

# *Respuesta inmune al trasplante*

L. CASTAÑER ALABAU, A. FRANCO MASIDE, A. BOOTELLO GIL

Servicio de Inmunología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid

## INTRODUCCIÓN

El hecho central que distingue a la respuesta inmune alogénica frente a la mayoría de respuestas a antígenos extraños es el reconocimiento directo de los aloantígenos del donante por las células T del receptor. Este tipo de reconocimiento es efectivo y provoca la estimulación y activación de las células T. Junto a esta vía de respuesta, se produce una respuesta fisiológica frente a los aloantígenos del donante a través del reconocimiento «indirecto», mediado por la presentación de los alo péptidos en las moléculas del MHC del receptor. Cuando hablamos de respuesta alogénica nos referimos al conjunto de ambas vías, excepto si se hace mención concreta a alguna de ellas.

La respuesta aloinmune dirigida frente a las diferencias que el sistema encuentra en el injerto se caracteriza por ser pleiotrópica, e incluye tanto a la inmunidad específica (células T y B), como el reclutamiento de los mediadores celulares y humorales inflamatorios inespecíficos. La intensidad de la misma depende de múltiples variables: 1) respuesta del receptor (factores genéticos y adquiridos que controlan la respuesta inmune), 2) características del donante (tipo de injerto, presencia y tipos celulares), 3) la compatibilidad donante-receptor, y 4) el régimen de inmunosupresión.

Esta revisión se va a centrar en los mecanismos celulares que participan en la regulación y fase efectora de la respuesta alogénica. Por último, comentaremos el estado actual del estudio de la tolerancia, con especial referencia a los mecanismos de inducción de la misma que se están desarrollando en modelos experimentales y preclínicos. Se señalan especialmente los estudios realizados sobre modelos de injerto renal (o de órgano sólido vascularizado) y con primates no humanos.

## BASES CELULARES DE LA RESPUESTA ALOGÉNICA

### SENSIBILIZACIÓN ALOGÉNICA

La respuesta inmune adaptativa no se produce de forma inmediata; al contrario, requiere de una fase previa en la que tras el reconocimiento antigénico se estimulan y activan las poblaciones celulares T y B que desarrollarán las funciones reguladoras y efectoras. Este primer contacto con el/los antígenos extraños se ha denominado sensibilización y las particularidades que la rodean serán determinantes para configurar el perfil de la respuesta.

Una característica importante para la activación de las células T es que requiere la presencia de células presentadoras activadas pertenecientes al sistema inmune innato. Esta activación se desarrolla en condiciones fisiológicas por los estímulos proinflamatorios. En este sentido, los estímulos que proveen las citoquinas inflamatorias inducen la activación de las células presentadoras, capacitándolas para su funcionalidad<sup>1</sup>. En el contexto del injerto alogénico, estas señales pueden ser producidas por las células del donante, expuestas a injurias inmunológicas y no inmunológicas, o por las células del huésped.

Aunque la mayor parte de estímulos proinflamatorios en la respuesta inmune derivan del sistema innato de defensa, en el caso del trasplante de órganos uno de los elementos centrales es la activación directa de células T del huésped. Este fenómeno se debe a las importantes disparidades antigénicas donante-receptor y, sobre todo, a la relativa independencia que tienen las células T de memoria, sobre todo por reconocimiento directo, respecto a la señales coestimuladoras. La ausencia de las señales coestimuladoras son una de las causas de anergia de las células T y B vírgenes. Cuando estas células son estimuladas a través de su receptor específico en ausencia de coestimulación entran en un estado anérgico, que plantea interesantes posibilidades terapéuticas.

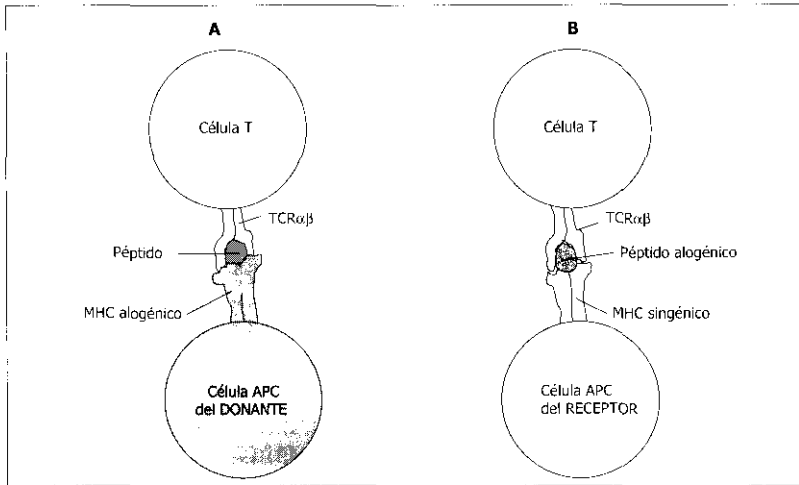
#### \* *Células presentadoras de antígeno en la estimulación alogénica*

Las células presentadoras de antígeno (APC, «*Antigen-Presenting Cells*») son un elemento crítico en el inicio de la respuesta inmune. Estas células expresan antígenos MHC de clase II de forma constitutiva, y el estímulo con interferón-g (IFN-g) o TNF-a («*Tumor Necrosis Factor*») incrementa su nivel de expresión, además de activar la expresión de otras moléculas necesarias para la presentación<sup>1-5</sup>.

Las células APC profesionales derivan de progenitores hematopoyéticos; las que muestran una mayor eficacia en el procesamiento y presenta-

ción antigénica son el heterogéneo grupo de células dendríticas<sup>5</sup>; y en un segundo plano, pero con importantes funciones específicas, se encuentran los macrófagos y las células B activadas<sup>6</sup>.

Una característica importante en la inmunología del trasplante es que la activación de las células T del receptor se puede originar, potencialmente, tanto en las células APC del donante como en las APC del receptor. Dependiendo del origen de la célula APC, la estimulación de la célula T se realizará de forma directa (APC del donante o alogénica) o indirecta (APC del receptor o singénica) (Figura 1).



Mecanismos del reconocimiento alogénico: A) Reconocimiento Directo, las células T del receptor reconocen los complejos de las moléculas del alo-MHC cargadas con péptidos procesados en la APC del donante, sobre la superficie de las APC del donante; B) Reconocimiento Indirecto, las células T del receptor reconocen a los aloantígenos, procesados por las APC del receptor, y presentados en el contexto de las moléculas propias de MHC. (Las figuras sombreadas indican componentes del donante. Este sombreado, así como las moléculas, se mantienen para el resto de las figuras).

Figura 1. Reconocimiento alogénico.

\* Tráfico de las células APC y sitios de sensibilización

Los estudios en ratón demuestran que se producen cambios en la localización de ambos tipos de células, APC del donante y del receptor, prácticamente de forma inmediata tras el trasplante: las APC del donante migran a los ganglios linfáticos y al bazo del receptor, mientras las APC del receptor migran al injerto y gradualmente reemplazan a las APC alogénicas. El tiempo invertido en el reemplazo completo de las APC del injerto es variable; desde varias semanas para el injerto renal en cerdos, hasta varios meses para el injerto de piel en ratones<sup>7,8</sup>.

Los ganglios linfáticos que drenan la región del injerto son el sitio primario de sensibilización. Las células T vírgenes, que circulan por el circuito linfoide, son retenidas en los ganglios cuando encuentran el antígeno específico que promueve su activación<sup>7</sup>. Sólo las células T activadas y las células de memoria son capaces de migrar a los tejidos extralinfoides, donde buscan el antígeno que provocó el estímulo.

Hay evidencias de que las células T de memoria con reactividad cruzada con los aloantígenos podrían activarse, o reactivarse, en el espacio anatómico del injerto, especialmente cuando se trata de órganos vascularizados portadores de células endoteliales del donante<sup>1,5,9</sup>.

#### \* Estimulación directa versus indirecta

Una diferencia significativa entre las vías directa e indirecta de sensibilización es que los tipos de APC implicados en cada una de ellas son probablemente diferentes.

La activación directa de las células T implica a dos tipos de APC, según el tipo de injerto: 1) muchos tejidos poseen sus APC especializadas (células de Langerhans en la piel o células de Kupffer en el hígado), y 2) las células endoteliales de los injertos vascularizados, que pueden presentar actividad APC, especialmente tras su activación<sup>9-11</sup>. La densidad de la población de APC también es variable según el tipo de injerto<sup>12</sup>, y sufre variaciones con el tiempo. Las células APC del donante son progresivamente reemplazadas por células APC originadas en la médula ósea del receptor<sup>8</sup>.

La activación indirecta depende de las APC de los ganglios linfáticos y bazo del receptor, incluyendo monocitos, células dendríticas y células linfoides. La disponibilidad de estas APC está, probablemente, menos sujeta a variabilidad que las dependientes del injerto. Estudios recientes indican que, como ocurre con las respuestas antigénicas, las células dendríticas y los monocitos son los tipos celulares principalmente implicados en la estimulación indirecta, mientras que las células B se sitúan en un segundo plano, especialmente cuando la sensibilización va dirigida frente a antígenos menores<sup>13</sup>.

#### \* Fenómeno de la sensibilización cruzada

Los antígenos exógenos son, en condiciones fisiológicas, presentados en el contexto de las moléculas de MHC de clase II, y son reconocidos por células T CD4<sup>+</sup><sup>14</sup>. Las respuestas indirectas frente a los aloantígenos deberían, según este principio, estar limitadas a las células T CD4<sup>+</sup>. Sin embar-

go, los estudios sobre transplantados indican que las células T CD8+ pueden sensibilizarse frente a antígenos menores presentados en el contexto de las moléculas singénicas de HLA de clase I<sup>14,15</sup>. Este fenómeno sugiere que los antígenos exógenos pueden ser presentados por moléculas de clase I, y se denomina de sensibilización cruzada («*cross-priming*»)<sup>15</sup>.

Diferentes mecanismos parecen estar implicados en este tipo de sensibilización<sup>16</sup>: 1) el contenido de los fagosomas de las APC puede trasvasarse al citosol para seguir la ruta de los antígenos endógenos<sup>17</sup>; 2) los fagocitos pueden digerir el contenido lisosomal, de forma que los péptidos producidos pueden ocupar las moléculas de clase I; y 3) las células del donante que mueren liberan péptidos alogénicos que pueden ir asociados a proteínas de estrés (Hsp «*Heat shock proteins*») y que son internalizadas por receptores específicos de las células APC profesionales, pasan al citosol y se incluyen en la ruta de los endógenos<sup>18</sup>.

#### \* Respuesta indirecta e inducción de tolerancia

La prolongación de la supervivencia del injerto a través de la eliminación de las células APC del mismo (el componente más inmunogénico de los llamados leucocitos transeúntes), así como la demostración de que las células estimuladas con células no presentadoras son anergizadas, sugieren que la manipulación de las células presentadoras puede ser importante para inducir la tolerancia. Pero este fenómeno es paradójico con la relevancia que ha adquirido en los últimos años el reconocimiento indirecto en la respuesta alogénica.

La importancia del reconocimiento indirecto ya ha sido apuntada anteriormente. Al menos tres posibilidades podrían explicar estas discrepancias: 1) las células APC del donante, además de estimular respuestas directas, podrían facilitar la respuesta indirecta mediante el transporte de los antígenos del donante a los ganglios linfáticos del receptor, 2) las células APC del donante pueden representar una de las dianas críticas de los mecanismos efectoros del rechazo del injerto, y 3) aunque la estimulación indirecta parece una vía importante para la respuesta de células T cooperadoras, la estimulación directa de células efectoras podría ser en gran parte dependiente de la presencia de las células APC del donante<sup>18,19</sup>.

#### \* Células T cooperadoras

La mayoría de tipos de rechazo de injerto, y especialmente el rechazo agudo, implican respuesta celular T. En humanos, el uso de agentes que

bloquean específicamente las respuestas T y la correlación de su uso con la supervivencia del injerto, confirman este papel central de las células T. Pero a pesar del uso de tratamiento inmunosupresor, no son infrecuentes los episodios de rechazo que aparecen a partir de los 3-4 días post-trasplante, que se pueden repetir sobre todo durante los tres primeros meses, o incluso mucho más tarde, como por ejemplo con la retirada de la inmunosupresión. En estos episodios, la respuesta es predominantemente celular, mediada por células T, y pueden aparecer en ausencia de anticuerpos anti-injerto.

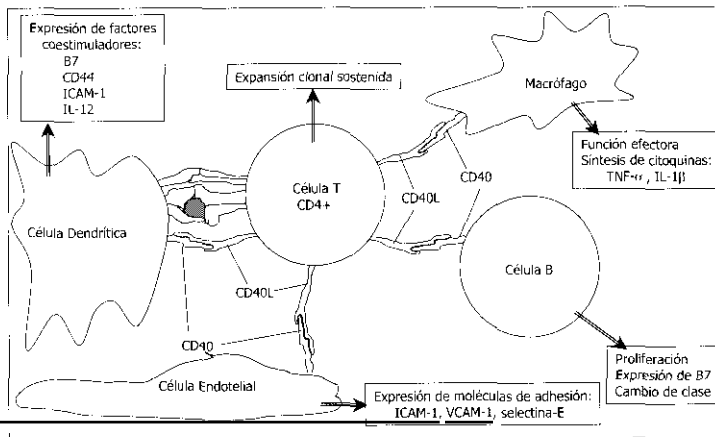
La respuesta inmune presenta variadas facetas respecto a sus mecanismos efectores, de los que se tratará más adelante. Las líneas directrices sobre la mayor o menor implicación de cada uno de estos mecanismos en la respuesta, vienen determinada por los diferentes tipos de señales derivadas de las células T cooperadoras.

Las células T cooperadoras (conocidas como células Th «*T helper*») presentan mayoritariamente un fenotipo CD4<sup>+</sup> TCR $\alpha$ /b<sup>+</sup> y son las responsables de la inducción de la respuesta efectora y del perfil de esta respuesta. Esto es, dependiendo de las citoquinas que secreten, promueven diferentes tipos de respuesta efectora: desde la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH, «*Delayed Type Hipersensitivity*») y de citotoxicidad celular, hasta la respuesta humoral dependiente de la síntesis de anticuerpos<sup>12,13</sup>.

#### \* Reconocimiento y activación de las células T cooperadoras

La activación de las células Th requiere, junto a la señal específica (el reconocimiento del antígeno a través de su receptor específico o TCR, «*T Cell Receptor*»), de una segunda señal, denominada señal de coestimulación. La principal señal coestimuladora se produce por la interacción de la molécula CD28, sobre la superficie de la célula T, con las moléculas de la familia B7, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), expresadas por las células APC profesionales<sup>20,21</sup>. En algunos sistemas las citoquinas IL-1 y/o IL-6 pueden suplir la segunda señal, aunque parece que su acción está mediada por la inducción de la expresión de las moléculas B7.

Una interacción particularmente interesante es la proporcionada por las moléculas CD40, expresada por las APC, y CD40L, expresado por las células T activadas. La cooperación entre APC y célula T activada induce una doble señal (Figura 2): 1) activa o potencia las funciones presentadoras de antígeno en las APC, y 2) prolonga el proceso de expansión clonal de la célula T. Este mecanismo de activación de células APC es importante en la respuesta alogénica por ser independiente de estímulo inflamatorio<sup>22</sup>.



Las interacciones CD40/CD40L juegan un papel central en el desarrollo de respuestas T dependientes. CD40L es expresado por las células T inmediatamente tras su activación. La interacción con CD40 estimula potencia la sensibilización de la respuesta, así como las fases efectoras de la misma: A) estimulan la capacidad coestimuladora de las células APC, B) potencian la proliferación y secreción de citoquinas por la propia célula T, C) estimulan la cooperación T-B para la producción de anticuerpos y formación del centro germinal, D) activan a los macrófagos, y F) inducen la expresión de moléculas de adhesión en los endotelios, lo que permite la adhesión y migración transendotelial.

Figura 2. Interacciones CD40/CD40L en la respuesta T dependiente.

Otras interacciones entre la célula Th y la APC son también relevantes. Son las derivadas de los correceptores (CD4 y CD8, que interactúan con regiones conservadas de las moléculas de clase II y I, respectivamente) y las moléculas de adhesión (LFA-1, CD2).

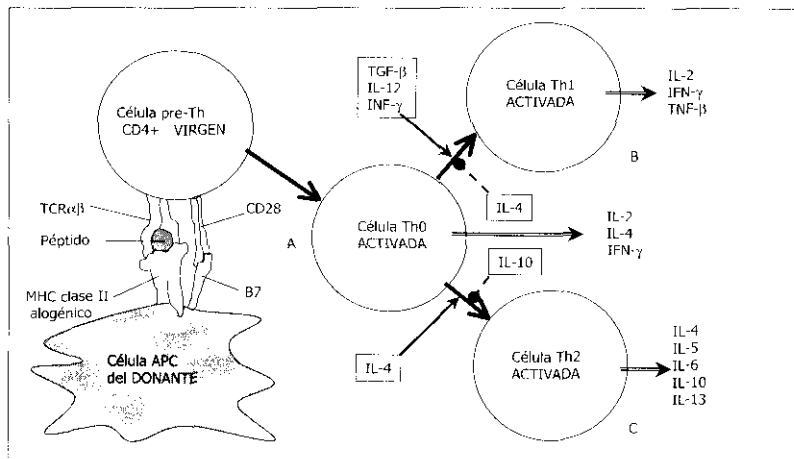
Las células Th alorreactivas pueden reconocer a los aloantígenos de las dos formas señaladas más arriba: directa e indirecta. Al nivel de la población, el reconocimiento indirecto (para aloantígenos HLA y para aloantígenos de sistemas menores) se caracteriza por una menor frecuencia relativa de precursores Th preparados para la respuesta, y por la importante dependencia de señales coestimuladoras, tanto celulares (uniones CD4/HLA clase II, ICAM-1/LFA-1, LFA-3/CD2, B7/CD28) como solubles (IL-1 y IL-6)<sup>20,22</sup>.

En el reconocimiento directo (sólo para aloantígenos del sistema MHC) la frecuencia de precursores es mucho mayor, y dependen también de señales coestimuladoras, aunque en menor grado debido a la mayor densidad de los aloantígenos en las células del injerto. La dependencia de coestimulación, sobre todo para células T vírgenes, podría ser uno de los motivos por los que los órganos deficientes en células APC profesionales tienen mayor dificultad para el desarrollo de la respuesta inmune. Las células del parénquima del injerto presentan, en condiciones fisiológicas, carencia en la presentación de las señales secundarias (ausencia de producción de citoquinas coestimuladoras o del ligando B7) para la activación

de las células Th. La dependencia de la coestimulación también depende la avidez del receptor específico por el antígeno.

