

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE CIRURGIA

Servei de Cirurgia Hepatobiliopancreàtica i
Trasplantaments

Programa de Doctorat:
Ciències de la Salut. Immunologia.

***PROPUESTA DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA LA
MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN
PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE HEPÁTICO***

TESIS DOCTORAL presentada por Joan Cos i Trullàs, para obtener el Grado de Doctor
en Medicina y Cirugía.

Directores de Tesis

Dra. Itxarone Bilbao Aguirre
Dr. Josep Quer i Sivila

Tesis subvencionada por la *Fundació La Marató de TV3*
(Ref.: 002110 y 052310).

Barcelona, 2009



La Dra. Itxarone Bilbao Aguirre, médico adjunto del *Servei de Cirurgia Hepatobiliopancreàtica i Trasplantaments*, adscrita al Ciber de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd) del Instituto de Salud Carlos III y el Dr. Josep Quer i Sivila, profesor asociado de la *Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona* e investigador del *Departament de Medicina Interna-Hepatologia, Laboratori de Malalties Hepàtiques Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona* y adscrito al Ciberehd del Instituto de Salud Carlos III.

Certifican que:

Joan Cos i Trullàs, licenciado en Grado en Biología por la *Universitat de Barcelona*, ha llevado a término bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada

***PROPUESTA DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA
LA MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA
EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE HEPÁTICO***

y que ésta reúne las condiciones necesarias para ser presentada ante el tribunal correspondiente, para optar al título de Doctor.

Dra. Itxarone Bilbao Aguirre

Dr. Josep Quer i Sivila

Barcelona, 17 de Julio de 2009

A la memoria de Carlos Margarit



Mi primer contacto con Carlos fue en el año 1993, al incorporarme como biólogo en el Servei de Cirurgiahepatobiliopancreàtica i Trasplantaments de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

Por aquel entonces Carlos estaba interesado en la creación de un laboratorio de investigación experimental con dos líneas de trabajo prioritarias: el trasplante de islotes pancreáticos y el modelo de hipertermia peritoneal. Ambas líneas de trabajo, dirigidas por el Dr. E. Murio, me parecieron sumamente interesantes. El hecho de poder trabajar en un centro hospitalario de primer nivel me pareció elitista. Poder investigar en líneas de investigación con una posible repercusión para el paciente se asemejaba al sueño hecho realidad. Poder trabajar con un equipo multidisciplinar me pareció una oportunidad sin precedentes, pero empezar a trabajar desde cero (buscar un espacio para investigar, definir el proyecto de investigación, buscar financiación, adquirir el material necesario para la puesta en funcionamiento del proyecto...) fue, para mi, extremadamente excitante; de la misma manera que lo fue el acercamiento respetuoso, discreto pero continuo a la personalidad de Carlos. Una persona de aspecto serio, reservado, exigente, con objetivos claros y de mirada profunda y arrogante. Una personalidad que fui conociendo durante el desarrollo del presente estudio.

Fue en el año 2003, cuando habiendo dejado la UCHBP para incorporarme en lo que actualmente se conoce como *Banc de Sang i Teixits* (BST), recuperé el contacto con Carlos. Carlos estaba interesado en abordar un estudio experimental con el fin de identificar aquellos pacientes que tras el trasplante hepático pudieran someterse a una retirada parcial o total de la inmunosupresión.

En aquella época me había implicado en un nuevo proyecto de interés por parte del *Banc de Teixits* del BST el cual lideraba el Dr. Lluís Massuet; la puesta en funcionamiento de un cultivo de células dendríticas para estudios de reconstitución de

la respuesta inmune específica en enfermedad mínima residual. Si bien la propuesta de Carlos se apartaba de la línea de trabajo trazada por el *Banc de Teixits del BST*, consideré que ambos estudios tenían un punto en común; la respuesta inmune del paciente. En ambos casos, la célula dendrítica como célula presentadora de antígeno, podría ser un nexo entre ambos proyectos. Finalmente, la propuesta de Carlos fue acogida con gran aceptación por parte de Lluís Massuet lo que permitió establecer una estrecha colaboración entre UCHBP y el *Banc de Teixits del BST*.

La motivación de Carlos en torno al proyecto nos arrasó a todos... Si bien las directrices del modelo de estudio fueron propuestas por Carlos, él siempre aceptó la opinión de todos los integrantes del grupo. La seguridad que mostraba en todos y cada uno de los aspectos del proyecto nos despertaba, sin ninguna duda, las ganas de activar cuanto antes el estudio. Todos nos sentíamos cómodos bajo su tutela y lo más importante, nos sentíamos estimulados para hacer realidad su propuesta, una propuesta que se transformó, con el día a día, en la propuesta de todo el equipo.

Los primeros pasos en el abordaje del estudio se presentaban difíciles. Las muestras obtenidas de cada paciente eran únicas e irrecuperables en el caso de perderse. El tiempo previsto para el abordaje experimental era limitado y la falta de experiencia en una línea de trabajo sin precedentes dentro de la Unidad auguraba un posible fracaso del estudio. El proyecto requería, en definitiva, una rigurosa coordinación y organización entre el equipo clínico y el equipo de laboratorio. Sin embargo, todos estos aspectos fueron superados por la disciplina de trabajo, siempre rigurosa y metódica, que todos supimos aplicar y respetar en todo momento. El seguimiento que Carlos aplicó en cada una de las fases del estudio siempre fue constante y minucioso.

Uno de los aspectos que más valoré de la personalidad de Carlos fue el respeto mantenido hacia la profesionalidad de cada uno de los integrantes del equipo investigador. Las opiniones o las propuestas presentadas por el equipo de laboratorio siempre eran bien recibidas, escuchadas y valoradas. Su continuo afán por conocer la opinión del investigador a partir de resultados preliminares permitía entablar largas charlas en su despacho que, en la mayoría de las ocasiones y a menudo acompañado de su café y sus galletas, aportaban mejoras y abrían nuevas perspectivas de estudio. Con Carlos, cualquier momento era bueno para dialogar e intercambiar opiniones. En cualquier sitio era capaz de crear el microambiente adecuado para la charla...

Cruzarme con él en los pasillos del hospital era poder hablar del proyecto, era poder hablar de la familia, era un momento para el saludo y el respeto mutuo. Era, simplemente, un momento para fraguar la amistad...

En el momento de redactar estas líneas, tres años desde que Carlos nos dejó, todavía recuerdo sus gestos y su profunda mirada. Una mirada que cuando se cruzaba en mi camino me transmitía la sensación de que nada es imposible y que todo objetivo es alcanzable si se tiene en cuenta el compromiso, la constancia y el respeto por un trabajo bien hecho. De que todo, si se trata desde la vertiente de la sinceridad, la confianza y la minuciosidad conlleva el correspondiente fruto. Su mirada guió mis pasos en mi profesión. Su mirada continúa guiando mis pasos en mi nueva actividad investigadora. Sus palabras, sus ideales, sus opiniones, su forma de proceder e incluso las charlas que mantuve con Él han estado presentes en el transcurso de la redacción de este trabajo. Ningún resultado ha sido transcrito sin ser...“consultado con Él”.

Este trabajo, si bien desde el punto de vista académico está catalogado como Tesis Doctoral, desde mi perspectiva personal no deja de ser un trabajo en reconocimiento a la labor investigadora de Carlos Margarit. Un trabajo en respuesta al compromiso que establecí con Carlos y con todos aquellos pacientes que confiaron en Él, con el equipo investigador y con la ciencia.

Han transcurrido cinco años desde la finalización del modelo experimental. Cinco años plegados de cambios substanciales en mi vida. Cinco años que he vivido con intensidad gracias a la labor minuciosa y precisa de sus manos, las cuales me ofrecieron la posibilidad de continuar gozando de la vida, de mi familia, de mi profesión y de nuevas ilusiones. Cinco años que parecen no ser nada, pero para mi han representado un cambio profundo en la manera de percibir la vida, de entenderla y, en definitiva, de vivirla. Gracias, Carlos, por darme nuevamente la vida. Gracias, Carlos, por cómo fuiste y por todo lo que hiciste.

Echo en falta, no obstante, una última charla con Carlos, pero tal y como dijo un gran amigo suyo; *nos vemos Carlos Margarit*.

Agradecimientos

A todas aquellas persona que participaron directamente o indirectamente en el proyecto.

Dra. Itxarone Bilbao, médico adjunto del *Servei de Cirurgiahepatobiliopancreàtica i Trasplantaments (SCHBPiT)* de l'*Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona*. Por su profesional implicación en el proyecto. Su interés por la evolución del proyecto hizo que siempre estuviera a mi lado. Los resultados del estudio fueron evaluados y contrastados con los datos del seguimiento clínico y siempre desde la perspectiva de una profesional motivada. Excelente profesional, persona sumamente implicada en su actividad diaria, responsable, comprometida, altamente competitiva... todo un conjunto de cualidades, envidiables, para todas aquellas personas que la han conocido como médico y como amiga. Su buena disposición al asumir la codirección de esta Tesis con el Dr. Josep Quer tras la desafortunada desaparición del Dr. Carlos Margarit, ha hecho posible la consolidación académica de este trabajo.

Dr. Josep Quer, profesor asociado de la Facultad de Medicina de la *Universitat Autònoma de Barcelona* e investigador de la *Unitat de Malalties Hepàtiques* de l'*Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona*. Josep fue, ante todo, un excelente amigo. Para mi y, muy probablemente, para el resto de la gente que lo ha conocido es el máximo exponente de la persona que ha nacido para ofrecer ayuda. Una ayuda que no necesita ser recompensada... Desde la perspectiva profesional, un excelente investigador. Con Josep he compartido los mejores y peores momentos de mi trayectoria profesional y personal. Con Él he podido compartir interesantes charlas entorno a la biología del virus de la hepatitis C. He tenido el honor de aprender a su lado. He tenido el honor de poder trabajar en su laboratorio entorno a la puesta en funcionamiento del cultivo del virus C; una época en la que pude continuar ejerciendo de biólogo tras perder, por motivos estructurales, el modesto laboratorio experimental del *SCHBPiT*. Fueron horas de trabajo que compartimos hasta el agotamiento, pero siempre con una sonrisa y un... "*mañana continuamos*". Gracias, Josep, por aceptar la codirección de esta Tesis.

Dr. Lluís Massuet, Jefe del *Banc de Teixits del Banc de Sang i Teixits de Barcelona*. De cuya mano entre a formar parte del laboratorio del *Banc de Teixits*. Recuerdo que tras reunirme con Él en una sala de reuniones, me entregó un libro de *abstracts* entorno a la célula dendrítica. Se fue y volvió al cabo de una hora. Su frase: “*si te interesa, el tema es tuyo*” fue, para mi, un gesto de confianza absoluta. A Lluís le debo la consolidación de este estudio. Lluís me ofreció las condiciones necesarias (contractuales y de espacio físico) para desarrollar el proyecto. Me ofreció respeto y confianza, sin dudar de mi profesionalidad y de mi implicación en el trabajo. Me ofreció parte de su tiempo y palabras de apoyo en los peores momentos de mi vida. Con él entendí que el silencio no tiene que ser un desprecio. El silencio, en muchos casos, es respeto.

