 3) CFSE^- , células estimuladoras apoptóticas (A3). También es posible distinguir dentro de la población de células vivas (Fig. 1F) otras tres subpoblaciones: (L1) células respondedoras no proliferativas ($\text{CFSE}^{\text{high}}\text{FSC}^{\text{low}}$), (L2) células respondedoras proliferativas ($\text{CFSE}^{\text{dim}}\text{FSC}^{\text{high}}$) y (L3) el resto de células estimuladoras vivas ($\text{CFSE}^-\text{FSC}^{\text{low}}$). Por otro lado, cuando se realiza un marcaje simultáneo utilizando anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 es posible determinar la proporción de linfocitos respondedores CD4^+ y CD8^+ que experimentan apoptosis (Fig. 1E, centro y derecha) o que permanecen vivos (Fig. 1F, centro y derecha).

2.9 Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test de la t de Student y las correlaciones se calcularon utilizando el análisis de regresión lineal con el programa SPSS v 10.0 (SPSS Inc. Illinois, USA). Los valores de *P* inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Estabilidad del marcaje con CFSE en cultivo

La primera serie de experimentos estaba enfocada a estudiar la estabilidad del CFSE en PBMCs cultivados durante diferentes periodos de tiempo, con el fin de analizar su utilidad en la determinación de la apoptosis y la proliferación inducida tras la estimulación *in vitro*. Los porcentajes de apoptosis de los linfocitos A y A·CFSE se midieron en diferentes muestras, tal como se describe en el apartado de materiales y métodos. En la figura 2 se muestran los datos de un experimento representativo, los porcentajes de las células apoptóticas A y A·CFSE en los días 1 y 7 de cultivo se analizaron utilizando un diagrama de puntos CFSE/7-AAD (Fig. 2A y 2B respectivamente). En estos diagramas se puede observar que la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CFSE en las células apoptóticas ($\text{CFSE}^-/7\text{-AAD}^+$) o en las células vivas ($\text{CFSE}^+/7\text{-AAD}^-$) era similar en ambos días, y pese a que la IMF de CFSE en el día 7 disminuyó ligeramente respecto al día 1, la capacidad de discriminar los dos grupos utilizando CFSE se mantenía a lo largo del periodo de 7 días de cultivo.

La evolución en el porcentaje de células A y A·CFSE a lo largo de los 7 días de cultivo se resume en la figura 2C, donde se han utilizado como referencia los valores obtenidos en el día 0 de cultivo. Los resultados revelan que los cambios en la proporción de células A y A·CFSE no varían

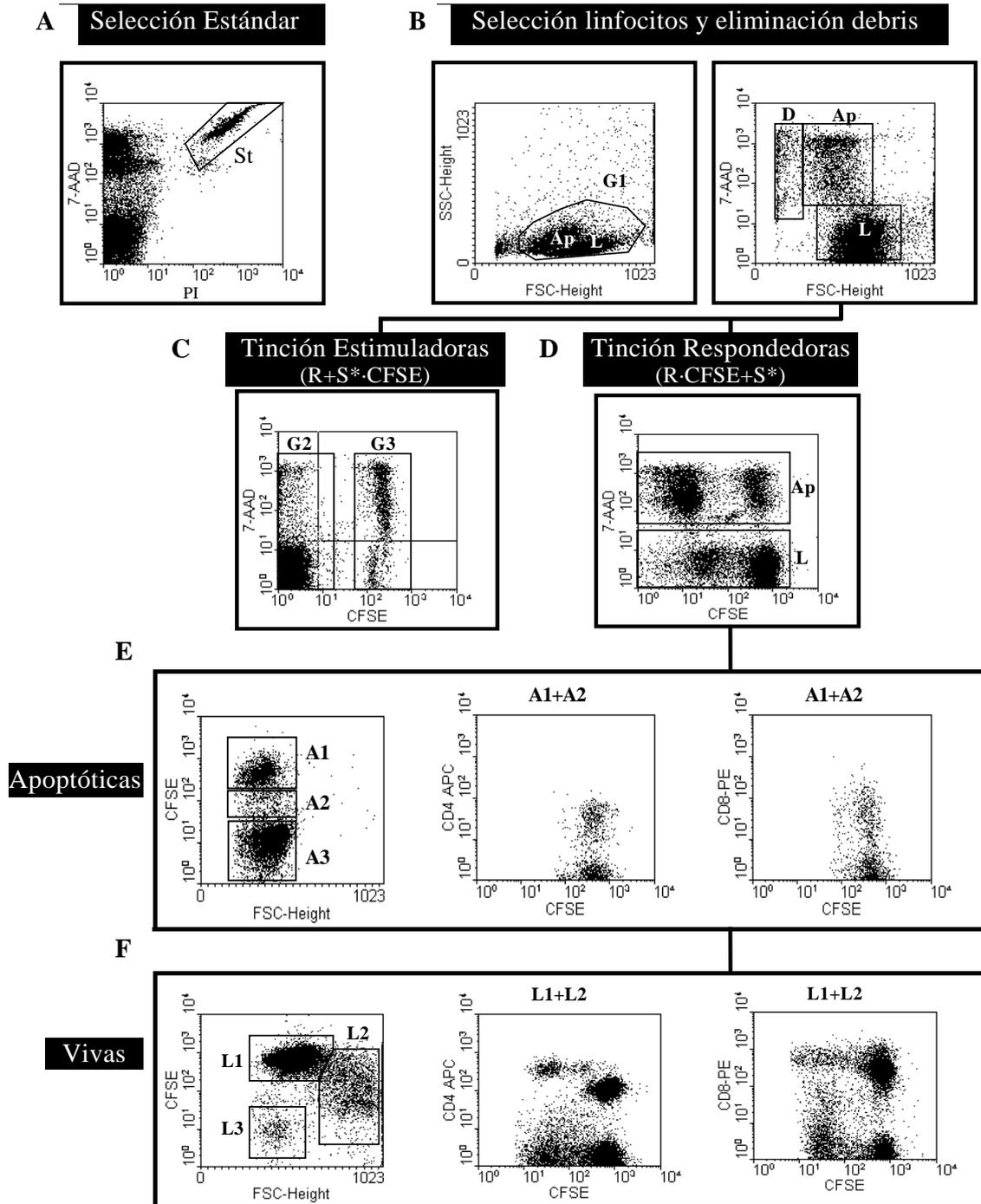


Fig. 1. Determinación de apoptosis o proliferación y fenotipaje de células respondedoras en CML utilizando CFSE, 7-AAD y células estándar marcadas con IP (St) en un diagrama de puntos PI /7-AAD. (B) Selección de linfocitos (G1) según criterios morfológicos, incluyendo células vivas (L) y apoptóticas (Ap). Los fragmentos celulares/cuerpos apoptóticos (D) se excluyeron de acuerdo a sus características en 7-AAD/FSC. (C) Diagrama de puntos CFSE/7-AAD mostrando los resultados en CML con células estimuladoras marcadas con CFSE (S*·CFSE); las células R incluidas en la región G2 y las células estimuladoras se excluyen en la región G3. (D) Análisis de las células respondedoras CFSE (R·CFSE), las células apoptóticas (Ap) y las vivas (L) se seleccionan en un diagrama CFSE/7-AAD. (E) Se muestran tres subtipos celulares dentro de las células apoptóticas (figura izquierda): A1, CFSE^{high} (respondedoras apoptóticas no proliferativas); A2, CFSE^{dim} proliferativas apoptóticas; y A3, estimuladoras apoptóticas CFSE. (F) Tres subtipos de células vivas, L1, respondedoras no proliferativas (CFSE^{high}FSC^{low}); L2, proliferativas (CFSE^{dim}FSC^{high}); y L3, estimuladoras vivas (CFSE^{low}FSC^{low}). En la región central y derecha de las figuras E y F se muestran las células respondedoras CD4 y CD8 apoptóticas (A1+A2) o vivas (L1+L2).

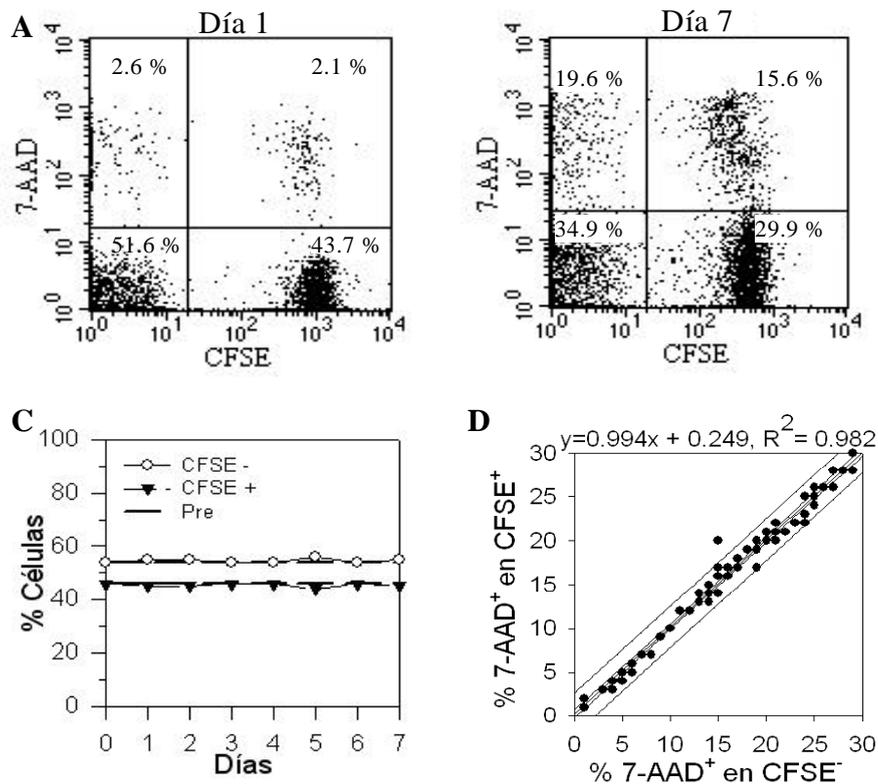


Fig. 2. Análisis de la estabilidad de CFSE en cultivos celulares. (A) Datos de un experimento representativo en una gráfica 7-AAD/CFSE obtenida después de un día de cultivo, de células A-CFSE mezcladas con células A. (B) Datos del mismo experimento mostrando las células apoptóticas CFSE⁺ y CFSE⁻ después de 7 días de cultivo. (C) Cinética de los cambios en porcentaje de las células CFSE⁺ y CFSE⁻ a lo largo de 7 días de cultivo comparado con los datos pre-cultivo. (D) Análisis de regresión del porcentaje de células apoptóticas (7-AAD⁺) marcadas con CFSE o sin marcar, obtenido en 10 experimentos independientes.

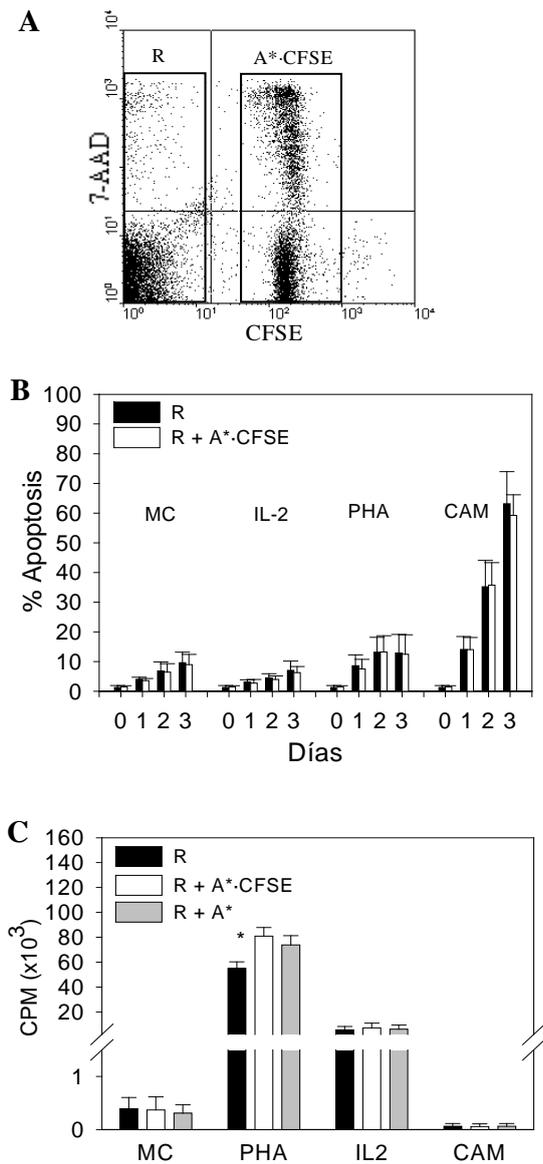
significativamente a lo largo del tiempo de cultivo (máxima variación, 3%). Finalmente, el análisis de regresión en el que se comparan la apoptosis experimentada por las células A-CFSE y A (figura 2D) revela la existencia de una buena correlación entre los porcentajes obtenidos en ambas poblaciones, y demuestra que el marcaje con CFSE no modifica los niveles de apoptosis.

3.2. Análisis de la interferencia de las células irradiadas marcadas con CFSE en la determinación de apoptosis y proliferación

Debido a que las células irradiadas sufren apoptosis (15,16), es necesario garantizar la capacidad de CFSE para discriminar entre células apoptóticas irradiadas y no irradiadas, y evaluar si las células irradiadas interfieren en la prueba basada en el uso de CFSE. Con este fin se diseñaron una serie de experimentos cuyos resultados se resumen en la figura 3; en ellos se puede apreciar que el marcaje con CFSE permite distinguir entre células apoptóticas (CFSE⁺/7-AAD⁺) y (CFSE⁻/7-AAD⁺) generadas en CM con PHA

en presencia de células A*-CFSE y tras 3 días de cultivo (Fig. 3A). Similar capacidad de discriminación se observó en experimentos en los que se utilizó CAM, IL-2 o MC sólo (datos no mostrados).

La figura 3B muestra el porcentaje de apoptosis detectada en cultivos realizados en presencia o ausencia de células A*-CFSE. En esta figura se puede observar que la presencia de las células A*-CFSE en cultivo no afecta los niveles de apoptosis detectados, con independencia del grado de apoptosis inducida. En el análisis de regresión lineal se observó una buena correlación entre la apoptosis observada en ambos tipos de cultivo ($R^2=0.990$). Finalmente, el grado de proliferación observada en estos cultivos se representa en la figura 3C, donde se puede observar que los niveles de proliferación no variaron con la adición de células autólogas al cultivo, con excepción de los cultivos en los que se utilizó PHA. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la proliferación inducida por PHA no se vio influenciada por el uso de CFSE, sino por el hecho de añadir células autólogas al cultivo.



3.3. Utilidad del CFSE para la cuantificación de células respondedoras apoptóticas en cultivo alogénico

El CML unidireccional clásico se realizó utilizando PBMCs de tres individuos distintos, según los protocolos descritos en materiales y métodos. Tal como se muestra en la figura 4A, el uso de CFSE no afectó al porcentaje total de células apoptóticas, tanto en cultivos alogénicos como autólogos, observándose una buena correlación en el análisis de regresión lineal ($R^2=0.978$). El marcaje con CFSE nos permitió evaluar la apoptosis inducida en las células respondedoras autólogas y alogénicas pudiendo descartar las células apoptóticas S*-CFSE (Fig. 4B).

Comparando las figuras 4A y 4B, es fácil inferir que el porcentaje de células apoptóticas autólogas y alogénicas representa una pequeña parte del total de células apoptóticas. Sin embargo, cuando se determina únicamente la apoptosis de las células respondedoras se puede observar que el número de células apoptóticas autólogas aumenta a lo largo del periodo de cultivo, mientras que el porcentaje de células apoptóticas alogénicas respondedoras se mantiene durante el mismo. Estas diferencias pueden ser debidas al efecto compensatorio debido a la fuerte activación celular que tiene lugar por el estímulo alogénico. Por otro lado, el marcaje de las células S* con CFSE no afectó la respuesta proliferativa (Fig. 4C).

Para validar los resultados obtenidos con este método, se utilizó una técnica alternativa (11), basada en el uso de AcMos anti-HLA específicos, para discriminar entre las células R y S*. En la figura 5 se muestran los resultados de un CML representativo, en presencia o ausencia de CAM, donde se indican los porcentajes de células apoptóticas y no apoptóticas obtenidos, marcando las células S* con CFSE (Fig. 5A) o anti-HLA-A2 (Fig. 5B). En ambos casos, los resultados son muy similares, pero las células marcadas con CFSE mantienen una mayor capacidad de discriminación de las células apoptóticas que cuando son marcadas con anti-HLA-A2, debido a que la expresión de HLA-A2 en las células S* apoptóticas ($HLA-A2^+/7-AAD^+$) sufre una caída significativa respecto a la observada en las correspondientes células S* vivas (Fig. 5B). Este fenómeno impide diferenciar claramente entre las células apoptóticas R ($HLA-A2^-, 7-AAD^+$) y las S* ($HLA-A2^+, 7-AAD^+$); sin embargo, con el marcaje con CFSE nos se observan diferencias significativas entre ambas poblaciones. Además, cuando los experimentos se realizaron combinado el marcaje con CFSE y anti-HLA-A1, se pudo observar la ausencia de solapamiento entre dos poblaciones con diferente HLA-A, y distinguir claramente las células R $HLA-A1^+$ de las S*-CFSE $HLA-A2^+$ (Fig. 5C).

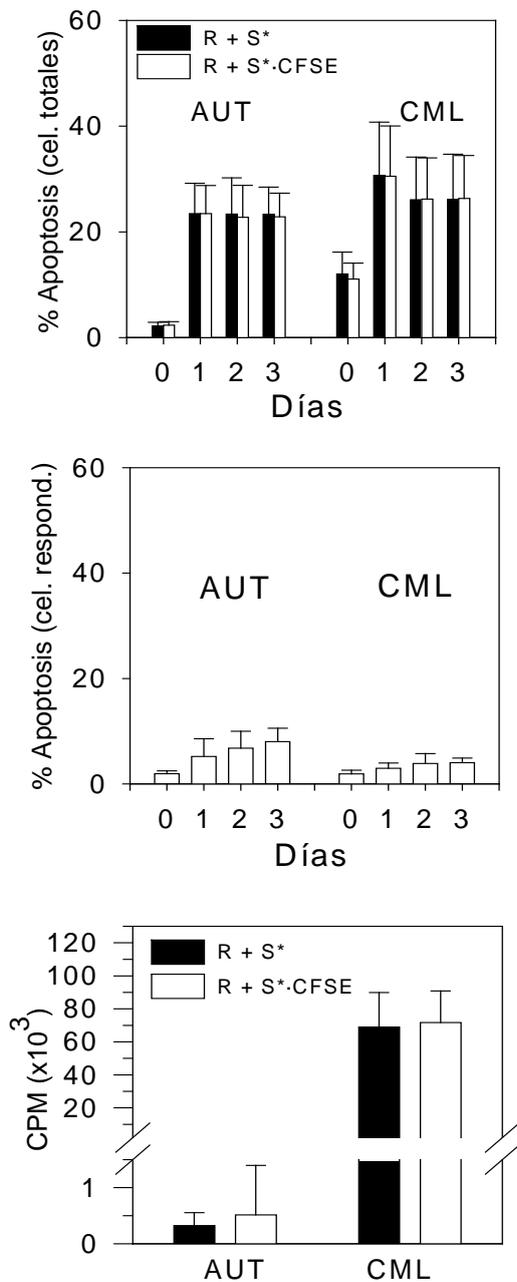


Fig. 4. Utilidad del uso de CFSE para la cuantificación de apoptosis de las células respondedoras en CML. (A) Porcentaje de apoptosis observado en el total de células (respondedoras + estimuladoras) en CML y cultivos autólogos utilizando células R mezcladas con estimuladoras S*.CFSE o S* en cultivos de 3 días. (B) Porcentaje de apoptosis observado en las células R. (C) Estudio comparativo de la respuesta proliferativa en cultivos utilizando células S*.CFSE o S* como estimuladoras en cultivos autólogos y alogénicos. La apoptosis se representa como la media % \pm SD, y la proliferación como la media CPM \pm SD de tres experimentos diferentes. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. AUT, cultivos autólogos y CML, cultivos alogénicos.

Finalmente, en la figura 5D, se comparan los resultados de apoptosis espontánea o inducida con CAM de las células R, determinados por ambos métodos, a lo largo del tiempo de evolución del cultivo. Los resultados obtenidos con ambas estrategias fueron similares tal como indica el análisis de regresión ($R^2=0.977$).

3.4. Aplicación de CFSE para la determinación del número absoluto de células respondedoras apoptóticas y proliferantes en CML

Con el fin de cuantificar de forma simultánea la muerte celular y la cinética de proliferación en CML, se diseñaron una serie de experimentos combinando el marcaje con CFSE y 7-AAD junto con el uso de células estándar marcadas con IP. En este estudio, debido al uso de CFSE para marcar las células R alogénicas, fue necesario realizar un análisis citométrico adicional que nos permitía cuantificar las subpoblaciones de células R apoptóticas y proliferantes, tal como se describe en el apartado de materiales y métodos.