\* Subpoblaciones de células T cooperadoras y funcionalidad

Tras la activación de sus precursores, las células Th se expanden y generan células cooperadoras maduras, secretoras de citoquinas<sup>23,24</sup>. El perfil de citoquinas secretado dependerá de la proporción relativa de las dos poblaciones maduras de Th (Figura 3):



Los precursores de células Th generan distintas subpoblaciones de células cooperadoras según el microambiente en que tiene lugar la sensibilización: A) las estimulaciones recortadas en el tiempo parecen generar células Th0 no polarizadas con un perfil de secreción de citoquinas mixto (IL-2 y IL-4); mientras que las estimulaciones prolongadas promueven la polarización de la respuesta, dependiendo del microambiente de citoquinas: B) las citoquinas TGF- $\beta$ , IL-12 y IFN- $\gamma$  inducen la diferenciación a Th1, y C) la IL-4 induce la diferenciación a Th2. Ambas poblaciones secretan citoquinas que retroalimentan positivamente la generación del mismo tipo celular e inhiben la población contraria (IL-4 para Th1 e IL-10 para Th2).

Figura 3. Generación de células TH1 y TH2 y citoquinas reguladoras.

- 1) Subpoblación de células Th1 secretoras de IL-2 y IFN-g, que dirigirán la respuesta de células T citotóxicas y la activación de macrófagos. Constituye la respuesta predominante frente al aloinjerto.
- 2) Subpoblación de células Th2 secretoras de IL-4, IL-5, IL-7, e IL-10 que dirigen predominantemente la respuesta de células B hacia su maduración a células plasmáticas, y la síntesis y secreción anticuerpos.
- 3) Células Th3 (ver Células reguladoras).

La polarización de la respuesta depende de varios factores, no claramente definidos. Parece que está favorecida por la estimulación crónica



en el contexto de un microambiente adecuado: la IL-4 promueve la formación de células Th2, mientras que la IL-12 favorece la generación de Th1<sup>23</sup>.

Las moléculas de coestimulación que expresan las células APC también pueden influir selectivamente sobre la diferenciación de los precursores de células Th. De esta forma, en algunos modelos experimentales se ha constatado la inhibición de respuestas Th1 por anticuerpos bloqueantes dirigidos contra B7-1, mientras que los dirigidos contra B7-2 inhibían las respuestas Th2. Sin embargo, otras observaciones demuestran que el papel de dichas moléculas no tiene la simplicidad descrita: 1) Ambos miembros de la familia B7 pueden inducir los dos tipos de respuesta; 2) La intensidad relativa de su expresión puede ser modificada por la dosis de antígeno; y 3) Algunos ejemplos sugieren que B7-2 interviene más en la respuesta primaria, mientras que B7-1 parece aumentar posteriormente, interviniendo en el mantenimiento de la respuesta primaria y en la respuesta secundaria. En general, estos resultados se desprenden de modelos de respuesta bloqueados con anticuerpos monoclonales, y deben ser interpretados con cautela<sup>20-24</sup>.

Funcionalmente, como se comentaba más arriba, las respuestas Th1 inducen respuestas mediadas por células del tipo hipersensibilidad retardada ( $T_{DTH}$ ), mientras que las Th2, más complejas, están caracterizadas por alta producción de anticuerpos y, consecuentemente, respuestas humorales. Las reacciones alérgicas se encuadran dentro de las respuestas Th2 y se caracterizan por alta producción de IgE específica contra el antígeno en cuestión, así como con proliferación y activación de eosinófilos y mastocitos. Sin embargo, tan solo algunas respuestas Th2 se caracterizan por la producción de IgE y el establecimiento de una reacción alérgica, ya que la mayoría producen otros isotipos de inmunoglobulinas. En general, la respuesta Th2 se asocia a inmunidad protectora contra microorganismos extracelulares.

La proporción entre las distintas citoquinas de tipo Th2 que son producidas durante una respuesta media la formación predominante de un isotipo u otro de inmunoglobulina durante la respuesta y consecuentemente el tipo de ésta. De esta forma, la formación de IgG4 suele correlacionarse negativamente con la de IgE, al igual que la de IgG2 con la de IgA<sup>18</sup>.

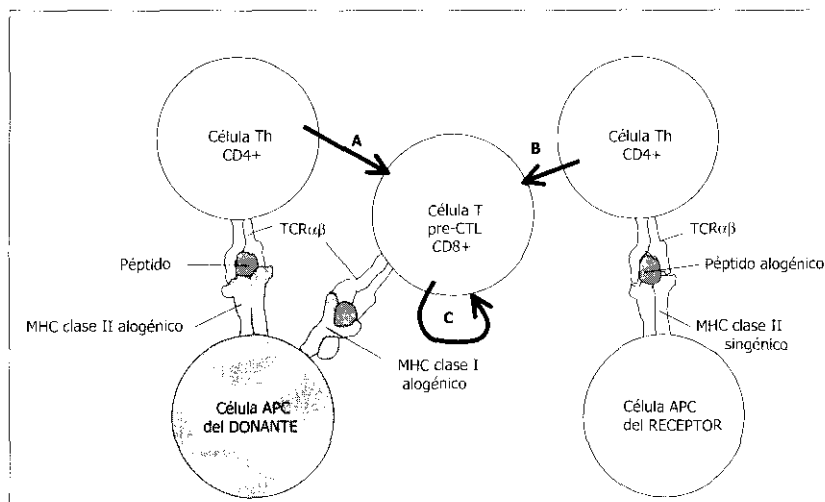
Las citoquinas producidas por cada subtipo son mutuamente inhibitorias para la diferenciación y función de las células del otro fenotipo. Mientras que el INF-g inhibe la proliferación de las células Th2, las citoquinas de Th2, IL-10 o IL-4, inhiben la de las células Th1<sup>18</sup>.

\* Cooperación cruzada entre células cooperadoras indirectas y efectoras directas

Las células T CD8+ citotóxicas que median el rechazo del injerto deben reconocer de forma directa los aloantígenos sobre las células del

donante. Si las células T cooperadoras se han sensibilizado de forma indirecta por las células APC singénicas, en los ganglios linfáticos que drenan el injerto, y las células T citotóxicas se sensibilizan de forma directa por las células del donante, debe producirse una asociación física entre ambas poblaciones para que se desarrolle la cooperación.

Esta relación no está bien definida, aunque algunos modelos murinos de trasplante de piel con injertos deficientes en moléculas de clase II, indican que esta cooperación se puede producir<sup>23</sup>. Estos resultados sugieren que el modelo fisiológico de cooperación Th-CTL (APC, T CD4+ y T CD8+, Figura 4A) no es necesario, o bien que un cierto grado de asociación física se puede producir, probablemente en el ganglio linfático de drenaje: APC alogénica-T CD8+ - TCD4+ - APC singénica (Figura 4B). Hay evidencias de la formación de agrupamientos que incluyen a estos cuatro tipos celulares en relación con el rechazo de injertos<sup>24</sup>.



Modelos de cooperación entre Th y CTL: A) Modelo de tres células en la cooperación directa sobre APC alogénica, B) Modelo de cuatro células para la cooperación cruzada entre reconocimiento directo (CTL) y reconocimiento indirecto (Th) sobre APC alogénica y singénica, respectivamente, y C) Maduración y expansión autocrina de las propias CTLs en el tipo de reconocimiento directo sobre el injerto.

Figura 4. Modelos de cooperación entre células TH y PRE-CTL.

#### \* Células cooperadoras CD8+

La activación de células T CD8+ cooperadoras ha sido demostrada en experimentos *in vitro*, sobre todo con modelos de estimulación alogéni-

ca. Estas células presentan una muy elevada afinidad por los aloantígenos de clase I, y se activan a través del reconocimiento directo de los mismos. Esta activación directa parece ser menos eficaz que para las células T CD4+. Por un lado, los injertos que solo presentan disparidad en antígenos de clase I son rechazados más lentamente, y además, la respuesta de células T CD8+ cooperadoras es más fácilmente inhibida por ciclosporina.

Aparentemente, la IL-2 producida por estas células sirve antes, de forma autocrina, a su propia maduración como células efectoras, que a proveer la cooperación con otras poblaciones (Figura 4C). Pueden comportarse como células Th, pero en general no liberan suficiente IL-2 para facilitar la segunda señal a células T CD8+ con diferente especificidad, y no proveen la cooperación necesaria para el desarrollo de la respuesta de anticuerpos por las células B.

La activación y maduración de estas células es más dependiente de las células APC del donante. Esto explicaría que los injertos vascularizados, aunque sólo expresen incompatibilidades en antígenos de clase I, requieren células T CD4+ para iniciar el rechazo<sup>15</sup>. En estos casos, el fenómeno de la sensibilización cruzada determina la destrucción de las células del donante por citotoxicidad directa de las células T CD8+ del receptor.

## CÉLULAS EFECTORAS DEL SISTEMA INMUNE

### \* *Células T Citotóxicas*

Los linfocitos T citotóxicos (CTL, «*Cytotoxic T Lymphocytes*») se activan tras el reconocimiento directo o indirecto (siempre en el contexto de moléculas HLA de clase I). La maduración de las CTL requiere una segunda señal que puede ser proporcionada o bien por factores coestimuladores presentes en células APC profesionales o por citoquinas secretadas por los linfocitos T cooperadores (IL-2). Las células T citotóxicas son predominantemente TCRab CD8+.

La actividad citotóxica se puede desarrollar sobre moléculas de clase I (citotoxicidad directa) o determinantes presentados por moléculas de clase I (citotoxicidad indirecta).

### \* Citotoxicidad indirecta

Los datos experimentales evidencian que el reconocimiento directo es el principal mecanismo por el que los CTL reaccionan frente al injerto. Sin

embargo, los mecanismos efectores indirectos parecen ser activos en algunos modelos, aunque resultan ineficaces en muchas circunstancias<sup>18</sup>. Estos mecanismos son probablemente más efectivos cuando las células APC alogénicas son reemplazadas por las singénicas, cuando las incompatibilidades en antígenos de clase I son múltiples, y para ciertos tipos de injerto (como los islotes pancreáticos)<sup>25,26</sup>.

#### \* Activación y maduración de células T citotóxicas

El mecanismo por el que las CTL interactúan con las APC no está bien caracterizado, tampoco se conoce con precisión las citoquinas necesarias para la diferenciación de las CTL: la IL-2 juega un papel importante, y parece que tanto el IFN- $\gamma$  como la IL-12 (producida por las APC) pueden contribuir a la diferenciación de las CTL.

En cuanto a la identidad de las células T que secretan estas citoquinas, se plantean dos situaciones diferentes<sup>27,28</sup>:

- 1) Cuando las CTL reconocen el antígeno en la superficie de células dendríticas, que tienen una elevada actividad coestimuladora, debido a la expresión de niveles altos de moléculas como B7-1 o B7-2. Los CTL, estimulados por la doble señal que reciben de la APC, secretan IL-2. La IL-2 secretada de forma autocrina les conduce a proliferar y diferenciarse. Las CTL CD8<sup>+</sup> que se desarrollan sin la intervención de células CD4, se denominan CTL independientes de células cooperadoras.
- 2) Cuando la APC presenta una actividad coestimuladora baja. En este caso, la activación de las CTL requiere la colaboración de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del subtipo Th1. Se postula que en una primera etapa las células Th1 y CTL reconocen al mismo antígeno presentado en la superficie de la misma célula APC. En una segunda etapa pueden producirse dos situaciones diferentes, no excluyentes. La célula Th1 estimula a la APC para que incremente su expresión de moléculas coestimuladoras, como B7, y se facilita el crecimiento autocrino de las CTL. Por otra parte, y de forma no excluyente, la célula Th1 activada puede proporcionar la IL-2 necesaria para la proliferación y diferenciación paracrina de las CTL.

Aunque las citoquinas secretadas por los linfocitos Th1 promueven la diferenciación de CTL, esto no significa que las citoquinas Th2 jueguen un papel inhibitorio. Al contrario, éstas parecen contribuir a la diferenciación de las CTL<sup>29</sup>.

### \* Actividad citotóxica

La diferenciación de las CTL implica la adquisición de la maquinaria necesaria para llevar a cabo la lisis celular.

Los requisitos principales que necesitan los CTL para adquirir la capacidad de lisis de las células diana son la producción de gránulos citolíticos. Su contenido molecular ha sido parcialmente definido y se ha demostrado que incluye: 1) Varias serín-esterasas denominadas granzimas; 2) Perforina; y 3) Otras enzimas (carboxipeptidasas, catepsina D, arilsulfatasa y  $\beta$ -glucuronidasa).

Varios cambios se dan durante este proceso. En breve, las CTL desarrollan gránulos citoplasmáticos específicos que se unen a la membrana. Como consecuencia de la exocitosis del contenido de los gránulos, la perforina, que en el gránulo está en forma de monómero, polimeriza. La polimerización de la perforina, que conduce a la formación de un gran canal hidrofílico, se da preferentemente en una bicapa lipídica, tal como la membrana plasmática de la célula diana. Si se ensambla un número suficiente de canales de perforina, la célula diana se ve incapaz de evitar la entrada de iones y agua. Esto conduce al hinchamiento y la lisis osmótica de la célula diana. Este método de muerte celular es similar al que se produce por la acción del complejo de ataque a la membrana del complemento y la perforina es homóloga estructuralmente al factor C9 del complemento, el principal constituyente del complejo de ataque a la membrana<sup>28,29</sup>.

Aunque la perforina purificada es capaz por sí misma de causar la lisis osmótica de la célula diana, se ha demostrado que una función igualmente importante de la perforina es hacer posible la introducción de granzimas en la célula diana. La granzima B es una serín-proteasa que rompe preferentemente a las proteínas en un residuo de ácido aspártico. Esta actividad permite que la granzima B inicie la cascada de activación de caspasas. Recientemente se ha demostrado que uno de los sustratos de la granzima B *in vivo* podría ser la caspasa 3 que juega un papel central en el control de una serie de estímulos apoptóticos. El resultado es que al introducirse la granzima B en el citoplasma de la célula diana se inicia la muerte por apoptosis. Uno de los últimos pasos en la apoptosis es la actuación de enzimas que degradan el ADN<sup>27,28</sup>.

La muerte se produce por una combinación de apoptosis y lisis osmótica. En la lisis celular mediada por CTL permanecen importantes incógnitas por resolver, como el mecanismo por el cual las células efectoras se protegen de la acción de sus propios mediadores, una vez liberados al espacio intercelular<sup>28</sup>.

Otro mecanismo por el que los CTL pueden inducir la muerte de las células diana está mediado por la interacción del ligando de Fas

(FasL) que expresan los CTL activados con las moléculas de Fas (CD95) en aquellas células diana que expresen dichas moléculas. Cuando Fas interacciona con su ligando se produce el reclutamiento de la caspasa 8 por el complejo del Fas activado y la activación proteolítica de dicha enzima. Así, la activación de Fas activa la vía de las caspasas y la apoptosis. Fas pertenece a una familia de receptores que incluye el del factor de necrosis tumoral y comparte con éste elementos estructurales localizados en el dominio citoplasmático que son esenciales para la inducción de la apoptosis. Los CTL comparten con otros linfocitos T activados la expresión de FasL, que pueden transmitir señales de inducción a la apoptosis en células diana que expresen Fas funcional en su membrana<sup>28,29</sup>.

Estudios recientes sugieren que la actividad citotóxica mediada por granzima y perforina es la forma predominante en células T citotóxicas CD8+, mientras que la inducción de apoptosis por interacción Fas/FasL es más representativa de células T CD4+ citotóxicas.

Por último, los CTL tras su activación secretan citoquinas y otras proteínas, principalmente IFN-g (activación de macrófagos), INF-a, linfotóxina y en menor grado IL-2, que potencian la respuesta alógena.

#### \* *Células citotóxicas naturales*

Las células citotóxicas naturales (NK o «*Natural Killer*») son linfocitos grandes granulares, que presentan la capacidad de lisar algunas células tumorales y de linaje hematopoyético (actividad NK). Poseen receptores, diferentes al TCR, de activación y de inhibición<sup>30</sup>:

- 1) Receptores inhibidores de las células o KIR («*Killer cell Inhibitory Receptors*») que reconocen específicamente alelos HLA de clase I y confieren resistencia frente a la lisis en células diana que expresan dichos alelos. Cada clon puede coexpresar varios receptores KIR que reconocen distintos alelos HLA-A, B y C, y cada interacción específica aparentemente funciona de forma independiente bloqueando la función lítica de la célula NK<sup>31</sup>.
- 2) Receptores de activación o KAR («*Killer cell Activatory Receptors*»). El NKRP1, por ejemplo, reconoce azúcares que son constitutivos de la matriz extracelular de la mayoría de las células. Su unión a dichos azúcares activa a la capacidad citolítica de las células NK.

Aunque las células NK infiltran los aloinjertos rechazados, no hay evidencias de su implicación en el rechazo de órganos sólidos y su depleción

no ha demostrado un impacto significativo en el rechazo de órgano sólido. Sólo se han implicado en el rechazo de aloinjertos de médula ósea y en el rechazo de xenoinjertos<sup>31</sup>.

Además de la citotoxicidad, las células NK pueden liberar citoquinas proinflamatorias, como IFN-g y TNF-a, que activan a los macrófagos y a las células endoteliales. En este sentido, las células NK suponen una primera línea de defensa en muchas infecciones y la secreción de IFN-g podría en los estadios iniciales puede derivar la respuesta de las células T al tipo Th1.

#### \* Actividad citotóxica estimulada por citoquinas

Las células NK muestran un aumento de su capacidad citolítica tras la exposición a citoquinas. En concreto, cuando son expuestas *in vitro* a altas concentraciones de IL-2, proliferan y aumenta su capacidad citotóxica, con capacidad de lisar células diana que normalmente son resistentes a la actividad de las células NK. Este efecto se denomina actividad LAK («*Lymphoquine-Activated Killing*») y pueden desarrollarla las células NK y los CTL.

No se conocen los mecanismos moleculares responsables de este cambio de comportamiento, que podría deberse a las señales transmitidas por algunos de los marcadores de activación expresados por las células NK activadas. Tampoco se ha demostrado que este fenómeno *in vitro* tenga correlación fisiológica.

Las concentraciones necesarias de IL-2 pueden no ser alcanzadas ni siquiera en el microambiente próximo a las células que la secreten. Y por otra, las células NK parecen desempeñar su papel más importante en la inmunidad temprana, mientras que la principal producción de IL-2 se daría más tardíamente por los linfocitos T<sup>31</sup>.

#### \* Células NK y xenotrasplante

En el modelo de xenotrasplante se ha caracterizado un nuevo tipo de reacción de rechazo, mediado por infiltrado de células NK y macrófagos. Este tipo de reacción se ha denominado Rechazo retardado del xenoinjerto. La activación de las células NK probablemente se origina en la ausencia de moléculas de HLA en el cerdo, lo que conlleva un déficit en la inhibición que aquellas ejercen sobre la población NK. Las células NK así activadas liberan INF-g y TNF-a que reclutan y activan a los macrófagos, desencadenando una severa reacción inflamatoria<sup>31,32</sup>.