Dr. Joan Ignacio Esteban, Catedrático de Medicina de la *Universitat Autònoma de Barcelona*. Como persona, como médico y como investigador. Personaje inagotable, fuente de ideas y de iniciativas, siempre en beneficio del paciente y de su equipo. Buen líder de grupo; el respeto a la profesionalidad de cada uno de los integrantes del grupo despertaba las ansias de abordar el tema planteado. Sin duda alguna ha sido la mejor fuente de bibliografía científica que he tenido hasta el momento. Gracias a Él he podido experimentar la sensación de que el día no da para todo... Imposible leer y digerir todos los artículos científicos que me entregaba entorno al mundo de la célula dendrítica y la inmunología del virus C. Gracias por incorporarme en tu equipo de profesionales. Gracias por ofrecerme tu apoyo moral en los momentos más duros de mi vida.

Dra. Teresa Villalba, hematóloga (*Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona*). Con ella compartir la puesta a punto del cultivo de células dendríticas y el interés, común, por desarrollar un estudio de aplicabilidad clínica. Sus conocimientos en la biología de la célula dendrítica fueron claves para poderme centrar en un tema que me resultaba novedoso y a la vez con amplias perspectivas para investigar.

Dr. Rafael Parra, hematólogo (*Banc de Sang i Teixits de Barcelona*). Juntamente con la Dra. T. Villalba me formaron en la caracterización inmunofenotípica de diferentes poblaciones de células sanguíneas tras largas horas dedicadas a la

citometría de flujo. Con ambos compartir el “estrés” que comporta la correcta adquisición de las muestras celulares cuando éstas son limitantes. Las horas que los tres pasamos delante de la pantalla del ordenador observando como iban apareciendo los eventos me permitió no solo aprender, sino también poder entablar largas charlas (no científicas) que recuerdo con gran aprecio.

Laura Ocaña, Bióloga y colaboradora del presente estudio. Una gran amiga. Incansable “criticona” de los artículos científicos y excelente profesional. Su incorporación en el proyecto se inició al año de su puesta en funcionamiento. Su labor experimental fue intensa. Su implicación, total. Supo tomar el relevo del laboratorio durante los meses que me ausenté por motivos de salud. Durante estos meses consiguió hacer frente al desarrollo experimental con sobrada capacidad y naturalidad. Con ella compartí los primeros resultados del modelo experimental. Juntos discutíamos los resultados. Siempre tenía una explicación, tanto para los resultados evidentes como para aquellos que... no lo eran tanto. Con ella elaboré mi segundo y modesto artículo. Su forma de ver y de vivir la vida (simple, sin grandes complicaciones pero defendiendo el compromiso) fueron de gran ayuda para continuar el día a día y... mejorarlo. Actualmente, continúa siendo investigadora en nuestra nueva línea de trabajo. Gracias por todo...

Al resto del **equipo médico** del SCHBPiT por su participación en la obtención de las muestras de tejido para llevar a cabo el estudio: Dr. Ramón Charco, Dr. Joaquín Balsells, Dr. Ernest Hidalgo, Dr. Antonio Escartín, Dr. Iñigo López y Dra. Silvina Bergamini.

Dr. Ramon Cleries (*Institut Català d'Oncologia. Servei d'Epidemiologia i Registre del Càncer*). Por su aportación en el desarrollo del modelo de análisis estadístico más adecuado para el estudio. Igualadino y amigo desde hace años. Nos conocimos unos años antes de empezar este estudio. Por aquel entonces, mi trabajo experimental versaba en estudios de sinergismo, aditivismo y antagonismo en un modelo de citotoxicidad *in vitro*. El estudio era complejo y el análisis de los resultados mucho más. Con él, y bajo la supervisión de la Dra. Marta Pérez-Cassany (profesora en la *Universitat Politècnica de Barcelona*) logramos profundizar en el modelo analítico. Ramón logró, con este estudio, su trabajo de licenciatura en estadística y de manera conjunta logramos una publicación científica. Ramón representa el compromiso en

persona; trabajador constatare y sin límites. Gracias a su profesionalidad hemos sido capaces de obtener conclusiones a partir del número limitado de muestras, un problema asociado a estudios como el planteado en este trabajo.

Montse Amenós, secretaria del *SCHBPiT*. Por su personalidad. Su simpatía inundaba la unidad y fuente de ánimo para los pacientes. A su lado todo era posible... No hacía falta pedirle consejo; ella lo ofrecía en el momento menos esperado. Tenía la gran destreza de conocer la personalidad de cada uno de los miembros del equipo. Máximo exponente del trabajo bien hecho. Siempre tuve una buena mano dispuesta a ofrecerme ayuda. Gracias por tus consejos y por el ánimo que supiste transmitirme en los momentos más duros de mi vida.

M^a Carmen Martínez, enfermera del *Banc de Teixits del BST*. Gracias a su excelente labor en el proceso de aféresis se pudieron obtener muestras de buena calidad. Su carácter afable era un buen estímulo para los pacientes que acudían, regularmente, a las citas. Siempre estaba dispuesta a ofrecerme ayuda. Participó en la purificación de las distintas poblaciones celulares requeridas por el estudio. Las charlas que mantenía con ella eran siempre gratificantes y de autoayuda para los dos. Gracias por estar a mi lado en los momentos críticos.

A resto del **equipo del Banc de Teixits**: Iolanda, Sonia, Dra. Marta Torrebadella y Dra. Adela Martí por compartir, conmigo, tanto los momentos de éxito profesional como los momentos de mayor desánimo. He aprendido de todas y de cada una de vosotras.

A los integrantes del la **Unidad de Hemofilia** del BST. Dr. Dominique Gallardo, Dr. Francisco Vidal y Eli Farssac. Gracias por acogerme en su laboratorio durante la puesta a punto del cultivo de células dendríticas. Dominique participó en la puesta en funcionamiento del estudio. Las charlas con Dominique siempre resultaron gratificantes y orientativas, tanto en los aspectos profesionales como personales. Gracias por saberme transmitir los ánimos necesarios para afrontar, con éxito, los retos que la vida ofrece, muchas veces, de manera inesperada.

Dr. Joan García. Su incorporación, como Jefe del *Banc de Teixits del BST*, fue en la fase final de este estudio. En todo momento respetó y valoró muy positivamente mi trabajo lo que me permitió terminar el estudio adecuadamente. Gracias a él se

mantuvieron las colaboraciones entre el BST, el SCHBPiT y la *Unitat de Malalties Hepàtiques de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona*.

*Molt especialment a: **Margarida**, i als meus fills; **Carlota i Eduard**. La Margarida la vaig conèixer a l'Institut Pere Vives Vich d'Igualada, l'any 1983. Des d'aleshores, no m'he separat mai d'ella. La Margarida ha estat una excel·lent amiga, una esposa immillorable i una mare excepcional. Mai he tingut un "no", d'Ella. Sempre m'ha recolzat en tot. Mai ha jutjat les meves decisions i sempre ha estat el meu puntal. De la Margarida estic aprenent l'art d'estimar; de l'amor incondicional. Els meus fills han estat la font de vida que he necessitat per poder continuar endavant després de conèixer la meva malaltia. De la Carlota i l'Eduard he après a gaudir de la senzillesa de la vida. En els petits detalls he pogut tornar a somriure, dels petits detalls he après i han sorgit noves esperances. Mai sabré, però, si he estat un bon espòs i un bon pare... Gràcies a tots tres per sacrificar aquelles hores que, podent estar amb ells vaig optar per dedicar-me a la tasca de redactar aquest treball. El meu comprimís s'ha reforçat amb la vostra paciència. Gràcies a la Carlota i a l'Eduard, què han sabut respectar el silenci que necessitava per dedicar-me a aquesta tasca.*

Una mención especial a **todos los pacientes** que aceptaron su participación en este estudio. Sin las muestras de sangre obtenidas por aféresis durante la fase previa al trasplante hepático y posteriormente durante el segundo y sexto mes del acto quirúrgico no hubiera sido posible llevar a cabo este estudio. Su buena disponibilidad ha representado, para mí, un motivo de respeto y de compromiso profesional.

A las siguientes instituciones:

Fundació La Marató de TV3 (edició: *Trasplantament d'Òrgans*). Título del proyecto: *"Estudi de la situació immunològica dels receptors d'un trasplantament hepàtic mitjançant la caracterització funcional i immunofenotípica de les cèl·lules mononucleades de sang perifèrica estimulades amb antígens del donant"*. Ref.: 002110. Investigador principal: Dr. Carlos Margarit Creixell (*Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona*).

Fundació La Marató de TV3 (edició: *Trasplantament d'Òrgans*). Título del proyecto: *"Avaluació prospectiva de la resposta limfocitària T CD4+ específica pel virus de l'hepatitis C (VCH) en receptors de trasplantament hepàtic VCH positiu. Reconstitució de la resposta immune específica"*. Ref.: 052310. Investigador principal: Dr. Joan Ignasi Esteban Mur (*Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona*).

CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Instituto de Salud Carlos III.

A la memòria d'en Ramon Cos



Per haver compartit amb nosaltres el teu camí.

Per haver lluitat per tu i pels teus.

Per la llibertat que ens vares donar.

Per aquell somriure que regalava serenor i esperança.

Per aquell fil de melodia que encara fa dansar els nostres cors.

Per haver-nos ensenyat a trobar claror en la foscor.

Per haver fet del camí un paisatge digne de veure i de viure.

Per ensenyar-nos a viure la vida: gaudint-la, acceptant-la, respectant-la, compartint-la...

Per aquells consells de savi que mai moriran.

Per al teu esperit, puntal de gratitud.

Per tot això, i per molts altres motius, t'hem estimat, t'estimarem i et tindrem, per sempre, en el nostre cor.

Joan Cos

A la M^a Rosa,
la meva mare, per tot allò
que m'has ensenyat.
Pel puntal familiar
que has representat.

Al David, el meu germà. Els
teus comentaris i el teu amor
seran guardats per sempre
en el meu cor.

Amb dedicació especial a:
Margarida, Carlota i Eduard.

Somos lo que hacemos día a día
de modo que la excelencia no
es un acto sino un hábito.