La figura 6 recoge un experimento representativo que muestra la cinética de las diferentes poblaciones apoptóticas y vivas en CML. Así, las figuras 6B y 6D representan los valores obtenidos expresados como porcentajes, mientras que las figuras 6A, 6C, 6E y 6F, muestran valores absolutos obtenidos en cada fase del cultivo. Por tanto, gracias a este tipo de experimentos, es posible obtener una visión general de las modificaciones que tienen lugar a lo largo del tiempo en las distintas subpoblaciones celulares dentro de un CML. Las figuras 6A y 6C muestran, respectivamente, el seguimiento en valores absolutos de una serie de poblaciones celulares que proliferan o sufren apoptosis en cultivos autólogos (R-CFSE + A*) o alogénicos (R-CFSE + S*) analizados cada 24 hrs de cultivo. La posibilidad de determinar el número absoluto de células R alogénicas, permite comparar de forma precisa las diferencias en la evolución de la respuesta alogénica y la de los cultivos control autólogos (Fig. 6A vs Fig. 6C), diferencias que no son tan evidentes cuando se analizan los datos expresados en porcentajes (Fig. 6B vs Fig. 6D). Además, este método permite distinguir al menos entre cuatro subpoblaciones, tales como, las células vivas proliferativas y no proliferativas e incluso las apoptóticas no proliferativas y las proliferativas que sufren apoptosis (Fig. 6E). De forma adicional, se puede evaluar la evolución de ciertas subpoblaciones en valores absolutos en función de su fenotipo linfocitario, tales como las células CD4 y CD8 respondedoras, mediante el uso combinado de AcMos anti-CD4 y anti-CD8 (Fig. 6F). En un seguimiento de 7 días de cultivo alogénico, se puede observar que después de 5 días,

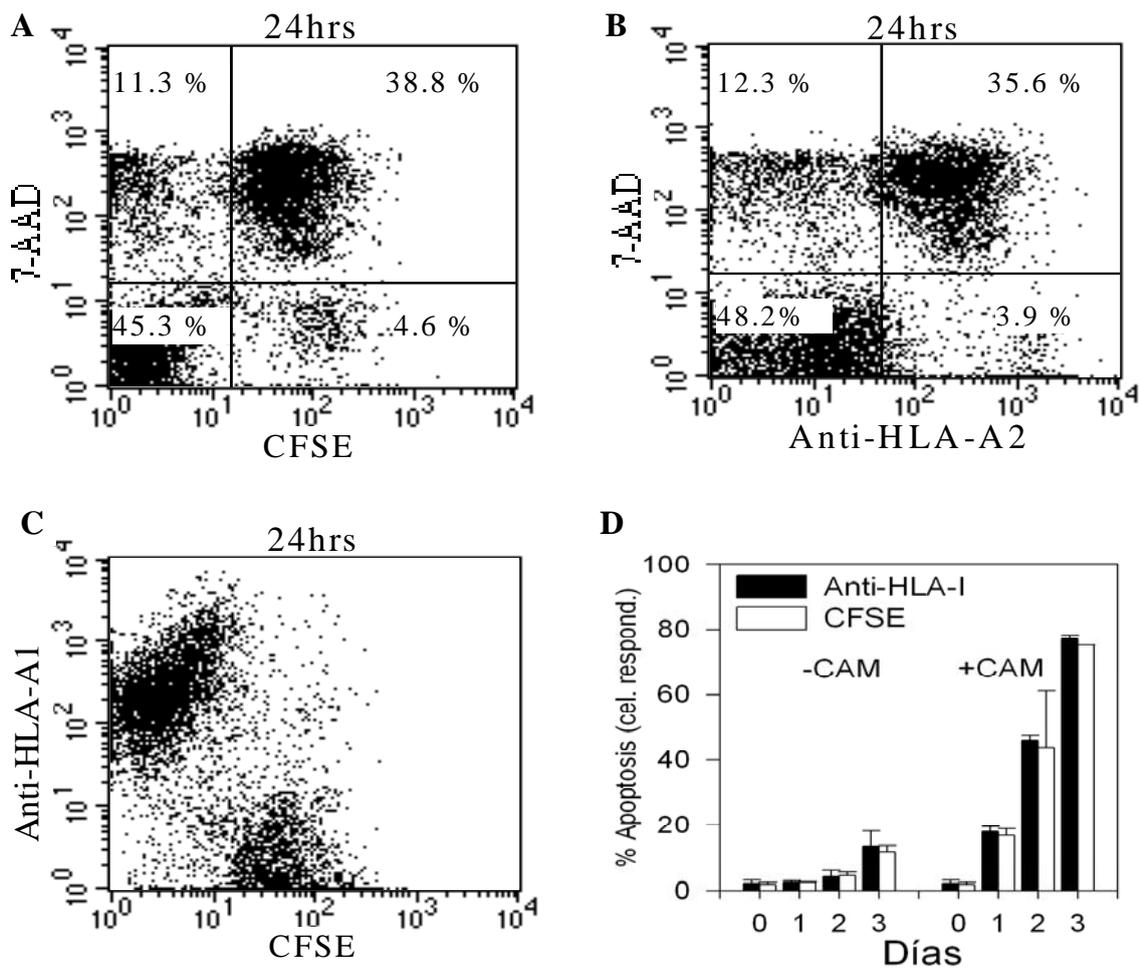


Fig. 5. Estudio comparativo de la capacidad de discriminación del marcaje con CFSE y AcMos para determinar la apoptosis en las células respondedoras. Esta figura muestra los datos obtenidos tras 24 hrs de cultivo, de células R HLA-A1⁺ estimuladas con S* y S*.CFSE HLA-A2⁺ homocigotas en presencia o ausencia de CAM. (A) Muestra los porcentajes de cada población en un gráfico CFSE/7-AAD obtenido de un experimento representativo utilizando células estimuladoras S*.CFSE HLA-A2⁺ y CAM. (B) Datos obtenidos utilizando células estimuladoras S* HLA-A2⁺ detectadas con un AcMo anti-HLA-A2+A28. (C) Gráfico en el que se muestra la ausencia de solapamiento entre las células R HLA-A1⁺ y S*.CFSE. (D) Comparación entre células apoptóticas respondedoras detectadas usando ambos métodos, en presencia o ausencia de CAM.

el número total de células proliferativas y apoptóticas respondedoras aumenta de manera sensible, incluyendo a los linfocitos T CD4 y CD8.

Finalmente, se realizó un análisis comparativo entre los resultados obtenidos por medio de la incorporación de timidina [³H] expresados en cpm (eje Y) con valores absolutos de células proliferativas no apoptóticas utilizando CFSE (eje X) (Fig. 7). Los datos revelan una buena correlación entre ambos métodos ($R^2 = 0.908$). Sin embargo los valores obtenidos con el marcaje con CFSE sugieren una mayor sensibilidad de este método, ya que la pendiente de la recta ($y = 0.220x + 6130$) resultó ser inferior a 1.

4. DISCUSION

Aunque la apoptosis es un proceso fisiológico

implicado en selección y eliminación celular, su desregulación ha sido asociada con diferentes procesos patológicos, incluyendo procesos implicados en la respuesta inmunológica. Por ello, la investigación de nuevos métodos que permitan estudiar los mecanismos que regulan la apoptosis y la proliferación celular, ayudarían a alcanzar un diagnóstico más preciso de estos procesos patológicos e incluso definir procedimientos terapéuticos más apropiados.

Con este objetivo, el trabajo que se describe en esta memoria de tesis ofrece una nueva estrategia metodológica, en la cual es posible caracterizar y cuantificar de forma simultánea las diferentes subpoblaciones linfocitarias que proliferan o sufren apoptosis en el modelo clásico de CML. Para ello, hemos introducido un método en el que se combina el uso de un estándar de células marcadas con IP junto

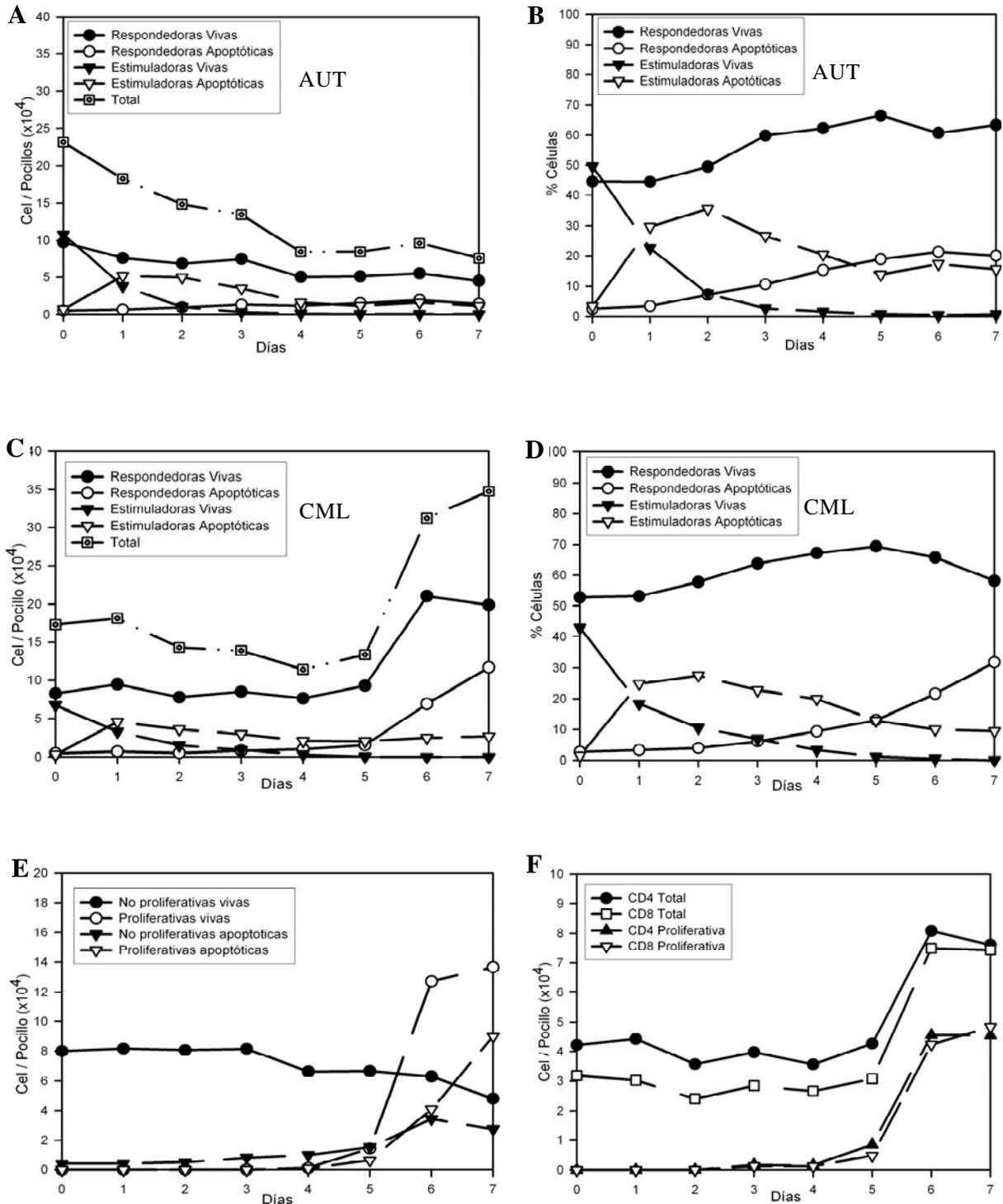


Fig. 6. Comparación entre los valores absolutos y el porcentaje de células apoptóticas y proliferativas desarrolladas en CML marcadas con CFSE, 7-AAD y un número fijo de células estándar marcadas con IP. (A) Representación de la cinética del número absoluto de células respondedoras apoptóticas y vivas, y células estimuladoras autólogas en cultivo de células R-CFSE mezcladas con células A*. (B) Datos del mismo experimento expresado en porcentajes. (C) y (D) representan los resultados obtenidos en cultivos alógenos utilizando células R-CFSE con células S*. (E) Representa únicamente las células respondedoras proliferantes y no proliferantes considerando las subpoblaciones de células apoptóticas y vivas en cultivo alógeno. (F) Muestra la cinética de las células respondedoras totales y proliferantes con diferente fenotipo (CD4⁺ o CD8⁺) observada en diferentes momentos del cultivo alógeno. Datos similares se obtuvieron en 6 experimentos diferentes.

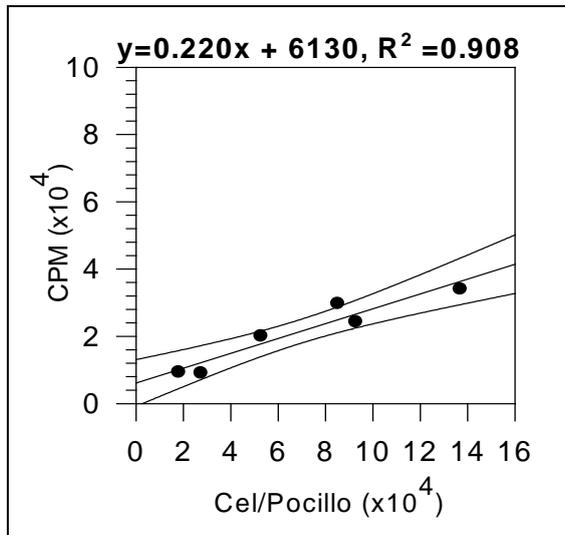


Fig 7. Análisis de correlación entre los niveles de proliferación basados en la incorporación de timidina [^3H] y el número de células vivas de la población proliferante. Los resultados expresados en cpm son la media de tres datos obtenidos para cada cultivo.

con el uso de los marcadores fluorescentes CFSE, 7-AAD y AcMOS específicos para su posterior análisis por citometría de flujo. En trabajos recientes se describe el uso de CFSE para determinar el porcentaje de linfocitos T que proliferan en CMLs xenogénicos (17) y combinándolo con el uso de 7-AAD permite determinar la citotoxicidad mediada por células (18). Sin embargo, en el presente trabajo es la primera vez en la que se usan estos colorantes para la determinación precisa de la cinética de apoptosis y proliferación en CML junto con la caracterización fenotípica de las subpoblaciones implicadas en el cultivo alogénico.

El primer objetivo de este estudio consistió en asegurar la capacidad de nuestro método para distinguir entre las células apoptóticas respondedoras, presentes en el cultivo, de las estimuladoras. Esto fue posible gracias al uso de CFSE, un colorante vital portador de un grupo succinil éster que se une de forma covalente a macromoléculas citoplásmicas y que presenta una emisión fluorescente de 518 nm; esta molécula permanece estable en cultivo durante varias semanas sin afectar la viabilidad celular (12).

Además, el CFSE se reparte de manera equitativa entre las células hijas después de la mitosis, y puede usarse de forma combinada con AcMOS para la caracterización inmunofenotípica de los nuevos linfocitos que se generan después de cada ciclo de división celular (13). Otros marcadores fluorescentes, como el PKH26, también han sido utilizados con un objetivo similar (19), sin embargo, se eligió el CFSE

debido a que su nivel de fluorescencia se mantiene después de varios ciclos de división y presenta una mayor resolución para detectar cambios discretos en el número de células en división. Así, nuestros resultados han demostrado que el CFSE se mantiene estable durante 7 días de cultivo, incluso en las células que sufren apoptosis, y que este marcador no se transfiere a los linfocitos no marcados. Por otro lado, este trabajo demuestra que el CFSE no afecta a los niveles de apoptosis ni de proliferación en cultivo, independientemente de que se utilice para marcar las células estimuladoras o las respondedoras.

En segundo lugar, de entre las diferentes técnicas descritas para la determinación de apoptosis, la elección del colorante 7-AAD fue debida a que ofrece una serie de ventajas: a) es capaz de teñir linfocitos vivos no fijados, que pueden ser separados y utilizados para estudiar su función; b) puede ser usado de forma combinada con AcMOS para un mejor inmunofenotipaje de la célula, y c) permite detectar cuerpos apoptóticos utilizando la combinación de parámetros FSC/SSC y 7-AAD, gracias a la cual, los cuerpos apoptóticos ($\text{FSC}^{\text{low}}/\text{7-AAD}^{\text{dim}}$) pueden ser eliminados del análisis (6). Además, se trata de una técnica sencilla y rápida que no requiere de una larga manipulación de la muestra. Tal como muestra el análisis multiparamétrico de la figura 1, cuando se usa CFSE y 7-AAD de forma combinada, es posible distinguir entre células apoptóticas estimuladoras y respondedoras, e incluso dentro de las células proliferantes respondedoras es posible diferenciar cuales de ellas han sufrido apoptosis.

La tercera contribución importante de este trabajo, fue el uso de un estándar de referencia para la determinación de valores absolutos, y que consistía en el uso de un número fijo de células marcadas con IP, que eran añadidas a los cultivos linfocitarios inmediatamente antes de su marcaje con 7-AAD. Esta estrategia fue muy útil para obtener una estimación precisa del número absoluto de células apoptóticas y proliferantes presente, en cada momento, dentro del cultivo. Aunque se ha descrito que es posible calcular el número absoluto de células por citometría de flujo bajo condiciones de flujo medio y volumen de muestra constante (20), estas condiciones no se pueden aplicar a cultivos con largos periodos de incubación, donde el volumen del medio disminuye y se produce una variación considerable en el mismo, de pocillo a pocillo. En el método que describimos en esta tesis, se utilizan células estándar con tamaño y comportamiento en suspensión similar a las células de los CMLs; esto supone una ventaja respecto a los métodos basados en el uso de microesferas, ya que éstas tienden a sedimentar, flotar o formar agregados alterando el recuento final (21). El uso de este tipo de células estándar nos permite calcular de forma

simultánea el número exacto de células apoptóticas y proliferantes en CML y aunque su utilización ha sido descrita con anterioridad (14), el origen de las células era distinto, y estaba enfocado únicamente a medir la citotoxicidad mediada por células. Tal como se recomienda (22), para estimar la tasa de muerte celular en cultivo, es necesario conocer tanto el número de células vivas como su nivel de proliferación en valores absolutos, en lugar del valor porcentual. Este método satisface ambas premisas, haciendo posible cuantificar el valor acumulado de apoptosis y proliferación, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de métodos, en los que la apoptosis medida supone una instantánea en el tiempo, del cuál no es posible obtener una visión real de la dinámica del cultivo.

Otros métodos utilizados para la determinación de apoptosis en CML, tales como el de JAM (23), no permiten detectar la apoptosis espontánea, pudiendo valorar únicamente la apoptosis de las células proliferantes, después de haber sido estimuladas. En comparación con dicho método, la estrategia propuesta en esta memoria nos permite conocer el número total de células respondedoras apoptóticas, antes y después de ser estimuladas en CML; además, permite diferenciar las células apoptóticas proliferantes de las no proliferantes.

Los métodos basados en el uso de AcMos se encuentran limitados por la disponibilidad de un AcMo específico que permita distinguir entre células estimuladoras y respondedoras. El método aquí descrito permite superar esta restricción, así como la necesidad de verificar la integridad de la molécula diana del AcMo en la membrana de las células apoptóticas (5,7,16). Asimismo, en los ensayos de proliferación, este nuevo método muestra ciertas ventajas con respecto al marcaje con timidina [^3H], ya que evita el uso de materiales radiactivos, facilita el marcaje secundario con AcMos, permite cuantificar células en división y no divididas, y determinar el número de ciclos de división (13).

Finalmente, es interesante remarcar el hecho de que exista una buena correlación entre el número de células CFSE proliferantes no apoptóticas y la proliferación determinada por el ensayo de incorporación de timidina [^3H]. Además, los resultados de los cultivos alogénicos *in vitro* (Fig. 6), revelan que los patrones de proliferación están en consonancia con los descritos por otros autores utilizando timidina [^3H] (24). De forma paralela al proceso proliferativo, se puede detectar una cinética de apoptosis similar, que implica principalmente a las células proliferantes. Las células apoptóticas pueden originarse por el proceso de muerte celular inducida por activación (AICD), que se ha considerado como uno de los mecanismos implicados en la tolerancia

periférica (4,25,26). Por otro lado, es interesante comprobar que el método nos permite confirmar que hay diferentes subtipos celulares en el cultivo mixto linfocitario, incluyendo células CD4, CD8, así como CD19 y CD16/56, que contribuyen al proceso final de apoptosis.

En resumen, el trabajo desarrollado en esta memoria de tesis describe un método útil que permite estudiar la cinética de proliferación y apoptosis, mediante el empleo de un único tubo y una manipulación mínima de la muestra, lo que ofrece la ventaja fundamental de poder determinar de forma simultánea el número absoluto de células apoptóticas y proliferantes en CML. Por todo ello, este método resulta muy útil para evaluar y caracterizar la respuesta alogénica inducida *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo, lo cual contribuirá a tener un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la respuesta inmunológica que da lugar a la tolerancia frente a injertos y tumores. Asimismo, nos permitirá investigar nuevas aproximaciones terapéuticas orientadas al control e inducción de estados de tolerancia específica.

5. REFERENCIAS

1. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:548-554.
2. Mogil RJ, Radvanyi L, Gonzalez-Quintal R et al. Fas (CD95) participates in peripheral T cell deletion and associated apoptosis in vivo. *Int Immunol* 1995;7:1451-1458.
3. Lowin B, Mattman C, Hahne M, Tschopp J. Comparison of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8:57-63.
4. Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance. *Transplantation* 1998;65:869-875.
5. Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 1994;15:12-20.
6. Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 1997;209:111-123.
7. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;170:145-157.
8. Bach FH, Voynow NK. One-way stimulation in mixed leukocyte cultures. *Science* 1966;153:545-547.
9. Mickelson EM, Longton G, Anasetti C et al. Evaluation of the mixed lymphocyte culture (MLC) assay as a method for selecting unrelated donors for marrow transplantation. *Tissue Antigens* 1996;47:27-36.
10. Matzinger P. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* 1991;145:185-192.
11. Sato T, Deiwick A, Raddatz G, Koyama K, Schlitt HJ. Interactions of allogeneic human mononuclear cells in the two-

- way mixed leucocyte culture (MLC): influence of cell numbers, subpopulations and cyclosporin. *Clin Exp Immunol* 1999;115:301-308.
12. Weston SA, Parish CR. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* 1990;133:87-97.
 13. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;171:131-137.
 14. Flieger D, Gruber R, Schlimok G et al. A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells. *J Immunol Methods* 1995;180:1-13.
 15. Reap EA, Roof K, Maynor K et al. Radiation and stress-induced apoptosis: a role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5750-5755.
 16. Philippe J, Louagie H, Thierens H et al. Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens. *Cytometry* 1997;29:242-249.
 17. Popma SH, Krasinskas AM, McLean AD et al. Immune monitoring in xenotransplantation: the multiparameter flow cytometric mixed lymphocyte culture assay. *Cytometry* 2000;42:277-283.
 18. Lecoeur H, Fevrier M, Garcia S, Riviere Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001;253:177-187.
 19. Slezak SE, Horan PK. Fluorescent in vivo tracking of hematopoietic cells. Part I. Technical considerations. *Blood* 1989;74:2172-2177.
 20. Terstappen LW, Hollander Z, Meiners H, Loken MR. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leukoc Biol* 1990;48:138-148.
 21. Brando B, Barnett D, Janossy G et al. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 2000;42:327-346.
 22. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F, Murakami T. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. *Hum Cell* 1998;11:3-12.
 23. O'Flaherty E, Ali S, Pettit SJ, Kirby JA. Examination of the sensitivity of T cells to Fas ligation: induction of allospecific apoptosis. *Transplantation* 1998;66:1067-1073.
 24. Dubey DP, Yunis I, Yunis EJ. Cellular typing. Mixed lymphocyte response and cell-mediated lympholysis. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington: American Society for Microbiology; 1986:847-858.
 25. Sharland A, Yan Y, Wang C et al. Evidence that apoptosis of activated T cells occurs in spontaneous tolerance of liver allografts and is blocked by manipulations which break tolerance. *Transplantation* 1999;68:1736-1745.
 26. Genestier L, Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Apoptosis of activated peripheral T cells. *Transplant Proc* 1999;31:33S-38S.

*El principio de la ciencia, es el siguiente:
La prueba de todo conocimiento es el experimento.
El experimento es el único juez de la "verdad científica".
(Richard P. Feynman)*

CAPÍTULO 4

CAPITULO 4

Monitorización de poblaciones linfocitarias en pacientes sometidos a trasplante hepático: Análisis *in vivo* e *in vitro* de la respuesta alogénica y del efecto de inmunosupresores

1. Introducción

El trasplante hepático muestra un comportamiento tolerogénico especial, así, en ciertas especies se puede mantener el injerto estable sin necesidad de inmunosupresión (1). Pese a que las bases celulares de la tolerancia inmunológica no se conocen bien, son diferentes los mecanismos que se han planteado para justificar este comportamiento. Así, se ha propuesto que la baja expresión de moléculas coestimuladoras en las potenciales APCs del injerto hepático (células endoteliales y de Kupffer) (2), podría dar lugar a la inducción de un estado de anergia en los linfocitos T *helper* (Th) del receptor debido a una presentación ineficiente de aloantígenos (3,4). Sin embargo, otras APCs no profesionales podrían presentar aloantígenos de forma indirecta en la periferia contribuyendo a generar una intensa respuesta alogénica gracias a la estimulación eficiente a los linfocitos Th a través de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) (5). Otros posibles mecanismos implicados en la inducción de tolerancia al injerto hepático es la delección central y periférica (6,7), por la cual ciertos linfocitos T son inducidos a morir por apoptosis después del reconocimiento antigénico. CD95 (APO-1) y su ligando (CD95L) son moléculas de superficie que median la apoptosis, que podrían ejercer un papel en la regulación de la respuesta inmunitaria frente a antígenos extraños y en la inducción de tolerancia periférica (8).