### \* Células B

La respuesta T sirve las señales secundarias para la maduración de células B a plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas. Es importante señalar que en los modelos animales (ratón, conejo) de aloinjerto hay poca participación de la inmunidad humoral en el rechazo agudo, así como que los inmunosupresores utilizados en clínica son más efectivos en la depresión de la respuesta T que en la B.

Sin embargo, la respuesta de anticuerpos frente a las células del donante puede ser relevante en el contexto del rechazo crónico. Y la presencia de anticuerpos citotóxicos frente a los antígenos del donante es un factor de riesgo para la pérdida a largo plazo del trasplante renal. Por ello, en clínica, la respuesta humoral surge como un importante factor de pérdida del injerto.

### \* Cooperación célula T-célula B

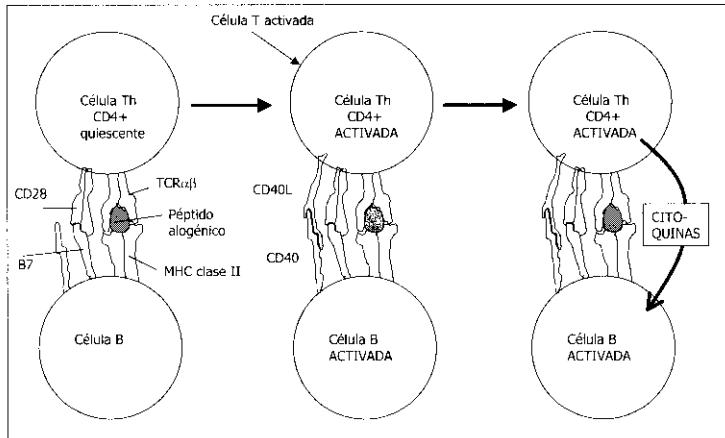
Diversos experimentos *in vitro* demuestran la importancia en la generación de las respuestas humorales de la interacción física entre las células B presentadoras del antígeno y las células Th. El contacto físico entre las células B y las células Th está mediado por múltiples parejas receptor-ligando. Las dos parejas receptor-ligando críticas, además del antígeno y el receptor antigénico, son las parejas B7/CD28 y CD40/CD40L (20,33).

Las células B reconocen al antígeno a través de su receptor específico (inmunoglobulina de membrana o BCR, «*B Cell Receptor*»). El entrecruzamiento del BCR por la unión al antígeno induce la activación de la célula B, que internaliza y procesa el antígeno, presentando los péptidos derivados del mismo en el contexto de las moléculas de clase II. Además, la activación induce la expresión de moléculas de la familia B7, que median la señal coestimuladora a través de la interacción con la molécula CD28 expresada por la célula T (Figura 5).

### \* Interacción CD40/CD40L

Algunos estudios sugieren que esta secuencia de sucesos se produce de forma invertida. Las células Th se activan inicialmente, respondiendo a una presentación por macrófagos o células dendríticas. Tras la activación se induce la expresión de CD40L. Cuando las células Th CD40L+ reconocen el antígeno presentado por las células B específicas, se produce la interacción entre CD40L y CD40. Esta interacción promueve la proliferación y diferenciación de las células B, y aumenta la expresión de B7, potenciando la activación de la célula Th. En cualquier caso la interacción





La cooperación T-B requiere además del estímulo específico (el reconocimiento por el TCR del antígeno específico en el contexto de las moléculas de clase II), las interacciones CD28/B7 y CD40L/CD40 entre célula T y célula B, respectivamente. La activación e interacción CD28/B7 induce la expresión de CD40L en la célula T. La interacción CD40/CD40L y las citoquinas secretadas en el espacio de cooperación promueven la proliferación y diferenciación de las células B.

Figura 5. Cooperación T-B.

entre las células B y las células Th es bidireccional, generando señales en las dos células implicadas (Figura 2C)<sup>33,34</sup>.

Diversos experimentos han puesto de manifiesto que el papel central de CD40 en la estimulación de la célula B mediante el contacto con la célula Th. CD40 se expresa en la mayor parte de los linfocitos B maduros y se pierde después de que las células B se diferencian a células secretoras de anticuerpos. CD40 es un miembro de la familia de proteínas de superficie celular que comprende los receptores para el TNF y la proteína Fas (CD95). Esta familia está involucrada en la regulación de la muerte celular programada y de la proliferación celular. El ligando de CD40, CD40L (CD154) es una glicoproteína de membrana que muestra una gran homología con TNF y el ligando de Fas, y se expresa transitoriamente en la superficie de las células T CD4+ tras su activación<sup>33,22</sup>.

La interacción de CD40L también es esencial para que se produzca el cambio de isotipo, como pone de manifiesto el hecho de que los individuos deficientes en CD40L presentan una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X conocida como Síndrome de hiper-IgM. Algunos grupos, mediante ensayos *in vitro*, han sugerido que otras moléculas de la superficie celular podrían ser capaces de proporcionar señales alternativas que indujeran la activación de las células B, el cambio de isotipo y la secreción de inmunoglobulinas, pero esto no ha podido ser demostrado *in vivo*<sup>36</sup>.

Esta vía de respuestas celulares mediada por contacto es un mecanismo general para la activación de células efectoras por las células Th, y no es exclusiva de la colaboración con las células B. La activación del macrófago mediada por las células Th también puede implicar la interacción del ligando de CD40 con el CD40 de los macrófagos<sup>33</sup>.

#### \* Cooperación indirecta y síntesis de anticuerpos

La cooperación T-B en la síntesis de anticuerpos frente a aloantígenos se produce a través del reconocimiento indirecto o fisiológico. El BCR reconoce epitopos conformacionales del antígeno, por lo que su reconocimiento es siempre directo. Las células B del receptor procesan los aloantígenos capturados a través de su receptor específico (inmunoglobulina de membrana) y los procesan para presentar los péptidos antigénicos en el contexto de las moléculas de clase II del MHC.

La generación de respuestas de anticuerpos T dependientes, implica la colaboración T-B. Esta cooperación es indirecta, según el modelo de tres células: células B-APC - célula T.

Los estudios de producción de aloanticuerpos tras el rechazo del injerto de piel han mostrado que tanto la producción inicial de aloanticuerpos de tipo IgM, como el cambio de isotipo posterior, se producen de forma T CD4+ dependiente. La cooperación T-B productiva para esta respuesta es la relación indirecta, mientras que la cooperación directa parece que sólo contribuye en la generación de anticuerpos de tipo IgM. Estos resultados sugieren que la producción aloanticuerpos de tipo IgG suponen un marcador que demuestra la sensibilización indirecta de células T CD4+.

## CITOQUINAS

#### \* *Citoquinas implicadas en el rechazo del injerto*

La relación de diferentes citoquinas con el rechazo del injerto se ha estudiado en modelos experimentales con ratones deficientes en estos factores (ratones «knockout» o KO), en modelos con tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-citoquinas, y tratamiento con citoquinas de fusión (citoquina/Ig).

A pesar de la asociación entre la respuesta Th1 y el rechazo, la presencia de IL-2 o de IFN-g, no es por sí sola necesaria para el proceso. La redundancia en los diferentes factores de crecimiento de las células T (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 o IL-15) y la promiscuidad en el uso de la cadena g común (g<sub>c</sub> o IL-2Rg) en sus receptores explica el modesto impacto que cada una

de las deficiencias estudiadas tiene sobre la evolución del injerto<sup>34,36</sup>. Sin embargo, la importancia relativa de cada una de ellas parece ser diferente, y se ha postulado una jerarquía de citoquinas respecto a la capacidad para estimular el rechazo o bloquear la inducción de tolerancia<sup>37,38</sup>:

- 1) La IL-2 supone un potente promotor del rechazo, y su detección en el contexto de inducción de tolerancia es extremadamente infrecuente. Estimula la proliferación de células T activadas por el antígeno y la proliferación de células NK, la activación de actividad citotóxica y NK, así como la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ <sup>24,26,34</sup>.
- 2) La IL-15 se comporta de forma similar. Esta citoquina es producida por los monocitos y por diversos tejidos, como riñón, pulmón, corazón, músculo estriado y placenta. El receptor de IL-15 comparte con el receptor de IL-2 dos cadenas ( $\beta$  y  $\gamma_c$ )<sup>38</sup>.
- 3) Las citoquinas IL-7 e IL-9 inhiben también la inducción de tolerancia, pero su implicación en el rechazo está peor definida<sup>24</sup>.
- 4) La IL-4 muestra un comportamiento más complejo. Puede prevenir los efectos adversos de la IL-2, aunque esta acción parece que se origina en la desviación del tipo de respuesta, de Th1 a Th2. Tanto la IL-4 como la IL-10 estabilizan la polarización de la respuesta Th2, y previenen la activación Th1. El tipo de respuesta Th2 antes que prevenir el rechazo, parece estar asociada a rechazo demorado<sup>24,38</sup>.

#### \* Citoquinas implicadas en las colaboración T-B

Las citoquinas desempeñan dos funciones principales en las respuestas de anticuerpos: determinan los tipos de anticuerpos producidos mediante la promoción selectiva del cambio hacia distintos isotipos de cadena pesada, y proporciona mecanismos de amplificación para estimular la proliferación y diferenciación de las células B<sup>14</sup>:

- 1) Las IL-2, IL-4 y IL-5, todas ellas producidas por las células Th, contribuyen a la proliferación de la célula B y pueden actuar sinérgicamente.
- 2) La IL-6, producida por los macrófagos, las células Th2 y otras muchas células, es un factor de crecimiento para las células B secretoras de anticuerpos ya diferenciadas.
- 3) La IL-1, IL-10 y TNF, producidas por macrófagos, también estimulan la proliferación de las células B *in vitro*. Las células B humanas cultivadas secretan cantidades elevadas de anticuerpos si se añaden IL-2, IL-6 o IL-10.

Pero la función más selectiva de las citoquinas en la secreción de anticuerpos es el control del cambio de isotipo («switching») de la cadena pesada que determina los tipos de anticuerpos producidos. En un principio los linfocitos B producen cadenas m y por tanto anticuerpos de tipo IgM. Sin embargo, tras la estimulación con el antígeno los linfocitos B proliferan y se diferencian, pudiendo producir anticuerpos de otros isotipos pero con la misma especificidad. El cambio de isotipo solo tiene lugar en células B activadas por el antígeno y está regulado por células T cooperadoras.

Además de las citoquinas, para que se produzca el cambio de isotipo es necesario el contacto directo vía interacción CD40/CD40L. Esta interacción parece necesaria para el cambio a cualquiera de los isotipos, mientras que las citoquinas inducen cambios de isotipo selectivos. Las citoquinas de las respuestas Th1 y Th2 inducen cambios de isotipo específicos de ambos tipos de respuesta<sup>13,35</sup>:

- 1) El INF-g secretado principalmente por las células Th1 induce el cambio de isotipo a IgG1 e IgG3.
- 2) Las citoquinas de la respuesta Th2 inducen el cambio de isotipo a IgE (IL-4) e IgA (IL-5 y TGF-b o «Transforming Growth Factor-b»),. El requerimiento absoluto de IL-4 para generar respuestas IgE se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*. En cultivos de células B maduras estimuladas con antígenos o activadores policlonales, la adición de INF-g inhibe el cambio a la IgE inducido por la IL-4, y a la inversa, la IL-4 reduce la producción de IgG1 e IgG3 (efectos antagónicos de las citoquinas).
- 3) El factor TGF-b producido por muchos tipos celulares, actúa junto con la IL-5 producida por las células Th2, estimulando la producción de IgA en los tejidos linfoides de las mucosas.

Por lo tanto, las células Th regulan tanto la producción de anticuerpos por las células B (Th2), como su isotipo (Th1, Th2). El punto relevante respecto a las citoquinas de los tipos Th1 y Th2 es que, además de tener efectos diferentes sobre las células B, la activación preferente de uno u otro subgrupo origina respuestas humorales con mecanismos efectores diferenciados. Las respuestas de anticuerpos estimuladas por las células Th1 están dominadas por la IgG1 e IgG3 que opsonizan los antígenos para su fagocitosis por los macrófagos. Los isotipos de anticuerpos estimulados por las células Th2, como la IgE o la IgG4, ni activan el complemento ni se unen a los receptores de Fc de los macrófagos. Estos anticuerpos están implicados en la defensa del huésped mediada por células efectoras no fagocíticas como los mastocitos y los eosinófilos.

## **MECANISMOS EFECTORES DEL RECHAZO ALOGÉNICO**

### **RECHAZO AGUDO**

El rechazo agudo de causa inmune es la forma más común entre las disfunciones tempranas del injerto. Ocurre en el 50-60% de receptores renales y se pueden producir varios episodios durante el mantenimiento del injerto. La incidencia de estos episodios y el tiempo en que aparecen disminuyen la tasa de supervivencia del injerto, tanto en el primer año, como a largo plazo, y constituyen un indicador de rechazo crónico.

Se produce por una respuesta primaria de células T y por lo tanto puede aparecer a partir del sexto día (en condiciones experimentales, y hasta los tres meses post-trasplante). Con los regímenes de inmunosupresión, su aparición puede ser mucho más tardía. De hecho, no es infrecuente que se presenten episodios leves o moderados de rechazo, que revierten con el tratamiento aunque pueden acarrear una progresiva disfunción del injerto. La biopsia muestra dos tipos de componente en este tipo de rechazo<sup>32,37-39</sup>

- 1) Rechazo vascular. Se observa vasculitis, y en los casos graves hemorragias y necrosis vascular. Están implicados anticuerpos dirigidos frente a los aloantígenos presentes en las células endoteliales, así como citotoxicidad indirecta mediada por anticuerpos y células T alorreactivas.
- 2) Rechazo celular. Se observa infiltrado de linfocitos T CD8+ y células inflamatorias, con edema intersticial e infiltrados linfocitarios perivenosos (característicos de la respuesta DTH). Están implicadas las células T alorreactivas y la citotoxicidad de tipo DTH mediada por macrófagos activados y reclutados al seno del injerto. La representatividad de los linfocitos T CD8+ en este tipo de rechazo viene deparada por la presencia ubicua de moléculas de HLA clase I.

En la fase inicial aparecen infiltrados de linfocitos activados en los capilares peritubulares. Estas células se adhieren a las células endoteliales y atraviesan las paredes capilares, desarrollando los infiltrados intersticiales, más característicos alrededor de los túbulos y glomérulos del córtex. La anatomía-patológica muestra infiltración intersticial por células mononucleares y ocasionalmente eosinófilos. Estos infiltrados se pueden acompañar de tubulitis (disrupción de la membrana basal de los túbulos), y/o vasculitis, con edematización de los endotelios capilares, necrosis fibrinoide arteriolar y trombos en los capilares glomerulares, hasta llegar a necrosis cortical en los casos severos.

El estudio fenotípico de los infiltrados muestra que son múltiples los tipos celulares presentes durante el rechazo del injerto, incluye células T CD4+ y T CD8+, células NK y macrófagos. Estas poblaciones presentan marcadores de activación (CD69, IL-2R, y HLA clase II en humanos), e incluyen, en el caso de las células T, tanto a células cooperadoras como citotóxicas. Las células B pueden estar representadas, aunque en muy baja proporción<sup>39</sup>.

El número de células infiltrantes no está relacionado con la intensidad del rechazo. En general, está más directamente relacionado con incompatibilidades de clase II que con las de clase I. Incluso las disparidades en antígenos menores, con tiempos de rechazo demorados, presentan un mayor infiltrado que los injertos con incompatibilidades sólo en antígenos de clase I.

Los estudios con ratones KO para diferentes genes implicados en la respuesta y/o la reconstitución con subpoblaciones de células T demuestran que tanto los diferentes grupos celulares estudiados, así como los diferentes mecanismos efectores, están implicados en el rechazo del injerto. Siendo compensados los defectos en cualquier vía efectora por el resto de mecanismos.

#### \* *Interacción entre células T y células endoteliales*

En las formas de rechazo agudo o crónico, tanto en lesiones por isquemia/reperfusión como por respuesta aloinmune, se produce una activación de células endoteliales y la infiltración leucocitaria del injerto. La relación entre las células T y las células endoteliales es especialmente interesante por constituir uno de los primeros contactos entre el sistema inmune del receptor y el injerto (además de las APC del donante) y por las características especiales que presentan las células del endotelio en lo que respecta a la respuesta inmune. No hay que olvidar que los endotelios forman parte del sistema retículo-endotelial de defensa.

Los estudios experimentales en este campo se basan sobre todo en modelos *in vitro*, y excepcionalmente en algún modelo *in vivo*.

#### \* *Reclutamiento selectivo de células T por las células endoteliales*

El reclutamiento de células T periféricas está mediado por moléculas de adhesión que se expresan en los endotelios microvasculares activados, que interaccionan con los ligandos selectivamente expresados por células T activadas o de memoria, pero no por células T vírgenes<sup>40-44</sup>.

La expresión por el endotelio de selectina-E aparece de forma temprana tras el trasplante y precede a los episodios de rechazo<sup>45,46</sup>, y también

selectina-P. La interacción preferente entre células T activadas y las células endoteliales del foco inflamatorio se explican, parcialmente, por la interacción de la selectina-E y-P que interaccionarán con sus ligandos específicos constituidos por oligosacáridos de células T CD4+ de memoria<sup>46</sup>, monocitos, neutrófilos y plaquetas.

Estudios *in vivo* realizados en ratón indican que las células Th1 son reclutadas de forma específica y mediada por selectinas en los focos periféricos de reacción de hipersensibilidad retardada (DTH), mientras que esto no ocurre con las Th2. Esto sugiere que los dos tipos de células Th podrían presentar diferencias en la expresión de las glicosil-transferasas requeridas para la síntesis de carbohidratos reconocidos por las selectinas. No está demostrado un patrón de reclutamiento específico para células Th2<sup>46-49</sup>. El reclutamiento de células Th1 podría provocar una predominancia de este tipo de respuesta, asociada al rechazo, dentro del injerto. Esto estaría en concordancia con la correlación entre bloqueo de respuestas Th1 y aceptación del injerto.

La fase de migración transendotelial de linfocitos y células mononucleares está regulada por interacciones específicas, entre las que destaca la expresión de VCAM-1 (CD106) por el endotelio. El ligando de VCAM1 es la integrina VLA-4 (α4:β1 o CD49d:CD29) expresada por todos los leucocitos. La interacción permite una adhesión más firme y el rodamiento de estos últimos sobre la capa endotelial. La expresión de VCAM-1 se correlaciona con los episodios francos de rechazo y con la infiltración celular<sup>42,44</sup>.

Otro factor importante que influye en la selectividad del reclutamiento lo constituye el conjunto de factores solubles conocidos como quimioquinas, y su interacción con los receptores específicos. Los injertos expresan múltiples quimioquinas tras las injurias; por isquemia/reperfusión, respuesta alogénica o infecciones virales. Los estudios sobre endotelios humanos demuestran que diferentes citoquinas proinflamatorias (principalmente IL-1, TNF-α e IFN-γ) estimulan la liberación por las células endoteliales de varias quimioquinas: 1) Quimioquinas de la familia C-X-C: IL-8, GRO e IP-10; y 2) Quimioquinas de la familia C-C: MCP-1, MCP-3 y RANTES<sup>45,48-49</sup>. Otras células de los parénquimas del injerto también pueden secretar quimioquinas frente a estímulos inflamatorios, pero están peor definidas.