Aristóteles

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. EL TRASPLANTE HEPÁTICO. ASPECTOS GENERALES	7
1.1 <i>Indicaciones del TxH</i>	9
1.2 <i>Contraindicaciones del TxH</i>	11
2. INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE	13
2.1 <i>Histocompatibilidad en el trasplante</i>	13
2.1.1 <i>El complejo mayor de histocompatibilidad</i>	13
2.1.1.1 <i>Los antígenos MHC de Clase I</i>	14
2.1.1.2 <i>Los antígenos MHC de Clase II</i>	15
2.1.2 <i>El complejo menor de histocompatibilidad</i>	18
2.1.3 <i>Antígenos sanguíneos ABO</i>	18
3. BASE INMUNOLÓGICA DEL TRASPLANTE Y SU TRATAMIENTO	19
3.1 <i>El rechazo</i>	19
3.2 <i>Inmunología del rechazo</i>	21
3.3 <i>Prevención del rechazo. La inmunosupresión</i>	25
4. EL TxH EN PACIENTES INFECTADOS POR VIRUS DE LA HEPATITIS C	31
4.1 <i>El VHC</i>	31
4.1.1 <i>Perfil de la respuesta inmune en la infección aguda</i>	32
4.1.1.1 <i>Curso de la infección. Los linfocitos CD8+/CD38+</i>	33
4.1.1.2 <i>La respuesta CD4+</i>	33
4.1.2 <i>Perfil de la respuesta inmune en la infección crónica</i>	34
4.1.3 <i>Persistencia viral</i>	35
4.2 <i>El papel de las células dendríticas (DCs) en la infección por VHC</i>	38
4.2.1 <i>Características de las DCs</i>	38
4.2.2 <i>Subpoblaciones de DCs</i>	42
4.2.3 <i>Cronicidad viral y DCs</i>	43
4.2.4 <i>La alteración de la funcionalidad de las DCs como posible mecanismo de persistencia viral</i>	44

4.3	Terapia en la infección crónica por VHC	46
4.4	El TxH en pacientes VHC+. La reinfección	47
4.4.1	Inducción de DCs tolerogénicas. El papel de los inmunosupresores	48
5.	MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES SOMETIDOS A TxH	53
5.1	Ensayos de monitorización inmunológica (EMI)	54
5.1.1	Antígeno específico	54
5.1.1.1	Análisis de citocinas	56
5.1.1.1.1	Citocinas circulantes	57
5.1.1.1.2	Citocinas in vitro	57
5.1.1.2	Detección de DCs	58
5.1.2	Antígeno no específico	59
5.1.2.1	Las células T reg	59
5.1.3	Otras técnicas candidatas en los EMI en TxH	60
5.1.3.1	Determinación de la fracción soluble de CD30 en el suero de los pacientes	60
5.1.3.2	Las células T Natural Killer (NKT)	61
5.1.3.3	ELISPOT	61
5.1.3.4	Aloanticuerpos	62
5.1.3.5	Análisis de la expresión génica mediante microarrays	62
II.	JUSTIFICACIÓN	67
III.	HIPÓTESIS	71
IV.	OBJETIVOS	75
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	79
1.	SUJETOS DE ESTUDIO	79
2.	POBLACIONES CELULARES	80
2.1	Criterios de inclusión	80
2.2	Obtención de las poblaciones celulares	82
2.2.1	Células mononucleadas de bazo	82
2.2.2	Células mononucleadas de sangre periférica	83
2.2.3	Monocitos de sangre periférica	83
2.2.4	Linfocitos T CD4+	84
2.3	Análisis del inmunofenotipo celular	84

3. ESTUDIOS LINFOPROLIFERATIVOS	85
3.1 <i>Proliferación de linfocitos T CD4+ frente a MC</i>	85
3.2 <i>Cuantificación de citocinas</i>	88
4. GENERACIÓN DE DCs	89
4.1 <i>Generación, in vitro, de DCs en pacientes sometidos a TxH</i>	89
4.2 <i>Generación, in vitro, de DCs de donantes sanos</i>	90
4.2.1 <i>Generación de DCs inmaduras</i>	91
4.2.2 <i>Generación de DCs expuestas al FK</i>	91
4.2.3 <i>Generación de DCs expuestas a NS3</i>	91
4.2.4 <i>Generación de DCs expuestas al FK y NS3</i>	92
4.2.4.1 <i>Funcionalidad de DCs expuestas al FK y NS3</i>	92
4.2.4.1.1 <i>Producción de IL-12p70</i>	92
4.2.4.1.2 <i>Translocación del factor nuclear NF-κB</i>	93
4.2.4.2 <i>Ensayo de endocitosis</i>	93
4.2.5 <i>Análisis del inmunofenotipo celular</i>	94
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
5.1 <i>Método Bayesiano</i>	95
VI. RESULTADOS	99
1. DATOS CLÍNICOS	99
2. ESTUDIO LINFOPROLIFERATIVO	103
2.1 <i>Por grupos</i>	103
2.2 <i>Por individuos</i>	105
2.2.1 <i>Probabilidad de rechazo. Análisis de Bayes</i>	108
3. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS	109
3.1 <i>Pacientes con episodios de rechazo</i>	109
3.2 <i>Pacientes sin episodios de rechazo</i>	110
3.3 <i>Pacientes VHC+</i>	112
4. CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CANDIDATOS A RETIRADA DE LA INMUNOSUPRESIÓN	115

5. CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE DCs EN PACIENTES SOMETIDOS A TxH POR VHC	117
5.1 <i>En pacientes VHC+ con recidiva viral</i>	117
5.2 <i>En pacientes VHC+ sin recidiva viral</i>	119
6. EFECTO DEL FK EN LA MADURACIÓN DE DCs PROCEDENTES DE DONANTE SANO	121
6.1 <i>Análisis por citometría de flujo de DCs y DCs+FK</i>	121
6.2 <i>Análisis por citometría de flujo de DCs+NS3 y DCs+FK+NS3</i>	124
6.3 <i>Ensayo de endocitosis</i>	127
6.4 <i>Producción de IL-12p70</i>	128
6.5 <i>Translocación del factor NF-κB</i>	129
 VII. DISCUSIÓN	 133
 VIII. CONCLUSIONES	 151
 IX. BIBLIOGRAFÍA	 159
 X. ABREVIACIONES	 179
 XI. PUBLICACIONES	 185

RESUMEN

RESUMEN

Actualmente, el trasplante hepático (TxH) es el tratamiento de numerosas enfermedades que abocan a una insuficiencia hepática aguda fulminante o, más frecuentemente, a una fase final de una hepatopatía crónica irreversible.

Los efectos secundarios asociados al empleo indiscriminado de drogas inmunosupresoras y el hecho de que un 20% de los pacientes sometidos a TxH desarrollen tolerancia al injerto tras una retirada total de la inmunosupresión (tolerancia operacional) promueve una investigación orientada a la búsqueda de técnicas de laboratorio con carácter predictivo de evolución clínica.

El objetivo de este estudio, propuesto por el Servei de Cirurgiahepatobiliopancreàtica i Trasplantaments de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona, fue doble. Por una parte identificar, mediante un modelo de respuesta celular antígeno específico, aquellos pacientes que tras someterse a TxH pudiesen ser candidatos a una retirada parcial o total de la inmunosupresión. Por otra parte estudiar el efecto del Tacrolimus (FK) sobre la capacidad madurativa de células dendríticas (DCs), como células presentadoras de antígeno.

El estudio se realizó sobre un total de 10 pacientes (6 pacientes VHC+ y 4 pacientes VHC-) y en tres fases bien diferenciadas: a) fase previa al TxH (PreTx), b) durante el segundo mes del TxH (2M) y, c) durante el sexto mes del TxH (6M). El tratamiento inmunosupresor administrado a los pacientes se basaba en distintas combinaciones de FK, corticoesteroides, micofenolatomofetil y anti-CD25.

Los resultados obtenidos en el modelo celular de respuesta linfoproliferativa sugieren que la pauta inmunosupresora administrada in vivo afecta a la respuesta celular in vitro. Este dato permitió obtener una variable (Índice de Estimulación; I.E.) con valor predictivo de evolución clínica (tendencia al rechazo del injerto cuando el I.E. > 1 o con tendencia a la aceptación del injerto cuando I.E. < 1). Además, los resultados correspondientes a la cuantificación de citocinas Th1 (proinflamatorias) y Th2 (tolerogénicas) ponen de manifiesto que la pauta inmunosupresora reduce los

niveles de citocinas Th1, siendo los niveles de Th2 (IL-10) una variable con un posible valor predictivo de evolución clínica del paciente trasplantado.

En el grupo de pacientes VHC, los niveles de Th1 descendieron durante el tratamiento inmunosupresor en comparación con los niveles de Th1 obtenidos en el PreTx. No obstante, el patrón de Th2 (IL-10) fue diferencial según los individuos presentaban o no recidiva viral; en el 100% de los pacientes con recidiva viral los niveles de IL-10 aumentaron durante el segundo y sexto mes en comparación con los niveles de IL-10 obtenidos durante el PreTx. Por el contrario, en el grupo de pacientes sin recidiva viral los niveles de IL-10 disminuyeron en un 66,6% de los casos. Estos resultados sugieren que una disminución de citocinas Th1 juntamente con un aumento de los niveles de IL-10 podría ser un mecanismo favorecedor de la progresión viral al quedar disminuida la presión ejercida por parte del sistema inmune del huésped frente al virus. Esta hipótesis se refuerza con los resultados obtenidos tras analizar el inmunofenotipo de las DCs; en el grupo de pacientes con recidiva viral se observa una disminuida expresión de las moléculas involucradas en la presentación antigénica (moléculas de adhesión y coestimulación).

Por otra parte, los resultados obtenidos tras la estimulación de DCs con proteína no estructural (NS3) del VHC indicaron que ésta incrementó la expresión de moléculas de coestimulación y de adhesión (CD80, CD83, CD86 y CD54). Sin embargo, cuando las DCs se incubaban, previamente, con FK, éste reducía ($p < 0,05$) la expresión de marcadores de maduración celular (CD1a, CD80, CD83) y también reducía los niveles de IL-12p70; un proceso que tiene lugar a través de la inhibición de la translocación del factor nuclear NF- κ B.

Podemos concluir, por lo tanto, que el modelo celular ha permitido, mediante el empleo de técnicas no invasivas, identificar unos parámetros (I.E., probabilidad de rechazo, niveles de citocinas proinflamatorias y tolerogénicas e inmunofenotipo de DCs) identificativos de un perfil de respuesta inmunológica del paciente trasplantado. La concordancia entre los resultados experimentales y la evolución clínica de cada uno de los pacientes sugiere que los parámetros indicados podrían ser una herramienta de considerable interés clínico en el momento de identificar aquellos pacientes candidatos a una retirada parcial o total de la pauta inmunosupresora.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. El Trasplante Hepático. Aspectos Generales

Un trasplante o injerto es la transferencia de células vivas, órganos o tejidos de una parte del organismo a otra o incluso de un individuo a otro. Actualmente, los trasplantes en clínica humana se han convertido en el tratamiento de elección en el fracaso de la funcionalidad de órganos tales como el riñón, el hígado o el corazón. Igualmente, el trasplante de médula ósea representa, hoy por hoy, la terapia más adecuada para determinadas inmunodeficiencias y síndromes linfoproliferativos, especialmente leucemias.

En el caso concreto del trasplante hepático (TxH), éste resulta actualmente el tratamiento de numerosas enfermedades que abocan a una insuficiencia hepática aguda fulminante o más frecuentemente, a una fase final de una hepatopatía crónica irreversible. Este tratamiento, que comporta una técnica quirúrgica de alto nivel, fue aplicado por primera vez en 1963 siendo su pionero el doctor Thomas Starzl de la Universidad de Colorado, USA (Starzl *et al.*, 1963).

Starzl llevó a cabo el TxH de manera experimental en tres pacientes lográndose una supervivencia, tras el acto quirúrgico, de tan solo tres semanas. Su primer éxito fue en 1967 al aumentar, en un año, la supervivencia postrasplante. Aunque la técnica quirúrgica empleada continuó siendo experimental durante los años 70, fue capaz de lograr supervivencias de alrededor del 25% al año del trasplante.

Los avances logrados en las dos últimas décadas en distintos aspectos técnicos tales como la preservación del injerto, la profilaxis, los cuidados en el pre y post operatorio así como el conocimiento de la inmunología del rechazo del injerto y el manejo de inmunosupresores, han permitido alcanzar supervivencias del orden del 80% y 60% al año y a los 5 años del TxH, respectivamente. No obstante, las alteraciones en la microcirculación del órgano trasplantado, las lesiones de la pared del endotelio vascular y la activación de una respuesta aloinmune mediada por células T durante la reperusión, son algunos de los factores implicados en la disfunción del aloinjerto por medio de la generación de radicales libres de oxígeno (Land *et al.*, 1994).