Para profundizar en el conocimiento de los mecanismos naturales implicados en el desarrollo de tolerancia al injerto hepático, es importante el desarrollo de un método fiable y no invasivo para evaluar el grado de respuesta frente al aloinjerto, esto nos permitiría disponer de una herramienta de aplicación clínica para la detección precoz de episodios de rechazo agudo, así como para la predicción del posible desarrollo de tolerancia al injerto. En este sentido, el fenotipado sistemático de poblaciones leucocitarias de sangre periférica facilitaría la detección de diferencias inmunológicamente significativas en pacientes con buena o mala aceptación del injerto. Esta estrategia nos ha permitido observar diferencias en la expresión de moléculas coestimuladoras entre los pacientes con episodios de rechazo agudo (RA) y aquellos con buena aceptación del injerto (NRA). Así, hemos detectado un incremento de expresión de las moléculas B7 (CD80 y

CD86) en linfocitos B y de CD28/CTLA-4 en linfocitos CD4⁺ en aquellos pacientes con episodios de RA (9-11) confirmando el papel preponderante de las moléculas coestimuladoras en los eventos previos a los episodios de RA y estableciendo la expresión de CD28 en linfocitos T de sangre periférica como un marcador para la predicción de desarrollo de RA o tolerancia en los receptores hepáticos. Por otro lado, el análisis de los cambios en expresión de CD95 y CD95L en diferentes subtipos celulares de sangre periférica, su influencia en la inducción de apoptosis *in vitro*, así como la implicación de estos subtipos celulares en la aceptación o el rechazo del injerto hepático nos pueden ayudar a conocer el papel que los fenómenos de delección clonal pueden tener en la aceptación del injerto hepático.

Los tratamientos inmunosupresores tradicionales, basados en el empleo de inhibidores de la calcineurina como la ciclosporina A (CsA) o el tacrolimus (FK506), han dado lugar a una importante mejora en la evolución de los trasplantes, sin embargo, el uso de estos agentes se ha asociado con el desarrollo de toxicidad, elevado riesgo de infecciones y alta incidencia de ciertos tumores (12,13). Por otro lado, por su capacidad para inhibir la apoptosis de los linfocitos Th activados alogénicamente, podría dificultar la posible aceptación aloespecífica del injerto (14). La mejor solución para resolver estos problemas es desarrollar tolerancia frente al injerto, por lo que el uso de anticuerpos monoclonales (AcMo) capaces de interferir los procesos inmunoreguladores, especialmente la vía coestimuladora, son candidatos idóneos para la inducción de tolerancia. Diferentes estrategias basadas en el bloqueo de las señales coestimuladoras generadas por CD80 y CD86 han sido ensayadas *in vivo* en modelos animales, utilizando la proteína de fusión CTLA4-Ig, capaz de unirse a CD80 y CD86, y los AcMos anti-CD80 y anti-CD86, que han logrado prevenir el desarrollo de RA y prolongar la supervivencia del injerto (15-24). Para conocer mejor los mecanismos implicados en el desarrollo de tolerancia a través del bloqueo de señales coestimuladoras, en este trabajo se ha utilizado el modelo clásico de estudio de alorrespuesta *in vitro* mediante cultivo mixto linfocitario (CML) unidireccional, con diferentes condiciones de inmunosupresión (CsA, anti-CD80 y anti-CD86) y analizando en cada caso los niveles de proliferación y de apoptosis, así como el fenotipo celular resultante

bajo las diferentes condiciones. Estos estudios se enfocaron a investigar la posible correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y las observaciones derivadas de la monitorización *in vivo*, así como su posible papel en el éxito del trasplante hepático.

2. Materiales y métodos

2.1. Pacientes

Con este objetivo se estudiaron un total de 83 receptores hepáticos realizados en el Hospital U. Virgen de la Arrixaca de Murcia. Los criterios de inclusión utilizados fueron: receptores de un primer trasplante hepático, disponibilidad de muestra y supervivencia superior a un mes, periodo de tiempo en el que se realizó el estudio. Las indicaciones para el trasplante mantenían una distribución semejante a la del estudio global de capítulos anteriores: cirrosis alcohólica (36%), hepatitis crónica por virus B o C (27%), cirrosis alcohólica y vírica (5%), carcinoma (10%), amiloidosis (1%) y cirrosis biliar primaria (4%), enfermedad de Wilson (2%), colangitis esclerosante (2%), hepatitis fulminante (4%), hepatitis autoinmune (1%) y otros (8%). Los receptores se clasificaron en dos grupos en función de la incidencia de episodios de RA: rechazo agudo (RA, n=25) y no rechazo agudo (NRA, n=58).

El diagnóstico de RA se realizó en función de los criterios clínicos, bioquímicos e histológicos convencionales descritos en capítulos anteriores. La inmunosupresión consistió en la triple terapia inmunosupresora estándar con metilprednisolona, azatioprina y CsA. Adicionalmente se utilizaron regímenes individuales con bolos de 1 g de metilprednisolona en caso de episodios de RA.

2.2. Monitorización de poblaciones linfocitarias

La monitorización de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo se realizó tal como se ha descrito previamente (9,11). Brevemente, se recogieron muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA en el periodo pre-trasplante (día 0) y en los siguientes periodos post-trasplante: días 1 a 3, 4 a 6, 7 a 9, 10 a 13, 14 a 17, 18 a 21, 22 a 25, y después del día 25. Las muestras de sangre periférica se marcaron inmediatamente con una combinación de diferentes AcMo siguiendo las técnicas estándar de inmunofluorescencia. Se adquirieron un total de 8×10^3 linfocitos en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson BD, San Jose, CA), en una región de adquisición en la que se consideraron los parámetros "light scatter", y la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD45/CD14. La intensidad media de fluorescencia (IMF) se determinó por medio del

programa PAINT-A-GATE plus (BD), utilizándose como medida relativa de la densidad de las diferentes moléculas analizadas. El número absoluto de células de las diferentes subpoblaciones se obtuvo a partir del valor absoluto de linfocitos obtenidos con un contador leucocitario (Sysmex, Toa Medical Electronic Co, Japan).

2.3. Anticuerpos monoclonales

Para la monitorización de poblaciones linfocitarias se utilizaron diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos frente a antígenos humanos: anti-CD45 (Hle-1, PerCP; BD), anti-CD14 (Leu-M3, Phycoerythrin; BD), anti-HLA clase-I (HLA-ABC, FICT; Serotec Ltd., Oxford, England), anti-CD3 (Leu-4, PerCP; BD), anti-CD4 (Leu3a, PerCP; BD), anti-CD5 (Leu-1, PE; BD), (anti-CD8, Leu-2a; BD), anti-CD19 (Leu-12, FITC; BD), anti-CD28 (CD28.2, FITC; Immunotech, Marseille, France), anti-CD80 (BB1, FITC; Pharmingen, San Diego, CA), anti-CD86 (IT2.2, PE; Pharmingen), anti-CD95 (DX2, PE; BD) y anti-CTLA-4 (BNI3.1, PE; Pharmingen). El reactivo Simultest IgG1-FITC/IgG2a-PE (BD) y IgG1-TRICOLOR (Caltag, Buckingham, UK) se utilizaron para determinar la fluorescencia de base.

Además, para los ensayos de bloqueo de coestimulación *in vitro* se utilizaron los anticuerpos purificados: anti-CD80 (BB1; Pharmingen) y anti-CD86 (IT2.2; Pharmingen). Adicionalmente se utilizó el anticuerpo anti-CD86 (FUN-1, PE; Pharmingen) que reconoce un epítipo diferente al clon IT2.2, para detectar la presencia de células CD86⁺ en cultivo. Asimismo, se utilizaron los controles de isotipos (mouse IgG1 y mouse IgM, purificados, BD) para determinar el efecto del uso de anticuerpos inespecíficos en cultivo.

2.4. Cuantificación de apoptosis espontánea e inducida por PHA

El estudio de apoptosis se realizó con células mononucleares de sangre periférica obtenida de receptores hepáticos (RA, n=4, NRA, n=12) y de controles sanos (n=14). Las células mononucleares se aislaron en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, en muestras obtenidas en el periodo pre-trasplante (día 0) y en los periodos post-trasplante: días 7 a 14 y 15 a 21, y se cultivaron durante 72 hrs con medio completo (MC) (RPMI-1640 suplementado con L-glutamina 1mM, penicilina/estreptomina al 1% y suero humano AB inactivado con calor al 10%) para determinar la apoptosis espontánea, o inducida mediante estímulo policlonal con PHA a 1/500 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). La apoptosis se determinó midiendo la incorporación de 7-AAD (Calbiochem,

San Diego, CA) a 0 hrs, 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs del cultivo, siguiendo las indicaciones descritas previamente (25).

2.5. Efecto del tratamiento con anti-CD80, anti-CD86 y CsA en cultivo mixto sobre la proliferación y los niveles de apoptosis linfocitaria

Para cada tipo de cultivo mixto linfocitario (CML) se realizaron tres experimentos utilizando muestras de donantes voluntarios sanos con el fin de determinar el efecto que el bloqueo de las señales coestimuladoras (CD80 y CD86) y el uso de inmunosupresores (CsA) tenía sobre los niveles de proliferación y apoptosis, y el perfil de poblaciones linfocitarias inducido en la respuesta alógena *in vitro*. La metodología se detalla en el capítulo 3 donde se describe la puesta a punto del método de determinación simultánea de proliferación y apoptosis en CML por citometría de flujo. Brevemente, se seleccionaron tres parejas respondedor (R) y estimulador (S) con tipaje HLA conocido y con la condición de tener al menos dos incompatibilidades en HLA-DR. Las parejas tenían el siguiente tipaje HLA:

Pareja 1: R1 (A31,32;B41,42;DR17,18) vs S1 (A24,30;B35,38;DR1,11).

Pareja 2: R2 (A1,29;B8,44;DR4,7) vs S2 (A1,3;B8,38;DR17,14).

Pareja 3: R3 (A29,-;B35,13;DR1,13) vs S3 (A31,32;B41,42;DR17,18).

Los experimentos consistieron en un cultivo primario de 7 días bajo diferentes condiciones, seguidos de un cultivo secundario en el que se mantenían las condiciones iniciales o se retiraba la inmunosupresión, los detalles de los mismos se recogen en la tabla 1. Los cultivos se realizaron

mezclando las células respondedoras marcadas con CFSE 1 μ M (Molecular Probes, Eugene, OR) y estimuladoras (irradiadas con 25 Gy) en una proporción de 1:1 partiendo de una concentración de 1×10^6 cels/ml de cada población. Como control se realizaron los correspondientes cultivos con estímulos autólogos. La concentración de los AcMo anti-CD80 y anti-CD86 fue de 4 μ g/ml. La CsA se utilizó en concentraciones farmacológicas (concentración final de 400 ng/ml), equivalentes a las que se usan en el mantenimiento del trasplante hepático durante el primer año post-trasplante.

A lo largo del periodo del cultivo primario y secundario se realizó el estudio de apoptosis de las células respondedoras a las 0 hrs, 96 hrs, 144 hrs y 168 hrs, utilizando el método de incorporación de 7-AAD. Simultáneamente, se determinó el grado de proliferación total y el de las poblaciones CD3⁺CD8⁺ y CD3⁺CD8⁻ y el nivel de expresión de los marcadores CD28, CD95, CD86 y HLA-DR.

2.6. Determinación del polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L

El análisis del polimorfismo de CD86 (CD86 +1057), CD95 (CD95 -670 y -1377) y CD95L (IVS2nt-124 y IVS3nt169), se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior.

2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 10.0 software (SPSS Inc. Illinois, USA). La comparación de los valores obtenidos para los distintos marcadores en los grupos de RA y NRA se realizó por medio del test de la T de Student. La comparación de los valores de expresión de CD86, CD95 y CD95L de linfocitos de SP en función del

Tabla 1. Condiciones de estimulación en cultivo mixto leucocitario primario y secundario

Estímulo Primario	Estímulo Secundario
Medio Completo	a) Medio Completo b) CsA + anti-CD80 + anti-CD86
anti-CD80 + anti-CD86	a) Medio Completo b) anti-CD80 + anti-CD86
CsA	a) Medio Completo b) CsA
CsA + anti-CD80 + anti-CD86	a) Medio Completo b) CsA + anti-CD80 + anti-CD86

polimorfismo de los respectivos genes se realizó utilizando el test de Kruskal-Wallis. La significación estadística se estableció para valores de $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Monitorización de poblaciones linfocitarias en sangre periférica

Tal como se ha descrito en estudios previos de nuestro grupo, todos los pacientes mostraron un aumento significativo en los niveles absolutos de leucocitos de SP en el periodo post-trasplante, especialmente a partir de la segunda semana que posteriormente se reducía progresivamente a lo largo del estudio. Estos valores eran significativamente superiores en el grupo RA a partir de la tercera semana post-trasplante (Fig 1A). Por el contrario, todos los pacientes mostraron una caída significativa de monocitos en SP durante los primeros días post-trasplante (días 1-3) recuperándose de forma progresiva en días posteriores (Fig 1B), si bien, aquellos pacientes que sufrían episodios de RA presentaban una nueva caída en los niveles de monocitos en la segunda semana post-trasplante, coincidiendo con el periodo de mayor frecuencia de RA, probablemente debido al tratamiento inmunosupresor administrado para controlar los episodios de RA. Un comportamiento similar se observaba en las cifras de los linfocitos de SP, especialmente en la primera semana post-trasplante (Fig 1C). En el caso de los pacientes que sufrían episodios de RA se observaba una ligera recaída en la segunda semana post-trasplante, coincidiendo con el periodo de mayor frecuencia de episodios de RA, si bien esta diferencia no era estadísticamente significativa. Posteriormente, se observaban en ambos grupos una recuperación progresiva de las cifras normales a lo largo del periodo de estudio.

Al analizar la composición de las diferentes subpoblaciones linfocitarias de SP, se observó que la población de linfocitos B ($CD19^+$) se mantenía estable a lo largo del periodo de estudio en ambos grupos (Fig 1D). Por el contrario, la población de linfocitos T ($CD3^+$) mostraba un comportamiento similar a la observada en los linfocitos totales (Fig 1E), durante la primera semana post-trasplante donde se detectaba una caída significativa en los niveles absolutos de linfocitos T en ambos grupos. En la segunda semana post-trasplante se recuperaron los niveles normales, si bien, en el grupo de RA se producía una recaída estadísticamente significativa en los niveles absolutos coincidiendo con el periodo de mayor incidencia de RA. Posteriormente, al final del periodo estudiado se observó una ligera caída en el grupo NRA mientras que en el grupo RA se recuperaban los niveles normales. Tal como se muestra en las figuras 1F y 1G,

este comportamiento se refleja tanto en la subpoblación de linfocitos T $CD4^+$ como en la subpoblación T $CD8^+$, de manera semejante a la descrita para la población total ($CD3^+$).

Al analizar la expresión de las moléculas coestimuladoras CD28, CD80 y CD86 en linfocitos a lo largo del primer mes post-trasplante, se confirman los resultados descritos previamente en publicaciones de nuestro grupo. Las poblaciones $CD4^+CD28^+$ y $CD8^+CD28^+$ (Fig 1H y 1I) siguen una evolución paralela a la de la población de linfocitos T totales ($CD3^+$). Sin embargo, el estudio de la expresión del marcador CD28 de superficie revela un incremento en la expresión de la molécula CD28 tanto en la población $CD4^+$ (Fig 2A) como en la $CD8^+$ (Fig 2B) durante los días de aparición del rechazo agudo (grupo RA), mientras que en los receptores con buena aceptación del injerto (grupo NRA), la molécula mantuvo sus niveles pre-trasplante. Asimismo, nuestros resultados demuestran que aquellos pacientes que sufrían de episodios de RA muestran un aumento significativo en el número absoluto de linfocitos T $CD86^+$ ($CD19^-CD5^+CD86^+$) durante la segunda semana post-trasplante (Fig 1J), coincidiendo con el periodo de mayor frecuencia de episodios de RA. Con respecto a los niveles de expresión de CD80 y CD86 en linfocitos B ($CD19^+$) no se observan variaciones significativas a lo largo del periodo de estudio (Fig 2C y 2D).

El estudio a lo largo del primer mes post-trasplante en la población linfoide de las moléculas implicadas en apoptosis (CD95 y CD95L) refleja un incremento significativo ($p < 0.05$) en el número absoluto de linfocitos B $CD19^+CD95^+$ en el grupo RA con respecto al grupo NRA desde el día 7 al 17 post-trasplante (Fig. 1K), periodo que coincide con la mayor incidencia de episodios de RA. Sin embargo, la expresión de CD95 en linfocitos $CD19^+$ (Fig 2E) muestra solo un ligero incremento en pacientes del grupo de RA patente desde el día 4 post-trasplante hasta el final del periodo estudiado, que no llega a ser estadísticamente significativo.

Por otro lado, el análisis del número absoluto de linfocitos T que expresan CD95 ($CD3^+CD95^+$) no mostró diferencias significativas entre los dos grupos de estudio (Fig 1L). Sin embargo, todos los pacientes experimentaron un aumento en la expresión de CD95 en linfocitos $CD3^+$ durante la primera semana post-trasplante. Después del día 7 post-trasplante, el incremento de CD95 en el grupo RA alcanza sus valores máximos y estadísticamente significativos ($p < 0.05$), coincidiendo con el periodo de mayor frecuencia de rechazo, recuperando sus niveles basales después de este periodo (Fig 2F). Por otro lado, la expresión de CD95L no se detectó ni en los linfocitos T ni en los B de los dos grupos de pacientes.

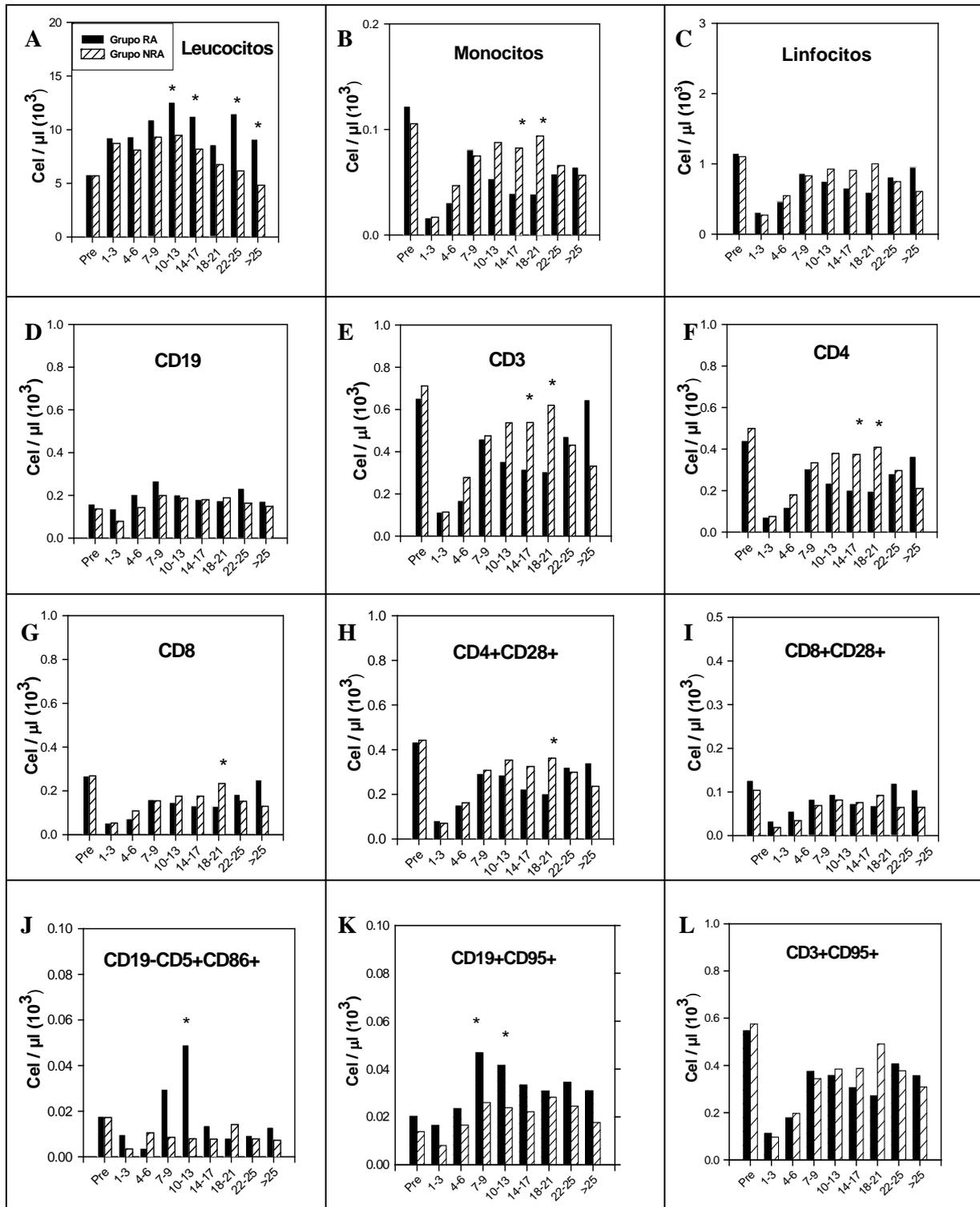


Fig. 1. Monitorización de poblaciones leucocitarias en el pre- y post-trasplante y su relación con la incidencia de rechazo agudo. **A)** Número absoluto de leucocitos (células/μL (10³)), **B)** Monocitos, **C)** Linfocitos totales, **D)** Linfocitos B (CD19⁺), **E)** Linfocitos T (CD3⁺), **F)** Linfocitos CD3⁺CD4⁺, **G)** Linfocitos CD3⁺CD8⁺, **H)** Linfocitos CD4⁺CD28⁺, **I)** Linfocitos CD8⁺CD28⁺, **J)** Linfocitos T CD86⁺ (CD19⁺CD5⁺CD86⁺), **K)** Linfocitos B CD95⁺ (CD19⁺CD95⁺) y **L)** Linfocitos T CD95⁺ (CD3⁺CD95⁺) en los grupos RA y NRA de receptores de injerto hepático. RA=rechazo agudo, NRA=no rechazo agudo, *indica diferencias estadísticas entre grupos (p<0.05).