También respecto a los receptores de quimioquinas existe una expresión diferencial entre las subpoblaciones Th1 y Th2. Las células Th1 expresan específicamente los receptores CXCR3 (receptor de IP-10) y CCR5 (receptor de RANTES). Las células Th2 expresan los receptores CCR3 (receptor de RANTES y MCP-3), CCR4 (receptor de TARC) y CCR7 (receptor de MIP-3b y SLC)<sup>48,49</sup>.

Además de la interacción con sus receptores, las quimioquinas potencian el reclutamiento estimulando la expresión de integrinas en las células T.

### \* Función accesoria de las células endoteliales

Además de las células APC profesionales, otros tipos celulares pueden ser estimulados para adquirir la capacidad de proveer la segunda señal requerida para la activación de las células T. Esta función se denomina accesoria.

Numerosos estudios *in vitro* evidencian que las células endoteliales pueden capacitarse para actuar como células APC, capaces de estimular directamente a los linfocitos alorreactivos. El reconocimiento directo de las moléculas de clase I del alo-MHC permite la activación de células T CTL, y el reconocimiento directo o indirecto de antígenos de clase II activa a las células Th. Pueden ser coestimuladoras tanto para la secreción de IL-4 como de IFN- $\gamma$ <sup>50-53</sup>.

La capacidad del endotelio para promover la secreción de IL-2 y la respuesta proliferativa de las células T CD4+ parece estar relacionada directamente con la expresión de CD58 por la célula endotelial, que interacciona con el ligando CD2 de la célula T (molécula con función accesoria que potencia la señal de activación transmitida por el receptor específico de antígeno)<sup>54</sup>.

Más importante, las células endoteliales pueden expresar la molécula CD40 que interacciona con CD40L (CD154), molécula cuya expresión está restringida a las células T recientemente activadas. Las interacciones entre CD40 y CD40L se comentaron en el contexto de la cooperación T-B. La unión CD40/CD40L induce la expresión de CD54 (ICAM-1), selectina E y VCAM-1, y la expresión de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-8, GM-CSF). Por tanto, CD40/CD40L podrían facilitar la concentración de linfocitos T en focos inflamatorios.

CD40L también parece desarrollar señales estimuladoras en la célula T, pero no están claramente definidas. Se ha demostrado la expresión, con baja intensidad, de CD40L en las células endoteliales de los injertos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Su estimulación induce la expresión de B7 en los leucocitos, por lo que puede constituir un potente estímulo proinflamatorio<sup>44,53,54</sup>.

Hay evidencias de que en el desarrollo de placas ateroscleróticas puede subyacer un proceso autoinmune; la interacción CD40/CD40L entre el endotelio y diferentes células del sistema inmune podría intervenir en dicho proceso.

Los injertos rechazados expresan CD40 y CD40L, siendo la expresión de CD40 predominantemente a expensas de las células endoteliales del injerto<sup>44,53</sup>. La implicación de la interacción CD40/CD40L en el rechazo agudo o crónico del injerto no está bien definida.

Sólo unos pocos estudios han demostrado la capacidad presentadora de antígeno de las células endoteliales<sup>51</sup>. Esta función podría resultar crítica para activar la respuesta de rechazo del injerto.



### \* Hipersensibilidad retardada

La hipersensibilidad retardada (DTH) es una respuesta que ocurre *in vivo*, pero que no puede ser reproducida *in vitro*. La reacción DTH en los tejidos comienza por una acumulación perivascular de linfocitos y monocitos en el foco antigénico. Sólo una pequeña población del infiltrado corresponde a células específicas: de su activación y respuesta se deriva la concentración de poblaciones inflamatorias inespecíficas. Los macrófagos constituyen en esta respuesta el último eslabón efector. La destrucción del foco antigénico y la lesión de los tejidos adyacentes la originan los macrófagos activados por las citoquinas liberadas por las células  $T_{DTH}^{19,32,37,39,44}$ .

### \* Activación de la respuesta

Tras el reconocimiento y activación, las células T específicas entran en ciclo y proliferan generando células T efectoras y de memoria. Ambas poblaciones abandonan el órgano linfático secundario y entran en la circulación. Si en el individuo no sensibilizado se calcula que puede haber no más de una célula virgen T antígeno-específica (para antígenos sencillos) por cada millón de células T vírgenes, tras el contacto y la fase de sensibilización esta frecuencia se incrementa, y hasta 1 de cada 10.000 células de memoria circulantes serán específicas frente al antígeno. El injerto alotgénico, sobre todo en el caso de órganos vascularizados, supone un sitio de sensibilización añadido, que potencia esta respuesta.

Ante la persistencia del estímulo antigénico, las células Th1 CD4+ de memoria y activadas circulantes (en algunos casos pueden ser CD8+) reconocen los aloantígenos presentados por células con función accesoria en los tejidos (macrófagos residentes o células del endotelio capilar y post-capilar). Su activación dará lugar a la respuesta inflamatoria.

### \* Estímulo de los endotelios

Por la secreción de TNF- $\alpha$  y por la relación directa célula T / célula endotelial (CD40-CD40L) se producen los siguientes efectos<sup>52,54</sup>:

- 1) Vasodilatación: el TNF- $\alpha$  incrementa la actividad enzimática endotelial para la secreción de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y, en combinación con el IFN- $\gamma$ , la síntesis de óxido nítrico (NO). Estos mediadores producen vasodilatación y mayor sensibilidad de las células endoteliales a sustancias vasoactivas como la histamina (liberada por los mastocitos perivascuales).

- 2) Adhesión de leucocitos: se produce la activación secuencial de moléculas de adhesión para neutrófilos y posteriormente linfocitos y monocitos (selectina-E y-P, y CD54). Las células endoteliales expresan constitutivamente ICAM-2 que sólo permite la adhesión de LFA-1.
- 3) Activación de leucocitos: las células endoteliales secretan IL-8 y MCP-1 (Proteína quimiotáctica de monocitos-1) que interactuarán con los linfocitos y monocitos adheridos a los endotelios y estimularán su extravasación.
- 4) Extravasación: en las células endoteliales se producen cambios conformacionales, con pérdida de uniones intercelulares y alteraciones de la membrana basal, que permitirán la fuga de células y de macromoléculas (fibrinógeno, fibronectina). El depósito de fibrinógeno y su producto insoluble (fibrina) originará la induración de la lesión además de facilitar la migración y retención de los leucocitos. Una molécula de adhesión adicional facilitará la migración de leucocitos (CD31 ó PECAM-1).

\* Amplificación de la respuesta T

Se produce por estos fenómenos descritos una segunda onda de reclutamiento de células T que infiltrarán el tejido y secretarán citoquinas importantes en la respuesta DTH<sup>56,57</sup>:

- 1) IL-2 que estimula la proliferación de las células T activadas y aumenta la producción de citoquinas
- 2) TNF- $\alpha$  y Linfotoxina que estimulan a las células endoteliales acondicionando el microambiente para el reclutamiento de nuevas células efectoras.
- 3) IFN- $\gamma$  que estimula la capacidad presentadora tanto de macrófagos como de células endoteliales incrementando la expresión de moléculas de clase II de HLA y moléculas coestimuladoras (B7); estimula además la secreción de IL-12 y activa las funciones efectoras de los macrófagos.

Las células T activadas específicamente (antígeno) o no (quimioquinas) permanecerán en el lugar de la inflamación e incrementarán la expresión de receptores de matriz extracelular (VLA-4 y VLA-5 permiten la unión a fibronectina, VLA-6 permite la unión a laminina). En células T crónicamente activadas se expresan VLA-1 y VLA-2, integrinas que median la unión con colágeno. Tras esta etapa de activación y expansión *in situ* las células T específicas del antígeno llegan a una frecuencia de 1 por cada 100 células T en el tejido.

### \* Activación de Macrófagos

Los monocitos que han sido reclutados en el foco de inflamación por los procesos anteriores se diferencian en macrófagos efectores, proceso denominado de activación de macrófagos. El factor más potente para esta activación es el IFN-g, aunque otros factores intervienen también en la transcripción de genes que cualifican al macrófago activado: citoquinas o la interacción con la célula T a través de CD40. Entre las funciones del macrófago activado se encuentran:

- 1) El IFN-g estimula la fagocitosis y la endocitosis, y aumenta la expresión de receptores de alta afinidad para el fragmento Fc de la IgG (FcγRI).
- 2) Liberación de mediadores de inflamación aguda como PAF, prostaglandinas, leucotrienos, trombina o factor tisular (activa la vía alternativa del complemento). La actividad de todos estos factores aumenta la respuesta inflamatoria local, que será rica en neutrófilos.
- 3) Aumenta la eficiencia del macrófago como APC a través principalmente del incremento en la expresión de moléculas HLA de clase II. Otras funciones coestimuladores también resultan aumentadas: moléculas de la familia B7, ICAM-1 y LFA-3. A su vez los macrófagos activados secretarán IL-12 o IFN-α, factores estimuladores de la diferenciación de los linfocitos.
- 4) Destrucción tisular y fibrosis. Cuando los macrófagos no pueden erradicar a la noxa, la secreción mantenida de citoquinas y factores de crecimiento producen importantes lesiones del tejido local y activan la proliferación de fibroblastos (PDGF, «Platelet-Derived Growth Factor», también producido por macrófagos), y la síntesis y deposición de colágeno (TGF-β). También se estimula la migración y proliferación de células endoteliales, que permiten la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).

### \* Citotoxicidad por células T

Las células CTL son inducidas *in vivo* durante el rechazo del injerto. Es más, de los tejidos rechazados se pueden obtener CTL con actividad citotóxica específica frente a las células del donante<sup>37,39</sup>. Se han obtenido evidencias adicionales en injertos renales con incompatibilidad sólo en clase I, de los que se han clonado CTL CD8+ implicados en el rechazo. La actividad CTL se demuestra en linfocitos obtenidos por biopsia del injerto y utilizan igualmente el TCRα/β. La estimación previa de precursores CTL no es predictiva de los episodios de rechazo o su intensidad; tampoco el

estudio de los las células T CD8+ circulantes o infiltrantes del injerto es pronóstico respecto a la recuperación del rechazo<sup>37</sup>.

Durante los primeros días en el rechazo del injerto renal los infiltrados perivasculares y periglomerulares están compuestos por un 50% de células T, de las cuales hasta el 80% son células T CD8+, en principio con ausencia de marcadores de activación, que aparecen posteriormente (IL-2R, CD69). Como se comentó anteriormente, la actividad citotóxica se desarrolla por reconocimiento directo de los aloantígenos y las características especiales del mismo facilitan la activación *in situ* de las células T.

Sin embargo, parece que la implicación de las células CTL en el rechazo explica sólo parcialmente los resultados, parece que predomina en las etapas iniciales y es progresivamente desplazada por la respuesta DTH (el infiltrado se enriquece en macrófagos y polimorfonucleares) y por la actividad citotóxica dependiente de la función cooperadora de las células Th<sup>37,58</sup>.

#### \* Estudio *in vitro* de la citotoxicidad específica por células T

Los ensayo de citotoxicidad celular (CML, «Cell-Mediated lympholysis») y análisis de precursores de CTL (cultivos de dilución límite) permiten una aproximación *in vitro* semicuantitativa. Las células CTL alorreactivas se generan en el ensayo de CML tras 5-7 días de estimulación con células alogénicas con diferente MHC. La citotoxicidad está en relación directa al número de precursores y a la función cooperadora de las células Th. La adición de IL-2 exógena en exceso permite realizar el ensayo de citotoxicidad obviando la función Th.

La generación de CTL frente a péptidos, derivados de antígenos menores, presentados en el contexto de las moléculas de MHC propio requiere una sensibilización previa *in vivo* frente a dichos antígenos.

La principal célula efectora en estos ensayos es la célula T CD8+ que reconocen de forma directa a los aloantígenos, aunque también se pueden detectar células T CD8+ que reconocen de forma indirecta, e incluso células T CD4+ citotóxicas específicas frente a los antígenos de clase II por reconocimiento directo.

#### \* Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos

La actividad ADCC («Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity») se puede detectar en receptores humanos durante el rechazo agudo o crónico, aunque también se ha detectado en receptores renales estables. No está clara la participación de este mecanismo *in vivo*. Parece que supone

un mecanismo secundario en el rechazo del injerto, aunque podría ser relevante en el desarrollo de arteritis y rechazo crónico del injerto.

Las alteraciones de las células endoteliales provocadas por los anticuerpos implicados en los rechazos hiperagudo y acelerado no se producen en el rechazo agudo. La cinética de la respuesta humoral inducida por los antígenos del injerto permite la acomodación del endotelio. Este proceso implica la expresión de genes antiapoptóticos ( $bcl-x_L$ ,  $bcl-2$  y  $A20$ )<sup>33</sup>. Además, se producen cambios del isotipo de inmunoglobulina que favorecen esta acomodación.

## RECHAZO CRÓNICO

Las formas lentas, progresivas y crónicas de disfunción del injerto renal, se agrupan en el llamado Rechazo Crónico. Aparece a partir de los 60 días post-trasplante y se caracteriza por una reconstrucción patológica del órgano con fibrosis y pérdida de la función<sup>59</sup>. Puede ocurrir tras episodios de rechazo agudo previos o no. No presenta buena respuesta al tratamiento excepto en aquellos casos en los que la lesión se ha producido por el mantenimiento de niveles inadecuados de inmunosupresión. En sentido estricto, el rechazo crónico supone una pérdida irreversible de la función renal que ocurre de forma tardía en el período post-trasplante, generalmente tras varios años.

### \* *Esclerosis vascular del trasplante*

El principal marcador, patognomónico, de esta patología es la esclerosis vascular del trasplante. Los cambios antomo-patológicos afectan a todas las estructuras renales. Aparece un progresivo crecimiento de la neointima, centripeto y oclusivo, que afecta a las estructuras arteriales del injerto. Durante este proceso, el tejido subendotelial prolifera forzando a la capa endotelial y reduciendo la luz de los vasos, con engrosamientos, al principio localizados, y duplicaciones de la lámina elástica interna. Hay engrosamientos de las membranas de los capilares glomerulares, con esclerosis e infiltrados de linfocitos y células plasmáticas en el mesangio, glomerulos ensanchados y atrofia de los túbulos.

Puede presentarse depósito de inmunoglobulinas con vasculitis severa y en los casos severos existe necrosis endotelial e hiperplasia de los miocitos intimaes (arteriosclerosis del injerto) que progresa hasta la obliteración de los vasos del injerto. Este proceso es progresivo y resistente al tratamiento. De forma terminal aparece una desestructuración general del mesénquima y fibrosis.

Se ha aceptado que la esclerosis vascular es la causa del rechazo crónico, y otras alternativas han sido menos estudiadas. Aunque todos los injertos rechazados muestran esclerosis severa, la lesión en formas leves no está ausente de todos los injertos renales con buen funcionamiento. Otros factores que podrían estar implicados en el desarrollo del rechazo crónico incluyen: 1) la isquemia inicial, 2) el injerto que conlleva reducción de masa (lesiones por hiperfiltración), 3) la denervación del injerto, 4) la hipertensión y la hiperlipidemia asociadas con los inmunosupresores, 4) la nefrotoxicidad de los mismos, o 5) las infecciones virales crónicas<sup>59,60</sup>.

Actualmente, los datos acumulados sugieren que aún siendo la esclerosis vascular el principal factor patogénico, otros factores mecanismos podrían ser determinantes en el rechazo crónico. Podría estar implicada la respuesta crónica DTH por linfocitos T y macrófagos<sup>59-61</sup>. Estos últimos podrían secretar citoquinas que pueden actuar como factores de crecimiento del mesénquima (fibrosis) y de los miocitos de la subíntima (hiperplasia muscular).

El proceso de esclerosis parece comenzar en el período post-trasplante temprano, incluso se ha sugerido que el compromiso para el desarrollo de la esclerosis puede estar ya determinado a los pocos días y ser resistente a los niveles de inmunosupresión que habitualmente se emplean<sup>62,63</sup>.

#### \* Patogenia de la esclerosis vascular del trasplante

Las hipótesis con las que se ha trabajado para explicar la esclerosis vascular del injerto derivan principalmente de los estudios sobre la aterosclerosis<sup>62</sup>. Así, se ha postulado que las injurias vasculares del injerto relacionadas con el trasplante (físicas o inmunológicas) inducen la activación de los endotelios. Los mecanismos reparadores implican a mediadores y células proinflamatorias. Entre ellos, cabe destacar al PDGF que induce la proliferación de los miocitos de la capa intermedia arterial. Estos miocitos pueden migrar a través de los endotelios activados y secretar proteínas de matriz extracelular.

El estrés vascular prolongado supone una persistencia de este proceso y, en teoría, activaría la formación de una nueva íntima. La extensión de las lesiones por isquemia/reperfusión, y la persistencia o repetición de agresiones inmunes frente a los aloantígenos vasculares, implicarían un importante factor de mantenimiento del estrés vascular. A diferencia del producido en la aterosclerosis, el proceso de esclerosis vascular del injerto es concéntrico y continuado a lo largo del árbol vascular.

#### \* Progenitores de la neointima

Los estudios con citometría de flujo indican que las células musculares de la neointima proceden del receptor del injerto, y no del donante<sup>62,65</sup>.

Este dato cuestiona la hipótesis sobre la patogenia de la esclerosis vascular. Implica que, a través de estímulos desconocidos, los miocitos del receptor se acumulan en la neointima del injerto. Recientemente se ha descrito la presencia en sangre periférica de progenitores de fibroblastos y de células endoteliales, los cuales penetran en los sitios de las áreas lesionadas<sup>60,61</sup>. Esto indica que los progenitores del receptor participan en la reparación vascular del injerto y, por causas desconocidas, sufren una disregulación que promueve la fibrosis y la proliferación neointima.

\* *Mecanismos inmunológicos del rechazo crónico*

La implicación del sistema inmune en el rechazo crónico presenta importantes problemas a nivel experimental. Ello se debe a la dificultad para desarrollar en el laboratorio modelos similares al desarrollo de rechazo en pacientes, tratados con drogas inmunosupresoras y que conlleva hasta 5-10 años para su desarrollo.

Puesto que las células APC del donante son reemplazadas progresivamente por las APC del receptor, se ha postulado que el principal tipo de reconocimiento en el rechazo crónico sería el indirecto.

\* *Células T y Esclerosis vascular del trasplante.*

La implicación de las células T en la patogenia de la esclerosis vascular se ha sugerido a partir de los estudios clínicos retrospectivos que demuestran la relación entre los episodios de rechazo agudo y el desarrollo del rechazo crónico. Esta intervención se puede explicar, en teoría, por varios mecanismos<sup>59,62-64-66</sup>.