I. Introducción

Aunque la introducción de la ciclosporina en los años 80, como droga inmunosupresora, revolucionó el campo del trasplante, la introducción de nuevos agentes inmunosupresores con mayor efectividad no ha solucionado los problemas asociados al uso continuado de los mismos. Estos problemas residen en: aparición de infecciones oportunistas, nefrotoxicidad, hipertensión arterial e hiperlipemia y tumores de novo. Además, existen evidencias del efecto negativo de la inmunosupresión sobre la progresión del virus de la hepatitis C en pacientes infectados y trasplantados. En este sentido, aunque la inmunosupresión favorece la supervivencia del injerto, también puede jugar un papel potenciador de la recidiva del virus C (De Ruvo *et al.*, 2005).

Por otra parte, la norma universalmente aceptada del empleo continuado de drogas inmunosupresoras para favorecer la supervivencia del injerto se está cuestionando. Existen en la bibliografía científica evidencias según las cuales algunos pacientes son capaces de mantener una función hepática normal tras el abandono espontáneo de las drogas inmunosupresoras a causa de infecciones graves (Uehling *et al.*, 1976; Zoller *et al.*, 1980; Starzl *et al.*, 1993; Burlingham *et al.*, 1995). Estas observaciones hacen pensar en que la tolerancia al injerto es posible.

En este sentido, los efectos adversos del empleo continuado de drogas inmunosupresoras, la falta de especificidad de los inmunosupresores así como los resultados empíricos obtenidos a raíz de un uso clínico poco selectivo e indiscriminado de los mismos promueve la investigación no solo de nuevos inmunosupresores sino también estrategias alternativas de administración. En la actualidad, una de las propuestas reside en la reducción o incluso la retirada parcial o completa de todas las drogas inmunosupresoras administradas en las pautas de doble o triple terapia. El principal inconveniente reside en la identificación de los candidatos, la cual debería estar basada no solo en la evolución clínica del paciente sino también en métodos de laboratorio que permitiesen una predicción del rechazo.

Si bien existen estudios clínicos orientados a este objetivo, no existe hasta la actualidad un consenso sobre qué tipo de técnicas de laboratorio podrían aportar esta información y, por lo tanto, las más adecuadas en el momento de identificar a los candidatos. Una de las principales causas reside en la falta de series amplias de estudio que aporten conclusiones relevantes. Otra es la sensibilidad de las técnicas actuales de laboratorio. Es de mención, también, el hecho de que algunas de las

técnicas parecen adecuadas para un determinado modelo de trasplante pero inadecuadas para otros.

Ante esta situación, la propuesta de la Unidad de Cirugía-Hepato-Bilio-Pancreática del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona fue la de establecer un sistema efectivo de recogida, almacenamiento y posterior procesamiento de muestras celulares obtenidas tanto del donante como del receptor de un TxH con el fin de monitorizar, mediante técnicas de caracterización inmunológica antígeno específico, la respuesta del receptor al aloinjerto. Se pretendía identificar aquellos pacientes que, tras un TxH, fuesen candidatos a una posible disminución o retirada parcial de la inmunosupresión.

1.1 Indicaciones del TxH

*E*n general, el TxH está indicado en aquellas pacientes con enfermedad hepatobiliar progresiva e irreversible, cuando se hayan agotado otras terapias, cuya esperanza de vida, al año, sea inferior a la del propio trasplante y, siempre, bajo una serie de criterios.

Las indicaciones para la inclusión o exclusión de candidatos al TxH pueden sufrir modificaciones dependiendo de la situación clínica de cada paciente, el diagnóstico y la repercusión sistémica de su patología.

Se han definido seis grupos principales de indicaciones del TxH:

1) Hepatopatías crónicas

En este grupo distinguimos a hepatopatías parenquimatosas y las hepatopatías colestásicas. En las hepatopatías parenquimatosas cabe citar la cirrosis etílica y la causada por el virus de la hepatitis C que suponen más del 70% de las indicaciones de TxH. De las hepatopatías colestásicas, las más frecuentes son la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria y la atresia de vías biliares (principal indicación de TxH en la infancia). Las enfermedades de origen vascular (síndrome de Budd-Chiari y enfermedad veno-oclusiva) son menos frecuentemente indicaciones de TxH.

I. Introducción

2) La insuficiencia hepática aguda grave

Se define como la aparición de encefalopatía hepática en las primeras ocho semanas desde el primer síntoma de enfermedad hepática. Es una indicación poco habitual de TxH. Sus principales causas son infecciones virales, agentes tóxicos (fundamentalmente paracetamol) o, más frecuentemente, desconocidas. Los criterios utilizados más frecuentemente para indicar el TxH son los del King's College (O'Grady *and* Williams, 1989).

3) Tumores hepáticos

El TxH se ha indicado en distintos tumores hepáticos primarios o secundarios, pero el más frecuente es el hepatocarcinoma. Este tumor afecta de forma casi exclusiva a pacientes con cirrosis hepática, lo que limita la resección hepática, incluso en los casos en que se detecten de forma precoz. Diversos estudios han comprobado que los pacientes con grandes lesiones tumorales o con lesiones multicéntricas tienen una elevada frecuencia de recidiva tumoral. Por ello, aunque los límites varían en los distintos grupos, la mayoría indica el trasplante en pacientes que tengan un único hepatocarcinoma inferior o igual a cinco centímetros de diámetro como máximo o que presenten tres lesiones tumorales ninguna de ellas superior a 3 cm (Mor *et al.*, 1998). Otros tumores en los que se acepta el TxH son el hepatocarcinoma fibrolamelar, el hepatoblastoma, el hemangioendotelioma epiteliode y casos seleccionados de metástasis de tumores neuroendocrinos. Sin embargo, el TxH no se considera una opción aceptable en el angiosarcoma ni en metástasis de otros tumores, porque la incidencia de recidiva es elevadísima.

4) Enfermedades metabólicas

Se incluye a la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson y el déficit de alfa-1-antitripsina. En otros casos, tales como en la polineuropatía amiloidótica familiar o en la hiperoxaluria primaria, el hígado es morfológica y funcionalmente

normal, pero tiene un defecto enzimático que es responsable de una enfermedad sistémica.

5) El retrasplante como consecuencia del fracaso de la función del injerto hepático

Se encuentra indicado en dos tipos de situaciones: urgente y electivo. El retrasplante urgente, en el postoperatorio inmediato del trasplante, se realiza en el caso de fallo primario del injerto, de complicación técnica (fundamentalmente trombosis de la arteria hepática) y, excepcionalmente en el rechazo hiperagudo. El retrasplante electivo se realiza fundamentalmente en casos de rechazo crónico y de recidiva de la enfermedad de base (cirrosis colostáticas y cirrosis por virus C, entre otras) y, menos frecuentemente, por consecuencias tardías de complicaciones vasculares o biliares.

6) Miscelánea de indicaciones de TxH

La poliquistosis hepática, hiperplasia nodular regenerativa y traumatismo hepático. En estas indicaciones, el número de TxHs realizados es muy escaso.

1.2 Contraindicaciones del TxH

Las contraindicaciones para el TxH pueden ser absolutas o relativas. Las contraindicaciones absolutas hacen referencia a aquellas enfermedades extrahepáticas cuyo pronóstico a corto plazo sea muy malo y/o las situaciones en las que se conoce que la supervivencia después del TxH es muy mala. Un ejemplo lo tenemos con el SIDA. Esta enfermedad tiene un pronóstico muy malo a corto plazo, que probablemente empeorará con el tratamiento inmunosupresor, por lo que en principio es una contraindicación absoluta para el TxH. Sin embargo, los actuales tratamientos antirretrovirales combinados se asocian a una mejoría del pronóstico.

Por ello, pese a que las primeras experiencias con el trasplante en estos pacientes fueron muy malas, se han realizado algunos trasplantes de órganos en

I. Introducción

situaciones controladas en pacientes con tratamiento antirretroviral combinado con resultados prometedores.

Algunas contraindicaciones absolutas, como la existencia de sepsis extrahepática activa, neoplasia extrahepática reciente, alcoholismo o toxicomanía o infección replicativa por el virus de la hepatitis B (por la elevada incidencia de recidiva de la infección en estos casos) son transitorias. En pacientes con cirrosis etílica se espera al menos 6 meses de abstinencia de alcohol antes de realizar un TxH. La mayoría de los tumores malignos se consideran curados 5 años después de su tratamiento. Este periodo de 5 años se utiliza habitualmente como punto de corte para contraindicar el TxH por tener antecedentes de neoplasia. Sin embargo, en algunos casos, la supervivencia esperable sería muy baja si se completara este plazo; por ello, el plazo puede acortarse de forma individualizada, siempre y cuando sea valorado por un comité de expertos (salvo tumores *in situ* o neoplasias cutáneas).

Las contraindicaciones relativas se producen cuando existen condiciones que aumentan la morbilidad y mortalidad relacionadas con el TxH, aunque de forma aislada no contraindican el TxH. La coexistencia de varias de estas condiciones puede incrementar el riesgo hasta el punto de suponer una contraindicación absoluta.

2. Inmunología del Trasplante

Existen diferentes tipos de trasplante atendiendo a la relación entre donante y receptor. En este sentido hablaremos de autotrasplante, trasplante singénico, alotrasplante y xenotrasplante.

Se habla de autotrasplante cuando el donante y receptor del injerto es el mismo individuo; de trasplante singénico, cuando el trasplante se efectúa entre dos individuos que son genéticamente idénticos (gemelos univitelinos o animales de experimentación seleccionados); de alotrasplante cuando se realiza entre dos individuos diferentes pertenecientes a la misma especie y, por último, se habla de xenotrasplante cuando el trasplante se realiza entre dos individuos de especies distintas.

Las diferencias genéticas entre donante y receptor son, precisamente, las responsables de que el receptor del injerto ponga en marcha una respuesta inmunitaria denominada de rechazo que va dirigida contra las estructuras extrañas presentes en las células del órgano o tejido trasplantado.

2.1 Histocompatibilidad en el trasplante

2.1.1 El complejo mayor de histocompatibilidad

El rechazo inmunológico de los órganos trasplantados está inducido por unas proteínas que, cumpliendo la misma función, difieren ligeramente de unos individuos a otros; son las llamadas proteínas polimórficas. Estas proteínas son reconocidas como extrañas por el sistema inmunológico de los diferentes individuos de la misma especie y pueden desencadenar la respuesta de rechazo. Las proteínas polimórficas que con mayor facilidad desencadenan el rechazo son las proteínas codificadas por un conjunto de genes situados en el brazo corto del cromosoma 6 (**Figura 1.1**) que se denominan complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

I. Introducción

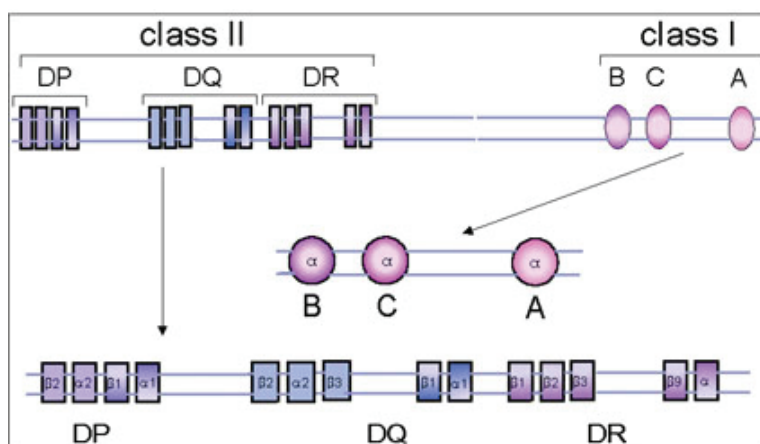


Figura 1.1 Genes del MHC humano en el cromosoma 6. Fuente: Roitt I et al., *Immunology*, 5th ed.