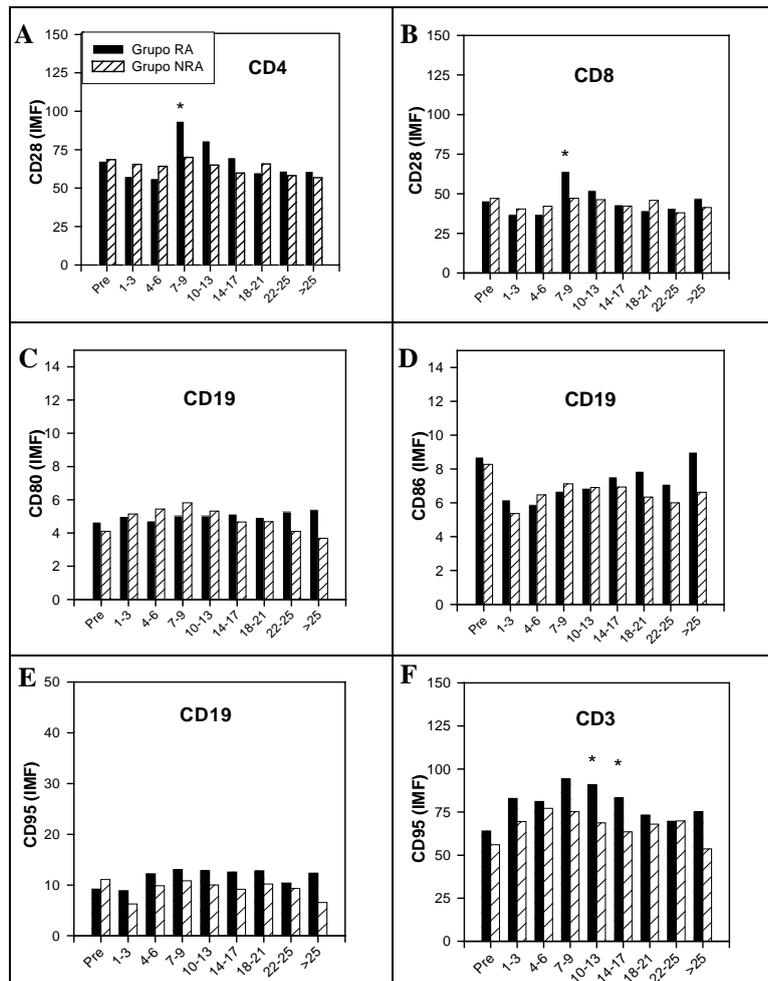


Fig. 2. Expresión de marcadores linfocitarios en el pre- y post-trasplante de acuerdo con la incidencia de rechazo agudo. **A)** y **B)** Expresión del marcador CD28 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. **C)** y **D)** Expresión de CD80 y CD86 en linfocitos B (CD19⁺). **E)** y **F)** Expresión de CD95 en linfocitos B (CD19⁺) y T (CD3⁺) respectivamente. RA=rechazo agudo, NRA=no rechazo agudo, IMF=intensidad media de fluorescencia, *indica diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$).

3.2. Asociación del polimorfismo de CD86, CD95 y CD95L y la expresión de CD86, CD95 y CD95L en células mononucleares de SP

En la figura 3 se muestra el estudio comparativo de la expresión pre-trasplante de CD86 en monocitos y CD95 en linfocitos T (CD3⁺) y B (CD19⁺) de SP en función del polimorfismo de los respectivos genes, CD86 (CD86 +1057 G/A), CD95 (CD95 -670 A/G y -1377 G/A). Debido a que no se detectó la presencia de CD95L en las células mononucleares de SP no se pudo realizar el análisis correspondiente. Los datos parecen indicar que no existe una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión en membrana de las moléculas CD86 y CD95 detectados en el pre-trasplante y las variantes genéticas estudiadas.

3.3. Apoptosis espontánea e inducida por PHA

El análisis *in vitro* del nivel de apoptosis espontánea en medio completo (MC) o inducida con PHA mostró que los individuos del grupo NRA desarrollaron un nivel de apoptosis similar al del grupo control, tanto en el periodo pre- como en el post-trasplante. Por el contrario, en el grupo RA, el nivel de apoptosis se incrementó significativamente ($p < 0.05$) con respecto al grupo NRA, en muestras extraídas en la segunda (días 7-14) y tercera semana (días 15-21) post-trasplante tanto en cultivos con MC como en los estimulados con PHA, coincidiendo con el periodo de mayor frecuencia de episodios de RA. Estas diferencias se podían observar a las 48 hrs y a las 72 hrs de cultivo (Fig 4).

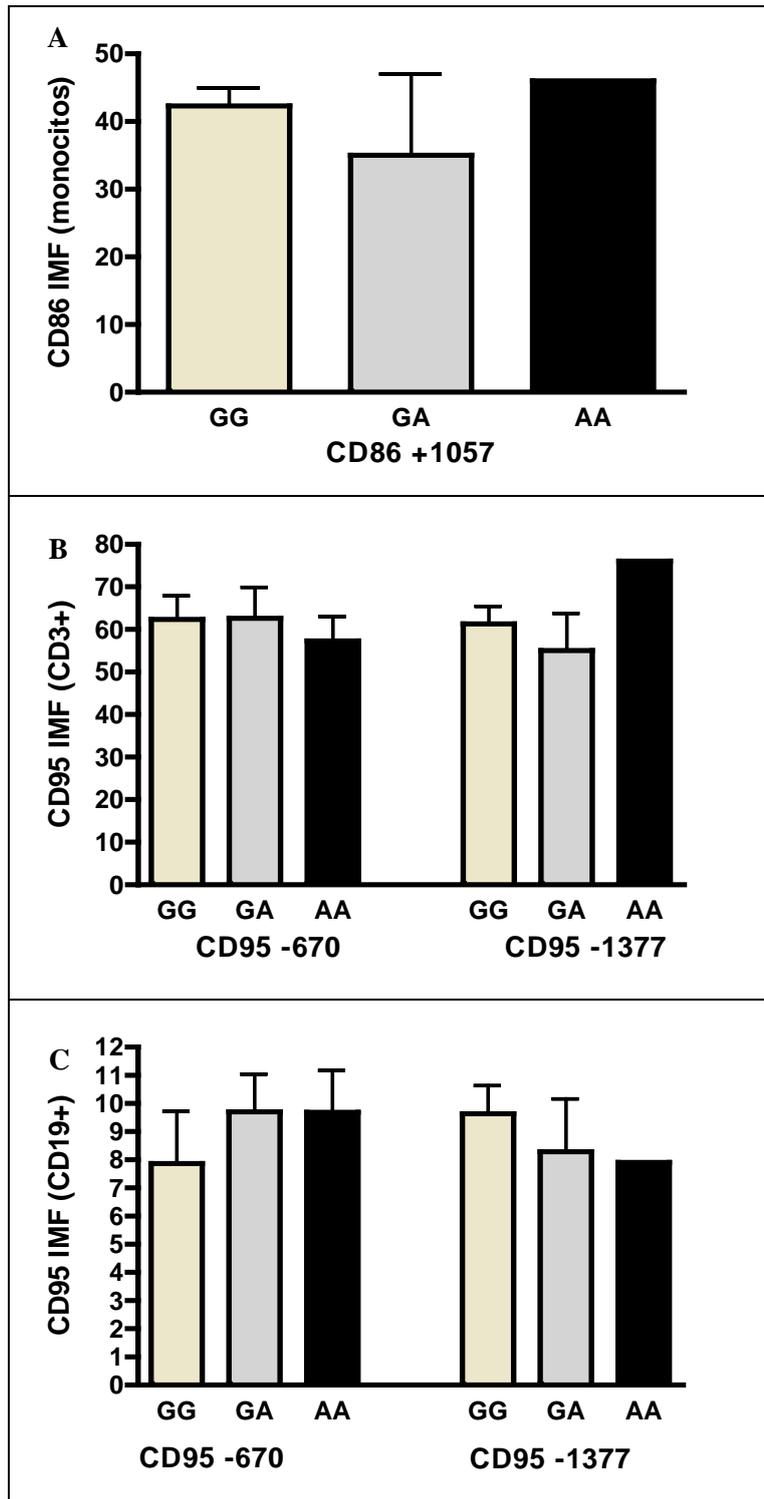


Fig. 3. Expresión pre-trasplante de CD86 en monocitos y de CD95 en linfocitos T y B de SP y su relación con el polimorfismo de los respectivos genes: **A)** CD86 en posición +1057, **B)** CD95 en linfocitos T (CD3⁺) en posiciones -670 y -1377. **C)** CD95 en linfocitos B (CD19⁺) en posiciones -670 y -1377. IMF=intensidad media de fluorescencia.

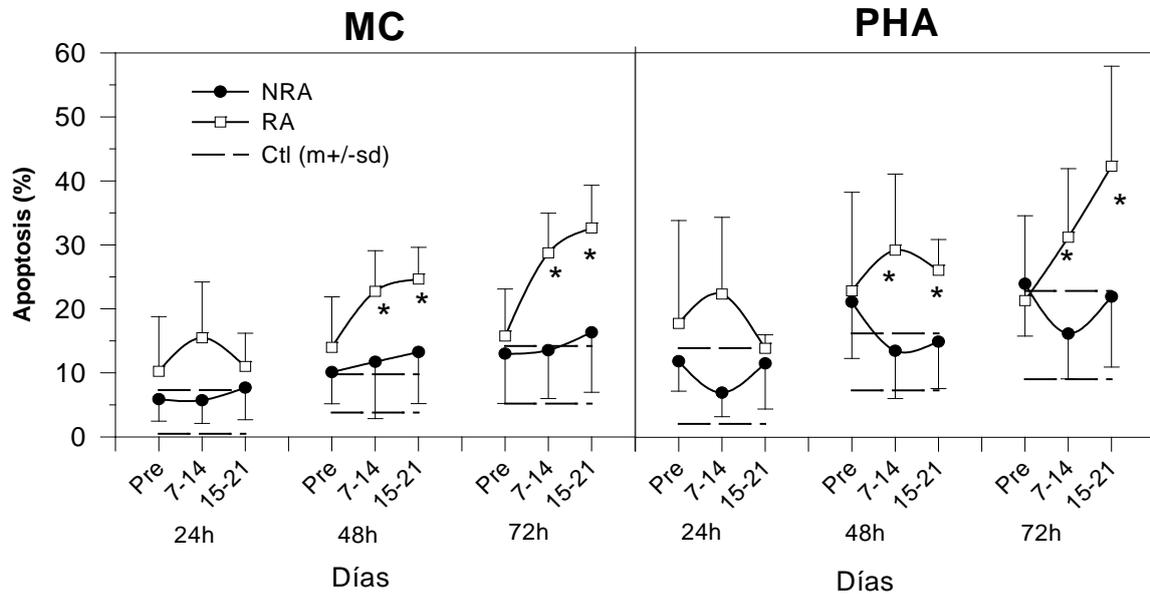


Fig 4. Porcentaje de apoptosis espontánea (MC) e inducida por activación con mitógenos (PHA) en el pre- y post-trasplante. La apoptosis fue determinada a las 0 hrs, 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs de cultivo y se expresa como el incremento del porcentaje determinado a las 0 hrs. RA=rechazo agudo, NRA=no rechazo agudo, Ctl=control. *indica diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$)

3.4. Monitorización de la proliferación y apoptosis en respuesta alogénica *in vitro*: Efecto del bloqueo con anti-CD80, anti-CD86 y CsA

Con el objetivo de corroborar los resultados observados *in vivo* en trasplante hepático, se realizaron una serie de experimentos utilizando el cultivo mixto linfocitario como modelo clásico de respuesta alogénica *in vitro*. Para ello, se diseñó un conjunto de CML primarios y secundarios con donantes sanos, bajo diferentes condiciones de inmunosupresión (anti-CD80, anti-CD86 o CsA), en los que se analizó el nivel de proliferación, apoptosis, expresión de marcadores de superficie celular y el perfil de poblaciones linfocitarias implicadas. En la figura 5A se pueden observar las poblaciones de células apoptóticas (Ap), células proliferantes (P) y no-proliferantes (NP) en función del tamaño FSC y granularidad (SSC), y del FSC y la expresión de CFSE (Fig 5B).

Los datos mostrados, resumen los resultados comunes obtenidos en los tres experimentos realizados, donde aparecen variaciones en el nivel de proliferación así como en la proporción de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ obtenidos, que entre otras razones podrían depender de la combinación de células estimuladoras y respondedoras utilizadas.

De forma general y bajo las diferentes condiciones de estimulación, la expresión del marcador CD28 de

los linfocitos T proliferantes $CD28^+CFSE^{dim}$, tras 7 días de cultivo, resulta mayor que la de los linfocitos T no proliferantes $CD28^+CFSE^{high}$, pues estos presentan una expresión similar a la detectada antes del cultivo (Fig 5C y 5D). De manera similar, se observa que el nivel de expresión del marcador CD95 de los linfocitos T proliferantes es significativamente mayor que el de los linfocitos T $CD95^+$ no proliferantes (Fig 5E y 5F). Asimismo, en los linfocitos T proliferantes tras cultivo alogénico, las moléculas DR y CD86 se expresan mayoritariamente, mientras que los linfocitos T que no proliferan son mayoritariamente DR^- y $CD86^-$ (Fig 5G-5J).

3.4.1. Cultivo primario basal

Como ensayo de referencia se analizó la evolución del CML sin inmunosupresión. La figura 6A muestra los resultados de proliferación y apoptosis de las poblaciones de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en cultivos estimulados con células autólogas. En el cultivo primario basal, se observó la aparición de células proliferantes a partir de las 96 hrs de cultivo con un máximo a las 168 hrs (Fig 6B). Las células que proliferan en estas condiciones son mayoritariamente $CD3^+CD8^+$ (~67.000 cels/pocillo), si bien también prolifera en menor grado la población de $CD3^+CD4^+$ (~16.000 cels/pocillo). Al analizar las características de las células proliferantes se observa que la población $CD3^+CD8^+$, muestra una proporción similar de células $CD28^+$ y $CD28^-$ (Fig 8A). Además, tanto la población

CD3⁺CD8⁺ como la CD3⁺CD4⁺ proliferante expresan CD86 (Fig 10A).

La cinética de los niveles de apoptosis en las células no proliferantes no se modifica prácticamente con respecto a la del cultivo autólogo (Fig 6A y 6B), mientras que la de las células proliferantes es poco significativa. Tras realizar el cultivo secundario reestimulando bajo las mismas condiciones que el primario, se observa una cinética semejante a la del

cultivo primario, con un incremento de la proliferación de las células CD3⁺CD8⁺ hasta las 144 hrs (~48.000 cels/pocillo), a las 168 hrs de cultivo, esta población decae drásticamente de forma simultánea a un aumento de los niveles de apoptosis (~55.000 cels/pocillo), probablemente debida a un efecto de apoptosis inducida por proliferación y/o un agotamiento del medio de cultivo (Fig 6B). Por el contrario, los niveles de proliferación de la población

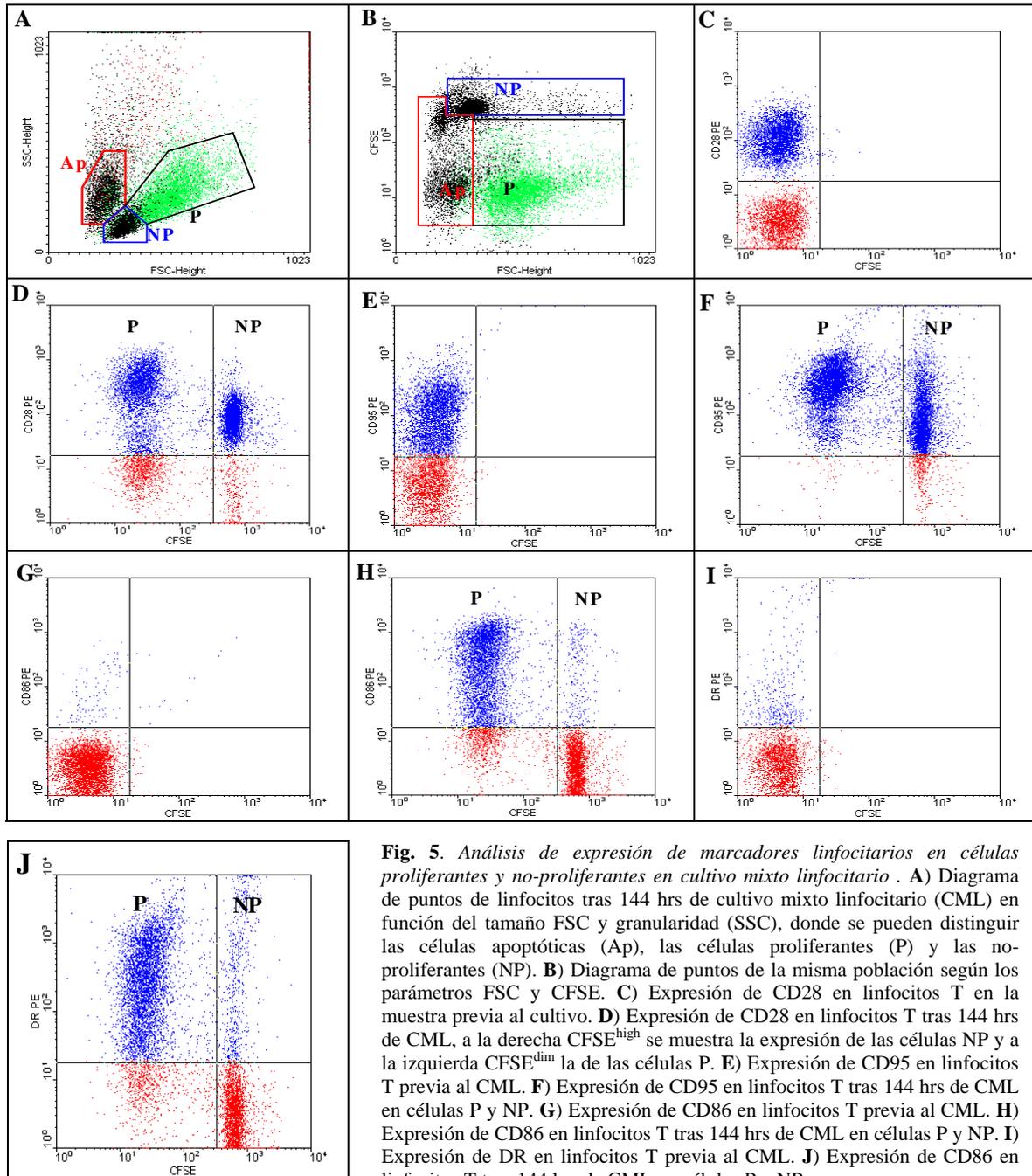


Fig. 5. Análisis de expresión de marcadores linfocitarios en células proliferantes y no-proliferantes en cultivo mixto linfocitario . **A)** Diagrama de puntos de linfocitos tras 144 hrs de cultivo mixto linfocitario (CML) en función del tamaño FSC y granularidad (SSC), donde se pueden distinguir las células apoptóticas (Ap), las células proliferantes (P) y las no-proliferantes (NP). **B)** Diagrama de puntos de la misma población según los parámetros FSC y CFSE. **C)** Expresión de CD28 en linfocitos T en la muestra previa al cultivo. **D)** Expresión de CD28 en linfocitos T tras 144 hrs de CML, a la derecha CFSE^{high} se muestra la expresión de las células NP y a la izquierda CFSE^{dim} la de las células P. **E)** Expresión de CD95 en linfocitos T previa al CML. **F)** Expresión de CD95 en linfocitos T tras 144 hrs de CML en células P y NP. **G)** Expresión de CD86 en linfocitos T previa al CML. **H)** Expresión de CD86 en linfocitos T tras 144 hrs de CML en células P y NP. **I)** Expresión de DR en linfocitos T previa al CML. **J)** Expresión de DR en linfocitos T tras 144 hrs de CML en células P y NP.

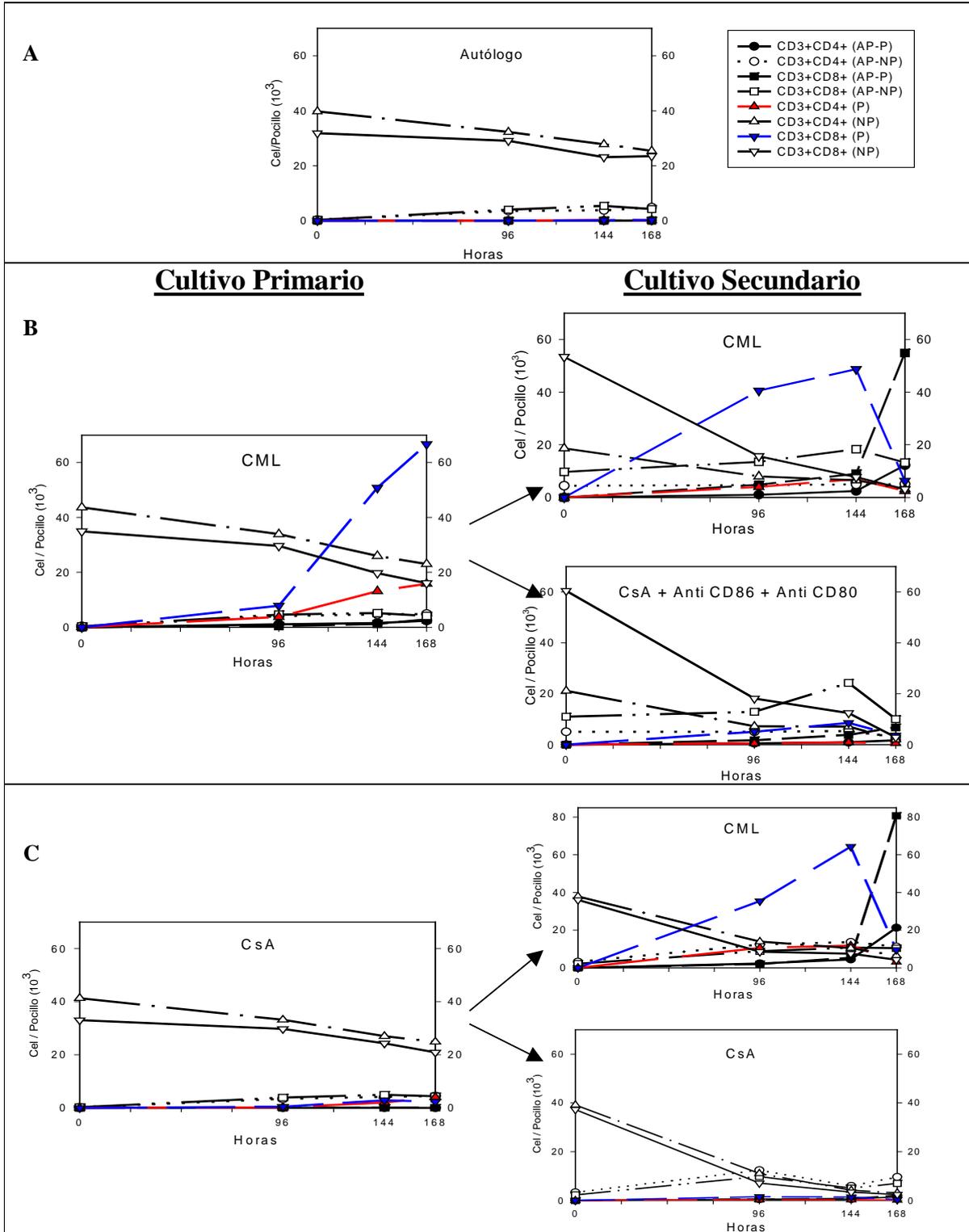


Fig. 6. Análisis de la proliferación y apoptosis en cultivo mixto linfocitario bajo diferentes condiciones de cultivo (I). **A)** Cinética de la proliferación y apoptosis de las poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en cultivo autólogo. **B)** Evolución de la proliferación y apoptosis en CML primario (izquierda) y secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o añadiendo CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo). **C)** Evolución de la proliferación y apoptosis en CML primario con CsA (izquierda) y secundario sin CsA (derecha arriba) o añadiendo CsA (derecha abajo). AP=apoptóticas, P=proliferantes y NP=no proliferantes.