- 1) Secreción de citoquinas proinflamatorias por las células T activadas. Entre ellas cabe destacar a los factores FGF a y b («*acidic and basic Fibroblast growth factor*»), el factor de crecimiento de unión a heparina y TGF.
- 2) Las células T activadas pueden inducir en las células endoteliales la secreción de factores de crecimiento (FGF, TGF, PDGF).
- 3) Secreción por las células T activadas de metaloproteasas que digieren la matriz extracelular con liberación factores histogénicos.

Los modelos de rechazo crónico en cerdos sugieren que las incompatibilidades en antígenos de clase I están más relacionadas con las lesiones vasculares que las de clase II. En este modelo las lesiones son predominantemente provocadas por células T CD8+. Pero el endotelio del cerdo

no presenta antígenos de clase II. En los modelos murinos ambos tipos de antígenos, así como ambas poblaciones T CD4+ y CD8+, parecen estar implicadas en el desarrollo de la vasculitis<sup>67,68</sup>.

#### \* Aloanticuerpos y rechazo crónico

También se han implicado a los aloanticuerpos en el desarrollo de la esclerosis vascular. Algunos estudios clínicos han demostrado la relación entre los aloanticuerpos, el desarrollo de esclerosis vascular y el rechazo crónico<sup>64</sup>, pero el mecanismo es desconocido.

Esta correlación junto a la asociación del rechazo crónico con los episodios de rechazo agudo y la refractariedad del mismo a la inmunosupresión, han sugerido que una producción crónica de aloanticuerpos podría estar implicada en esta forma de rechazo. En ratones inmunodeficientes (SCID), la transferencia de aloanticuerpos en ausencia de células T induce las lesiones vasculares típicas del rechazo crónico. Aunque la transferencia de células T en ausencia de células B, también causa las lesiones, parece que en este caso hay una menor tendencia al progreso hasta los estadios terminales con fibrosis<sup>59,64</sup>.

### RECHAZO HIPERAGUDO

El rechazo hiperagudo es infrecuente, se debe a la presencia de anticuerpos preformados frente a antígenos del injerto. Habitualmente por sensibilización previa a aloantígenos del sistema HLA o por incompatibilidad de grupo sanguíneo ABO. En la práctica clínica se evitan las disparidades de grupo sanguíneo entre donante y receptor, y se estudia la presencia en el suero del receptor de anticuerpos frente a antígenos del donante (prueba cruzada). La prueba cruzada positiva es una contraindicación para el trasplante.

Se inicia a las pocas horas del implante y se desarrolla en menos de 24 horas. La anatomía patológica revela coagulopatía intrarrenal con trombosis extensa que ocluye las arteriolas y los glomérulos, hemorragias, y un infiltrado neutrófilo menos intenso que en otras formas de rechazo.

Este tipo de rechazo afecta principalmente a los órganos vascularizados como el riñón y el corazón, siendo más resistentes al mismo el hígado y la piel.

#### \* *Mecanismo del rechazo hiperagudo*

Los antígenos diana de este tipo de rechazo son expresados por las células endoteliales del injerto: 1) por determinantes constituidos por



moléculas de carbohidratos, o, más frecuente, 2) por determinantes de las proteínas de los aloantígenos del sistema HLA. La unión antígeno-anticuerpo se produce sobre la membrana de la célula endotelial, promoviendo la fijación del complemento a través de la vía clásica de activación. La cascada del complemento conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC, «*Membrane Attack Complex*») formado por la asociación de los componentes C5 a C9 del complemento.

Las células endoteliales producen diferentes factores que actúan como reguladores en varios niveles de la cascada del complemento. Entre ellos destacan: el receptor de C1 (CR1), el factor desacelerador (DAF o CD55), CD46 y CD59. También producen anticoagulantes que modifican la cascada de la coagulación.

El estímulo inicial para la activación debe desbordar estos mecanismos para el desarrollo del rechazo hiperagudo. El título de anticuerpos y/o la afinidad de los mismos deben ser lo suficientemente elevados para que prosiga la reacción.

#### \* Activación de tipo I del endotelio

El complejo MAC, además de abrir poros en la membrana celular, causa activación de las células endoteliales. Este tipo de activación presenta características propias, ocurre en ausencia de síntesis proteica o de nueva transcripción de genes, y se ha denominado de tipo I. En él se producen cambios como la retracción celular con apertura de las uniones célula-celulares, y la pérdida de factores antitrombóticos. Estos cambios están directamente relacionados con los principales hallazgos anatómo-patológicos del rechazo hiperagudo: hemorragia extravascular y edema, y trombosis intravascular<sup>69</sup>.

#### \* *Anticuerpos preformados*

El rechazo hiperagudo se debe a una respuesta de tipo humoral. La inmediatez en la aparición de las lesiones se debe a que la lesión está producida por anticuerpos preformados: anticuerpos naturales o inducidos por sensibilizaciones previas.

Los anticuerpos naturales no requieren exposición previa a los tejidos alogénicos. Parece que este tipo de anticuerpos, dirigidos frente grupos sanguíneos principalmente, se generan en respuesta a determinantes de tipo carbohidrato presentes en los microorganismos. La respuesta «natural» es T independiente y los anticuerpos naturales son mayoritariamente de tipo IgM, aunque en algunos casos se puede producir el cambio de clase.

Los anticuerpos inducidos que causan rechazo hiperagudo son predominantemente anticuerpos dirigidos frente a aloantígenos del sistema HLA. Las principales causas de sensibilización a aloantígenos son: las transfusiones de sangre, las gestaciones, y los trasplantes previos; en algunos casos se han descrito sensibilizaciones cruzadas originadas por agentes infecciosos. Esta respuesta es T dependiente y los anticuerpos son de más elevada afinidad que los anticuerpos naturales.

\* *Rechazo acelerado*

Este tipo de reacción se inicia en las primeras 24 horas tras el trasplante y se desarrolla en 3 a 5 días. Esta causado por anticuerpos inducidos rápidamente tras el trasplante. No hay consenso sobre su denominación y se ha denominado rechazo temprano, acelerado o subagudo. Incluso se ha dudado de su existencia. En la práctica clínica es muy infrecuente, y ha sido mejor caracterizado en modelos de trasplante xenogénico de órganos vascularizados. Los pacientes retrasplantados son el principal grupo de riesgo.

Las lesiones típicas se caracterizan por la trombosis intravascular y la necrosis fibrinoide de las arteriolas del injerto. En ocasiones se observan signos antomo-patológicos correspondientes a rechazo agudo<sup>70</sup>.

\* *Anticuerpos de respuesta secundaria*

De forma similar al rechazo hiperagudo, en el rechazo acelerado los antígenos diana son expresados por las células endoteliales. Los anticuerpos frente a estos antígenos se producen de forma «acelerada»; esto es, de forma anticipada a la cinética de la respuesta primaria T dependiente. Incluso pueden aparecer en presencia de tratamiento inmunosupresor.

Todos estas características implican una respuesta secundaria en la mayoría de casos. Generalmente se trata de anticuerpos preformados a títulos bajos, que por sí mismos son incapaces de desencadenar una respuesta hiperaguda. En estos casos, la prueba cruzada puede ser negativa incluso con las más sofisticadas técnicas.

La respuesta secundaria originada por el estímulo alogénico induce una rápida producción de anticuerpos, de forma que se alcanzan en un corto período de tiempo niveles críticos para promover el rechazo acelerado.

\* *Mecanismo del rechazo acelerado*

En los modelos experimentales utilizados, la unión antígeno-anticuerpo puede promover el rechazo acelerado por varias vías: 1) fijación de

complemento, 2) citotoxicidad mediada por células de tipo ADCC, y 3) actividad NK. Los modelos xenogénicos son los que, particularmente, han implicado a la actividad NK y a otros componentes del sistema inmune innato en este tipo de rechazo<sup>68</sup>.

\* Activación de tipo II del endotelio

Los cambios endoteliales ocurren, por la cinética de esta respuesta, de forma más lenta que en el rechazo hiperagudo. El tiempo en que desarrollan los mismos permite la síntesis de proteínas y la activación de la transcripción de genes, por lo que se ha denominado activación de tipo II. Incluye la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 e IL-8), la expresión de moléculas de adhesión (selectina-E, ICAM-1) y la pérdida de factores antitrombóticos (trombomodulina). Estos cambios inducen la destrucción inflamatoria de los vasos en ausencia de linfocitos infiltrantes, y la trombosis intravascular<sup>70</sup>.

\* *Prueba cruzada pretrasplante*

La prueba cruzada es un ensayo donde se estudia la presencia de anticuerpos preformados en el receptor frente a las células del donante. Esta reactividad se puede evaluar por varias técnicas (microlinfocitotoxicidad directa o potenciada con anticuerpos anti-IgG fijadores de complemento, citofluorometría). Las células del donante que se utilizan en la prueba son mononucleares derivadas de bazo y/o ganglio linfático.

La prueba cruzada positiva significa que el suero del receptor presenta anticuerpos que reconocen antígenos del donante expresados por las células mononucleares. El ensayo de citotoxicidad determina anticuerpos fijadores de complemento, mientras que la citofluorometría puede detectar cualquier isotipo de inmunoglobulina. Él o los antígenos diana pueden ser de varios tipos: tanto antígenos HLA como otros antígenos, y también puede tratarse de autoanticuerpos (frente a estructuras monomórficas).

En algunos casos, la disección de la prueba cruzada evaluando el antígeno diana y el isotipo de inmunoglobulina implicado son importantes para valorar la prueba cruzada y en relación con la supervivencia del injerto:

- 1) Anticuerpos de tipo IgG o IgM dirigidos frente a aloantígenos de clase I contraindican el trasplante.

- 2) Anticuerpos de tipo IgG o IgM dirigidos frente a antígenos de clase II no contraindican el trasplante, aunque diversos estudios los asocian con un mayor riesgo de rechazo a largo plazo.
- 3) Generalmente no se detectan los anticuerpos frente a antígenos menores, tanto por su intensidad de expresión como por su localización (muchos de ellos son específicos de tejido y pueden no ser expresados por células mononucleares de sangre periférica).
- 4) Los autoanticuerpos, mayoritariamente de tipo IgM, no contraindican el trasplante.

## TOLERANCIA CENTRAL Y PERIFÉRICA

La tolerancia al trasplante supone la aceptación del injerto a largo plazo en ausencia de inmunosupresión mantenida. Varios modelos experimentales han logrado este objetivo; pero en clínica humana, los protocolos que facilitan una aceptación prolongada del injerto presentan importantes inconvenientes: 1) el aumento de los riesgos de infección y neoplasias, y 2) la falta de efectividad sobre el rechazo crónico.

La adquisición de tolerancia al trasplante implica, en sentido estricto, la falta de respuesta frente al tejido alogénico con respuesta inmune mantenida al resto de antígenos, en ausencia de tratamiento inmunosupresor.

Puesto que las respuestas implicadas en el rechazo giran todas ellas sobre la activación de la célula T, esta revisión se centrará sobre los mecanismos de tolerancia T.

La falta de respuesta del sistema inmune a la estimulación antigénica se denomina tolerancia inmunológica. La tolerancia frente a los antígenos propios, conocida como autotolerancia, es mantenida a través de mecanismos que evitan de forma activa la maduración o estimulación de los linfocitos potencialmente reactivos: 1) tolerancia central, activa sobre células T inmaduras, que tiene lugar en el timo; y 2) tolerancia periférica, que tiene lugar en células T maduras.

Los principales mecanismos de tolerancia son la eliminación (o deleción clonal) mediante un proceso de muerte celular (inducida por activación generalmente), y la anergia clonal, o inactivación funcional. La tolerancia central se debe principalmente a la eliminación, mientras en la periférica parece que tiene mayor peso relativo la anergia clonal. La falta de respuesta funcional también se puede deber a la inducción de células T reguladoras que suprimen las funciones efectoras y de activación de los linfocitos maduros autorreactivos.

El desarrollo de tolerancia es un proceso activo durante toda la vida del individuo y es posible inducir tolerancia en individuos adultos a determinados antígenos utilizando determinadas vías, dosis y pautas de administración de éstos.

### \* *Tolerancia central*

La tolerancia central tiene lugar en el timo, durante el desarrollo de los timocitos. Implica dos procesos de selección, negativa y positiva, relacionados con la maduración del TCR<sup>71,72</sup>.

La selección positiva es el proceso que hace posible la supervivencia de los timocitos, cuyos TCR se unen con baja afinidad a los complejos formados por moléculas propias del MHC y péptidos propios o extraños, mientras que mueren todos aquellos que no son capaces de interactuar con las moléculas del MHC propio. Se seleccionan así células T restringidas por el MHC propio, tanto para antígenos propios como extraños. Durante la selección negativa, los clones de linfocitos cuyos TCR se unen con alta afinidad a antígenos propios asociados a moléculas del MHC propio son eliminados (delección clonal) o inactivados (anergia clonal).

Se constituye así el repertorio T, que incluirá células T cuyos TCR presenten también alta afinidad por péptidos extraños asociados a moléculas propias de MHC. El proceso no es absoluto, de forma que también maduran clones de células T con capacidad autorreactiva, que serán reguladoras en la periferia, y en determinadas condiciones provocan patología autoinmune.

### \* *Tolerancia periférica*

La tolerancia periférica ha sido inducida con éxito sólo en modelos con incompatibilidad menor, disparidad en antígenos menores o modelos en de incompatibilidad en el MHC en roedores. En modelos animales de superior tamaño ha sido generalmente más difícil de conseguir.

Los mecanismos de tolerancia periférica incluyen: 1) Anergia clonal, debida al reconocimiento de antígenos propios sin coestimulación; 2) La muerte celular inducida por activación debida a la estimulación por antígenos propios; 3) Supresión de los linfocitos T autorreactivos mediante células T reguladoras o supresoras, generalmente mediante citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGF- $\beta$ <sup>71-76</sup>.

### \* *Ignorancia inmunológica*

La mayoría de los autoantígenos no son expresados en el timo y en sangre periférica aparecen clones T capaces de reconocerlos.

En algunos casos, las proteínas propias son expresadas en los tejidos periféricos a niveles demasiado bajos como para servir de diana del reconocimiento T. Algunos péptidos presentados por moléculas MHC tienen

un nivel suficiente para inducir reconocimiento T, pero demasiado bajo para inducir tolerancia. La naturaleza de esos péptidos varía según el genotipo MHC, que afecta profundamente a la unión del péptido. En todos los casos donde aparecen células T maduras autorreactivas, sin fenómenos de autoagresión y en ausencia de mecanismos reguladores se habla de ignorancia inmunológica<sup>71</sup>.

Este fenómeno se ha descrito también en un modelo de trasplante cardíaco alogénico en rata con tratamiento tolerizador (anticuerpos anti-CD40L y CTLA-4/Ig). El huésped presenta células T reactivas frente al injerto aunque no se produce rechazo. Sin embargo, estas células reaccionan *in vitro* frente a células del donante, y son capaces de rechazar otros injertos del mismo donante<sup>77</sup>. Esto implica que la ignorancia no supone estrictamente una forma de tolerancia.

## MECANISMOS DE LA TOLERANCIA

### DELECCIÓN CLONAL

La delección clonal se produce por apoptosis o muerte celular programada. Este mecanismo tiene una importancia destacada en el proceso de maduración tímica y en el control de la respuesta inmune periférica.

#### \* *Delección clonal en el timo*

Respecto a la tolerancia central, los procesos de selección promueven la muerte por apoptosis en situaciones contrapuestas dependiendo del estado madurativo de los timocitos. En el córtex, los timocitos que no seleccionados positivamente por su interacción con las células epiteliales, sufren apoptosis y son eliminados por los macrófagos corticales. En la médula, los timocitos positivamente seleccionados, que poseen un TCR restringido por MHC de clase I o II y que reconocen con alta afinidad péptidos específicos presentados por las células dendríticas, son seleccionados negativamente, eliminándose por apoptosis, los cuerpos apoptóticos serán posteriormente fagocitados por los macrófagos medulares<sup>71,72</sup>.

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran la capacidad de las células dendríticas para inducir la selección negativa de células T específicas para moléculas singénicas y alogénicas de MHC, antígenos menores de histocompatibilidad, y otros antígenos (proteínas circulantes, antígenos virales, superantígenos). El potencial que tienen las células dendríticas de internalizar y procesar el antígeno, así como su capacidad coesti-

muladora, las posibilita para la selección negativa de clones de células T específicos para antígenos, frente a los cuales, la tolerancia no puede ser inducida por las células epiteliales corticales<sup>3,73</sup>.

Se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares que controlan el proceso de selección negativa. Al igual que en la selección positiva, las moléculas CD4 y CD8 probablemente desempeñen un papel importante en la selección negativa debido a que favorecen interacciones eficaces entre los timocitos en desarrollo y las células dendríticas tímicas tolerizantes, que pertenecen al mismo linaje que los timocitos. Las moléculas expresadas por las células dendríticas tímicas, que juegan un papel esencial en la activación periférica de la célula T, en la coestimulación y en la apoptosis, no están bien definidas en el contexto de la inducción de tolerancia. Las interacciones que podrían estar involucradas en la selección negativa son las siguientes<sup>72</sup>: 1) LFA-1/ICAM-1; 2) B7/CD28, interacción que parece ser necesaria solo cuando el antígeno está presente en pequeñas cantidades; 3) CD40/CD40L, esta interacción participa en la deleción clonal T regulando positivamente a las moléculas coestimuladoras de las APC, que son necesarias para contactar con los timocitos durante la selección negativa y cuando el antígeno es producido en condiciones fisiológicas; 4) CD30L/CD30; y probablemente, 5) la interacción Fas/FasL, los resultados obtenidos han sido contradictorios, mientras que el bloqueo de FasL no altera *in vitro* la deleción de timocitos, los anticuerpos anti-Fas inducen apoptosis de timocitos *in vitro* o *in vivo*.

#### \* Deleción clonal periférica

La apoptosis es un mecanismo importante tanto para evitar respuestas autoinmunes eliminando linfocitos maduros autorreactivos como para la regulación negativa y la finalización de las respuestas inmunes frente a antígenos extraños. Por apoptosis también se eliminan los linfocitos activados cuando termina la respuesta inmune (escapan de ella los clones que se diferencian a células de memoria). La apoptosis puede inducirse tanto por vías dependientes del TCR y de sus moléculas coestimuladoras, como a través de la vía dependiente del CD95 (Fas o APO1)<sup>78</sup>.

Las células T vírgenes no expresan Fas y resisten la apoptosis. Su estimulación induce la expresión de Fas en membrana a las 24 horas y paralelamente el aumento de los niveles de Bcl-2 (inhibidor de la apoptosis por bloqueo de la endonucleasa). Si no existe reestimulación antigénica, los linfocitos activados mantienen la expresión de Fas, pero una semana después de la estimulación antigénica sus niveles de Bcl-2 disminuyen, por lo que estos linfocitos activados son susceptibles de entrar en apoptosis

inducida por células que, como las células NK y los CTL, expresan el ligando de Fas (FasL). La reestimulación antigénica de estos linfocitos produce en aproximadamente la mitad de ellos un aumento de los niveles de Bcl-2 y una nueva fase de expansión clonal, mientras que en la mitad restante induce apoptosis<sup>28</sup>.