Los genes del MHC o HLA (*Human Leukocyte Antigens*) en el caso de los humanos, codifican una serie de moléculas presentes en la superficie de las células responsables del grado de compatibilidad o incompatibilidad entre donante y receptor. Dependiendo de su localización cromosómica, los antígenos MHC se han clasificado en dos grupos: antígenos de Clase I y antígenos de Clase II.

2.1.1.1 Los antígenos MHC de Clase I

Los genes del MHC de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) sintetizan las moléculas encargadas de presentar antígenos peptídicos a los linfocitos T CD8⁺. Dentro de la región I también encontramos otros genes de polimorfismo muy bajo o nulo, conocidos como *class I-like genes* (HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J y HLA-X). Los antígenos de clase I están formados por dos cadenas polipeptídicas. La cadena ligera es una β -2 microglobulina no polimórfica, de 12.000 Da de peso molecular codificada por un gen del cromosoma 15. La cadena pesada alfa (α), de 45.000 Da, sí es polimórfica y le confiere la especificidad antigénica (Bodmer et al., 1992; Daar et al., 1984). Esta cadena α posee tres segmentos que se numeran desde el extremo N-terminal, α 1, α 2, y α 3. Los segmentos α 1 y α 2 interactúan separados por un segmento en lámina plegada β para formar el sitio de unión al péptido. Este espacio creado es lo suficientemente grande para que quepan péptidos de un tamaño comprendido entre 8

y 11 aminoácidos. El segmento $\alpha 3$ se pliega para formar un dominio tipo Ig, este segmento contiene un bucle que sirve de unión a la molécula CD8. Tres antígenos de clase I se han considerado en la tipificación para el trasplante de órganos. Estos son: HLA-A, B y C. Los antígenos HLA A y B se expresan en todas las células nucleadas del organismo. Los antígenos HLA- A, B y algo menos el C, son extremadamente polimórficos (**Figura 1.2**).

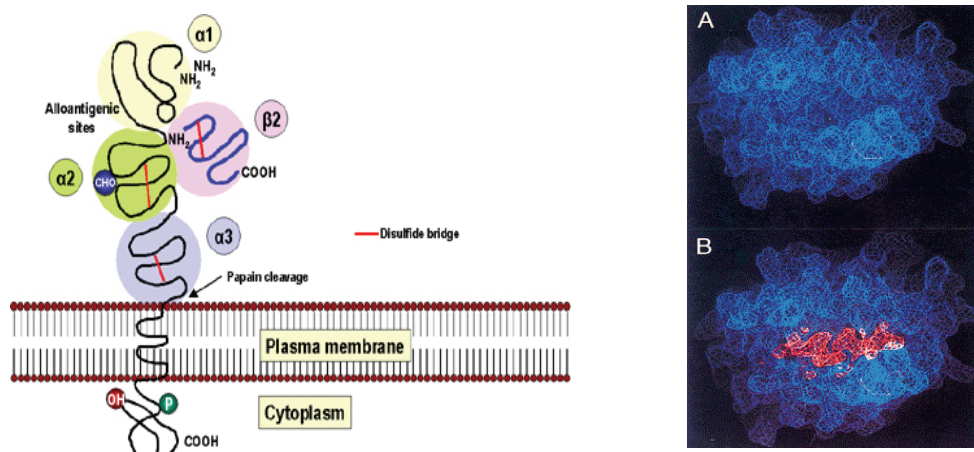


Figura 1.2 Molécula MHC de clase I mostrando la cadena α (segmentos $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$). **A)** Sitio de unión al antígeno de la molécula de clase I. Los segmentos $\alpha 1$ y $\alpha 2$, del extremo amino terminal interaccionan y forman el sitio de unión al péptido. **B)** Sitio de unión a péptido con péptido unido (rojo), su tamaño es suficientemente grande para unir péptidos de 8 a 11 residuos de aminoácidos en una conformación flexible y extendida, los extremos de esta hendidura están cerrados de manera que péptidos de mayor tamaño no pueden encajar. Fuente: Roitt T I et al., *Immunology*, 5th ed.

2.1.1.2 Los antígenos MHC de Clase II

Los genes HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR codifican las moléculas de clase II del MHC cuya función consiste en presentar los antígenos peptídicos a los linfocitos T $CD4^+$. Dentro del locus clase II se encuentran también genes que codifican varias proteínas encargadas del procesamiento del antígeno. Una de ellas es el heterodímero TAP (transportador asociado con el procesamiento del antígeno), encargado de transportar los péptidos desde el citosol al interior del retículo endoplásmico. Otros genes codifican subunidades del proteasoma. Además de estos genes, también se

I. Introducción

ubican en el locus del MHC II a un par de genes que codifican la proteína HLA-DM que esta involucrada en la unión del péptido a la molécula de clase II.

Los antígenos de Clase II (**Figura 1.3**) están formados por dos cadenas polipeptídicas: la cadena α , con un peso molecular de 29.000 Da, y la cadena β , de 34.000 Da. Ambas cadenas están codificadas por genes de la región D del cromosoma 6 (Bjorkman *et al.*, 1987). Comúnmente, los antígenos de clase II se denominan HLA-DR. Estos antígenos presentan una menor distribución en las células del organismo que los de clase I. Se expresan fundamentalmente en los linfocitos B, en las células presentadoras de antígeno (APC) y en el endotelio vascular siendo regulada su expresión por el interferón y por el factor de necrosis tumoral (TNF) (Bodmer *et al.*, 1992; Daar *et al.*, 1984).

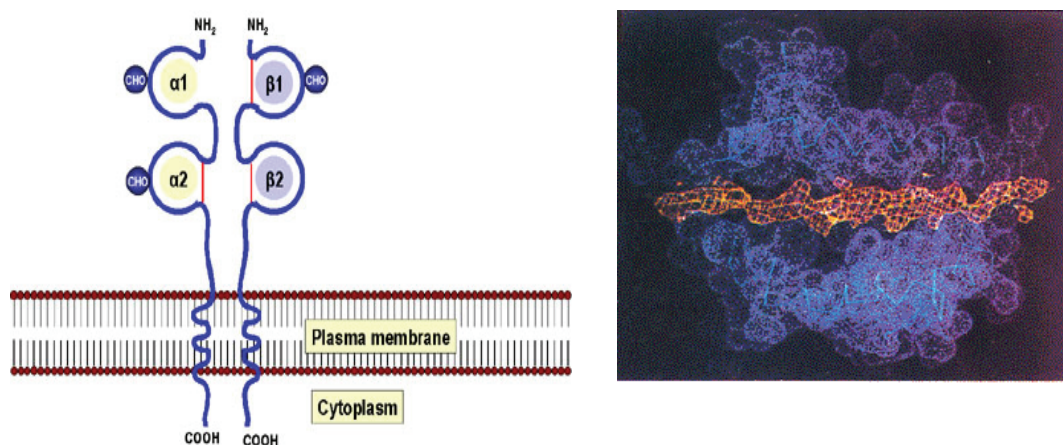


Figura 1.3 Molécula MHC de clase II mostrando las cadenas α y β así como el sitio de unión al antígeno al péptido (rojo). Fuente: Roitt *et al.*, *Immunology*, 5th ed.

Los extremos $\alpha 1$ y $\beta 1$ del extremo amino terminal de las moléculas de clase II interaccionan y forman la hendidura de unión al péptido, estructuralmente similar a la de clase I. En las moléculas de clase II, los extremos de la hendidura de unión al péptido están abiertos de manera que pueden unir péptidos de 10 a 20 residuos.

Otros antígenos relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad son los denominados de clase III (C2, C4a y el Bf) relacionados con el sistema del complemento (Bjorkman *et al.*, 1987).

La presencia en los órganos injertados de moléculas HLA distintas a las del receptor (situación de incompatibilidad HLA) provoca en éste el desarrollo de anticuerpos y células T citotóxicas dirigidas frente a dichas moléculas, lo que conduce al rechazo de dicho órgano. Este proceso se conoce como reacción del huésped contra el injerto. En estos casos, el patrón de respuesta inmunológica del receptor y el tiempo que tarda en manifestarse pueden variar en función de los componentes inmunitarios que intervengan y por el estado inmunológico del receptor. En este sentido podemos clasificar el rechazo en hiperagudo o fulminante, acelerado, agudo y crónico o ductopénico, tal y como se comentará más adelante.

Por el contrario, si las moléculas HLA presentes en el órgano injertado son iguales a las del receptor (situación de compatibilidad HLA), se reduce en gran medida la incidencia y la severidad del rechazo, aumentando por tanto la supervivencia del injerto.

Analizando el tiempo de supervivencia del injerto, se ha demostrado que cuanto mayor es la compatibilidad HLA mayor es la supervivencia de los mismos. La supervivencia a largo plazo (sobre todo después de los 5 primeros años), es mayor cuanto mayor sea el grado de compatibilidad HLA, sobre todo en lo que se refiere a las moléculas de clase II. Por ello, es necesario realizar la tipificación HLA de aquellos pacientes que entran en lista de espera para recibir un determinado órgano. En el momento en que se produce una donación de cadáver, se realiza la tipificación HLA del donante, lo que permite seleccionar los mejores receptores de entre todos los candidatos que figuran en la lista de espera.

El hecho de que la compatibilidad HLA de clase II sea más importante que la de clase I en el trasplante de órganos no está totalmente aclarado pero parece tener su origen en la manera como se induce la respuesta inmune. Se sabe que los linfocitos T $CD4^+$, sólo son capaces de reconocer las moléculas que le son presentadas en la superficie de las células, unidas a moléculas de clase II (restricción por clase II), por el contrario, los linfocitos T $CD8^+$, sólo son capaces de reconocer moléculas que le son presentadas en la superficie de las células unidas a moléculas de clase I (restricción por clase I). Como la activación de las células T $CD8^+$ requiere la participación de células T $CD4^+$ activadas, es bastante lógico pensar que las diferencias en las moléculas de clase II induzcan una respuesta allogénica más intensa que las diferencias en las moléculas de clase I.

2.1.2 El complejo menor de histocompatibilidad

*E*xisten otros antígenos, los llamados antígenos del complejo menor de histocompatibilidad, que participan, también, en el rechazo.

Estudios en roedores demuestran la capacidad del rechazo de los animales trasplantados entre gemelos con idéntico HLA, con o sin inmunosupresión (Peffer *and* Thorsby, 1982). Ello hace pensar que ciertos antígenos detectados en la superficie de las células endoteliales o los monocitos podrían ser importantes en los mecanismos de rechazo. Los casos de rechazo y de enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) en pacientes trasplantados, entre individuos gemelos de idéntico HLA o entre individuos sin parentesco pero con excelente compatibilidad HLA, pone de manifiesto la presencia de antígenos no controlados por el complejo mayor de histocompatibilidad humano (Goulmy *et al.*, 1982). Un ejemplo lo tenemos en el trasplante renal donde un 30% de los pacientes que reciben injertos renales de individuos con idéntico HLA presentan rechazo.

2.1.3 Antígenos sanguíneos ABO

*L*os antígenos sanguíneos del sistema ABO se expresan en otras células y tejidos además de en los hematíes. Se detectan en los leucocitos y en algunas plaquetas, en las células endoteliales de muchos órganos y vasos sanguíneos y en algunas células epiteliales. En todos los individuos existen unos anticuerpos naturales, las isoaglutininas, que actúan contra el resto de antígenos sanguíneos diferentes a los del propio individuo.