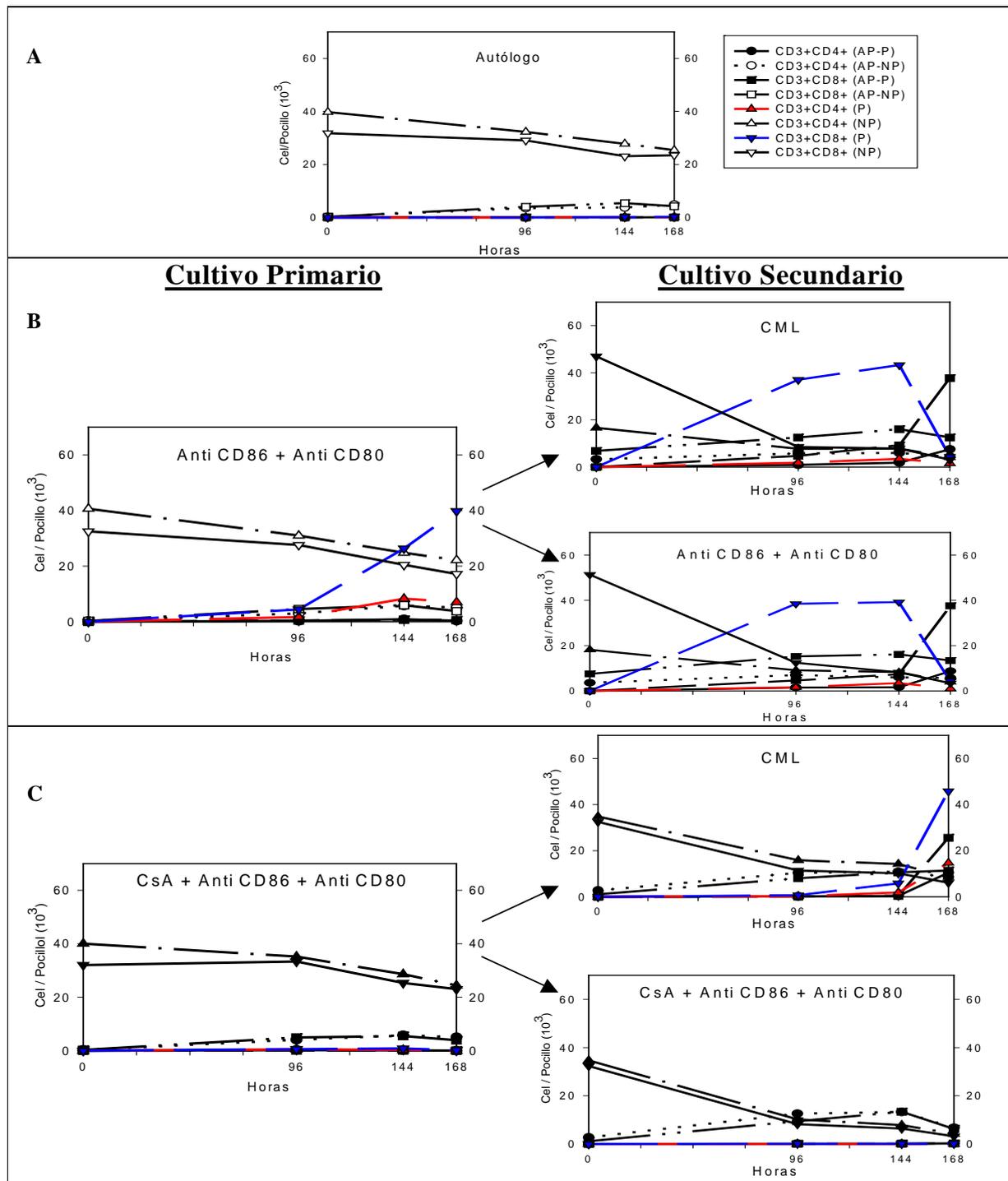


Fig. 7. Análisis de la proliferación y apoptosis en cultivo mixto linfocitario bajo diferentes condiciones de cultivo (II). **A)** Cinética de la proliferación y apoptosis de las poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en cultivo autólogo. **B)** Evolución de la proliferación y apoptosis en CML primario añadiendo anti-CD86 + anti-CD80 (izquierda) y secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o reestimulando con anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo). **C)** Evolución de la proliferación y apoptosis en CML primario inmunosuprimido con CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (izquierda) y secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o añadiendo CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo). AP=apoptóticas, P=proliferantes y NP=no proliferantes.

CD3⁺CD4⁺ son poco relevantes. En la población proliferante tanto las células CD3⁺CD8⁺ como las CD3⁺CD4⁺ expresan mayoritariamente los marcadores CD28 y CD86 (Fig 8A y 10A), si bien tras 144 hrs de cultivo se observa un incremento importante de las poblaciones CD3⁺CD8⁺CD86⁻ y CD3⁺CD8⁺CD28⁻. Cuando se analiza la evolución tras realizar el cultivo secundario añadiendo simultáneamente CsA, anti-CD80 y anti-CD86 (Fig 6B, 8A y 10A), se produce un bloqueo completo de la proliferación de las diferentes poblaciones, si bien a lo largo del cultivo no se detecta un incremento significativo en los niveles de apoptosis, así la cinética de apoptosis es semejante a la observada en el cultivo secundario sin inmunosupresión.

3.4.2. Cultivo primario con CsA

La evolución del cultivo primario en presencia de CsA muestra una cinética semejante a la del cultivo autólogo (Fig 6C), tanto en proliferación como en apoptosis, si bien se aprecia la aparición de una población residual de células proliferantes (~5.000 cels/pocillo) constituida por una proporción semejante de linfocitos CD3⁺CD8⁺ y CD3⁺CD4⁺. La reestimulación manteniendo CsA redundaría en una inhibición total de la proliferación y en una aceleración de la aparición de apoptosis en células no proliferantes, con una evidente pérdida de la mayoría de las poblaciones en cultivo.

Por el contrario, en el caso del cultivo secundario en ausencia de CsA del cultivo, se observa un aumento significativo de la proliferación que alcanza su máximo a las 144 hrs de cultivo. Esta proliferación es debida principalmente a la población de linfocitos T CD3⁺CD8⁺ (~64.000 cels/pocillo), si bien aunque en menor grado también prolifera la población CD3⁺CD4⁺ (~12.000 cels/pocillo), en ambos casos estas poblaciones expresan mayoritariamente los marcadores CD28 y CD86 (Fig 8B y 10B). Tal como ocurría en los cultivos anteriores, aquí también se observa un aumento significativo de la apoptosis de células proliferantes a las 168 hrs de cultivo, quizás inducida por la activación y el agotamiento del medio.

3.4.3. Cultivo primario con anti-CD80 + anti-CD86

Al comparar la evolución del cultivo primario bajo estas condiciones (Fig 7B), con el CML en condiciones basales, se observa una cinética semejante, si bien el nivel de proliferación es significativamente inferior, detectándose una población de linfocitos T CD3⁺CD8⁺ proliferantes (~40.000 cels/pocillo), y T CD3⁺CD4⁺ proliferantes (~7.000 cels/pocillo). Al igual que se observaba en el CML basal, tras la estimulación la población proliferante CD3⁺CD4⁺ es mayoritariamente CD28⁺,

mientras la población proliferante CD3⁺CD8⁺, muestra una proporción similar de células CD28⁺ y CD28⁻ (Fig 9A). Asimismo, tanto la población CD3⁺CD8⁺ como la CD3⁺CD4⁺ proliferante expresan mayoritariamente CD86 (Fig 11A). En el cultivo secundario, tras reestimar en ausencia de anti-CD80 y anti-CD86 se observa una cinética de proliferación y apoptosis semejante a la observada en el cultivo secundario MLC, si bien con una importante disminución de la población CD3⁺CD8⁺ (~43.000 cels/pocillo) a las 144 hrs de cultivo. Esta disminución es debida principalmente a una reducción en el número de células CD3⁺CD8⁺CD86⁺ (Fig 11A). Asimismo, a diferencia de lo observado en el CML basal, dentro de la población proliferante, la expresión de CD28 es prácticamente residual (Fig 9A). Es interesante destacar que la reestimulación secundaria manteniendo el bloqueo con anti-CD80 y anti-CD86 muestra una cinética totalmente equiparable a la obtenida sin añadir estos anticuerpos.

3.4.4. Cultivo primario con anti-CD80 + anti-CD86 + CsA

La evolución del cultivo primario adicionando anti-CD80 + anti-CD86 + CsA muestra una cinética semejante a la del cultivo autólogo (Fig 7C), tanto a nivel de proliferación como de apoptosis. La reestimulación manteniendo estas condiciones anula completamente la proliferación y acelera la apoptosis de las células no proliferantes hasta conseguir la desaparición de las células en cultivo. Por el contrario, al reestimar sin estos agentes, a las 144 hrs de cultivo se observa la aparición de células proliferantes CD3⁺CD8⁺ y CD3⁺CD4⁺ cuyo número aumenta súbitamente a las 168 hrs de cultivo [CD3⁺CD8⁺ (~46.000 cels/pocillo) y CD3⁺CD4⁺ (~15.000 cels/pocillo)]. Esta subida va acompañada de una elevación paralela de la apoptosis de estas poblaciones CD3⁺CD8⁺ (~26.000 cels/pocillo) y CD3⁺CD4⁺ (~9.000 cels/pocillo). Fenotípicamente estas poblaciones proliferantes son positivas para CD28 y CD86 (Fig 9B y 11B).

4. Discusión

El objetivo del presente estudio fue determinar la posible existencia de diferencias significativas en la evolución de las poblaciones leucocitarias de SP y la expresión de marcadores linfocitarios entre los pacientes que sufrían episodios de RA y aquellos que presentaban una buena aceptación temprana del injerto hepático. Para ello, se analizaron diferentes subpoblaciones linfocitarias (CD3, CD5, CD19, CD4 y CD8), así como la expresión de marcadores de activación (CD28, CD80 y CD86) y aquellos

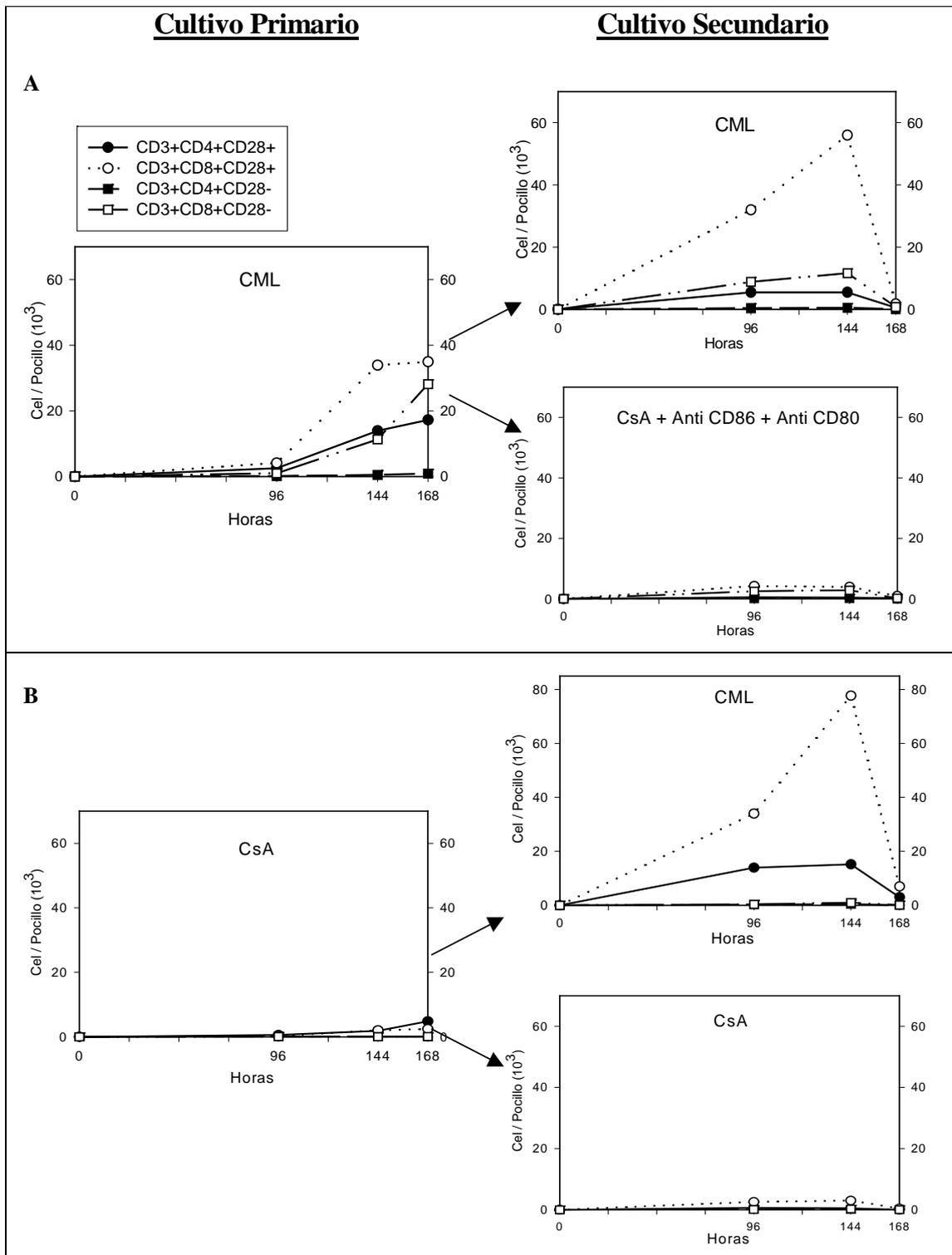


Fig. 8. Evolución de la expresión de CD28 en las células proliferantes CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en cultivo mixto linfocitario bajo diferentes condiciones de cultivo (I). **A)** Cinética de la expresión de CD28 en las poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en CML (izquierda) y CML secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o inmunosuprimido con CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo). **B)** Cinética de la expresión de CD28 en las poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en CML inmunosuprimido con CsA (izquierda) y CML secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o inmunosuprimido con CsA (derecha abajo).

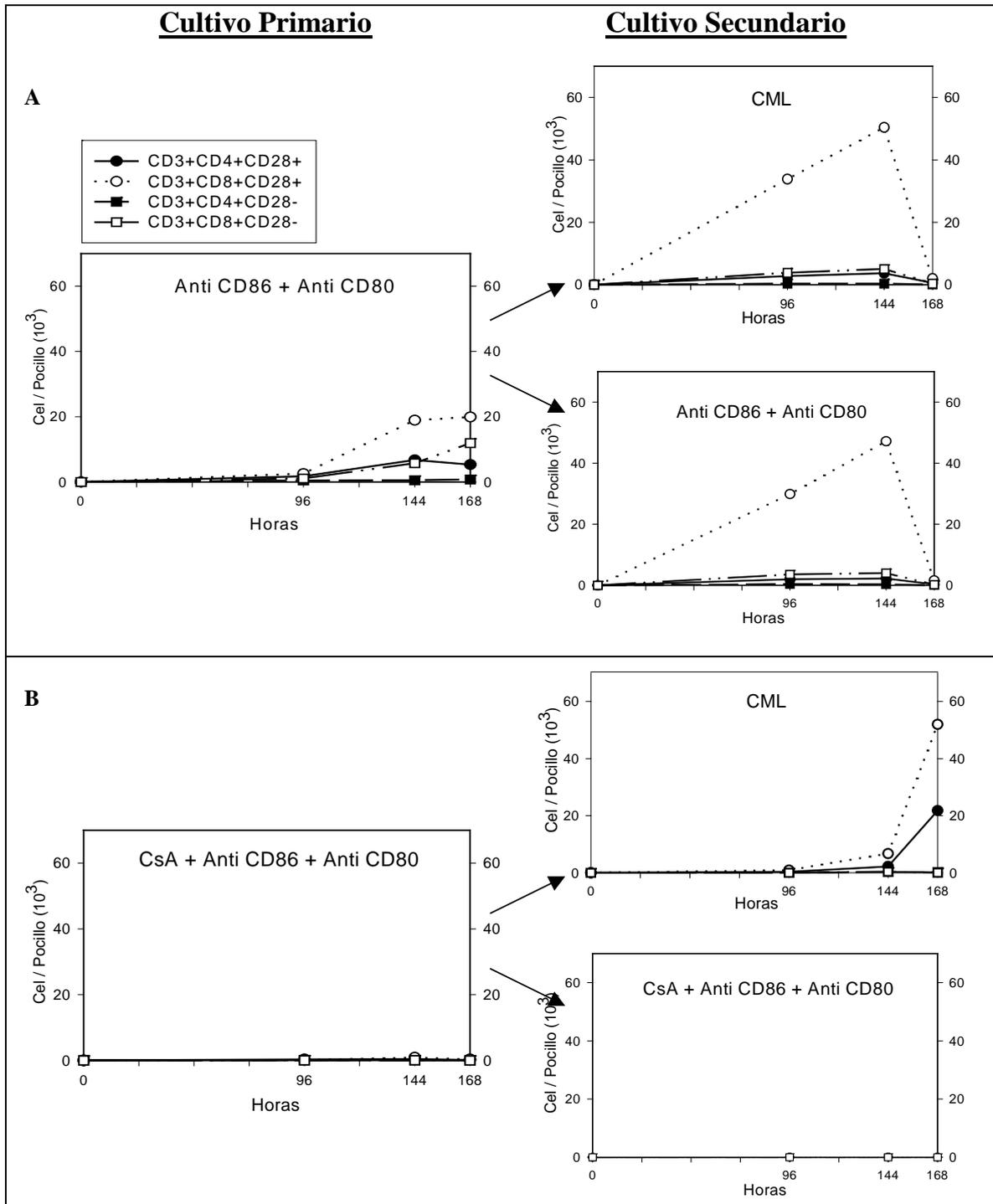


Fig. 9. Evolución de la expresión de CD28 en las células proliferantes $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ en cultivo mixto linfocitario bajo diferentes condiciones de cultivo (II). **A)** Cinética de la expresión de CD28 en las poblaciones $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ en CML primario añadiendo anti-CD86 + anti-CD80 (izquierda) y CML secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o adicionando anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo). **B)** Cinética de la expresión de CD28 en las poblaciones $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ en CML inmunosuprimido con CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (izquierda) y CML secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o inmunosuprimido con CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo).

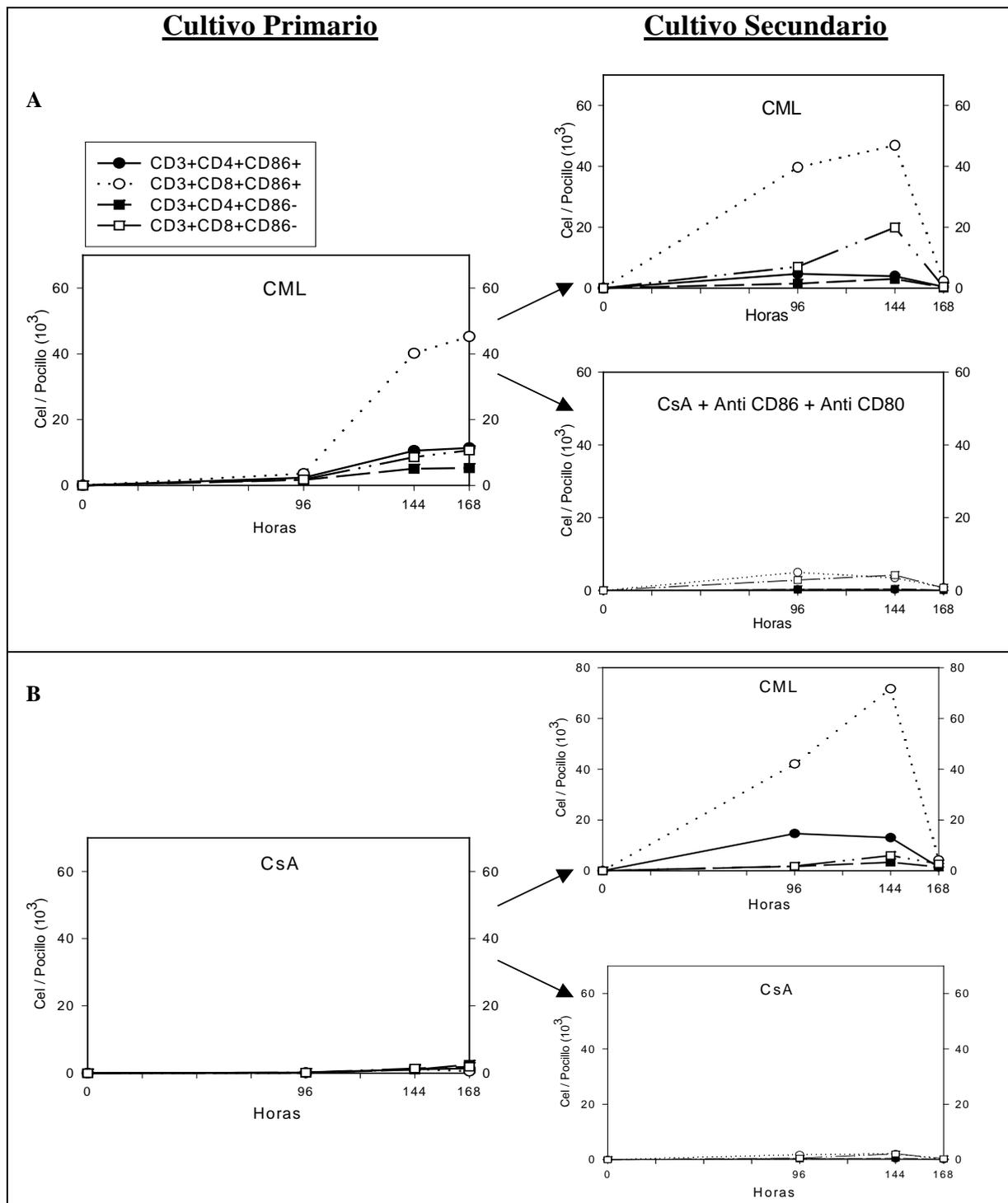


Fig. 10. Evolución de la expresión de CD86 en las células proliferantes CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en cultivo mixto linfocitario bajo diferentes condiciones de cultivo (I). **A)** Cinética de la expresión de CD86 en las poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en CML primario (izquierda) y CML secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o inmunosuprimido con CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo). **B)** Cinética de la expresión de CD86 en las poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en CML inmunosuprimido con CsA (izquierda) y CML secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o inmunosuprimido con CsA (derecha abajo).