Existe, al menos para células T citotóxicas autorreactivas, un mecanismo de delección clonal periférica en tejidos inmunoprivilegiados, como el globo ocular u otros, cuyos antígenos son de aparición tardía en el desarrollo (ovarios y testículos). Las células de estos tejidos expresan FasL, que induce la apoptosis de los clones autorreactivos que expresan Fas al activarse.

Las células T activadas también pueden expresar el receptor de TNF y ser, por tanto, sensibles a la apoptosis inducida por TNF. La reestimulación antigénica es necesaria para la diferenciación de linfocitos memoria, capaces de sobrevivir en ausencia de reestimulación antigénica y que pueden dar lugar a una progenie de linfocitos efectores o contribuir a la educación de linfocitos vírgenes si el antígeno reaparece.

## ANERGIA CLONAL

Como se ha comentado anteriormente, en ausencia de coestimulación, se induce tolerancia por anergia o delección de células T maduras. Como las células de los tejidos propios no se expresan B7 u otras moléculas de coestimulación, la tolerancia a los tejidos propios es la norma. Un linfocito se considera anérgico si no puede responder al estímulo antigénico específico proporcionado por una célula APC, y este estado es reversible tanto *in vitro* como *in vivo*. En las células T, el estado anérgico se caracteriza por un déficit en la producción de IL-2, y la anergia se puede evitar con el suplemento exógeno de esta citoquina.

Otra causa de anergia en células T es la estimulación con péptidos antigénicos para los que presentan muy baja afinidad<sup>20-22,33,79</sup>.

### \* *CD28 y CTLA-4 en la regulación de la repuesta inmune*

El reconocimiento antigénico en ausencia de coestimulación induce anergia o apoptosis. La coestimulación por B7-1 ó B7-2 del correceptor CD28 de las células T es un factor crítico en la decisión que conduce a la activación del célula T (en presencia de B7) o a la anergia o apoptosis (en su ausencia).

Evidencias recientes sugieren que los procesos de coestimulación son aún más complejos. Incluyen la competición de señales coestimuladoras



positivas y negativas, cuyo balance determina el tipo de respuesta de la célula T que reconoce el antígeno.

La molécula CTLA4 se une a B7-1 y B7-2 con afinidad mucho mayor que la correspondiente a la unión con CD28; por tanto, CTLA4 compite con CD28 por unirse a sus ligandos comunes, antagonizando las señales de coestimulación transducidas por CD28, actúa así como un contrarreceptor de éste. La competencia entre CD28 y CTLA4 es fundamental en la decisión del tipo de respuesta de la célula T. El balance entre CTLA4 y CD28 unidos a B7 determina si el célula responderá (cuando predomina la unión de CD28) o se anergizará (cuando predomina la unión de CTLA4). Se ha sugerido que la unión de CTLA4 a CD80 no sólo puede inducir anergia en linfocitos vírgenes, sino que también puede inducir apoptosis en linfocitos activados<sup>33</sup>.

## MODULACIÓN POR CÉLULAS REGULADORAS

Las células T supresoras se definieron como una población independiente de los cooperadores Th y de los citotóxicos CTL. El concepto de supresión por células T ha sido tabú durante al menos la década de los 80. Aunque se han obtenido clones de células supresoras, estos no han presentado marcadores fenotípicos específicos y su mecanismo de acción no ha quedado bien determinado. Actualmente, un gran número de observaciones experimentales parecen indicar que la actividad supresora es ejercida por diferentes poblaciones celulares y entran en juego diferentes mecanismos de inhibición. Estas poblaciones se agrupan a nivel conceptual como células reguladoras. De hecho, en muchos casos la inhibición de determinadas respuestas se produce a través de citoquinas y se acompaña de la potenciación de otras, estableciéndose un balance entre los diferentes tipos de respuesta.

### \* *Células reguladoras*

Se postula que las células reguladoras, en condiciones fisiológicas, estarían implicadas en el mantenimiento de la tolerancia a las sucesivas cohortes de células T vírgenes procedentes del timo. Hay evidencias de que las primeras oleadas de células T del timo, en períodos tempranos del desarrollo, son seleccionadas por el epitelio tímico para el reconocimiento de lo propio sin sufrir delección. Se ha sugerido que estas células transmiten el estado tolerante en la periferia a las nuevas oleadas de células T procedentes del timo: al principio frente a los mismos antígenos a los que sensibilizaron en el epitelio tímico, y posteriormente podrían tolerizar la

respuesta a otros antígenos. Un dato que apoyaría esta hipótesis es la baja expresión en timo de antígenos frente a los que se desarrollan respuestas autoinmunes. En algunos modelos de diabetes se ha descrito la ausencia de determinadas poblaciones tímicas que podrían estar implicadas en el mantenimiento de la tolerancia.

#### \* Células T NK1+ y Células T doble-negativas

La actividad tolerizante descrito anteriormente se ha imputado a poblaciones que básicamente se caracterizan por la presencia de marcadores de célula NK y la producción de grandes cantidades de IL-4. Las células NKT («*Natural Killer T cells*») y las células T DN (doble-negativas CD4- CD8-) expresan marcadores de NK y de células de memoria, tienen un uso restringido de regiones Va y Vb, y su reconocimiento está restringido por moléculas no clásicas (clase Ib) del MHC, como CD1<sup>71,80,84</sup>.

Las células T capaces de prevenir diabetes insulín-dependiente en ratas adultas tras timectomía e irradiación-g presentan el fenotipo TCRab+ CD4+ CD45RC<sup>low</sup> RT6+<sup>81</sup>. Además de éstas, los timocitos TCRab+ CD4-/ CD8- NK1+ CD62L- también protegen a los ratones NOD de desarrollar IDDM<sup>83</sup>.

Su distribución muestra preferencias por determinados tejidos: constituyen el 20-30% de células T del hígado y de la médula ósea, 10-20% de los timocitos maduros, y 0,5-1% de esplenocitos; están prácticamente ausente de sangre periférica (<0,5%).

Las células T NK1 pueden secretar grandes cantidades de IL-4, IL-10 e IL-5; pero también secretan IFN $\gamma$  y TNF-b<sup>82,85</sup>. No está demostrado si este perfil de citoquinas Th1+Th2 es producto de una o de dos subpoblaciones.

#### \* Regulación cruzada entre células Th1 y Th2

Las células Th2, a través de la secreción de IL-10, reducen la expresión de B7 e IL-12 por parte de las APC, dos estímulos importantes para el desarrollo de células Th1.

Esta contrarregulación se desarrolla entre respuestas ya activadas. Un problema clave está el desarrollo inicial de las mismas. La respuesta Th1 como se mencionó anteriormente refleja un estado proinflamatorio. Por otra parte, el desarrollo de la respuesta Th2 requiere el estímulo de IL-4. Esta citoquina juega así un papel central: 1) estimula el desarrollo de la respuesta Th2, 2) inhibe el desarrollo y la respuesta Th1, y 3) constituye parte de la función efectora Th2. En ausencia de un microambiente de tipo Th2, se ha buscado candidatos para la producción inicial de IL-4 en una respuesta inmune<sup>24,80,86</sup>: 1) Células T CD4+ de memoria (y

posiblemente vírgenes); 2) Células T CD4+ NK1.1+; y 3) Células T doble negativas.

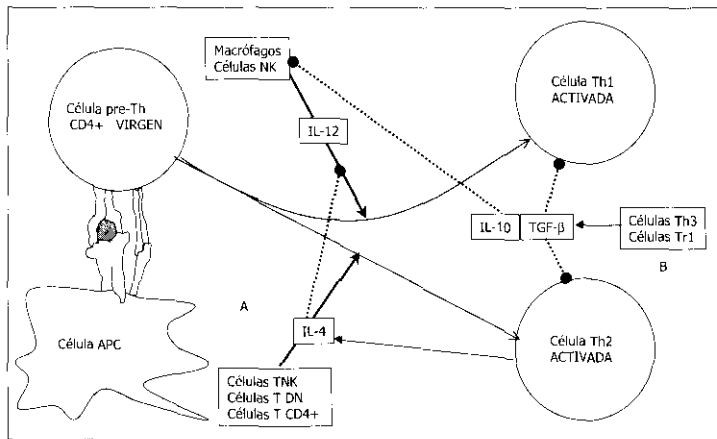
El microambiente rico en IL-4 o tal vez un ambiente de respuesta Th2 generalizado, pueden promover el cambio de la respuesta Th1 a Th2 por reversión del perfil de citoquinas, esto conlleva un reclutamiento de precursores no comprometidos presentes en la población Th1 temprana.

\* Tipo de respuesta T cooperadora y evolución del trasplante

Hay múltiples evidencias experimentales de que la respuesta de tipo Th1 se manifiesta generalmente durante el rechazo del injerto. Tanto las citoquinas Th1 (IL-2 e IFN-g), como los marcadores de células citotóxicas (granzima B), son claramente detectables durante el episodio de rechazo<sup>36</sup>.

Por el contrario, en los pacientes que reciben terapias tolerantes se detecta la ausencia de las citoquinas de la respuesta Th1 junto a la presencia de las del tipo Th2 (IL-4 e IL-10). Ésto ha sugerido que la desviación desde el tipo de respuesta Th1 a Th2 podría ser crítica para el desarrollo de tolerancia al injerto (Figura 6)<sup>24</sup>.

Sin embargo, en varios modelos preclínicos, la respuesta de tipo Th2 se ha detectado acompañando al rechazo demorado del injerto, y también



Las células reguladoras parecen desarrollar su acción a través de citoquinas mediadoras. A) La secreción inicial de IL-4 que promueve la diferenciación de células Th2 es secretada por poblaciones T reguladoras (TNK, T doble negativas y T CD4+ de memoria), y también por células Th2. La acción de IL-4 bloquea las respuestas Th1 e induce las Th2. B) Las células reguladoras Th3 y Tr1 secretan IL-10 y TGF-β. C) IL-10 bloquea la inducción de respuestas Th1 por bloqueo de la secreción de IL-12 por las células accesorias, además está relacionada con la activación alternativa de las APC. D) TGFβ bloquea las dos respuestas Th1 y Th2, y también bloquea la expresión de moléculas de clase II en células no profesionales.

Figura 6. Citoquinas y células reguladoras en el control de la respuesta TH.

ha sido implicada en el rechazo de tipo crónico. A este respecto, resulta interesante considerar que los tratamientos de tolerización con potentes supresores de la respuesta (como la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD40L y proteína de fusión CTLA-4/Ig) utilizados con éxito en el trasplante cardíaco alogénico, se acompañan de la ausencia en el periodo post-trasplante temprano tanto de respuesta Th1 como Th2<sup>78</sup>.

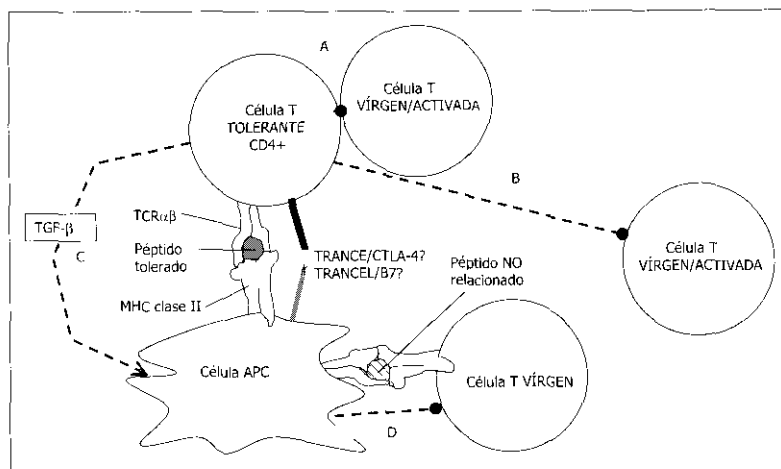
El proceso de tolerancia probablemente incluya a ambos tipos de respuesta, siendo la respuesta Th1 más implicada en la actividad T efectora, es más susceptible de determinarse su nivel de tolerización. Pero también se han ensayado protocolos de tolerización de respuestas Th2 con éxito. Algunos trabajos demuestran que otro tipo de célula podría estar regulando negativamente las dos respuestas Th1 y Th2.

#### \* Células T reguladoras: Células Th3 y Tr1

La inhibición de las dos respuestas se ha obtenido con TGF-b. Se ha descrito una subpoblación Th3 que se caracteriza principalmente por producir TGF-b en respuesta a su antígeno específico. El TGF-b es una citoquina que tiene una importante función fisiológica dentro del sistema inmune intestinal al mediar el cambio de clase a IgA de las células plasmáticas de la mucosa, pero además de ello está demostrado su capacidad inmunoreguladora inhibiendo tanto las respuestas Th1 como las Th2<sup>85,86</sup>. Estos resultados son contradictorios con la implicación de TGF-b en el rechazo crónico, reportada por algunos grupos.

Aunque no son conocidos los mecanismos exactos de su acción inmunomoduladora se ha documentado que por una parte interfiere con los fenómenos de presentación antigénica actuando sobre las células APC. Por otra parte, también parece modificar el patrón de receptores de quimioquinas de las células efectoras, bloqueando la expresión de los receptores de quimioquinas inflamatorias (CCR2, CCR3 y CCR5) y promoviendo la expresión de otros (CCR4 y el CCR7). Con ello previene el desplazamiento hacia las zonas efectoras, a la vez que aumenta el acúmulo de las células de respuesta en los órganos linfoides<sup>85</sup>.

Recientemente se ha descrito en un modelo murino un tipo celular CD4+ que produce IL-10 además de TGF-b, pero no IL-4 (y sólo muy bajas cantidades de IFN-g), con capacidad para impedir la instauración de un modelo experimental de colitis autoinmune. Dichas células han sido denominadas Tr1 («*T regulatory 1*»). En el momento actual se duda si estas células suponen una variedad de las Th3 o un subtipo aparte, con lo que el universo de los distintos subtipos de células cooperadoras continuaría en expansión<sup>80,87,88</sup>. Son también células T CD4+, prácticamente indistinguibles de las Th3 que regulan el cambio de isotipo a IgA en la mucosa intestinal (Figura 7).



La célula T CD4+ reguladora desarrolla su efecto inhibitorio a través de varios mecanismos: A) A través de la expresión de moléculas de membrana y/o secreción de citoquinas (IL-10) inhibe a células T respondedoras vírgenes o activadas (base del fenómeno de tolerancia infecciosa) facilitando su desarrollo como células tolerantes. B) Suprime de forma específica a otras células T por competición por el espacio o los ligandos presentados por las células APC. C) a través de la secreción de TGF-β y la expresión de moléculas de membrana (TRANCE y CTLA-4) induce en las APC una actividad proinhibidora, de forma que otras respuestas a antígenos no relacionados son suprimidas (supresión ligada, D).

Figura 7. Mecanismos de supresión por células reguladoras.

Presentan muy poca capacidad proliferativa, probablemente a causa de su propia secreción de IL-10. Esta proliferación se restaura con anticuerpos anti-IL-10 o suplementando con IL-2 exógena<sup>87</sup>. La acción sobre las células APC podría ser determinante en la acción tolerizante, como se desprende de algunos estudios sobre la llamada «activación alternativa de células APC», sobre todo estudiada en macrófagos.

#### \* Activación alternativa de células APC

La activación alternativa de macrófagos puede ser inducida por IL-4 y por glucocorticoides, así como por otras citoquinas como IL-10, IL-13 y TGF-b con efectos similares. Los macrófagos así activados expresan características moleculares y fenotípicas alternativas<sup>89</sup>.

Presentan una capacidad aumentada la fagocitosis, pero los macrófagos activados alternativamente no presentan un aumento de su función microbicida. Tienen una expresión aumentada de moléculas de HLA de clase II, indicando su capacidad para la presentación efectiva de antígeno. Expresan CD23 (FcεRII) pero no expresan otras especies de receptores de Fcg. Esto sugiere que los macrófagos activados alternativamente podrían inducir la diferenciación de células Th2.

La regulación negativa de la inflamación podría estar mediada por la expresión y síntesis de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-10 y el antagonista de IL-1R. No expresan IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 ó MIP-1 $\alpha$ . Por otro lado, los macrófagos activados alternativamente están asociados con altos niveles de vascularización *in vivo*, y parecen ser angiogénicos *in vitro*. Más aún, la fagocitosis de células apoptóticas promueve la activación alternativa de los macrófagos y la secreción de citoquinas anti-inflamatorias de forma autocrina/paracrina.

Además de los mediadores de supresión, como PGE<sub>2</sub> y lipocortina I, los macrófagos activados alternativamente secretan IL-10 y TGF- $\beta$ .

Las células dendríticas también se pueden activar de forma alternativa y desarrollar actividades supresoras<sup>89</sup>. La activación por IL-10 inhibe la presentación de antígenos tumorales por células de Langerhans, las cuales anergizan células Th1 de forma específica de antígeno. Las funciones accesorias respecto a las células Th2 parecen estar preservadas. Las células dendríticas inmaduras tratadas con IL-10 inducen tolerancia sobre células T vírgenes. Un modelo clásico de activación alternativa es el tratamiento con irradiación UVB de las células de Langerhans de la piel.

Un nuevo miembro de la familia de TNF se ha descrito en las células Tr1, TRANCE («*TNF-Related Activation-induce cytokine*»), cuyo ligando es expresado por las células dendríticas y podría intervenir en la modulación de su función<sup>90</sup>.

#### \* Relación entre anergia y regulación

La presentación antigénica en presencia de IL-10 genera anergia. Y parece que las células T CD4+ anergizadas retienen cierta capacidad de producción de IL-10. Todo esto ha llevado a sugerir que la inducción de tolerancia por células Th3 o Tr1 podría deberse a la inducción de estados anérgicos sobre poblaciones Th1 y/o Th2<sup>91-92</sup>.

Algunos ensayos muestran que las células anérgicas pueden inhibir respuestas de células vírgenes por ocupación de los sitios de presentación antigénica, fenómeno descrito como «servicio civil»<sup>93</sup>.

#### \* Células supresoras naturales

Se han descrito células supresoras inespecíficas en diversos modelos. En relación con el trasplante alogénico cabe destacar a las células supresoras naturales (NS, «*Natural Suppressors*») obtenidas en ratones. Se generan *in vitro* tras cultivo mixto primario e *in vivo* tras irradiación linfóide. Su actividad supresora se ejerce sobre células vírgenes antes de su

activación. Además, en el ensayo *in vitro* parecen promover el desarrollo de células supresoras específicas<sup>71,94-95</sup>.

#### \* *Actividad veto*

La actividad veto viene definida por la capacidad para inactivar a los precursores de CTL con receptores específicos frente a los aloantígenos que presentan las células veto. Induce la supresión de la actividad citotóxica dirigida frente a los antígenos de la célula veto<sup>71,93,96</sup>.