Los antígenos ABO también se hallan en los componentes celulares del hígado. Aunque se han publicado casos de TxH sin incidencias bajo incompatibilidad ABO, la presencia de éstos antígenos en el hígado no hace aconsejable el TxH en situación electiva aunque sí se puede justificar en ciertos casos de extrema urgencia, donde la espera de un injerto compatible supone un riesgo elevadísimo. En este caso el TxH con un órgano incompatible puede suponer un puente, en aproximadamente el 40-50% de los casos, al trasplante definitivo con un órgano compatible (Gugenheim *et al.*, 1990).

3. Base inmunológica del trasplante y su tratamiento

3.1 El rechazo

En el *Internacional Working Party* se entiende por rechazo a la reacción fisiológica del sistema inmunitario del organismo contra la presencia de tejidos u órganos extraños con capacidad para producir disfunción o pérdida del injerto.

En el TxH el rechazo se presenta en el 50-80 % de los pacientes, y es el responsable de la pérdida del 5 al 15% de los injertos (Adams *and* Neuberger, 1991). Esta reacción se dirige principalmente contra las células del epitelio biliar y del endotelio de la arteria y venas intrahepáticas del injerto, lo que sugiere que son los antígenos presentes en estas células los que, expresados junto a las moléculas del sistema HLA, desencadenan la respuesta inmune.

Las dos lesiones características que se producen como consecuencia de esta respuesta inmunológica son la ductopenia y la arteriopatía obliterante. La ductopenia se caracteriza por la destrucción progresiva de los conductos biliares (interlobulillares y septales) intrahepáticos que lleva a su desaparición a medida que progresa el cuadro. La arteriopatía se produce por una proliferación intimal y subintimal, con infiltración por macrófagos del receptor con citoplasma espumoso, que origina la obliteración de la luz vascular.

El rechazo se ha clasificado en cuatro grandes síndromes clínicos, de terminología aún controvertida. El primero se refiere al rechazo hiperagudo o rechazo fulminante que se produce sólo horas o incluso minutos después de realizado el injerto; el segundo al rechazo acelerado que se manifiesta durante los primeros días postransplante; el tercero al rechazo agudo, aquel que se produce en el primer mes postransplante y, el cuarto al rechazo crónico o ductopénico, que se produce meses o años después del trasplante (Demetris *et al.*, 1995).

Mientras que en el rechazo hiperagudo y acelerado son los anticuerpos preexistentes en el suero del receptor frente a las moléculas HLA los responsables del rechazo del injerto, en el agudo no se conoce el mecanismo exacto aunque los hallazgos histológicos y la respuesta a la terapia inmunosupresora indican que en él intervienen tanto la inmunidad específica (humoral y celular) como otros mecanismos

I. Introducción

no específicos (respuesta inflamatoria con estimulación de polimorfonucleados, plaquetas y macrófagos, etc.). La etiología del rechazo crónico continúa, actualmente, sin conocerse con exactitud.

En la prevención del rechazo y de GVHD se puede actuar a diferentes niveles. Antes del trasplante, buscando la máxima compatibilidad posible entre el donante y el receptor y asegurándose de que, en todo caso, el receptor no tiene anticuerpos preformados contra los antígenos HLA del donante; y después del trasplante con el uso de una terapia inmunosupresora adecuada a cada caso. La compatibilidad HLA (sobre todo para el locus HLA-DRB1*) aumenta la supervivencia del injerto en todos los tipos de trasplantes, salvo en el TxH.

En TxH los resultados de supervivencia del órgano en relación con la compatibilidad HLA del donante y receptor son contradictorios e incluso se ha asociado un mayor grado de compatibilidad con una mayor incidencia de rechazo. La explicación a este hecho, en principio sorprendente, podría ser que mecanismos inmunológicos distintos del rechazo podrían contribuir al fallo hepático. Esta respuesta inmunológica podría estar dirigida frente a antígenos virales o asociarse a enfermedades autoinmunes que operen a través de mecanismos restringidos por moléculas HLA (Duquesnoy *et al.*, 1991). Por lo tanto en el TxH el papel de la compatibilidad HLA podría ser dual. La compatibilidad reduciría el riesgo de rechazo, pero aumentaría la posibilidad de que se produjeran otro tipo de reacciones inmunológicas dirigidas contra el hígado injertado y posterior deterioro del mismo (Markus *et al.*, 1988).

En la década de los años 80, el grupo de O'Grady demostró que los pacientes que presentaban buena compatibilidad DR presentaban una mayor incidencia de hepatitis por citomegalovirus, lo que conllevaba una mayor incidencia de rechazos crónicos del injerto hepático (O'Grady *et al.*, 1988). Estudios publicados por el grupo de la Universidad de Pittsburg ponen de manifiesto el efecto dual de la compatibilidad HLA en el TxH, demostrando un riesgo superior de recurrencia de virus B, C y citomegalovirus en aquellos pacientes con mejor compatibilidad HLA-DR (Mañez *et al.*, 1993; Mañez *et al.*, 1995). Sin embargo, ningún grupo se plantea el TxH bajo compatibilidad HLA-DR, como en el caso del trasplante renal, dado que el hígado es un órgano vital que no tiene ningún sistema artificial permanente de sustitución.

3.2 Inmunología del rechazo

En un trasplante, el rechazo se origina al introducir, en el receptor, células del donante con antígenos de histocompatibilidad distintos a los del receptor. No obstante, no está claro el mecanismo exacto de reconocimiento y activación linfocitaria.

Existen dos posibles mecanismos: uno directo y otro indirecto. En el directo, las células presentadoras de antígeno (CPA) del órgano donado, muy probablemente células dendríticas, presentan sus MHC de clase II junto con los péptidos antigénicos correspondientes y ello es reconocido como extraño por los linfocitos T $CD4^+$ del receptor que continuamente están circulando por el organismo (**Figura 1.4**). En el indirecto, que tiene lugar en los nódulos linfáticos del receptor, son las propias CPA del receptor las encargadas de procesar y presentar, con sus propias MHC de clase II, los antígenos del donante a las células T del receptor. Es este último mecanismo de activación el que se cree que es el más importante en el rechazo en el TxH.

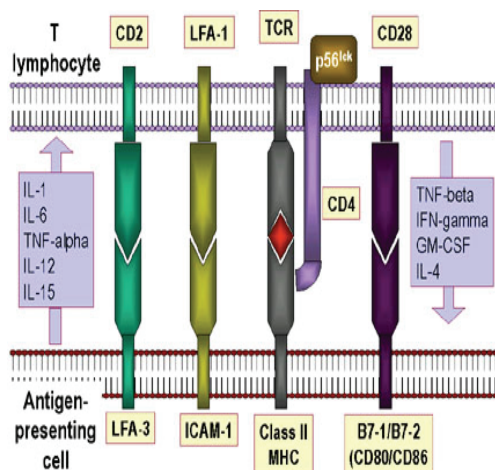


Figura 1.4 Moléculas implicadas en la interacción entre célula $CD4^+$ y CPA así como algunas de las citocinas producidas. Fuente: Roitt *et al.*, *Immunology*, 5th ed.

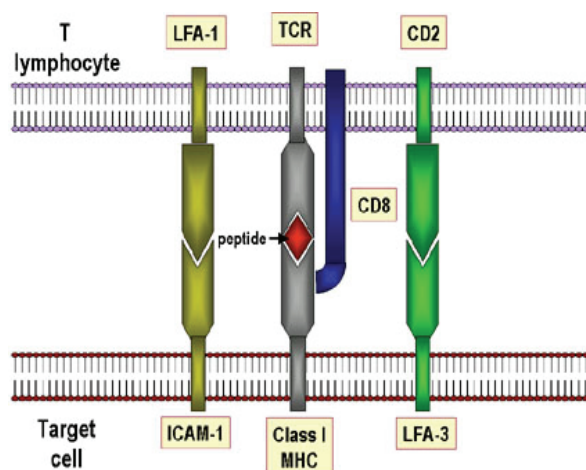


Figura 1.5 Moléculas implicadas en la interacción entre célula $CD8^+$ y CPA. Fuente: Roitt *et al.*, *Immunology*, 5th ed.

En cualquier caso, el reconocimiento se efectúa por reconocimiento entre la CPA y el linfocito T ($CD4^+$, si reconoce antígenos unidos a MHC de clase II o $CD8^+$, si reconoce antígenos unidos a MHC de clase I) mediante las correspondientes moléculas de adhesión (**Figura 1.4 y 1.5**); una vez logrado esto, se encajan los complejos MHC clase II-péptido con el receptor de célula T (TCR) y el CD3 transmite la señal de

I. Introducción

activación del TCR al interior de la célula T. No obstante, esta primera señal es insuficiente para la activación completa del linfocito T. Se precisa de una segunda señal producida por las moléculas denominadas de coestimulación las cuales tras unirse a su ligando originarán la activación total de la célula CD4⁺.

En la célula T, la molécula de coestimulación crítica es CD28, cuyos ligandos en la célula presentadora de antígeno son las moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). La activación final de la célula T comporta la activación de al menos 50 genes.

El TCR sólo lo poseen los linfocitos T y está siempre asociado a la molécula de CD3 (**Figura 1.6**). La función del CD3 es la de transmitir, al interior de la célula, la señal de activación del TCR. El TCR reconoce al conjunto MHC de clase I o de clase II con el antígeno (Ag) procesado. Estos reconocimientos sólo pueden llevarse a cabo si se logra una buena adhesión entre la CPA y la célula T, lo cual se consigue mediante las moléculas de adhesión.

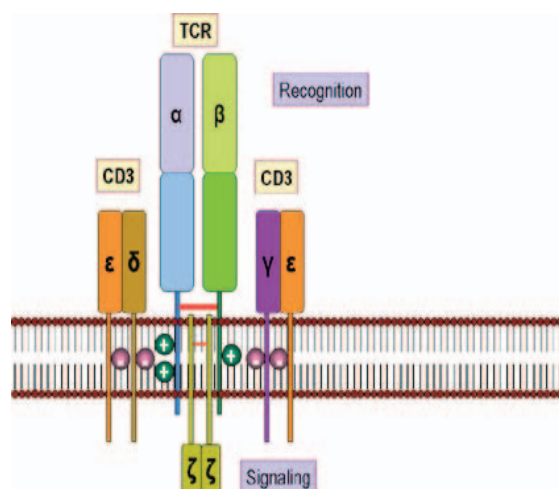


Figura 1.6 El TCR forma un complejo basado en cadenas polipeptídicas conocidas como CD3ε, CD3δ y CD3γ. Este complejo se denomina TCR/CD3. El heterodímero constituye la unidad de reconocimiento antigénico y las cadenas CD3 la unidad de señalización. Fuente: Roitt *et al.* *Immunology*, 5th ed.

Si bien se han descrito más de 20 moléculas de adhesión, caben destacar las siguientes: las moléculas CD4 y CD8 que reconocen y ligan porciones de molécula MHC de clase II y de clase I, respectivamente; las moléculas CD2 que se encuentran en los linfocitos y que se unen a su ligando LFA-3 (CD58) presente en las células CPA; y también caben destacar las moléculas pertenecientes a la familia de las integrinas tales como la LFA-1 presente en la membrana de los leucocitos y complementaria a las ICAM-1 e ICAM-2 que actúan como complementarias a las moléculas LFA-1 que se encuentran en un gran número de células del organismo (Frenette *and* Wagner, 1996 Part I; Frenette *and* Wagner, 1996 Part II).