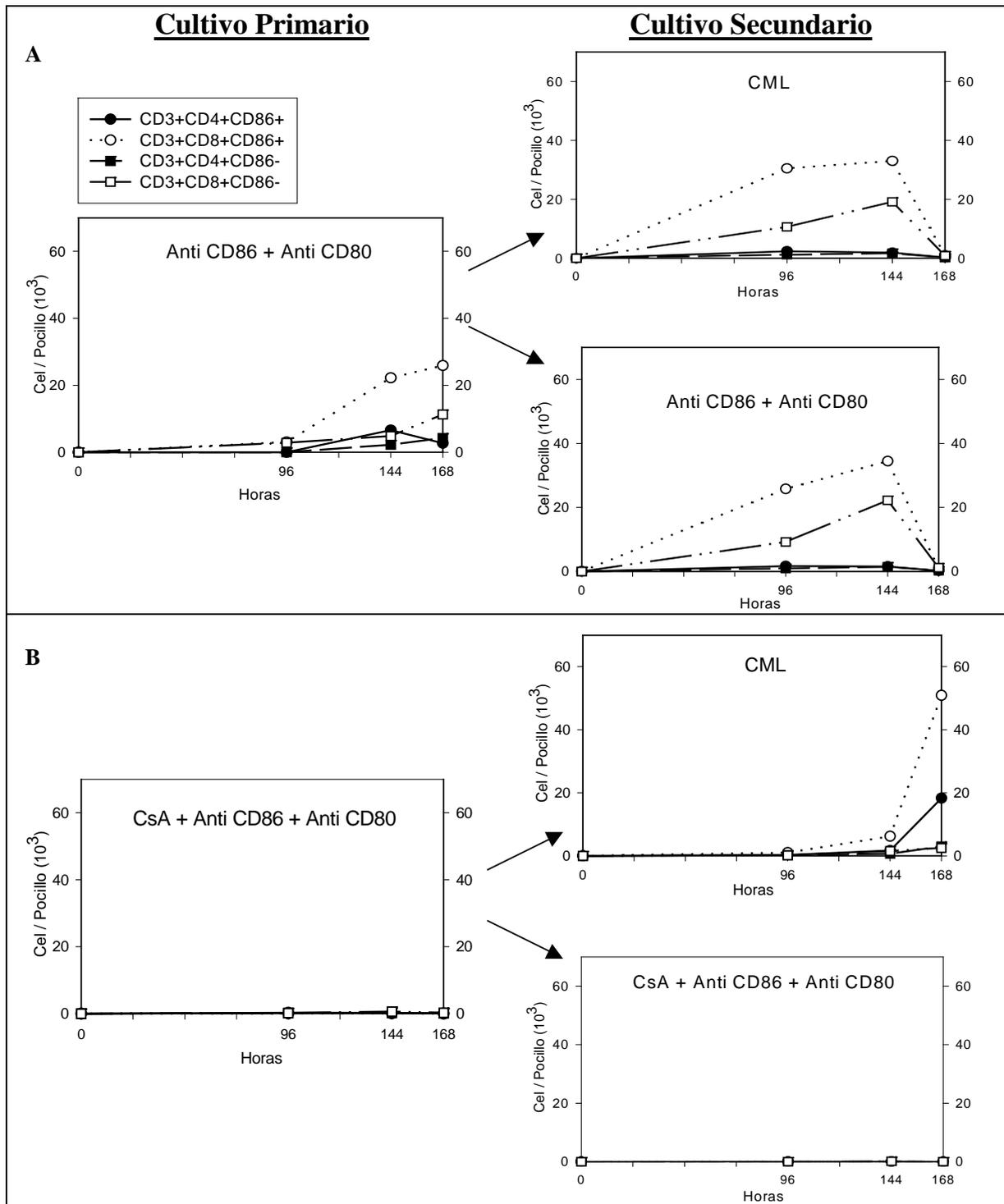


Fig. 11. Evolución de la expresión de CD86 en las células proliferantes $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ en cultivo mixto linfocitario bajo diferentes condiciones de cultivo (II). **A)** Cinética de la expresión de CD86 en las poblaciones $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ en CML primario adicionando anti-CD86 + anti-CD80 (izquierda) y CML secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o adicionando anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo). **B)** Cinética de la expresión de CD86 en las poblaciones $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ en CML inmunosuprimido con CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (izquierda) y CML secundario sin inmunosupresión (derecha arriba) o inmunosuprimido con CsA + anti-CD86 + anti-CD80 (derecha abajo).

implicados en los fenómenos de apoptosis (CD95 y CD95L). De igual manera, se intentó corroborar si los datos obtenidos *in vivo* se correspondían con lo que ocurría *in vitro* siguiendo el modelo clásico de respuesta alogénica mediante CML, en particular sobre la evolución de ciertos marcadores linfocitarios como CD28, CD86 y CD95. Por último, intentamos determinar el efecto que ejerce en la respuesta alogénica *in vitro* (apoptosis y proliferación) la inmunosupresión con CsA y el bloqueo de las señales coestimuladoras utilizando anticuerpos anti-CD80 y anti-CD86.

El análisis de subpoblaciones linfocitarias de SP confirmó los resultados descritos en estudios previos de nuestro grupo de investigación (9-11). De hecho, se detectó un incremento en la expresión de CD28 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de forma previa y durante los episodios de rechazo agudo. Estos resultados sugieren que el aumento de expresión de CD28 en los linfocitos T sería consecuencia de la intensa activación alogénica que tiene lugar en situaciones de rechazo agudo. Contrariamente, la baja expresión de CD28 en los linfocitos T de pacientes con buena aceptación del injerto podría indicar una interacción ineficiente o inductora de tolerancia con las células o tejidos injertados (26,27). En efecto, los resultados observados *in vivo* se han confirmado en los estudios realizados *in vitro* mediante CML, en los que hemos observado que los linfocitos T proliferantes CD4⁺ y CD8⁺ mostraban un aumento en la expresión del marcador CD28 tras estímulo alogénico, no solo en condiciones normales sino también en los cultivos en los que se adicionó CsA, anti-CD80 o anti-CD86. Los resultados en CML muestran que la mayoría de las células proliferantes CD4⁺ expresan CD28, tanto en cultivo primario como secundario, aunque la proporción de linfocitos proliferantes CD8⁺CD28⁺ y CD8⁺CD28⁻ puede variar en función de la combinación entre donante y receptor, si bien es mayoritaria la población CD8⁺CD28⁺. No obstante, pese a que la proporción de linfocitos T CD8⁺CD28⁻ sea menor, su papel en la regulación de la respuesta alogénica puede ser fundamental. Se ha demostrado que pueden actuar como una población T supresora (Ts) capaz de modular la acción de las células T helper (Th) de forma restringida por MHC mediante la inhibición de las células presentadoras de antígeno (APCs). Dicha inhibición se realizaría a través de la interacción de las Ts con las APC y la inducción de la expresión de los receptores de inhibición ILT3 e ILT4 en la superficie de la APC. Estas APCs potencialmente tolerizantes serían incapaces de inducir la regulación positiva de sus moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 bloqueando así la activación de las células Th (28,29). Por ello, cabe pensar que la proporción de poblaciones activadoras y supresoras puede variar en función de la combinación de

moléculas HLA existente entre donante y receptor, del perfil genético del receptor y de su historial inmunológico, lo que condicionaría finalmente el grado de respuesta alogénica.

Además, en este trabajo se describe por primera vez en trasplante hepático, la aparición de una población de linfocitos T CD86⁺ coincidiendo con el desarrollo de episodios de RA. Diversos trabajos han descrito la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en linfocitos T activados de sangre periférica, en clones T CD4, clones T CD8 y clones de células NK (30-32). Asimismo, se ha observado la expresión de CD86 en los linfocitos T procedentes de pacientes con diferentes patologías como fluido sinovial reumatoide (33,34), sangre periférica de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (35), pacientes con mieloma (36), en linfocitos T infiltrantes de tumor procedentes de ascitis de pacientes con cáncer ovárico, otros tipos de carcinomatosis peritoneales (37) y en linfocitos T activados *in vitro* de pacientes con VIH (38). Igualmente, se ha descrito que las células dendríticas (CD) serían capaces de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras B7 en linfocitos T autólogos (39). Por otro lado, en el presente trabajo hemos demostrado que en CML los linfocitos T proliferantes expresan CD86 tras 144 hrs de cultivo, coexpresando a su vez altos niveles de HLA de Clase II (DR), en concordancia con lo descrito previamente (40). El análisis conjunto de todos estos datos y tal como se ha sugerido previamente (41,42), es lógico pensar que la expresión combinada de HLA-DR y moléculas coestimuladoras indicaría una potencial función como APCs. En este sentido, estudios recientes han demostrado que la expresión de CD86 en linfocitos T es funcional, siendo capaz de inducir la proliferación de linfocitos T vírgenes autólogos (43) y alogénicos (44), reafirmando el concepto de linfocitos T activados con capacidad de APC. Todo ello, parece indicar que los linfocitos T activados serían capaces de modular la respuesta inmunitaria de forma localizada actuando como APCs pudiendo iniciar la activación de los linfocitos T vecinos en presencia de antígenos exógenos. Además, la expresión de CD86 en linfocitos T puede servir como un marcador temprano de activación T y ser de gran utilidad para predecir el desarrollo de episodios de RA.

Igualmente, este trabajo ha revelado que tras el trasplante hepático, el número de linfocitos B CD19⁺CD95⁺ se incrementa en los pacientes que sufren rechazo agudo coincidiendo con los días del diagnóstico de rechazo. Además, la expresión de CD95 aumentó significativamente en los linfocitos T, siendo menos evidente en los linfocitos B. De forma similar, es de destacar que tras CML *in vitro*, las células proliferantes T sobreexpresan CD95 a las 96

hrs de cultivo. Igualmente, los estudios *in vitro* demuestran que los linfocitos CD3⁺CD95⁺ de los pacientes que sufren episodios de rechazo agudo experimentan mayor nivel de apoptosis espontánea e inducida con mitógenos, que los individuos con buena aceptación del injerto a corto plazo. Este fenómeno podría estar relacionado con una mayor presencia de linfocitos T alorreactivos en el grupo de pacientes con episodios de RA, lo que esta en consonancia con estudios previos demostrativos de que los linfocitos T alorreactivos rápidamente adquieren altos niveles de expresión de CD95 y CD95L (45). Por otro lado, se ha demostrado que los linfocitos T activados rápidamente entran en apoptosis cuando son re-estimulados con superantígenos en lo que se ha denominado *muerte celular inducida por activación* (AICD), mientras que las linfocitos T periféricos quiescentes son más resistentes a este tipo de inducción de apoptosis (46). Aunque no hemos podido detectar la expresión de CD95L ni en linfocitos de sangre periférica ni en cultivo, es posible que esta molécula pueda ser rápidamente usada o secretada en forma soluble, lo que dificultaría su detección en la superficie de la membrana celular. Diferentes estudios han demostrado la implicación de la vía CD95/CD95L en modelos experimentales con aceptación espontánea del injerto (47). Este proceso parece tener lugar principalmente en el injerto ya que utilizando modelos experimentales con ratas, se han llegado a detectar altos niveles de CD95L en injertos hepáticos aceptados espontáneamente.

Para adquirir la tolerancia periférica frente al injerto es necesario conseguir un balance entre la deleción de linfocitos T efectoras alorreactivos y el desarrollo de linfocitos T reguladores. La mayoría de los tratamientos inmunosupresores utilizados en la actualidad tiene el objetivo principal de controlar la respuesta de los linfocitos T efectoras. Sin embargo, como contrapartida también pueden bloquear la generación, expansión o diferenciación de los linfocitos T reguladores, lo que dificulta la adquisición de la inmuno-tolerancia al injerto. La ciclosporina A y el tacrolimus (FK506) son inmunosupresores antagonistas de la calcineurina utilizados ampliamente en el trasplante de órganos. Ambos actúan inhibiendo factores nucleares como NFAT y NF-κB, lo que da lugar a la inhibición de la transcripción de numerosos genes de citocinas como IL-2 e inmunomoduladores implicados en la activación y proliferación de linfocitos T (48,49). La señal producida por IL-2 es necesaria para el mantenimiento de los linfocitos T reguladores en la periferia (50,51) y para el desarrollo de AICD de las células efectoras (52,53), por lo que su bloqueo compromete el desarrollo de tolerancia periférica al injerto, tal como se ha descrito en ratones IL-2 *knockout* resistentes a la tolerancia al trasplante (54). En estudios *in vitro* también se ha observado que

la CsA disminuye la apoptosis de linfocitos Th activados de forma aloespecífica al reducir la activación de caspasa-3 (14) e inhibe la proliferación de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ estimulados con aloantígenos (18). Los resultados obtenidos en el presente trabajo utilizando CMLs inhibidos con CsA parecen apoyar esta hipótesis; así, aunque en cultivo primario se observa una inhibición casi completa de la proliferación, estas células primadas son capaces de mantener su capacidad proliferativa, mostrando en respuesta secundaria un nivel de proliferación semejante e incluso superior al observado en CML sin inhibición. La inhibición observada en el cultivo primario no va acompañada de un aumento significativo de la apoptosis de las células efectoras, más aun, se observa la proliferación de ciertos clones de linfocitos, probablemente resistentes a la acción de los inhibidores de calcineurina. Por otro lado, dentro del fenotipo de linfocitos proliferantes en cultivo secundario con CsA no se observa la presencia de linfocitos CD3⁺CD8⁺CD28⁻, caracterizados por presentar principalmente una actividad Ts.

Otros abordajes en el tratamiento inmunosupresor han consistido en el uso de AcMo orientados a bloquear las señales coestimuladoras de la respuesta inmune en un intento de favorecer el desarrollo de tolerancia al injerto. Así, se ha observado que el uso de la proteína de fusión CTLA-4Ig, capaz de unirse con las moléculas CD80 y CD86 con alta afinidad, previene el rechazo de alo- y xeno-injertos e incluso facilita la inducción de tolerancia al injerto (15-17). Además, experimentos realizados en CML han demostrado que no inhibe la expansión de linfocitos T reguladores (18). El tratamiento con anti-CD80 y anti-CD86 en ratones prolonga la supervivencia en trasplante de islotes pancreáticos (19) y cardiaco (20), mientras que en monos *rhesus* y babuinos se ha conseguido prolongar la supervivencia del trasplante renal (21-23). Los resultados obtenidos bloqueando el CML con anti-CD80 y anti-CD86 muestran una reducción en la proliferación del cultivo primario, viéndose afectadas todas las poblaciones T pero manteniendo su proporcionalidad. Estas células primadas conservan su capacidad proliferativa y en cultivo secundario alcanzan un nivel de proliferación similar, independientemente de que se añada o no al medio de cultivo anti-CD80 y anti-CD86. Todo esto, sugiere que el boqueo con anti-CD80 y anti-CD86 permitiría la proliferación de un subgrupo de linfocitos T efectoras independientes de la vía de coestimulación CD28/CD80-CD86, no viéndose afectados por este bloqueo en cultivos posteriores. Por otro lado, el uso combinado de anti-CD80 y anti-CD86 con CsA suprime totalmente la proliferación en CML. No obstante, al eliminar este bloqueo en cultivo secundario se observa una proliferación tardía de

linfocitos T (6-7 días) no detectándose la presencia de linfocitos T CD8⁺CD28⁻.

En conjunto, estos resultados nos permitirían pensar que los linfocitos T activados (CD3⁺CD86⁺DR⁺) podrían actuar como células presentadoras de antígeno no profesionales ejerciendo un efecto dual, por un lado favorecería la expansión de la respuesta inmunológica de forma local, y por otro, facilitaría su frenado gracias a la rápida regulación negativa de las moléculas coestimuladoras y a su mayor predisposición a sufrir apoptosis. Por otro lado, el tratamiento con CsA mantendría al paciente en un estado de "latencia inmunológica", al menos a corto plazo, que podría ser revertida con la eliminación del fármaco, sin embargo podrían existir clones capaces de escapar a los efectos inmunosupresores de la CsA. El tratamiento con anticuerpos bloqueantes de las señales coestimuladoras no frenaría la respuesta allogénica pero la reduciría seleccionando clones independientes de la vía del CD28, mientras que el uso combinado de ambos frenaría la respuesta allogénica pero no elimina totalmente los clones reactivos.

En resumen, podemos concluir que la monitorización de ciertos marcadores linfocitarios como CD28, CD95 y CD86 en pacientes sometidos a trasplante hepático sería de gran ayuda para conocer el estado inmunológico del receptor y estimar con antelación el posible desarrollo de episodios de rechazo agudo. Por otro lado, el análisis *in vitro* del efecto que tienen en la respuesta allogénica los diferentes agentes inmunosupresores, tanto de forma individual como combinada, nos permitiría conocer los mecanismos implicados en la respuesta allogénica y mejorar el diseño de futuros tratamientos orientados a prolongar la supervivencia del injerto y la mejora de la morbimortalidad del paciente.

5. Referencias

1. Kamada N, Teramoto K, Bagerizo A et al. Cellular basis of transplantation tolerance induced by liver grafting in the rat. Extent of clonal deletion among thoracic duct lymphocytes, spleen, and lymph node cells. *Transplantation* 1988;46:165-167.
2. Leon MP, Bassendine MF, Wilson JL et al. Immunogenicity of biliary epithelium: investigation of antigen presentation to CD4⁺ T cells. *Hepatology* 1996;24:561-567.
3. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Nadler LM. The role of B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. *Immunol Rev* 1996;153:5-26.
4. Tan P, Anasetti C, Hansen JA et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993;177:165-173.
5. Molajoni ER, Cinti P, Orlandini A et al. Mechanism of liver allograft rejection: the indirect recognition pathway. *Hum Immunol* 1997;53:57-63.
6. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 1991;9:745-772.
7. Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990;63:1249-1256.
8. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1456.
9. Garcia-Alonso AM, Minguela A, Muro M et al. CD28 expression on peripheral blood T lymphocytes after orthotopic liver transplant: upregulation in acute rejection. *Hum Immunol* 1997;53:64-72.
10. Minguela A, Garcia-Alonso AM, Marin L et al. Evidence of CD28 upregulation in peripheral T cells before liver transplant acute rejection. *Transplant Proc* 1997;29:499-500.
11. Minguela A, Marin L, Torio A et al. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 costimulatory molecules are mainly involved in acceptance or rejection of human liver transplant. *Hum Immunol* 2000;61:658-669.
12. Conti F, Morelon E, Calmus Y. Immunosuppressive therapy in liver transplantation. *J Hepatol* 2003;39:664-678.
13. Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005;352:1371-1373.
14. Woodside KJ, Hu M, Liu Y et al. Apoptosis of allospecifically activated human helper T cells is blocked by calcineurin inhibition. *Transpl Immunol* 2006;15:229-234.
15. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 1992;257:789-792.
16. Turka LA, Linsley PS, Lin H et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11102-11105.
17. Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ et al. Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* 1994;57:1701-1706.
18. Lim DG, Joe IY, Park YH et al. Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2007;18:94-100.
19. Lenschow DJ, Zeng Y, Hathcock KS et al. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation* 1995;60:1171-1178.
20. Bashuda H, Seino K, Kano M et al. Specific acceptance of cardiac allografts after treatment with antibodies to CD80 and CD86 in mice. *Transplant Proc* 1996;28:1039-1041.
21. Ossevoort MA, Ringers J, Kuhn EM et al. Prevention of renal allograft rejection in primates by blocking the B7/CD28 pathway. *Transplantation* 1999;68:1010-1018.
22. Kirk AD, Tadaki DK, Celniker A et al. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* 2001;72:377-384.
23. Boulday G, shton-Chess J, Bernard P et al. Association of rapamycin and co-stimulation blockade using anti-B7 antibodies in renal allotransplantation in baboons. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1752-1760.

24. Vincenti F. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:299-306.
25. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;170:145-157.
26. Bachmann MF, Kall-Faienza K, Schmits R et al. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997;7:549-557.
27. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996;273:104-106.
28. Colovai AI, Mirza M, Vlad G et al. Regulatory CD8+CD28-T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 2003;64:31-37.
29. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002;3:237-243.
30. Prabhu Das MR, Zamvil SS, Borriello F et al. Reciprocal expression of co-stimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T cells following activation. *Eur J Immunol* 1995;25:207-211.
31. Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL. Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1993;177:845-850.
32. Sansom DM, Hall ND. B7/BB1, the ligand for CD28, is expressed on repeatedly activated human T cells in vitro. *Eur J Immunol* 1993;23:295-298.
33. Verwilghen J, Lovis R, De BM et al. Expression of functional B7 and CTLA4 on rheumatoid synovial T cells. *J Immunol* 1994;153:1378-1385.
34. Ranheim EA, Kipps TJ. Elevated expression of CD80 (B7/BB1) and other accessory molecules on synovial fluid mononuclear cell subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:1637-1646.
35. Abe K, Takasaki Y, Ushiyama C et al. Expression of CD80 and CD86 on peripheral blood T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 1999;19:58-66.
36. Brown R, Murray A, Pope B et al. B7+ T cells in myeloma: an acquired marker of prior chronic antigen presentation. *Leuk Lymphoma* 2004;45:363-371.
37. Melichar B, Nash MA, Lenzi R, Platsoucas CD, Freedman RS. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clin Exp Immunol* 2000;119:19-27.
38. Wolthers KC, Otto SA, Lens SM et al. Increased expression of CD80, CD86 and CD70 on T cells from HIV-infected individuals upon activation in vitro: regulation by CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1996;26:1700-1706.
39. Ferlazzo G, Semino C, Meta M et al. T lymphocytes express B7 family molecules following interaction with dendritic cells and acquire bystander costimulatory properties. *Eur J Immunol* 2002;32:3092-3101.
40. Whitford P, Mallon EA, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br J Cancer* 1990;62:971-975.
41. Pichler WJ, Wyss-Coray T. T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today* 1994;15:312-315.
42. Barnaba V, Watts C, De BM, Lane P, Lanzavecchia A. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur J Immunol* 1994;24:71-75.
43. Jeannin P, Herbault N, Delneste Y et al. Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J Immunol* 1999;162:2044-2048.
44. Sun ZW, Qiu YH, Shi YJ et al. Time courses of B7 family molecules expressed on activated T-cells and their biological significance. *Cell Immunol* 2005;236:146-153.
45. O'Flaherty E, Ali S, Pettit SJ, Kirby JA. Examination of the sensitivity of T cells to Fas ligation: induction of allospecific apoptosis. *Transplantation* 1998;66:1067-1073.
46. Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J Immunol* 1993;150:4338-4345.
47. Fandrich F, Lin X, Zhu X et al. CD95L confers immune privilege to liver grafts which are spontaneously accepted. *Transplant Proc* 1998;30:1057-1058.
48. Cardenas ME, Zhu D, Heitman J. Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;4:472-477.
49. Mattila PS. The actions of cyclosporin A and FK506 on T-lymphocyte activation. *Biochem Soc Trans* 1996;24:45-49.
50. Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol* 2002;169:4850-4860.
51. D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 2005;6:1152-1159.
52. Wells AD, Li XC, Li Y et al. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* 1999;5:1303-1307.
53. Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858-861.
54. Kneitz B, Herrmann T, Yonehara S, Schimpl A. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 1995;25:2572-2577.

*Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,
de pronto, cambiaron todas las preguntas.
(Mario Benedetti)*

DISCUSIÓN FINAL

1. DISCUSIÓN FINAL

El trasplante hepático es un buen modelo para el estudio de las bases de la respuesta tolerogénica en alotrasplante, por ello, el análisis de las alteraciones inmunológicas que tienen lugar en el receptor de un injerto hepático durante el periodo post-trasplante puede ser clave para profundizar en el conocimiento de los mecanismos que confieren al trasplante hepático su especial carácter tolerogénico y para entender los principales factores que contribuyen al desarrollo de tolerancia periférica. El objetivo final del presente trabajo fue realizar un estudio multifactorial que contemplara algunos de los numerosos factores inmunológicos tales como el estado inmunológico del receptor previo y posterior al trasplante, factores genéticos, patología que sirvió de base para la indicación del trasplante y también la influencia de la edad, el sexo o el tratamiento inmunosupresor, con el fin de poder determinar *a priori* si pueden influir en la buena o mala aceptación del injerto hepático.

En cuanto a los posibles factores genéticos, el estudio se ciñó al análisis de una serie de variantes polimórficas de moléculas de especial relevancia para la respuesta inmunitaria: bien por su implicación en la generación de la segunda señal del reconocimiento antigénico (CD86) y en los procesos de apoptosis (CD95 y CD95L) o bien de las principales interleucinas que interviene en la modulación de la respuesta inmunitaria (TNF- α , IL-10, INF- γ , IL-6 y TGF- β 1). Asimismo, se cuantificaron las formas solubles de CD86, CD95 y CD95L en el pre y post-trasplante ya que podrían interferir en la respuesta alogénica y condicionar la aceptación del injerto hepático. Además, la monitorización de diferentes subpoblaciones celulares en sangre periférica en el pre-trasplante y durante el primer mes post-trasplante, haciendo especial incidencia en el estudio de la expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD28 e implicadas en procesos de apoptosis como CD95 y CD95L, permite establecer una relación con los cambios inmunológicos que tienen lugar en los periodos próximos a los episodios de rechazo agudo. El conjunto de datos obtenidos mediante el estudio en pacientes, revela la existencia de ciertos factores que pueden servir para la predicción temprana de la aparición de rechazo agudo con la ventaja de ser en todo caso métodos no invasivos.