La interacción que parece estimular la actividad veto implica a las moléculas de clase I del MHC de la célula inhibida. La molécula CD8 expresada por una gran parte de células con actividad veto podría explicar la relación con las moléculas de clase I; sin embargo, otras moléculas podrían estar implicadas en el fenómeno y se ha sugerido que el TGF- $\beta$  también estaría implicado<sup>71,73</sup>.

Se han definido varios tipos celulares con actividad veto: células CTL, células NK activadas y otras células de origen hematopoyético mal definidas<sup>71</sup>.

## INDUCCIÓN DE TOLERANCIA

### QUIMERISMO Y TOLERANCIA

La inducción de tolerancia central ha sufrido importantes avances en la última década. La tolerancia central puede ser manipulada para generar tolerancia al injerto alogénico mediante la creación de quimeras de médula ósea (del donante) o por inyección intratímica de células alogénicas o péptidos.

El quimerismo hematopoyético fue reconocido como inductor de tolerancia desde hace más de 50 años por Owen, Medawar y otros. La capacidad de las células hematopoyéticas para inducir tolerancia se produce principalmente por promover la *delección clonal* de los timocitos cuyos receptores reconocen los antígenos expresados por el inóculo alogénico<sup>97,98</sup>. Entre los tipos celulares capaces de inducir tolerancia intratímica se encuentran las células dendríticas, las células B y los timocitos (y también células del estroma tímico de origen no hematopoyético).

Pero otros mecanismos están también implicados en esta inducción de tolerancia. La inducción de quimerismo hematopoyético puede inducir la tolerancia de células T maduras preexistentes (que maduraron en el timo de forma previa a la inducción). Mientras que los timocitos inmaduros con receptores de alta afinidad son muy susceptibles a sufrir *delección clonal*, también las células T maduras son susceptibles de *delección periférica*, generalmente tras activación, por exposición al antígeno específico *in*

*vivo*<sup>71,99</sup>. Mecanismos no deleccionales también han sido constatados en la inducción de tolerancia por quimerismo: anergia clonal inducida por células B alogénicas o eliminación de células pre-CTL por actividad veto.

Esta inducción de tolerancia está favorecida por la ausencia, congénita (inmunodeficiencias) o inducida, de células T maduras del huésped. Por ello, la aproximación más simple y generalizada en modelos animales para enfrentar el problema de la reactividad huésped contra injerto ha sido el pretratamiento de los receptores con irradiación corporal total previa al trasplante de médula ósea. Esto supone una reconstitución completa que genera importantes problemas de enfermedad injerto contra huésped, sobre todo en el caso de incompatibilidades mayores.

La severidad de estos protocolos y la asunción de que un quimerismo linfohematopoyético mixto sería deseable para una reconstitución más fisiológica de la respuesta inmune, han llevado al estudio de modelos de quimerismo sin régimen mieloablativo previo. Las quimeras mixtas han mostrado niveles normales de inmunocompetencia, probablemente por la presencia de células APC del huésped que permiten una presentación antigénica óptima a las células T que han madurado en el timo del huésped. El uso de anticuerpos monoclonales para eliminar poblaciones definidas del huésped (CD4 o CD8) seguido de irradiación total a baja dosis o de irradiación focal en timo, han permitido definir las barreras inmunológicas y físicas al injerto hematopoyético<sup>88,95,97</sup>.

#### \* *Barreras inmunológicas al injerto hematopoyético*

En el modelo referido, se ha comprobado que las células T CD4+ y T CD8+ son capaces de rechazar la médula ósea incompatible en clase I y clase II, respectivamente. Además, las células T CD8+ también presentan una importante actividad en el rechazo de injertos incompatibles en clase II, mientras que las células T CD4+ reaccionan frente a las incompatibilidades en clase I de forma menos severa, aunque detectable. Esta reactividad cruzada podría reflejar el reconocimientos de péptidos del MHC en el contexto de moléculas del MHC compartidas por donante y huésped.

La aplicación de este modelo en primates (con el uso de anticuerpos, irradiación corporal subtotal más tímica y trasplante de médula ósea alogénica) ha sido efectiva para la inducción de tolerancia en modelo de injerto renal<sup>100</sup>.

#### \* *Barreras fisiológicas al injerto hematopoyético*

Los mecanismos que facilitan el prendimiento del injerto hematopoyético tras los regímenes mieloablativos no están aclarados. Se postula



que este acondicionamiento permite la creación de nichos físicos por destrucción de las células del huésped, tanto en médula ósea como en el timo, y el estímulo para la liberación de citoquinas que promueven la hematopoyesis y la linfopoyesis.

Por otra parte, el aumento en el número de células del injerto permite reducir la dosis de irradiación para conseguir el prendimiento del injerto. Puesto que los timocitos y las células dendríticas linfoides tienen un precursor común, se ha sugerido que altos niveles de repoblación con timocitos del donante reflejaría altos niveles de quimerismo respecto a las células dendríticas linfoides.

## MICROQUIMERISMO Y TOLERANCIA

El microquimerismo se define como el quimerismo que se encuentra por debajo del nivel de detección de la citometría. En los receptores humanos de aloinjertos se ha comprobado la presencia de microquimerismo durante muchos años tras el trasplante<sup>97</sup>. Por ello, se ha hipotetizado que el microquimerismo facilitaría un estado de tolerancia específica frente al donante. Diferentes mecanismos podrían, teóricamente, estar implicados en la inducción de tolerancia por microquimerismo:

- 1) Anergia de células T inducida por las APC no profesionales del donante (células B y T)<sup>100</sup>.
- 2) Actividad veto de células T, NK y otros tipos. Esta actividad se ha detectado en receptores renales de larga supervivencia<sup>76</sup>.
- 3) Inducción de tolerancia central por migración de los leucocitos del donante al timo del receptor. En el caso del trasplante hepático se ha demostrado la presencia de células progenitoras hematopoyéticas autónomas en su regeneración, que podrían garantizar una presencia continuada de células inductoras de tolerancia en el timo del receptor<sup>101</sup>.

Sin embargo, los intentos para correlacionar la respuesta específica frente al donante *in vitro* (MLR «Mixed Lymphocyte Reaction» y CML) con el quimerismo y la tolerancia *in vivo* no han sido efectivos. Los ensayos *in vitro* tampoco han permitido elaborar pronósticos sobre la evolución del injerto hacia el rechazo o hacia su aceptación. Es posible que en algunos pacientes se alcance una tolerancia parcial o completa, específica frente al donante. Especialmente si se consideran aquellos receptores que se mantienen con muy bajos niveles de inmunosupresión, así como los que presentan dificultades en seguir la pauta de tratamiento y lo discontinúan.

Se ha intentado aumentar el nivel de quimerismo, tanto en primates como en receptores humanos de órgano sólido, mediante la administración en el momento del trasplante de médula ósea del donante, sin terapia mielosupresora. Los estudios clínicos no han mostrado una reducción significativa en el número de episodios de rechazo, incluso con detección de niveles de quimerismo aumentados<sup>100,102</sup>. Sólo una fracción de receptores han mostrado una larga aceptación del injerto, y los mejores resultados se han obtenido cuando el donante y el receptor compartían algún alelo del locus HLA-DR<sup>103</sup>.

Actualmente, los datos recogidos apuntan a que el microquimerismo en humanos no es por sí mismo un marcador del estado tolerante, ni es requerido para el mantenimiento del injerto bajo cualquier circunstancia.

## RELACIÓN ENTRE TOLERANCIA CENTRAL Y PERIFÉRICA

La delimitación entre tolerancia central y periférica no es siempre clara. En un modelo en cerdo de trasplante de riñón con terapia inmunosupresora de corta duración se ha podido demostrar que el timo era un elemento central en la inducción de tolerancia.

Aunque los leucocitos del injerto pueden llegar al timo y promover la tolerización de los timocitos en desarrollo, no queda claro como se consigue tolerizar a las células T maduras periféricas. Se han postulado varias hipótesis<sup>104</sup>:

- 1) Las células T del huésped que reaccionan frente al injerto pueden recircular y migrar al timo. La interacción en el timo entre ambas poblaciones, leucocitos del donante y células T alorreactivas del huésped, puede provocar la inactivación de estas últimas. Esto supondría un mecanismo de seguridad por el que las células T se inactivan al encontrar en el timo el mismo antígeno que indujo su activación en periferia.
- 2) Los timocitos que se desarrollan en el ambiente tímico, que incluye leucocitos del donante, pueden generar células específicas frente a los antígenos del donante que regulen negativamente a las células T alorreactivas periféricas, bien inhibiéndolas bien induciendo su apoptosis.

Por otro lado, los resultados que se han obtenido con la inyección intratímica de los antígenos del donante también han aportado datos sobre la relación entre la tolerancia central y periférica. La tolerancia frente a aloantígenos solubles puede ser inducida por la inyección intratímica de éstos, sin deplección de células T periféricas. De esta forma se aceptan

los injertos del mismo donante que los aloantígenos solubles. Sin embargo, la timectomía tras la aceptación del injerto provoca el rechazo de éste. Esto implica un control de la respuesta inmune periférica por parte del timo, bien por generación de células T reguladoras, bien por inactivación de células T activadas periféricamente<sup>105</sup>.

El papel del injerto en la inducción de tolerancia en animales que reciben inyecciones intratímicas no debe ser menospreciado. Para conseguir transferir el estado tolerante se requiere la administración intratímica junto al injerto en el huésped inicial. Se desconoce el mecanismo por el que el injerto facilita esta toleración de un repertorio preexistente.

## BLOQUEO DE MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE

Aprovechando los conocimientos sobre la activación celular T y la inducción de anergia, se han intentado aproximaciones terapéuticas en modelos alogénicos mediante el bloqueo de las señales coestimuladoras<sup>106</sup>.

Se han administrado células del donante sin capacidad APC: células APC con actividad coestimuladora inhibida por irradiación ultravioleta o bien células no profesionales. Éste es uno de los mecanismos por los que se supone que actuarían los regímenes de transfusiones específicas del donante.

### \* *Bloqueo de CD3*

Las terapias inmunosupresoras que se dirigen frente al complejo TCR-CD3 son útiles en el mantenimiento del injerto. Los anticuerpos monoclonales frente a CD3 previenen el rechazo del injerto cuando se han utilizado como terapia de inducción, aunque su vida media es corta.

Se ha desarrollado una nueva inmunotoxina, holo-FN18-CRM9-inmunotoxina (IT), combinando anticuerpos monoclonales anti-CD3 (ratón anti-Rhesus) con toxina diftérica mutada en su sitio de unión a la célula. IT induce la aceptación de aloinjertos renales en Rhesus, tanto frente a disparidades en clase I como en clase II. Disminuye el número de células CD3 tanto en sangre periférica como en nódulos linfáticos y esta disminución se mantiene hasta los 3-6 meses; sin embargo, los animales tratados pueden desarrollar respuestas T dependientes, y desarrollan anticuerpos frente a la toxina en el plazo de 1-3 meses. Con el tratamiento también disminuye la frecuencia de precursores de CTL y el cultivo mixto se mantiene. Cuando se administra a partir del día 7 post-trasplante los animales desarrollan rechazo agudo, pero con la

administración a día 0 sólo se han documentado rechazos crónicos o nefritis intersticial<sup>107</sup>.

La combinación de IT y trasfusión de médula ósea del donante, en día 0, permite supervivencias del injerto de 120 días. Ni los ensayos de precursores CTL o MLR, ni el quimerismo observado, se correlacionan con la supervivencia del injerto<sup>108</sup>.

IT activa *in vitro* a las células T, por lo que se postula que su acción *in vivo* puede deberse a la inducción de anergia en células T por afectación del patrón de sobrecruzamiento del TCR para su activación.

\* *Bloqueo de moléculas de coestimulación*

También se han estudiado las terapias con anticuerpos bloqueantes de la coestimulación. Se ha conseguido la inducción de anergia en trasplantes cardiacos en ratón con la administración de anticuerpos bloqueantes dirigidos frente a diferentes moléculas de adhesión, como LFA-1 e ICAM-1. Se han obtenido animales tolerantes, sobre todo al combinar ambos anticuerpos<sup>54</sup>.

\* *Bloqueo de los correceptores CD4 y CD8*

El uso reciente de terapias (no exhaustivas) con anticuerpos monoclonales anti-CD4 en la inducción de tolerancia al injerto, han permitido definir importantes fenómenos de regulación que suprimen a las células T CD4+ o CD8+. No se requiere la deplección de la subpoblación diana para la inducción de tolerancia. En un modelo en primate no humano los anticuerpos anti-CD4 de tipo IgG1, que provocan una marcada deplección de células T CD4+, no mostraba diferencias respecto a la supervivencia del injerto que cuando el monoclonal era del tipo IgG4, no depleccionante<sup>109</sup>. La tolerancia obtenida presenta importantes particularidades:

- 1) No es activa sobre células T activadas de forma previa al desarrollo de la tolerancia, por lo que requiere un bloqueo previo de la estimulación alogénica. Una vez inducida, la tolerancia es activa sobre células T vírgenes o activadas.
- 2) Es específica pero también se desarrolla sobre antígenos no relacionados que sean expresados por la misma célula APC que presenta el antígeno específico (fenómeno de supresión ligada).
- 3) Depende de células T CD4+ que transfieren el estado tolerante a células T vírgenes, así como a huéspedes singénicas que nunca han sido tratados con anticuerpos anti-CD4 (fenómeno de tolerancia infecciosa).

\* *Bloqueo de moléculas de coestimulación*

La inducción de tolerancia bloqueando la principal vía de coestimulación, CD28/B7, ha sido ensayada en injertos renales con la administración de una proteína de fusión (CTLA-4/Ig). CTLA-4 presenta mucha mayor afinidad que CD28 por B7, de forma que inhibe las señales derivadas de CD28<sup>20,110</sup>.

El bloqueo de la interacción CD40/CD40L también produce una aceptación prolongada del injerto, asociada a una respuesta inmune predominantemente de tipo Th2. Esta acción se debe probablemente a las diferentes interacciones en que interviene CD40 (Figura 2). El tratamiento con anti-CD40L se ha mostrado útil en modelo de aloinjerto renal en primates para la prevención de los episodios de rechazo, pero no para su rescate. Esta acción parece que está mediada por el bloqueo de las interacciones entre la célula Th y las células efectoras: tanto la cooperación T-B, con inhibición de la respuesta de aloanticuerpos, como la activación de macrófagos (bloqueo de la transcripción de la sintetasa inducible de óxido nítrico, iNOS).

La combinación de CTLA-4/Ig y anticuerpo monoclonal anti-CD40L supone un potente régimen inmunosupresor y han permitido una supervivencia significativamente prolongada de los injertos de piel en modelos murinos. El bloqueo de ambas vías de activación aborta la expansión clonal T *in vitro* e *in vivo*. Se ha reportado el mantenimiento a largo plazo de injertos de piel y la inhibición del rechazo vascular crónico en injertos cardíacos<sup>78</sup>.

En primates, la administración durante una semana del tratamiento combinado ha conseguido supervivencias del injerto renal de 180 días. Este protocolo también induce los fenómenos de supresión ligada y tolerancia infecciosa descritos anteriormente<sup>106</sup>.

\* *Bloqueo de receptor de IL-2*

El uso de anticuerpos monoclonales anti-IL-2R (receptor de IL-2) se fundamenta en que la diana del tratamiento sólo serán las células T activadas por el estímulo antigénico. Su uso clínico ha sido aprobado por la F.D.A. basado en la evidencia de la reducción en un 20% de los episodios de rechazo. Los datos de los ensayos clínicos no muestran un incremento en las complicaciones del tratamiento. No aumenta la tasa de infecciones por CMV u otros virus. Se desconocen los efectos del tratamiento sobre otras respuestas inmunes y, en principio, el tratamiento no es inductor de tolerancia a los antígenos del donante<sup>111</sup>.

\* *Inmunosupresión mediada por péptidos*

En modelos experimentales se están ensayando estrategias de modificación de la respuesta inmune mediante administración de péptidos sintéticos derivados las cadenas a y b de las moléculas de clase I y clase II del MHC, y también de otras moléculas implicadas en la presentación antigénica.

En general, las funciones inmunomoduladoras descritas varían según la procedencia del péptido<sup>112</sup>:

- 1) Los péptidos derivados de regiones monomórficas (correspondientes a la región de unión de CD8 a las moléculas de clase I, o a la región de unión de CD4 a las moléculas de clase II) provocan una supresión no alelo específica. Los péptidos derivados de moléculas de clase I inhiben sobre todo la diferenciación de precursores de CTL y, en algunos casos, la actividad citotóxica. Los péptidos derivados de moléculas de clase II son inhibidores del cultivo mixto, de la secreción de citoquinas y de la generación de CTL.
- 2) Los péptidos derivados de regiones polimórficas suelen provocar supresión específica de alelo.

Se han estudiado distintas rutas de administración, pero la más utilizada ha sido la inyección intratímica, y excepto en el caso de disparidades menores los tratamientos se han complementado con bajas dosis de ciclosporina. Existe mucha controversia sobre el mecanismo de acción de estos péptidos; se han implicado acciones centrales así como alteración del reconocimiento por el TCR de las células T periféricas, e incluso a la asociación de estos péptidos con proteínas de la familia Hsp (se postulan actividades de tipo inmunofilina para estas proteínas).