I. Introducción

La presentación de un antígeno extraño en el contexto del complejo de clase II por la célula presentadora, induce la liberación de interleucina 1 (IL-1) por esta CPA y ello, junto a los eventos citados anteriormente, propicia la aparición, en la célula T, de receptores para la IL-2 así como un aumento de la actividad celular. El linfocito T activado comienza a producir IL-2 que unida a su receptor da lugar a una acción autocrina y paracrina (**Figura 1.7**).

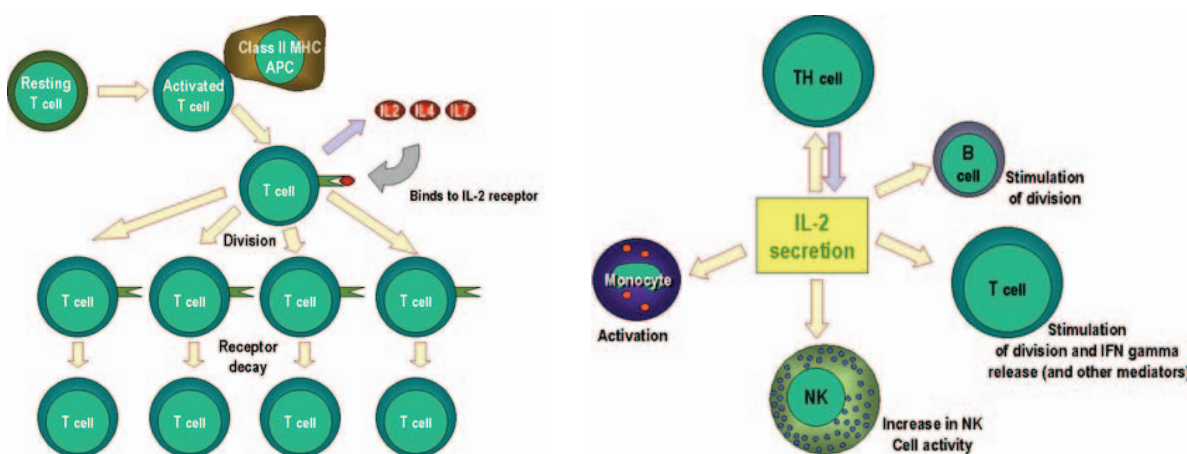


Figura 1.7 Cooperación entre células del sistema inmune. Fuente: Roit I et al., *Immunology*, 5th ed.

La acción autocrina origina la producción de más receptores para IL-2 e induce la proliferación y maduración de clones de linfocitos T CD4⁺. La acción paracrina tiene su efecto a nivel de los linfocitos T CD8⁺ y células NK, en ambos casos activándolas e induciendo su proliferación. Por otra parte, los linfocitos T CD4⁺ activados comienzan a producir otras interleucinas (IL-4, IL-6, Interferón- γ (IFN- γ)) que inician la proliferación y la maduración de los linfocitos B a células plasmáticas con producción de anticuerpos específicos contra los antígenos del donante. El IFN- γ activa a los macrófagos y estimula la expresión de MHC de clase II en las células no inmunes del injerto (hepatocitos), lo que fomenta la activación de linfocitos T del huésped. También estimula la aparición de moléculas de adhesión tipo ICAM-1 y de receptores TNF- α .

I. Introducción

De todo lo citado debemos destacar el papel primordial que los linfocitos T CD4⁺ tienen en el rechazo. Su acción es clave en este proceso y su manifestación final es la puesta en marcha de la reacción efectora del rechazo que se puede llevar a cabo de las siguientes formas:

a) Los linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos) sensibilizados y expandidos lisan directamente las células del órgano trasplantado que presentan moléculas de clase I; este es el tipo de rechazo más frecuente.

b) Los anticuerpos específicos circulantes, aunque no imprescindibles en la reacción de rechazo, se unen con el antígeno del donante y ello conlleva la activación del complemento por la vía clásica, cuya consecuencia es la producción de ciertas actividades biológicas, mediadas por los fragmentos C3a y C5a sobre todo, como quimiotaxis y aumento de la permeabilidad vascular que favorecen el aflujo masivo de polimorfonucleares y macrófagos al injerto y la destrucción del mismo por los enzimas lisosomales de aquellos y por el propio complemento; de esta forma se llevaría a cabo el rechazo hiperagudo en el caso de existir anticuerpos preformados en el receptor, por fortuna un acontecimiento más bien raro.

c) Los anticuerpos específicos se fijan sobre los antígenos de superficie de las células del injerto por la porción Fab, la porción Fc se une a células NK que llevan a cabo la lisis; este mecanismo de citotoxicidad se denomina citotoxicidad dependiente de anticuerpos. No se conoce la importancia de este mecanismo en el rechazo.

d) Las células NK podrían reconocer como extrañas a las células del injerto sin mediar las moléculas de clase I y II y dar lugar a la lisis directa de las mismas, mediante un mecanismo de inmunidad innata.

e) Finalmente las células T CD4⁺ activadas y reconocedoras de antígenos en clase II inducen la atracción de macrófagos hacia las células del injerto con liberación de sus enzimas y lisis de las mismas. A esto se le ha llamado hipersensibilidad retardada.

3.3 Prevención del rechazo. La inmunosupresión

Existen diferentes estrategias orientadas a la prevención de la activación de la respuesta inmune frente al injerto (Simmons, 1994). Estas estrategias están orientadas a:

- 1)** Destrucción pretrasplante de las células con capacidad inmunológica
- 2)** Impedir que los antígenos sean identificados por las clonas de linfocitos T
- 3)** Interferir con el procesamiento del antígeno por parte de las células del receptor
- 4)** Inhibir la transformación y proliferación de linfocitos
- 5)** Limitar la diferenciación de linfocitos a células NK o a células plasmáticas productoras de anticuerpos
- 6)** Activar un número suficiente de linfocitos supresores $CD4^+CD25^+$
- 7)** Inhibir la destrucción de las células del injerto por los linfocitos citotóxicos o las células NK
- 8)** Evitar el daño tisular
- 9)** Inducir tolerancia inmunológica

En la práctica los abordajes orientados a disminuir la inmunogenicidad del injerto o de las células del receptor implicadas en el rechazo se basan en el empleo de fármacos inmunosupresores.

El objetivo de los tratamientos inmunosupresores reside en controlar la respuesta inmunológica del huésped contra el injerto de manera específica y sostenida, tanto a corto como a largo plazo, sin que ello interfiera en la capacidad, por parte del sistema inmunológico, de controlar infecciones o neoplasias, de generar efectos tóxicos al huésped o al órgano trasplantado y mantener una óptima calidad de vida. La base de los tratamientos inmunosupresores reside en el empleo de agentes químicos o biológicos, dirigidos a bloquear la respuesta de los linfocitos T.

Los linfocitos, como cualquier otra célula del organismo, presentan un ciclo celular en el que se distinguen diversas fases: G0, G1, S, G2 y M.

I. Introducción

La fase G0, o quiescente, representa a células metabólicamente activas cuya situación no es de diferenciación terminal y pueden responder a estímulos entrando en el ciclo de diferenciación.

La fase G1 se caracteriza por una intensa actividad sintética de proteínas y precede a la fase S en la cuál se duplica el material genético.

La fase G2 precede a la M (mitosis) en la cual se dividen el núcleo y citoplasma celulares (Hayes, 1993).

Durante la estimulación antigénica, los linfocitos se activan y la transducción de esta señal al núcleo da lugar a una activación de los genes con aumento de RNA y síntesis subsiguiente de linfocinas, receptores de superficie celular, etc. Es en esta fase de intensa actividad biosintética (G1) donde ejercen su efecto algunos antimetabolitos. Entre ellos cabe destacar a: a) la azatioprina (análogo de la purina que se incorpora en el DNA e inhibe la síntesis de nucleótidos de purina), b) nuevos agentes como el brequinar sódico (inhibición no competitiva de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa necesaria para la síntesis de pirimidina, con la consiguiente inhibición de la síntesis de DNA/RNA), c) la mizoribina (antibiótico que bloquea el paso de ácido inosínico monofosfato a ácido guanílico en el ciclo de síntesis de las purinas e inhibe, por tanto, la producción de DNA/RNA) y, d) el ácido micofenólico (antibiótico que inhibe las enzimas inosina monofosfato deshidrogenasa y guanosina monofosfato sintetasa, necesarias para la síntesis de monofosfato de guanosina, bloqueando la síntesis de purinas y consiguientemente la de DNA/RNA).

Este tipo de drogas inmunosupresoras actúan en fases precoces del ciclo celular sobre células en rápida proliferación y por lo tanto se deben usar como preventivas del rechazo y no durante el rechazo instituido ya que tiene poco efecto sobre la respuesta inmune ya establecida.

Otras drogas inmunosupresoras de considerable interés son la ciclosporina A (CsA), los corticoides y el tacrolimus los cuales parecen inhibir la transcripción de genes de la IL-2, IFN- γ , IL-3 e IL-4 que se requieren para la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B; se bloquea el ciclo celular a nivel de G1 impidiéndose la entrada en la fase S. De nuevo se trata de fármacos que actúan en fases precoces del ciclo celular, aunque los corticoides tienen otras acciones (inhibición de las fosfolipasas involucradas en la producción de mediadores inflamatorios, dificultar la fagocitosis y la liberación de linfocinas tóxicas, impedir la migración extravascular de células y proteínas plasmáticas, inhibir la expresión y función de importantes receptores o moléculas -como las moléculas MHC de clase I y II- en las

membranas celulares etc.) que los hacen ser efectivos en el rechazo constituido y, de hecho, se emplean en el tratamiento del rechazo agudo.

La rapamicina es un antibiótico macrólido que parece actuar en las fases G0 y G1 de ciclo celular impidiendo la transducción de la señal de las linfocinas y, por tanto, impide la producción de IL-1, IL-2, IL-6 e IFN- γ .

La 15-deoxispergualin, un antibiótico antitumoral, tiene poca acción en las fases precoces del ciclo celular y parece ejercer su efecto en las fases tardías de la activación de los linfocitos T y B. Aunque no se conoce su exacta forma de actuación, se sabe que dificulta la activación de los monocitos/macrófagos, la expresión de MHC clase II-peptido y la diferenciación-proliferación de los linfocitos T y B.

Los denominados agentes biológicos son otras de las herramientas empleadas en la prevención del rechazo. Son anticuerpos dirigidos frente a las distintas estructuras expresadas en la superficie de los linfocitos. Inicialmente se obtuvieron anticuerpos policlonales antilinfocitos, para lo cuál se inyectaban esplenocitos, timocitos o linfocitos periféricos a conejos, ratones o caballos; estos animales desarrollaban una respuesta inmune de anticuerpo y se les extraía el suero del que se separaba la fracción globulínica extrayendo los anticuerpos frente a hematíes, plaquetas, neutrófilos, etc. de forma que el producto final llevaba anticuerpo antilinfocitos o antitimocitos que era lo que se inyectaba al receptor de un TxH. Claramente las dianas de estos agentes son múltiples, pudiendo ser cualquier estructura antigénica de la membrana linfocitaria.