Por último, los estudios realizados mediante modelos de estimulación *in vitro* de los fenómenos que tiene lugar en la respuesta alogénica cuando se usan diferentes condiciones cultivo, incluyendo variaciones en las condiciones de inmunosupresión

(anti-CD80, anti-CD86 y CsA) permite establecer una correlación con los resultados del seguimiento *in vivo*. Para realizar este abordaje ha sido necesario diseñar un método que permite, en el contexto del cultivo mixto linfocitario, determinar de forma simultánea los niveles de proliferación y apoptosis e identificar el fenotipo de las principales poblaciones leucocitarias implicadas en las respuesta alogénica *in vitro*.

Mediante ambos tipos de estudio, *in vivo* e *in vitro*, se ha podido poner en evidencia que la molécula CD86 puede ser fundamental en el desarrollo de la respuesta alogénica, y por tanto, afectar a la respuesta temprana frente al injerto hepático. De hecho, desde el punto de vista genético se ha demostrado que los pacientes con el genotipo AA en la posición +1057 del gen de CD86, en los que se ha producido la sustitución en homocigosis de alanina a treonina en el tallo citoplásmico (146,147), tienen una mejor aceptación del injerto a corto y largo plazo, presentando ausencia de episodios de RA y una mayor supervivencia. Aunque el mecanismo de acción de esta variante no es conocido, esta sustitución puede generar un potencial sitio de fosforilación en la región citoplásmica que contribuya a modificar las señales de transducción que llegan al interior de la célula presentadora de antígeno, ya que se ha descrito que esta vía participa en la diferenciación de los linfocitos B y en la producción de IgG1 e IgG2a (148). Según esto, los pacientes portadores del genotipo AA podrían tener una capacidad de respuesta alogénica más reducida, lo que supondría una ventaja para la aceptación del injerto hepático. No obstante, según nuestros datos, estas variantes genéticas no conllevan cambios relevantes en la expresión en membrana de CD86 en monocitos, ni en los niveles de la forma soluble de la molécula CD86 (CD86s) en sangre periférica.

CD86s también parece ser importante en la mejor o peor aceptación del injerto hepático, pues los pacientes que sufren episodios de RA parten de unos niveles basales de CD86s significativamente superiores. En este sentido es de destacar que en este trabajo se describe por primera vez, que los receptores que llegan al trasplante afectados por infecciones crónicas debidas a virus hepatotróficos (VHC y VHB), los niveles de CD86s son significativamente superiores que en el resto de patologías, lo que puede ser el reflejo de una activación crónica del sistema inmunitario, lo que favorecería el aumento en los niveles basales de CD86s. Esta molécula, es producida de forma constitutiva por monocitos y células dendríticas (149), y se ha observado que ciertas patologías como leucemia, LES y asma, pueden provocar un aumento en los niveles de

CD86s (149-153). Aunque su mecanismo de acción no es conocido, se ha propuesto que la molécula CD86s parece tener un efecto dual, de modo que por un lado puede generar señales coestimuladoras tras unirse a su co-receptor CD28 (154,155), y por otro por su unión preferencial a CTLA-4 puede generar señales negativas al interior del linfocito T (156). En definitiva, su efecto final se vería condicionado por el balance entre las señales positivas y negativas generadas a través de CD86s en el linfocito T.

Además, la elevación del número de linfocitos T CD86⁺ en SP en el periodo post-trasplante, podría servir también como marcador precoz de la aparición de RA. En la misma línea, los estudios de estimulación *in vitro* han puesto de manifiesto que los linfocitos T proliferantes coexpresan el marcador CD86 y altos niveles de HLA de clase II (DR) tras 144 hrs en CML, tal como se ha observado *in vivo* en el presente trabajo y confirmando lo descrito previamente (157). En efecto, la expresión de CD86 en linfocitos T parece ser funcional, ya que es capaz de inducir la proliferación de linfocitos T vírgenes autólogos (158) y alogénicos (35) por lo que, tal como se ha sugerido previamente (159,160), la expresión combinada de HLA-DR y moléculas coestimuladoras indicaría una potencial función como APCs de estos subtipos de linfocitos T. De este modo, los linfocitos T activados serían capaces de modular la respuesta inmunitaria de forma localizada actuando como APCs capaces de iniciar la activación de los linfocitos T vecinos en presencia de antígenos exógenos.

Una vez iniciada la respuesta inmunitaria, es fundamental el desarrollo de mecanismos que puedan controlarla y, en este sentido, los mecanismos de apoptosis y en concreto, la vía CD95/CD95L resulta fundamental. Más aún, en el caso de trasplante hepático, su implicación sería importante para la aceptación o rechazo del injerto hepático (161-165).

Desde el punto de vista genético, el presente estudio describe por primera vez, que los pacientes portadores del genotipo -670 AA del gen de CD95 presentan una supervivencia del injerto menor que en el resto de genotipos. Este polimorfismo se sitúa en la región de activación de interferón gamma (GAS) localizado en el promotor (166), por lo que se modificaría la expresión de CD95 dependiente de INF- γ (167). Según esto, el genotipo AA portado por el paciente, podría tener un efecto perjudicial en la supervivencia del injerto, debido a una posible transcripción reducida de CD95 dependiente de INF- γ , lo que daría lugar a una capacidad reducida para la delección por apoptosis de precursores citotóxicos T alorreactivos en el hígado, mecanismo

fundamental para el desarrollo de tolerancia frente al injerto hepático (168). No obstante, según los datos del presente trabajo, esta variante polimórfica no afecta a los niveles basales de expresión de CD95 en linfocitos T y B, ni a los niveles de CD95s en suero.

Por otro lado, el análisis de poblaciones leucocitarias en SP confirma que el papel de la vías CD95/CD95L puede ser fundamental para la aceptación del injerto hepático, ya que se observa un aumento en la expresión de CD95 en linfocitos T y en el número de linfocitos B CD95⁺ en los pacientes que sufren episodios de RA. Estos datos también se confirman por los estudios realizados *in vitro*, en los que mediante CML se observa que las células T proliferantes sobre-expresan de modo significativo el marcador CD95. Además, es destacable que en los linfocitos CD3⁺CD95⁺ de pacientes que sufren episodios de RA la apoptosis espontánea e inducida por mitógenos, sea superior que la experimentada por dichas células en individuos que no sufren de episodios de rechazo. En conjunto, los datos relativos a estas poblaciones celulares son concordantes con una mayor presencia, en los pacientes con episodios de RA, de linfocitos T alorreactivos, caracterizados por presentar una elevada expresión de CD95 y CD95L (169). Debido a ello, estos linfocitos serían más sensibles a los mecanismos de apoptosis mediados por la vía del CD95 y CD95L que los linfocitos quiescentes (170).

Otro posible mecanismo de inducción de apoptosis a través de la vía CD95/CD95L implicaría a sus respectivas formas solubles. Tal como se ha descrito en estudios previos (171,172), estas moléculas también se sobre-expresan en el periodo pre-trasplante, en pacientes con infecciones crónicas por VHB y VHC con respecto a lo que ocurre en el resto de patologías. Así pues, los niveles de CD95Ls alcanzados en cada caso, parecen depender del grado de activación del sistema inmunitario (173). En este sentido, resultara lógico pensar que los pacientes afectados por infecciones crónicas o procesos autoinmunes presenten niveles más elevados de la forma soluble de CD95L. Si se tiene en cuenta que CD95Ls tras unirse con CD95 de membrana puede aumentar la inducción de los procesos de apoptosis (174,175), se justifica que aquellos pacientes con altos niveles de CD95Ls experimentarían una mayor capacidad para la delección clonal de linfocitos T autorreactivos, lo que daría lugar a una reducción en la respuesta frente a los aloantígenos del donante hepático. Por otro lado, CD95Ls también puede ejercer un papel anti-apoptótico al competir con CD95L de membrana por la unión con

CD95 (176), e incluso favorecer el daño tisular hepático (46) por lo que su papel final en el trasplante hepático dependerá del balance entre ambos efectos.

Es bien conocido que las citocinas tienen un papel primordial en la orquestación de la respuesta inmunitaria y más concretamente en la respuesta alogénica y de hecho, son numerosas las evidencias que demuestran su papel en la evolución de un órgano transplantado (144,177). Concretamente, estudios de nuestro grupo han señalado que los pacientes con un perfil de citocinas donde predomina el tipo Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) durante los 24-48 hrs post-trasplante, muestran una buena aceptación del injerto, mientras que los pacientes con un perfil Th1 (INF- γ) predominante y reducción de Th3 (TGF- β 1) se relacionan con un aumento en la incidencia de rechazo del injerto (144). Todo ello, ha propiciado el interés por el análisis de las variantes polimórficas de los diferentes genes de citocinas (178), entre otras razones porque han sido relacionadas con cambios en la expresión de las mismas (179-181). Sin embargo, los datos aquí presentados indican que al menos las variantes: TNF- α (-308 G/A), IL-6 (-174 G/C), INF- γ (+874 T/A), TGF- β 1 (codón 10 T/C y codón 25 G/C) e IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A), no se relacionan de modo significativo con la evolución a corto plazo del injerto hepático, ni cuando se consideran los distintos genotipos o haplotipos ni los fenotipos secretores. Resultados en clara consonancia con los obtenidos en un meta-análisis publicado recientemente (182). Tan solo cabe mencionar la ausencia de genotipo T/T G/C de TGF- β 1 (codón 10 y codón 25) y el haplotipo TC en el grupo de pacientes con episodios de RA observada en el presente estudio. Aunque resulta difícil predecir el papel de este haplotipo en la expresión de TGF- β 1, conviene recordar que estas variantes polimórficas se localizan en la región del péptido señal y TGF- β 1 necesita eliminar dicho péptido para su activación, y la modificación en los aminoácidos próximos a la zona de rotura del péptido podría, a su vez, modificar el grado de activación de dicha citocina (183). Debido a que TGF- β 1 se caracteriza por su capacidad inmunosupresora y de inducción de tolerancia (184), sería lógico pensar que la variante TC de TGF- β 1 pueda favorecer su activación e impulsar dicha capacidad inmunosupresora, repercutiendo en la disminución de la incidencia de RA en los pacientes portadores de esa variante y que son sometidos a trasplante hepático.

Así pues, según estos resultados el efecto de los diferentes polimorfismos estudiados afectaría en mayor medida a la evolución a largo plazo del injerto hepático. Entre todas las variantes analizadas, parecen ser fundamentales las correspondientes a

IL-6 (-174) e IL-10 (-1082, -819 y -592); IL-6 tendría un posible efecto dual, de manera que, por un lado podría actuar como mediadora de la respuesta de fase aguda y, por otro, también con una capacidad anti-inflamatoria e inmunosupresora, mientras que IL-10 tendría una actividad eminentemente inmunosupresora. De hecho, el análisis multivariante confirma que la presencia del genotipo GC en la posición -174 de IL-6 se asocia con una disminución de la supervivencia del injerto hepático. Resultados similares se han obtenido en trasplante renal, donde la presencia del genotipo GG en los receptores se ha asociado con una mayor supervivencia que la observada en los portadores del alelo C (185). A pesar de que se desconoce el papel que esta variante tiene sobre la actividad de IL-6, tanto *in vitro* como *in vivo* se ha descrito que la presencia del alelo C daría lugar a una menor producción de IL-6 comparada con el alelo G (186). Según ello, los receptores con niveles elevados de IL-6 (genotipo GG) podrían aceptar mejor el injerto que los que presentan unos niveles bajos de IL-6 (genotipos GC+CC) y cabe pensar que a largo plazo, la actividad predominante de IL-6 sería la inmunosupresora, capaz de controlar los niveles de otras citocinas pro-inflamatorias (187) y de suprimir la activación/maduración de las células dendríticas alterando la respuesta de los linfocitos T (188). Además, se ha descrito que las terapias inmunosupresoras, incluyendo el uso de esteroides y ciclosporina, son capaces de alterar la transcripción del gen de IL-6 (189,190), lo que puede conferir una capacidad de respuesta al tratamiento diferente en cada paciente en directa dependencia del genotipo de IL-6, ya que el polimorfismo de IL-6 -174 se localiza cerca del sitio de unión del receptor de glucocorticoides, capaz de reprimir su activación transcripcional (186).

Por otro lado, tanto con el análisis univariante como con el multivariante se ha observado que los pacientes con el genotipo GCC/ATA en las posiciones -1082, -819 y -592 de IL-10 presentan una mayor supervivencia a partir del quinto año post-trasplante. Consecuentemente, se puede pensar que este genotipo pueda asociarse a una mayor producción de dicha citocina, tal como se ha descrito que ocurre *in vitro* (191-193). Así, sobre esta base, unos niveles elevados de IL-10 favorecerían el mantenimiento de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ e inducirían a las células reguladoras tipo I (194) permitiendo una mejor tolerancia al injerto hepático.

De todo lo aquí descrito cabe deducir que el conocimiento de los mecanismos de actuación de los diferentes tratamientos inmunosupresores actuales es primordial para mejorar el diseño de las futuras terapias inmunosupresoras que redunden en una mejor

aceptación de injertos y reduzcan la morbimortalidad del paciente. Más aún, un análisis contrastado de los datos obtenidos *in vivo* con los obtenidos con modelos *in vitro* permitiría conocer su verdadero papel en la tolerancia frente al injerto hepático. Debido a que la ciclosporina A y el Tacrolimus (FK506) son los inmunosupresores más utilizados en el trasplante de órganos, el estudio de su impacto en una serie de CML en la que se incorporó a los distintos cultivos la CsA como único inmunosupresor o combinada con anticuerpos bloqueantes anti-CD80 y anti-CD86, orientados éstos a inhibir la segunda señal del reconocimiento alogénico, permitió obtener resultados bastante informativos. De modo que la incorporación únicamente de CsA al cultivo, como era de esperar, se traducía en una inhibición casi completa de la proliferación, sin embargo, las células resultantes de este primer cultivo una vez primadas son capaces de retener su capacidad proliferativa y de no experimentar un aumento significativo en los niveles de apoptosis. Estos resultados se pueden justificar debido al mecanismo de acción de la CsA, que actúa inhibiendo la producción de ciertas citocinas e inmunomoduladores, que como la IL-2, se sabe que están implicadas en la activación y proliferación de linfocitos T (195,196), lo que a su vez impide el mantenimiento de los linfocitos T reguladores (197,198) e inhibe la muerte por apoptosis de las células efectoras (199,200). De tal manera que su acción final puede comprometer el desarrollo de tolerancia periférica frente al injerto. Por otro lado, también se ha descrito que el bloqueo de la vía CD28/CD80-CD86 con anti-CD80 y anti-CD86 en ratones prolonga la supervivencia en trasplante de islotes pancreáticos (201) y cardíaco (202), mientras que en monos *rhesus* y babuinos se ha conseguido prolongar la supervivencia del trasplante renal (203-205). En efecto, mediante el bloqueo del CML con anti-CD80 y anti-CD86, la proliferación se reduce en cultivo primario, si bien estas células mantienen su capacidad proliferativa en el cultivo secundario, lo que sugiere una selección de aquellos linfocitos T capaces de proliferar de forma independiente de la vía CD28/CD80-CD86. Sin embargo, al inhibir conjuntamente con anti-CD80, y anti-CD86 y con CsA queda totalmente suprimida la proliferación en CML. A la vista de ello, se puede postular que los linfocitos T activados que co-expresan CD86 y HLA-DR funcionen como APCs no profesionales, favoreciendo así la respuesta alogénica local. No obstante se trataría de un subtipo de linfocitos probablemente más sensibles a los mecanismos de apoptosis y a la regulación negativa mediada por sus moléculas coestimuladoras, algo que finalmente vendría a favorecer el frenado de la respuesta

allogénica. Asimismo, el tratamiento con CsA, mantendría al paciente en estado anérgico, siempre que los niveles del inmunosupresor resulten biológicamente activos, pero permitiría la generación de algunos clones capaces de escapar al bloqueo de la vía de la calcineurina y que podrían ser responsables o contribuir a la aparición de episodios de RA. Por otro lado, el bloqueo de la segunda señal (por anti-CD80 y anti-CD86) puede propiciar el desarrollo de anergia en aquellos clones alorreactivos dependientes de la vía CD28/CD80-CD86 e igualmente comprometidos en el desencadenamiento de episodios de RA. Por el contrario, el uso combinado de CsA, anti-CD80 y anti-CD86 es capaz de abrogar de forma completa la respuesta allogénica *in vitro*, ya sea en respuesta a estímulos primarios o secundarios, un hecho que sugiere el interés del posible uso de esta estrategia en tratamientos inmunosupresores futuros.

En resumen, el interés de los resultados del presente trabajo radica en la demostración de la complejidad de factores y mecanismos que median en el control de la respuesta inmunológica y más concretamente de la allogénica. Al mismo tiempo, constituyen una prueba evidente de que la buena o mala aceptación del injerto viene determinada por la actuación final del conjunto de señales favorecedoras e inhibitoras puestas en juego en cada individuo. De hecho, éstas, son a su vez dependientes del sustrato genético de cada paciente y probablemente del donante, así como del estado inmunológico inicial del paciente principalmente relacionado con la patología asociada a la indicación del trasplante. Ante ello, se puede concluir que en todo caso, es fundamental conocer las principales variables implicadas en la aceptación o rechazo del injerto, a ser posible antes del trasplante o en los primeros días después del trasplante, de manera que permita en cierta medida protocolizar una terapia a la carta lo más pronto posible tras el trasplante. Para ello, la monitorización inmunológica del receptor puede ser una herramienta indispensable en el futuro para detectar precozmente los posibles eventos inmunológicos que puedan comprometer la supervivencia del injerto hepático y quizás también de otros órganos. La principal consecuencia del uso habitual de estos procedimientos en clínica, puede derivar de su gran utilidad a la hora de aconsejar la intensificación o reducción de la terapia inmunosupresora habitual o incluso la introducción de innovaciones terapéuticas en aquellos pacientes en los que por estos métodos se ponga en evidencia un mayor riesgo de pérdida del injerto y más aún, su análisis tras la terapia inmunosupresora facilitaría la comprobación de la efectividad del tratamiento. Por último, la ampliación de resultados en esta línea puede resultar

interesante para proponer nuevas dianas terapéuticas y profundizar en el desarrollo de estrategias inmunosupresoras más específicas que incluyeran el uso combinado de inmunosupresores clásicos como la ciclosporina A o el Tacrolimus con anticuerpos dirigidos a modular los mecanismos de reconocimiento y activación alogénica.

*La verdad en un tiempo es error en otro.
(Montesquieu)*

CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES

1. El polimorfismo genético del receptor en las moléculas implicadas en la respuesta alogénica puede condicionar la aceptación del injerto hepático, a corto plazo, por su impacto sobre la incidencia de rechazo agudo (RA) o a largo plazo, por su influencia en la supervivencia del injerto. Así, determinados polimorfismos genéticos de CD86 y de TGF- β 1 se asociaron con una menor incidencia de episodios de rechazo agudo, mientras que variantes genéticas de CD95 e IL-6 por un lado y de CD86 e IL-10 por otro, se correlacionaban con una menor o mayor supervivencia del injerto, respectivamente.
2. Los niveles pre-trasplante de CD86s y CD95Ls parecen influir en la aceptación temprana del injerto hepático. De hecho, niveles elevados de CD86s en el pre-trasplante se asocian con una mayor incidencia de episodios de RA. Nuestros datos sugieren que el balance entre la molécula CD86s, facilitadora de la respuesta alogénica y CD95Ls, favorecedora de la tolerancia al injerto podría condicionar, al menos en parte, la evolución del injerto hepático.
3. La monitorización inmunológica del paciente sometido a trasplante hepático permite detectar variaciones asociadas a la aparición de episodios de RA. Así, el incremento de las poblaciones T CD86⁺ y B CD19⁺CD95⁺, así como en la expresión de CD95 en los linfocitos T CD3⁺ es coincidente con el diagnóstico de rechazo agudo. Estos resultados fueron confirmados *in vitro* en cultivo mixto linfocitario.
4. Los linfocitos T de sangre periférica muestran *in vitro* un mayor nivel de apoptosis espontánea e inducida por mitógenos durante los episodios de RA, sugiriendo la presencia de un mayor número de linfocitos alorreactivos sensibles a la *muerte celular inducida por activación* (AICD).
5. El nuevo método citométrico descrito en este trabajo, permite con un único tubo y una manipulación mínima de la muestra, estudiar la cinética de proliferación y apoptosis en cultivo mixto linfocitario, pudiéndose determinar de forma simultánea el número absoluto de células proliferantes y apoptóticas en el cultivo.
6. El análisis del efecto de CsA, anti-CD80 y anti-CD86 en cultivo mixto linfocitario revela que la CsA es capaz de inhibir totalmente la proliferación en el cultivo primario, si bien, los linfocitos primados en estas condiciones no mueren por

apoptosis y son capaces de mantener su capacidad proliferativa. Por el contrario, el bloqueo con anti-CD80 y anti-CD86 reduce la proliferación en cultivo primario de todas las poblaciones de linfocitos T, pero permite el desarrollo de aquellos linfocitos independientes de la vía CD28/CD80-CD86. Interesantemente, la adición combinada de CsA, anti-CD80 y anti-CD86 al cultivo primario suprime totalmente la proliferación linfocitaria.

Todos caminaron. Pero pocos dejaron huellas...
(José Narosky)

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

1. Rosa Rodríguez, G. Registro español de trasplante hepático. Memoria de resultados 2010. 4. 2011. ONT y SETH.
2. Rosen HR. Transplantation immunology: what the clinician needs to know for immunotherapy. *Gastroenterology* 2008;134:1789-1801.
3. Neuberger J. Incidence, timing, and risk factors for acute and chronic rejection. *Liver Transpl Surg* 1999;5:S30-S36.
4. Conti F, Morelon E, Calmus Y. Immunosuppressive therapy in liver transplantation. *J Hepatol* 2003;39:664-678.
5. Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005;352:1371-1373.
6. Braet F, Luo D, Spector I, Vermijlen D, Wisse E. Endothelial and pit cells. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:437-453.
7. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:51-62.
8. Wujciak T, Opelz G. Computer analysis of cadaver kidney allocation procedures. *Transplantation* 1993;55:516-521.
9. Held PJ, Kahan BD, Hunsicker LG et al. The impact of HLA mismatches on the survival of first cadaveric kidney transplants. *N Engl J Med* 1994;331:765-770.
10. Shoskes DA, Wood KJ. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994;15:32-38.
11. Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, von BH. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988;335:730-733.
12. MacDonald HR, Lees RK, Schneider R, Zinkernagel RM, Hengartner H. Positive selection of CD4+ thymocytes controlled by MHC class II gene products. *Nature* 1988;336:471-473.
13. Opelz G. Effect of HLA matching in 10,000 cyclosporine-treated cadaver kidney transplants. *Transplant Proc* 1987;19:641-646.
14. Opelz G. Strength of HLA-A, HLA-B, and HLA-DR mismatches in relation to short- and long-term kidney graft survival. Collaborative Transplant Study. *Transpl Int* 1992;5 Suppl 1:S621-S624.
15. Opelz G, Wujciak T. Cadaveric kidneys should be allocated according to the HLA match. *Transplant Proc* 1995;27:93-99.
16. Singer A, Kruisbeek AM, Andrysiak PM. T cell-accessory cell interactions that initiate allospecific cytotoxic T lymphocyte responses: existence of both Ia-restricted and Ia-unrestricted cellular interaction pathways. *J Immunol* 1984;132:2199-2209.
17. Lombardi G, Sidhu S, Lamb JR, Batchelor JR, Lechler RI. Endogenous peptides contribute to the ligand recognized by anti-DR1 human alloreactive T cells. *Transplant Proc* 1989;21:142-144.
18. Stock PG, Ascher NL, Chen S et al. Evidence for direct and indirect pathways in the generation of the alloimmune response against pancreatic islets. *Transplantation* 1991;52:704-709.
19. Via CS, Shanley JD, Shearer GM. Synergistic effect of murine cytomegalovirus on the induction of acute graft-vs-host disease involving MHC class I differences only. Analysis of in vitro T cell function. *J Immunol* 1990;145:3283-3289.