## BIBLIOGRAFÍA

1. BRODSKY F.M., GUAGLIARDI L.E.: The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* V9:707-744 (1991).
2. HART. D.: DENDRITIC CELLS: unique leukocyte populations which controls the primary immune response. *Blood* Vol 90 9:3245-3287 (1997).
3. BANCHEREAU J. et al: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* Vol 392:252 (1998).
4. CELLA M. et al. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Op. Immunol.* Vol 9:10-16 (1997).
5. K KNIGHT S.C., PATTERSON S.: Bone-marrow-derived dendritic cells, infection with human immunodeficiency virus and immunopathology. *Annu. Rev. Immunol.* V15:203-234 (1997).
6. GERMAIN R.N.: Antigen processing and presentation. En *Fundamental Immunology* 4th ed. (W.E. Paul Ed.). Raven Press (1998)

7. STEINMAN R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* V9:271-296 (1991).
8. DUSTIN M.L., SPRINGER T.A.: Role of lymphocyte adhesion receptors in transiente interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* V9:27-66 (1991).
9. KIRBY J.A., CUNNINGHAM A.C. Intra-graft antigen presentation: the contribution of bone-marrow derived, epithelial and endothelial presenting cells. *Transplant. Rev.* V11:127-140 (1997).
10. ADAMS P.W., LEE H.S.A., WALDAMN W.J., SEDMAK D.D., OROSZ C.G.: Alloantigenicity of human endothelial cells. III, Quantitated indirect presentation of endothelial alloantigens to human helper lymphocytes. *Transplantation* v58:476-483 (1994).
11. PAGE C., THOMPSON C., YACOB M., ROSE M.: Human endothelial stimulation of allogeneic T cells via a CTLA-4 independent pathway. *Transpl. Immunol.* V2:342-347 (1994).
12. AUCHINCLOSS H. JR., MAYER T., GHOBRIAL R., WINN H.J.: T cell subsets, bm mutants, and the mechanism of allogeneic skin graft rejection, *Immunol. Res.* V8:149-164 (1989).
13. PARKER D.C.: T cell-dependent B-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* v11:331-360 (1993).
14. PAMER E., CRESSWELL P.: Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* V16:323-358 (1998).
15. LEE R.S., GRUSEBY M.J., GLIMCHER L.H., WINN H.J., AUCHINCLOSS H JR. : Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med* v179:865-872 (1994).
16. BEVAN M.J.: Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* V182:915-922 (1995).
17. YORK I.A., ROCK K.L.: Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* V14:369-396 (1996).
18. AUCHINCLOSS H. SULTAN H.: Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr. Op. Immunol.* V8:681-687 (1991).
19. DOODY D.P., STENGER K.S., WINN H.J.: Immunological nonspecific mechanism of tissue destruction in the rejection of skin grafts. *J. Exp. Med.* V179:1645-1652 (1994).
20. LENSCHOW D.J., WALUNA T.L., BLUESTONE J.A.: CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* v14:233-258 (1996).
21. BOISE L.H., NOEL P.J., THOMPSON C.B.: CD28 and apoptosis. *Curr. Op. Immunol.* V5:620-625 (1995).
22. FOY T.M., ARUFFO A., BAJORATH J., BUILMANN J.E., NOELLE R.J.: Immune regulation by CD40 and its ligand gp39. *Annu. Rev. Immunol.* V14:591-617 (1996).
23. SEDER R.A., PAUL W.E.: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* V12:635-637 (1994).
24. STROM T.B., ROY-CHAUDHURY P., MANFRO R., ZHENG X.X., NICKERSON P.W., WOOD K., BUSHELL A.: The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr. Op. Immunol.* V8:688-693 (1996).
25. STEIGER J., NICKERSON P.W., STEURER W., MOSCOVITCH-LOPATIN M., STROM T.B.: IL-2 knockout mice reject islet cell allografts. *J. Immunol.* V155:489-498 (1995).

26. ZHENG X.X., STEELE A.W., NICKERSON P.W., STEURER W., STEIGER J., STROM T.B.: Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J. Immunol.* V154:5590-5600 (1995).
27. PODACK E.R., HENGARTNER H., LICHTENHELD M.G.: A central role of perforin in cytotoxicity? *Annu. Rev. Immunol.* V9:129-157 (1991).
28. COHEN J.J., DUKE R.C., FADOK V.A., SELLINS K.S.: Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* V10:267-293 (1992).
29. BERKE G.: The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu. Rev. Immunol.* V12:735-773 (1994).
30. LANIER L.L.: NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* V16:359-393 (1998).
31. O Manilay J., Sykes M.: Natural killer cells and their role in allograft rejection. *Curr. Op. Immunol.* V10:532-538 (1998).
32. HUTCHINSON I.V.: Cellular mechanisms of allograft rejection. *Curr. Op. Immunol.* V3:722-728 (1991).
33. LARSEN C.P., PEARSON T.C.: The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance and tolerance. *Curr. Op. Immunol.* V9:641-647 (1997).
34. LIN J.X., MIGONE T.S., TSANG M., FRIEDMAN M., WEATHERBEE J.A., ZHOU L., YAMAUCHI A., BLOOM E.T., MIETZ J. JOHN S. Et al.: The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13 and IL-15. *Immunity* v2:331-339 (1995).
35. HARRIMAN W., VÖLK H., DEFRANOUX N., WABL M.: Immunoglobulin class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* V11:361-384 (1993).
36. DALLMAN M.J., LARSEN C.P., MORRIS P.J.: Cytokine gene transcription in vascularized organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* V174:493-496 (1991).
37. MASON D.V., MORRIS P.J.: Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu. Rev. Immunol.* V4:119-145 (1986).
38. DALLMAN M.J.: Cytokines and transplantation: Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in adults. *Curr. Op. Immunol.* V7:632-638 (1995).
39. ROSENBERG A.S., SINGER A.: Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. *Annu. Rev. Immunol.* V10:189-213 (1992).
40. SALMI, M. et al. How do lymphocytes know where to go: current concepts and enigmas of lymphocyte «homing». *Adv. Immunol.* V64: 139 (1997).
41. KRAAL, G., et al. High endothelial venules: lymphocyte traffic control and controlled traffic. *Adv. Immunol.*, 65: 347 (1997).
42. IMHOF, B.A. et al. Leukocyte migration and adhesion. *Adv. Immunol.*, V58: 345-416 (1995).
43. GRAYSON et al. D 2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J. Exp. Med.*, V188:2187-2191 (1998).
44. BRISCOE D.M., ALEXANDER S.I., LICHTMAN A.H.: Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr. Op. Immunol.* V10:525-531 (1998).



45. LICHTMAN A.H., DING H., HENAULT L., VACHINO G., CAMPHAUSEN R., CUMMING D., LUSCINSKAS F.W.: CD45RO+ (memory) but not CD45RA+ (naive) T cells roll efficiently on E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 under flow. *J. Immunol.* V158:3640-3650 (1997).
46. BORGES E., TIETZ W., STEEGMAIER M., MOLL T., HALLMANN R., HAMANN A., VESTWEBER D.: P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 binds P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J. Exp. Med.* V185:573-578 (1997).
47. AUSTRUP F., VESTWEBER D., BORGES E., LOHNING M., BRAUER R., HERZ U., RENZ H., HALLMAN R., SCHEFFOLD A., RDBRICH A. Et al.: P- and E-selectin mediated recruitment of T helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* v385:81-83 (1997).
48. LOETSCHIER P., UGUCCIONI M., BORDOLI L., BAGGIOLINI M., MOSER B., CHIZZOLINI C., DAYER J.M.: CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* v391:344-345 (1998).
49. SALLUSTO F., MACKAY C.R., LANZAVECCHIA A.; Selective expression of the eoxatin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* v227:2005-2007 (1997).
50. MA W., POBER J.S.: Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by but not differentiation of naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* V (1998).
51. BRISCOE D.M., HENAULT L. E., GEEHAN C., ALEXANDER S.I., LICHTMAN A.H.: Human endothelial cell costimulation of T cell IFN-gamma production. *J. Immunol.* V159:3247-3256 (1997).
52. GREWAL I.S., FLAVELL R.A.: A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T cell responses. *Immunol. Today* v17:410-414 (1996).
53. REUL R. M., FANG J.C., DENTON M. D., GRRHAN C., LONG C., MITCHELL R.N., GANZ P., BRISCOE D.M.: CD40 and CD40 ligand (CD154) are coexpressed on microvessels in vivo in human cardiac allograft rejection. *Transplantation* v64:1766-1774 (1997).
54. SULTAN P., SCHECHNER J.S., MCNIFF J.M., HOCHMAN P.S., HUGHES C.C., LORBER M.I., ASKENASE P.W., POBER J.S.: Blockade of CD2-LFA-3 interactions protects human skin allografts in immunodeficient mouse/human quimeras. *Nat. Biotechnol* v15:759-762 (1997).
55. BEVILACQUA M.P.: Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* V11:767-804 (1993).
56. KAGI D., LEDERMANN B., BURKI R., ZINKERNAGEL M., HENGARTNER H.: Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu. Rev. Immunol* v14:207-232 (1996).
57. DOHERTY P.C., ALLAN J.E., LYNCH F., CEREDIG R.: Dissection of an inflammatory process induced by CD8+ T cells. *Immunol Today* v12:17-23 (1991).
58. BENHAM A.M., SAWYER G.J., FAVRE J.W. : Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney grafts. *Transplantation* v59:1028-1032 (1995).
59. OROSZ CH.G., PELLETIER R.P.: Chronic remodelling pathology in grafts. *Curr. Op. Immunol.* V9:676-680 (1997).
60. HAYRY P., MENNANDER A., RAISANEN-SOKOLOWSKI A., USTINOV J., LEMSTROM K. AHO P. YILMAZ S., LAUTENSCHLAGER I., PAAVONEN T.: Pathophysiology of vascular wall changes in chronic allograft rejection. *Transplant. Rev.* V7:1-20 (1993).

61. PLISSONNIER D., NOCHY D., POCET P., MANDET C., HINGLAIS N., BARIETY J., MICHEL J.B.: Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation* v60:414-424 (1995).
62. ASAHARA Y., MUROHARA T., SULLIVAN A., SILVER M., VAN DER ZEE R., LI T., WITZENBICHLER B., SCHATTEMAN G., ISHER J.M.: Isolation of putative progenitor endothelial cell for angiogenesis. *Science* v275:964-967 (1997).
63. BUCALA R., SPIEGEL R.A., CHESNEY J., HOGAN M., CERAMI A.: Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.* V1:71-81 (1994).
64. SCHMID C., HEEMANN V., TILNEY N.L.: Retransplantation reverses mononuclear infiltration but not myointimal proliferation in a rat model of chronic cardiac allograft rejection. *Transplantation* v61:1695-1699 (1995).
65. CHEN Y., KUCHROO V.K., INCHE J-I., HAFLER D.A., WEINER D.L.: Regulatory T cell clones induced by oral tolerance; suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* v265:1237-1240 (1994).
66. ROSE M.L.: Antibody-mediated rejection following cardiac transplantation. *Transplant. Rev.* V7:140-152 (1993).
67. RUSSELL P.S., CHASE C.M., WINN H.J., COLVIN R.B.: Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts: III. Effects of recipient treatment with a monoclonal antibody to interferon-g. *Transplantation* v57:1367-1371 (1994).
68. RUSSELL P.S., CHASE C.M., COLVIN R.B.: Insights regarding the pathogenesis of transplant arteriopathy from experiments with animals. *Transplantation* v64: (1997).
69. PLATT J.L., VERCELLOTTI G.M., LINDMAN B.J., OEGEMA T.R., BACH F.H., DALMASSO A.P.: Release of heparan sulfate from endothelial cells: implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *Transplantation* v51:530-533 (1991).
70. AUCHINCLOSS H.JR.: Xenogeneic transplantation. A review. *Transplantation* v46:1-20 (1988).
71. STOCKINGER B. T LYMPHOCYTE tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv. Immunol.* V71.229-274 (1999).
72. STOCKINGER B.: T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv. Immunol.* V71.229-274 (1999).
73. CHARLTON B., AUCHINCLOSS H.JR., FATHMAN C.G.: Mechanisms of transplantation tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* V12:707-734 (1994).
74. RAMSDALL F., FOWLKES B.J.: Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen. *Science* v257:1130-1134 (1992).
75. QUILL H.: Anergy as a mechanism of peripheral T cell tolerance. *J. Immunol.* V156:1325-1327 (1996).
76. DAVIES D.J., MARTIN G., PHILIPS J., MARSHALL S.E., COBBOLD S.P., WALDMAN H.: T cell regulation in adult transplantation tolerance. *J. Immunol* v157:529-533 (1996).
77. LARSEN C.P., ELWOOD E.T., ALEXANDER D.Z., RITCHIE S.C., HENDRIX R., TUCKER-BURDEM C., CHO H.R., ARUFFO A., HOLLENBAUGH D., LINSLEY P.S. et al.: Long term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* v381:434-438 (1996).
78. THOMPSON C.N.: Apoptosis. *En Fundamental Immunology* 4th (W.E. Paul editor). Raven Press. 1998.

79. LOMBARDI G., SIDHU S., BATCHELOR R., LESCHER R.: Anergic T cells suppress cells in vitro. *Science* v264:1587-1589 (1997).
80. COBBOLD S., WALDMAN H.: Infectious tolerance. *Curr. Op. Immunol.* V10:518-524 (1998).
81. SATO K., OHTSUKA K., HASEGAWA K. Et al.: Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* V182:759-767 (1995).
82. YOSHIMOTO T., PAUL W.E.: CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* V179:1285-1295 (1994).
83. BAXTER A.G., KINDER S.J., HAMMOND K.J., SCOLLAY R., GODFREY D.I.: Association between alpha-beta TCR+CD4-CD8- T cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* v46:572-582 (1997).
84. PLAIN K.M., FAVA L., SPINELLI A., HE X.Y., CHEN J., BOYD R., DAVIDSON C.L., HALL B.M.: Induction of tolerance with non-depleting anti-CD4 monoclonal antibodies is associated with down-regulation of TH2 cytokines. *Transplantation* v64:1559-1567 (1997).
85. LETTERIO J.J., ROBERTS A.B.: Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* V16:137-161 (1998).
86. GROUX H., O'GARRA A., BIGLER M., ROULEAU M., ANTONENKO S., DE VROES J.E., RONCAROLO M.G.: A CD4+ T cell-subset inhibits antigen-specific T-cell-responses and prevents colitis. *J. Exp. Med.* V187:177-183 (1998).
87. WONG W., MORRIS P.J., WOOD K.J.: Pretransplant administration of a single donor class I major histocompatibility complex molecule is sufficient for the indefinite survival of fully allogeneic cardiac allografts: evidence for linked epitope suppression. *Transplantation* v63:1490-1494 (1997).
88. SCULLY R., QIN S., COBBOLD S., WALDMANN H.: Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* V24:2383-2392 (1994).
89. GOERDT S. Et al. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* Vol 10:137-142 (1999).
90. ANDERSON D.M., MARASKOVSKY E., BILLINGSLEY W.L., DOUGALL W.C., TOMESTKO M.E., ROUX E.R., TEEPE M.C., DUBOSE R.F., COSMAN D., GALIBERT L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic cell function. *Nature* v390:175-179 (1997).
91. FRASCA L., CARMICHAEL P., LECHLER R., LOMBARDI G.: Anergic T cells effect linked suppression. *Eur. J. Immunol.* V27:3191-3197 (1997).
92. BEMELMAN F., HONEY K., ADAMS E., COBBOLD S., WALDMANN H. BONE marrow transplantation induces either clonal deletion or infectious tolerance depending on the dose. *J. Immunol.* V160:2645-2648 (1998).
93. ROCHA B., VON BOEHMER H.: Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* v251:1225-1228 (1991).
94. OKADA S., STROBER S.: Spleen cells from adult mice given total lymphoid irradiation or from newborn mice have similar regulatory effects in the mixed leucocyte reaction. 1. Generation of antigen-specific cells in the mixed leu-

- cocyte reaction after the addition of spleen cells from adult mice given total lymphoid irradiation. *J. Exp. Med* v156:522-538 (1982).
95. OSEROF A., OKADA S., STROBER S.: Natural suppressor (NS) cells found in the spleen of neonatal mice and adult mice given total lymphoid irradiation (TLI) express the null surface phenotype. *J. Immunol* v132:101-110 (1984).
  96. WEB S.R., HUTCHINSON J. HAYDEN K. SPRENT J.: Expansion/deletion of mature T cells exposed to endogenous superantigens in vivo. *J. Immunol* v152:586-597 (1994).
  97. SYKES M.: Chimerism and central tolerance. *Curr. Op. Immunol.* V8:694-703 (1996).
  98. MATZINGER P: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev Immunol.* V12:991-1045 (1991).
  99. Rocken M., urban J.F., Shevach E.M. : Infection breaks T cell tolerance. *Nature* v359:79-82 (1992).
  100. KAWAI T., COSIMI A.B., COLVIN R.B., POWELSON J., EASON J., KOZLOWSKI T., SYKES M., MONROY R., TANAKA M., SACHA D.H.: Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomologous monkeys. *Transplantation* v59:256-262 (1995).
  101. TANIGUCHI H., TOYOSHIMA T., FUKAO K., NAKAUCHI H.: Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nat. Med.* V2:198-203 (1996).
  102. SHAPIRO P., RAO A.S., FONTES P., ZEEVI A., JORDAN M., SCANTLEBURY V.P., VIVAS C., GRITSCH H.A., CORRY R.J., EGIDI F. Et al.: Combined simultaneous kidney/bone marrow transplantation. *Transplantation* v60:1421-1425 (1995).
  103. THOMAS J.M., VERBANAC K.M., SMITH J.P., KASTEN-JOLLY J., GROSS U., REBELLATO L.M., HAISCH C.E., CARVER F.M., THOMAS F.T.: The facilitating effect of one-DR antigen sharing in renal allograft tolerance induced by donor bone marrow in rhesus monkeys. *Transplantation* v59:245-255 (1995).
  104. GIANELLO P.R., YAMADA K., FISHBEIN J.M., LORF R., NICKELT V., COLVIN R.N., AM J.S., SACHS D.H.: Long-term acceptance of primarily vascularized renal allografts in miniature swins. *Transplantation* v61:503-522 (1996).
  105. DEBRUIN R.W.F., VANROSSUM T.J., SCHERINGA M., BONTHUIS E., IJZERMANS J., MARQUET R.L.: Intrathymic injection of alloantigen may lead to hyperacute rejection and prolonged graft survival of heart allograft in the rat. *Transplantation* v60:1061-1063 (1996).
  106. HAMAWY M.M., KNECHTLE S.J.: Strategies for tolerance induction in nonhuman primates. *Curr. Op. Immunol.* V10:513-517 (1998).
  107. KNECHTLE S.J., VARGO D., FECHNER J., ZHAI Y., WANG J., HANAWAY M.J., SCHARFF J., HU H., KNAOO L., WATKINS D., NEVILLE D.M.: FN18-CRM9 immunotoxin promotes tolerance in primate renal allografts. *Transplantation* v63:1-6 (1997).
  108. THOMAS J.M., NEVILLE D.M., CONTREARS J.L., ECKHOFF D.E., MENG G., LOBASHEVSKY A.L., WANG P.X., HUANG ZX.Q., VERBANAC K.M., HAISCH C.E., THOMAS F.T.; Preclinical studies of allograft tolerance in rhesus monkeys: a novel anti-CD3-immunotoxin given peritransplant with donor bone marrow induces operational tolerance to kidney allografts. *Transplantation* v64:124-135 (1997).
  109. MOURAD G.J., PREFFER F.I., WEE S.L., POWELSON J.A., KAWAI T., DELMONICO F.L., KNOWLES R.W., COSIMI A.B., COLVIN R.B.: Humanized IgG1 and IgG4

- anti-CD4 monoclonal antibodies-effects on lymphocytes in the blood, lymph nodes and renal allografts in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 65:632-641 (1998).
110. GREWAL I.S., FLAVELL R.A.: CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* V16:111-135 (1998).
  111. WALDAMN , O'SHEA: The use of antibodies against the IL-2 receptor. *Curr. Op. Immunol.* V
  112. DAVIS M.M., BONIFACE J.J., REICH Z., LYONS D., HAMPL J., ARDEN B., CHIEN Y-H.: Ligand recognition by alpha-beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* V16:523-544 (1998).
  113. MAGEE C.C., SAYEGH M.H.: Peptide-mediated immunosuppression. *Curr. Op. Immunol.* V9:669-675 (1997).