20. Demetris AJ, Qian S, Sun H et al. Early events in liver allograft rejection. Delineation of sites of simultaneous intragraft and recipient lymphoid tissue sensitization. *Am J Pathol* 1991;138:609-618.
21. Martinez OM, Rosen HR. Basic concepts in transplant immunology. *Liver Transpl* 2005;11:370-381.
22. Renna-Molajoni E, Cinti P, Evangelista B et al. Role of the indirect recognition pathway in the development of chronic liver allograft rejection. *Transplant Proc* 1998;30:2140-2141.
23. Toyokawa H, Nakao A, Bailey RJ et al. Relative contribution of direct and indirect allorecognition in developing tolerance after liver transplantation. *Liver Transpl* 2008;14:346-357.
24. Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:185-190.
25. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248:1349-1356.
26. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996;273:104-106.
27. Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 1993;363:156-159.
28. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-126.
29. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001;2:203-209.
30. Yamada A, Salama AD, Sayegh MH. The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:559-575.
31. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-258.
32. Hamann D, Baars PA, Rep MH et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997;186:1407-1418.
33. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23:515-548.
34. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001;1:220-228.
35. Sun ZW, Qiu YH, Shi YJ et al. Time courses of B7 family molecules expressed on activated T-cells and their biological significance. *Cell Immunol* 2005;236:146-153.
36. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 2002;17:201-210.
37. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2001;19:565-594.
38. McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* 1998;165:231-247.
39. Chitnis T, Najafian N, Abdallah KA et al. CD28-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2001;107:575-583.
40. Roitt IM, Delves PJ. La producción de efectores. In: Roitt IM, Delves PJ, eds. *Inmunología: Fundamentos*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2005:199-224.

41. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
42. Mele TS, Kneteman NM, Zhu LF et al. IFN-gamma is an absolute requirement for spontaneous acceptance of liver allografts. *Am J Transplant* 2003;3:942-951.
43. Elwood ET, Larsen CP, Maurer DH et al. Microchimerism and rejection in clinical transplantation. *Lancet* 1997;349:1358-1360.
44. Holzkecht ZE, Platt JL. The fine cytokine line between graft acceptance and rejection. *Nat Med* 2000;6:497-498.
45. Pirenne J, Kitade H, Kawai M et al. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 2005;79:S25-S27.
46. Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:567-579.
47. Rocken M, Shevach EM. Immune deviation--the third dimension of nondeletional T cell tolerance. *Immunol Rev* 1996;149:175-194.
48. Moore KW, O'Garra A, de Waal MR, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-190.
49. Enk AH, Saloga J, Becker D, Mohamadzadeh M, Knop J. Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. *J Exp Med* 1994;179:1397-1402.
50. Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997;159:4772-4780.
51. Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E et al. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol Cell Biol* 1993;13:1155-1162.
52. Prud'homme GJ, Piccirillo CA. The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2000;14:23-42.
53. Harber M, Sundstedt A, Wraith D. The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2000;2000:1-20.
54. McFarland HF. Complexities in the treatment of autoimmune disease. *Science* 1996;274:2037-2038.
55. Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2245-2252.
56. Anderson G, Partington KM, Jenkinson EJ. Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *J Immunol* 1998;161:6599-6603.
57. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 2000;13:829-840.
58. Ohashi PS, Oehen S, Buerki K et al. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991;65:305-317.
59. Heath WR, Allison J, Hoffmann MW et al. Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 1992;359:547-549.
60. Heath VL, Moore NC, Parnell SM, Mason DW. Intrathymic expression of genes involved in organ specific autoimmune disease. *J Autoimmun* 1998;11:309-318.

61. Lanzavecchia A. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J Exp Med* 1995;181:1945-1948.
62. Pollanen P, von EM, Jahnukainen K et al. Role of transforming growth factor beta in testicular immunosuppression. *J Reprod Immunol* 1993;24:123-137.
63. Clark DA, Flanders KC, Banwatt D et al. Murine pregnancy decidua produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor beta-2. *J Immunol* 1990;144:3008-3014.
64. Jones LA, Chin LT, Longo DL, Kruisbeek AM. Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science* 1990;250:1726-1729.
65. Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990;63:1249-1256.
66. Dittel BN, Merchant RM, Janeway CA, Jr. Evidence for Fas-dependent and Fas-independent mechanisms in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999;162:6392-6400.
67. Kabelitz D. Apoptosis, graft rejection, and transplantation tolerance. *Transplantation* 1998;65:869-875.
68. Singer GG, Carrera AC, Marshak-Rothstein A, Martinez C, Abbas AK. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Opin Immunol* 1994;6:913-920.
69. Voll RE, Herrmann M, Roth EA et al. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390:350-351.
70. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000;191:411-416.
71. Gajewski TF, Lancki DW, Stack R, Fitch FW. "Anergy" of TH0 helper T lymphocytes induces downregulation of TH1 characteristics and a transition to a TH2-like phenotype. *J Exp Med* 1994;179:481-491.
72. Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R, Lechler R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 1994;264:1587-1589.
73. Knoechel B, Lohr J, Zhu S et al. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol* 2006;176:6473-6483.
74. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
75. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.
76. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004;10:801-805.
77. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-190.
78. Huber S, Schramm C, Lehr HA et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004;173:6526-6531.
79. Fu S, Zhang N, Yopp AC et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4+CD25- precursors. *Am J Transplant* 2004;4:1614-1627.

80. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212:28-50.
81. Ciubotariu R, Colovai AI, Pennesi G et al. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. *J Immunol* 1998;161:5193-5202.
82. Miller RG, Muraoka S, Claesson MH, Reimann J, Benveniste P. The veto phenomenon in T-cell regulation. *Ann N Y Acad Sci* 1988;532:170-176.
83. Martorell J. Inmunología del trasplante: Mecanismos de rechazo y tolerancia. In: Brunet M, Campistol JM, Rimola A, eds. *Tacrolimus*. Madrid: Drug Farma; 2000:21-36.
84. Martorell J. Bases Inmunológicas del rechazo. In: Cuervas-Mons V, del Castillo-Olivares JL, eds. *Introducción al trasplante de órganos y tejidos*. Madrid: Arán ediciones; 1999:135-144.
85. Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology* 1998;28:638-645.
86. Matas AJ, Burke JF, Jr., DeVault GA, Jr., Monaco A, Pirsch JD. Chronic rejection. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:S23-S29.
87. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966;2:662-665.
88. Demetris AJ, Jaffe R, Tzakis A et al. Antibody mediated rejection of human liver allografts: transplantation across ABO blood group barriers. *Transplant Proc* 1989;21:2217-2220.
89. Knechtle SJ, Kolbeck PC, Tsuchimoto S et al. Hepatic transplantation into sensitized recipients. Demonstration of hyperacute rejection. *Transplantation* 1987;43:8-12.
90. Wardle EN. Kupffer cells and their function. *Liver* 1987;7:63-75.
91. Adams DH, Neuberger JM. Patterns of graft rejection following liver transplantation. *J Hepatol* 1990;10:113-119.
92. Demetris A, Adams D, Bellamy C et al. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. An International Panel. *Hepatology* 2000;31:792-799.
93. Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* 1988;46:754-761.
94. Barbatis C, Woods J, Morton JA et al. Immunohistochemical analysis of HLA (A, B, C) antigens in liver disease using a monoclonal antibody. *Gut* 1981;22:985-991.
95. Simpson MA, Madras PN, Cornaby AJ et al. Sequential determinations of urinary cytology and plasma and urinary lymphokines in the management of renal allograft recipients. *Transplantation* 1989;47:218-223.
96. Heidecke CD, Kupiec-Weglinski JW, Lear PA et al. Interactions between T lymphocyte subsets supported by interleukin 2-rich lymphokines produce acute rejection of vascularized cardiac allografts in T cell deprived rats. *J Immunol* 1984;133:582-588.
97. Adams DH, Hubscher SG, Shaw J, Rothlein R, Neuberger JM. Intercellular adhesion molecule 1 on liver allografts during rejection. *Lancet* 1989;2:1122-1125.
98. Hubscher S, Neuberger J. Chronic rejection of the liver allograft. In: Neuberger J, Adams D, eds. *Immunology of liver transplantation*.: E. Arnold; 1993:216-229.

99. Perkins JD, Rakela J, Sterioff S et al. Results of treatment in hepatic allograft rejection depend on the immunohistologic pattern of the portal T lymphocyte infiltrate. *Transplant Proc* 1988;20:223-225.
100. McCaughan GW, Davies JS, Waugh JA et al. A quantitative analysis of T lymphocyte populations in human liver allografts undergoing rejection: the use of monoclonal antibodies and double immunolabeling. *Hepatology* 1990;12:1305-1313.
101. Donaldson PT, Alexander GJ, O'Grady J et al. Evidence for an immune response to HLA class I antigens in the vanishing-bileduct syndrome after liver transplantation. *Lancet* 1987;1:945-951.
102. Creput C, Durrbach A, Samuel D et al. Incidence of renal and liver rejection and patient survival rate following combined liver and kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:348-356.
103. Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunological tolerance and liver transplantation. *J Hepatol* 2004;41:698-705.
104. Behrens D, Lange K, Fried A et al. Donor-derived soluble MHC antigens plus low-dose cyclosporine induce transplantation unresponsiveness independent of the thymus by down-regulating T cell-mediated alloresponses in a rat transplantation model. *Transplantation* 2001;72:1974-1982.
105. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N et al. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992;339:1579-1582.
106. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 1993;17:1127-1152.
107. Lau AH, de CA, Lu L, Thomson AW. Liver tolerance mediated by antigen presenting cells: fact or fiction? *Gut* 2003;52:1075-1078.
108. Qian S, Lu L, Fu F et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 1997;158:4654-4661.
109. Knolle PA, Schmitt E, Jin S et al. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 1999;116:1428-1440.
110. Li W, Kuhr CS, Zheng XX et al. New insights into mechanisms of spontaneous liver transplant tolerance: the role of Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells. *Am J Transplant* 2008;8:1639-1651.
111. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-2729.
112. Hoerbelt R, Johnston DR, Shoji T et al. Combination treatment with donor-specific transfusions and cyclosporine a induces long-term survival of cardiac allografts in miniature Swine. *Transplantation* 2005;80:1275-1282.
113. Wiesner RH. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) versus cyclosporine in liver transplantation: a report of the United States FK506 Study Group. *Transplantation* 1998;66:493-499.
114. Pfeilschifter J, Muhl H. Immunopharmacology: anti-inflammatory therapy targeting transcription factors. *Eur J Pharmacol* 1999;375:237-245.
115. Hsu NC, Chung CY, Horng HC, Chang CS. Corticosteroid administration depresses circulating dendritic cells in ITP patients. *Platelets* 2004;15:451-454.

116. Ahsan N, Hricik D, Matas A et al. Prednisone withdrawal in kidney transplant recipients on cyclosporine and mycophenolate mofetil--a prospective randomized study. Steroid Withdrawal Study Group. *Transplantation* 1999;68:1865-1874.
117. Nielsen OH, Vainer B, Rask-Madsen J. Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1699-1708.
118. Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Transplantation* 1999;68:391-396.
119. Stewart SF, Hudson M, Talbot D, Manas D, Day CP. Mycophenolate mofetil monotherapy in liver transplantation. *Lancet* 2001;357:609-610.
120. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 1998;31:335-340.
121. Beaudreuil S, Samuel D, Rouas-Freiss N, Durrbach A. New aspect of immunosuppressive treatment in liver transplantation. How could you induce tolerance in liver transplantation? *Transpl Immunol* 2007;17:98-107.
122. Neuhaus P, Clavien PA, Kittur D et al. Improved treatment response with basiliximab immunoprophylaxis after liver transplantation: results from a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Liver Transpl* 2002;8:132-142.
123. Egawa H, Teramukai S, Haga H et al. Present status of ABO-incompatible living donor liver transplantation in Japan. *Hepatology* 2008;47:143-152.
124. Fan K, Wang H, Wei H et al. Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance. *Transplantation* 2007;84:746-754.
125. Fung J, Kelly D, Kadry Z, Patel-Tom K, Eghtesad B. Immunosuppression in liver transplantation: beyond calcineurin inhibitors. *Liver Transpl* 2005;11:267-280.
126. Wieers G, Gras J, Bourdeaux C et al. Monitoring tolerance after human liver transplantation. *Transpl Immunol* 2007;17:83-93.
127. Zhou L, Toungouz M, Donckier V et al. A rapid test to monitor alloreactive responses in whole blood using real-time polymerase chain reaction. *Transplantation* 2005;80:410-413.
128. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J et al. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant* 2005;5:314-322.
129. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J et al. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am J Transplant* 2003;3:689-696.
130. Bettens F, Tiercy JM, Campanile N et al. Microchimerism after liver transplantation: absence of rejection without abrogation of anti-donor cytotoxic T-lymphocyte-mediated alloreactivity. *Liver Transpl* 2005;11:290-297.
131. Koopmans M, Kremer H, I, Baelde HJ et al. Chimerism in kidneys, livers and hearts of normal women: implications for transplantation studies. *Am J Transplant* 2005;5:1495-1502.
132. Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:2118-2125.

133. Ontañón J, Muro M, Garcia-Alonso AM et al. Effect of partial HLA class I match on acute rejection in viral pre-infected human liver allograft recipients. *Transplantation* 1998;65:1047-1053.
134. Muro M, Alvarez-Lopez MR, Torio A et al. HLA-DRB1 and -DQB1 polymorphism in liver recipients: relationship between HLA-DQB1*0302 allele frequency and acute rejection. *Hum Immunol* 1997;56:70-76.
135. Muro M, Marin L, Torio A et al. Effect of HLA matching on liver graft survival. *Transplant Proc* 1999;31:2477-2479.
136. Muro M, Marin L, Torio A et al. HLA polymorphism in the Murcia population (Spain): in the cradle of the archaeological Iberians. *Hum Immunol* 2001;62:910-921.
137. Muro M, Herrero N, Marin L et al. Polymorphism in the upstream regulatory region of the HLA-DQB1 gene in liver graft recipients. *Hum Biol* 2001;73:845-854.
138. Muro M, Sanchez-Bueno F, Marin L et al. DQA1 and DQB1 genes polymorphism on acute rejection development in liver transplantation. *Transplant Proc* 2002;34:3302-3303.
139. Garcia-Alonso AM, Minguela A, Muro M et al. CD28 expression on peripheral blood T lymphocytes after orthotopic liver transplant: upregulation in acute rejection. *Hum Immunol* 1997;53:64-72.
140. Minguela A, Marin L, Torio A et al. CD30+ and CD27- lymphocytes in liver transplant: Th2 cytokine secretion. *Transplant Proc* 1999;31:516-518.
141. Minguela A, Bermejo J, Pons JA et al. HLA class I expression on peripheral blood lymphocytes and hepatocytes after liver transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:2466-2468.
142. Minguela A, Marin L, Torio A et al. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 costimulatory molecules are mainly involved in acceptance or rejection of human liver transplant. *Hum Immunol* 2000;61:658-669.
143. Minguela A, Sanchez-Bueno F, Marin L et al. Could expression of co-stimulatory molecules on B-PBL condition the acceptance or rejection of human liver grafts? *Transplant Proc* 2001;33:1384-1385.
144. Minguela A, Torio A, Marin L et al. Implication of Th1, Th2, and Th3 cytokines in liver graft acceptance. *Transplant Proc* 1999;31:519-520.
145. Minguela A, Torio A, Marin L et al. Implication of soluble and membrane HLA class I and serum IL-10 in liver graft acceptance. *Hum Immunol* 1999;60:500-509.
146. Delneste Y, Bosotti R, Magistrelli G, Bonnefoy JY, Gauchat JF. Detection of a polymorphism in exon 8 of the human CD86 gene. *Immunogenetics* 2000;51:762-763.
147. Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2000;1:428-434.
148. Suvas S, Singh V, Sahdev S, Vohra H, Agrewala JN. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem* 2002;277:7766-7775.
149. Hock BD, Patton WN, Budhia S et al. Human plasma contains a soluble form of CD86 which is present at elevated levels in some leukaemia patients. *Leukemia* 2002;16:865-873.
150. Hock BD, McKenzie JL, Patton WN et al. The clinical significance of soluble CD86 levels in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2003;98:1681-1688.

151. Hock BD, Drayson M, Patton WN et al. Circulating levels and clinical significance of soluble CD86 in myeloma patients. *Br J Haematol* 2006;133:165-172.
152. Shi HZ, Xie ZF, Deng JM, Chen YQ, Xiao CQ. Soluble CD86 protein in serum samples of patients with asthma. *Thorax* 2004;59:870-875.
153. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:989-994.
154. Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP et al. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity* 2000;13:303-312.
155. Rennert P, Furlong K, Jellis C et al. The IgV domain of human B7-2 (CD86) is sufficient to co-stimulate T lymphocytes and induce cytokine secretion. *Int Immunol* 1997;9:805-813.
156. Flo J, Tisminetzky S, Baralle F. Codelivery of DNA coding for the soluble form of CD86 results in the down-regulation of the immune response to DNA vaccines. *Cell Immunol* 2001;209:120-131.
157. Whitford P, Mallon EA, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Br J Cancer* 1990;62:971-975.
158. Jeannin P, Herbault N, Delneste Y et al. Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J Immunol* 1999;162:2044-2048.
159. Pichler WJ, Wyss-Coray T. T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today* 1994;15:312-315.
160. Barnaba V, Watts C, De BM, Lane P, Lanzavecchia A. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur J Immunol* 1994;24:71-75.
161. Pan TL, Goto S, Lin YC et al. The fas and fas ligand pathways in liver allograft tolerance. *Clin Exp Immunol* 1999;118:180-187.
162. Li XK, Okuyama T, Tamura A et al. Prolonged survival of recipient rats with Fas-ligand-transfected liver allografts by using HVJ-liposome. *Transplant Proc* 1998;30:943.
163. Hiroyasu S, Shiraishi M, Koji T et al. Analysis of the Fas system and Bcl-2 in rat liver allograft rejection. *J Surg Res* 1999;84:204-211.
164. Rivero M, Crespo J, Mayorga M et al. Involvement of the Fas system in liver allograft rejection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1501-1506.
165. Marin L, Minguela A, Moya-Quiles MR et al. Expression of CD95 and apoptosis induction in peripheral blood cells from liver graft recipients. *Transplant Proc* 2002;34:280-282.
166. Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 1997;34:577-582.
167. Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol* 1994;24:3057-3062.
168. Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev* 2000;174:47-62.
169. O'Flaherty E, Ali S, Pettit SJ, Kirby JA. Examination of the sensitivity of T cells to Fas ligation: induction of allospecific apoptosis. *Transplantation* 1998;66:1067-1073.
170. Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J Immunol* 1993;150:4338-4345.

171. Song le H., Binh VQ, Duy DN et al. Variations in the serum concentrations of soluble Fas and soluble Fas ligand in Vietnamese patients infected with hepatitis B virus. *J Med Virol* 2004;73:244-249.
172. Tortorella C, Sacco R, Orlando P et al. sICAM-1, sCD95 and sCD95L levels in chronic liver diseases of different etiology. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000;22:19-33.
173. Tanaka M, Suda T, Haze K et al. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996;2:317-322.
174. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995;14:1129-1135.
175. Sieg S, Smith D, Kaplan D. Differential activity of soluble versus cellular Fas ligand: regulation by an accessory molecule. *Cell Immunol* 1999;195:89-95.
176. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997;186:2045-2050.
177. Gorczynski RM. Role of cytokines in allograft rejection. *Curr Pharm Des* 2001;7:1039-1057.
178. Bidwell J, Keen L, Gallagher G et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun* 2001;2:61-70.
179. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863-866.
180. Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9465-9470.
181. Teramoto K, Tanaka Y, Kusano F et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha gene during allograft rejection following rat liver transplantation. *Liver* 1999;19:19-24.
182. Warle MC, Metselaar HJ, Hop WC, Tilanus HW. Cytokine gene polymorphisms and acute liver graft rejection: a meta-analysis. *Liver Transpl* 2005;11:19-26.
183. Syrris P, Carter ND, Metcalfe JC et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)* 1998;95:659-667.
184. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998;16:137-161.
185. Muller-Steinhardt M, Hartel C, Muller B, Kirchner H, Fricke L. The interleukin-6 -174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int* 2002;62:1824-1827.
186. Fishman D, Faulds G, Jeffery R et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376.
187. Xing Z, Gauldie J, Cox G et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-320.
188. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004;173:3844-3854.
189. Yoshimura N, Kahan BD, Oka T. The in vivo effect of cyclosporine on interleukin-6 gene expression in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1991;23:958-960.

190. Schmidt SC, Hamann S, Langrehr JM et al. Preoperative high-dose steroid administration attenuates the surgical stress response following liver resection: results of a prospective randomized study. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007;14:484-492.
191. Turner DM, Williams DM, Sankaran D et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-8.
192. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM et al. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526-530.
193. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin CE et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 2001;72:1444-1450.
194. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F et al. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001;166:5530-5539.
195. Cardenas ME, Zhu D, Heitman J. Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;4:472-477.
196. Mattila PS. The actions of cyclosporin A and FK506 on T-lymphocyte activation. *Biochem Soc Trans* 1996;24:45-49.
197. Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol* 2002;169:4850-4860.
198. D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 2005;6:1152-1159.
199. Wells AD, Li XC, Li Y et al. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med* 1999;5:1303-1307.
200. Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858-861.
201. Lenschow DJ, Zeng Y, Hathcock KS et al. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation* 1995;60:1171-1178.
202. Bashuda H, Seino K, Kano M et al. Specific acceptance of cardiac allografts after treatment with antibodies to CD80 and CD86 in mice. *Transplant Proc* 1996;28:1039-1041.
203. Ossevoort MA, Ringers J, Kuhn EM et al. Prevention of renal allograft rejection in primates by blocking the B7/CD28 pathway. *Transplantation* 1999;68:1010-1018.
204. Kirk AD, Tadaki DK, Celniker A et al. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* 2001;72:377-384.
205. Boulday G, shton-Chess J, Bernard P et al. Association of rapamycin and co-stimulation blockade using anti-B7 antibodies in renal allotransplantation in baboons. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1752-1760.

La ciencia son hechos; de la misma manera que las casas están hechas de piedras, la ciencia está hecha de hechos; pero un montón de piedras no es una casa y una colección de hechos no es necesariamente ciencia.

(Henri Poincaré)