Los anticuerpos monoclonales, por el contrario, presentan dianas perfectamente definidas. Estos se producen inmunizando en primer lugar al ratón con linfocitos humanos y a continuación se aíslan los linfocitos B del ratón, clonándolos y seleccionando el clon productor de los anticuerpos que nosotros deseamos, el cual se hibrida con una línea celular inmortal, como la del mieloma humano. El hibridoma obtenido se clona para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales antilinfocito. Con esta tecnología se han desarrollado anticuerpos monoclonales frente a moléculas clave de la superficie de los linfocitos T.

El más usado, con diferencia, es el anticuerpo anti-CD3 u OKT3, el cuál se une al CD3 internalizándolo o modulándolo de manera que no se puede transmitir la señal de reconocimiento del Ag. Otras moléculas utilizadas como dianas son el receptor de la

I. Introducción

IL-2 (IL-2R) expresado en las células T activadas. Los anticuerpos anti-IL-2R impiden la proliferación y diferenciación linfocitaria al inactivar estos receptores. Las cadenas α y β del TCR son las dianas de los nuevos anticuerpos monoclonales tales como el BMA031 y el T10B9, que han mostrado tanta eficacia como OKT3 y con menos complicaciones infecciosas. También han sido usadas como dianas algunas moléculas de adhesión como la ICAM-1. En este caso, los anticuerpos anti-ICAM-1 desfuncionalizan estas moléculas impidiendo una buena captación entre CPA y linfocito T que se traduce en un no reconocimiento del antígeno. Se han empleado también anticuerpos anti-CD4, los OKT4, con buenos resultados.

A pesar de los logros alcanzados en el campo de la inmunosupresión (IS), los resultados obtenidos hasta la actualidad no son totalmente óptimos. La mitad, aproximadamente, de los pacientes sometidos a TxH presentan episodios de rechazo agudo y entre un 5% - 10% desarrollan un rechazo crónico dependiendo de la pauta inmunosupresora recibida. Por otra parte, el porcentaje de pacientes que presentan infecciones después del TxH es muy alto. Estas infecciones vienen dadas por distintos motivos; la situación clínica del paciente antes del trasplante, la envergadura de la propia intervención quirúrgica o por el tratamiento IS recibido.

Otros efectos indeseables, como consecuencia del uso continuado y de por vida de los IS, son el desarrollo de neoplasias de novo, nefrotoxicidad por ciclosporina o tacrolimus, hipertensión arterial e hiperlipidemia con el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Si bien hay evidencias científicas que apoyan el abandono de la IS por sus efectos adversos, en la actualidad este tratamiento continúa siendo el tratamiento de elección tras el TxH. La retirada parcial o total de los IS continúa planteando cuestiones de vital importancia tales como:

- a) el beneficio a largo plazo que comporta para el paciente la retirada de la inmunosupresión,
- b) qué enfermedades de base podrían mejorar o agravarse y,
- c) cuáles de los pacientes trasplantados son buenos candidatos a una retirada de la IS.

Aunque el abordaje a estas preguntas no resulta fácil, es obvio pensar que la respuesta debe de hallarse a través de datos clínicos y de investigación básica,

I. Introducción

concretamente en la búsqueda de aquellos factores fisiopatológicos implicados en el desarrollo de tolerancia inmunológica de los receptores frente al injerto.

En este sentido, el análisis individualizado de los parámetros de función hepática, la histología hepática y los parámetros inmunológicos deberán ser la clave para definir el perfil diferencial entre pacientes que tolerarían el injerto hepático sin IS o a bajas dosis de aquellos pacientes que no lo tolerarían. En el caso concreto de pacientes sometidos a TxH por infección por virus C, la retirada de la IS podría favorecer el control, por parte del sistema inmune del receptor, de la progresión viral.

4. El TxH en pacientes infectados por virus de la hepatitis C

La hepatopatía de origen vírico y, especialmente, la causada por el virus de la hepatitis C (VHC) es una de las indicaciones para el TxH. En nuestro medio social se ha calculado que el VHC infecta entre un 1.0% y un 2.64% de la población general y que más del 70% de los carcinomas hepatocelulares presentan evidencias de infección por VHC. Ello ha provocado que más de la mitad de las indicaciones de TxH sean causados por una infección persistente del VHC.

4.1 El VHC

El VHC es un virus de RNA de cadena simple positiva de aproximadamente 10,000nt que se clasifica como único representante del género *Hepacivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* (**Figura 1.8**). El virus está constituido por tres proteínas estructurales (core, envuelta 1 (E1) y envuelta 2 (E2) que componen la nucleocápside

y envuelta glicolípídica del virión y por 7 proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Rosenberg, 2001; Kato, 2001) responsables de las funciones de replicación y persistencia viral.

Presenta una región 5' no codificante altamente conservada, con un lugar de entrada de ribosomas (IRES) para la traducción del RNA viral dando lugar a una poliproteína de 3011 aminoácidos que es procesada por proteasas

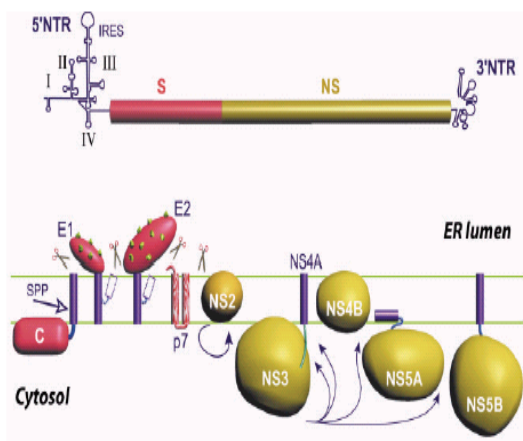


Figura 1.8 VHC. Fuente: *Penin F et al. Hepatology 2004, 39:5-19.*

celulares para dar las proteínas estructurales y por proteasas virales NS2-NS3 con actividad metaloproteasa que libera NS2, y por la Serin-Proteasa NS3 que junto a su cofactor NS4A induce el corte del resto de la parte no-estructural de la poliproteína dando lugar a NS4B, NS5A y NS5B. NS3 tiene también actividad helicasa. NS5A tiene

I. Introducción

función en replicación, mientras que NS5B es la RNA polimerasa RNA dependiente que copia el RNA viral a partir de señales que encuentra tanto en 3' no codificante como en 5'.

El mecanismo de entrada a los hepatocitos no está aún claro aunque algunos receptores celulares podrían estar involucrados tanto en los procesos de unión del virus a la célula como en su posterior entrada. Cabe destacar a la tetraspanina CD81, el receptor *type I scavenger* clase B (SR-BI), el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr), el L-SIGN (*liver/lymph Node-Specific Intracellular Adhesión Molecule 3 grabbing Non-Integrin*), DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesión Molecule 3 Grabbing non-integrin*), el receptor de asialoglicoproteínas (ASGPR), o también el *heparan sulfate* y Claudin-1.

Tal como ocurre con otros virus de RNA, el VHC evoluciona rápidamente debido a elevadas tasa de mutación y elevados niveles de replicación gracias al uso de una RNA polimerasa que no posee mecanismos de corrección de errores. Esto permite que el virus circule en el paciente infectado como una quasispecies (Martell *et al.*, 1992) es decir, como una mezcla compleja de variantes relacionados entre ellos y que están cooperando, de manera que le permite a la población adaptarse a cambios en el medio y persistir. Esto hace difícil conseguir un tratamiento efectivo.

4.1.1 Perfil de la respuesta inmune en la infección aguda

La evolución del paciente infectado por VHC está sujeta a diferentes componentes de la respuesta inmune; la respuesta inmune innata (principalmente interferones de tipo I y células NK) y la respuesta inmune adaptativa (linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ así como anticuerpos). Sin embargo, los mecanismos que conducen a la evasión de VHC a la respuesta inmune todavía quedan por descifrar.

Una de las vías principales de evasión utilizadas por el VHC es la incapacidad por parte del huésped en desarrollar una adecuada respuesta celular mediante un defecto en los mecanismos de presentación antigénica. Algunos estudios han sugerido una disfunción de las células dendríticas (Bain *et al.*, 2001; Sarobe *et al.*, 2002) en contraposición a otros estudios que no lo sugieren (Longman *et al.*, 2004). Otro

mecanismo de evasión empleado por el VHC es la variabilidad genética que se estructura, al igual que la mayoría de virus RNA, como una quasiespecie viral (Martell, 1992).

4.1.1.1 Curso de la infección. Los linfocitos CD8⁺/CD38⁺

En la infección aguda la replicación viral se detecta ya desde la primera semana y alcanza rápidamente sus niveles máximos (Diepolder *et al.*, 1995; Diepolder *et al.*, 1997; Ferrari *et al.*, 1994; Gerlach *et al.*, 1999; Missale *et al.*, 1996; Thimme *et al.*, 2002; Bigger *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 1997). La respuesta citotóxica comienza a detectarse sobre las 4 semanas y alcanza su máxima intensidad coincidiendo con el comienzo biológico de la hepatitis. Los linfocitos CD8⁺/CD38⁺ son, inicialmente, los responsables de la respuesta citotóxica. Éstos no producen interferón pero son muy eficaces en la destrucción de hepatocitos infectados aunque, por si solos, son incapaces de controlar el nivel de replicación viral y terminar con la infección.

4.1.1.2 La respuesta CD4⁺

La subsiguiente fase está relacionada con una aparición de respuesta CD4⁺, potente, multiespecífica y productora de IFN-γ. Esta respuesta se dirige, principalmente, contra las proteínas no estructurales del VHC lo que origina una brusca disminución de los niveles de RNA circulantes del virus hasta llegar a valores indetectables. En esta fase se normalizan los niveles de transaminasas del paciente y se produce un cambio fenotípico y funcional de los linfocitos CD8⁺, lográndose una población de células productoras de IFN-γ capaz de controlar la replicación viral por mecanismos no citolíticos.

Estudios de activación génica en tejido hepático de chimpancés durante la fase aguda de la infección (Bigger *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2002) han demostrado que existe una relación directa entre la expresión de genes inducidos por el IFN-γ y la inhibición de la replicación viral, lo que sugiere que, al igual que otros virus hepatotropos, el VHC

I. Introducción

es susceptible a las citocinas liberadas por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y, especialmente, al IFN- γ (Guidotti *et al.*, 1999).

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la persistencia a largo plazo de la respuesta CD4⁺ Th1 se asocia, de manera sistemática, a una erradicación completa de la infección mientras que su pérdida o incluso una marcada reducción de su intensidad va seguida de una reaparición del virus y del establecimiento de una infección persistente (Diepolder *et al.*, 1995; Missale *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1997; Gerlach *et al.*, 1999). En los pacientes que resuelven la infección, tanto la respuesta CD4⁺ Th1 como la respuesta CD8⁺ se mantienen de forma indefinida mientras que la producción de anticuerpos disminuye progresivamente hasta hacerse indetectable entre la primera y la segunda década posterior a la exposición (Takaki *et al.*, 2000).

Ello explica la frecuente detección de respuesta inmune celular en pacientes seronegativos con riesgo de exposición. Así, diversos estudios han demostrado respuesta citotóxica o proliferativa en sujetos seronegativos expuestos (Koziel *et al.*, 1997; Scognamiglio *et al.*, 1999) y especialmente en esposas de pacientes portadores, en las que puede demostrarse respuesta inmune celular en la mitad de los casos (Bronowicki *et al.*, 1997). Estos datos confirman que la exposición y la resolución espontánea de la infección es mucho más frecuente de lo que los tests serológicos pueden detectar.

4.1.2 Perfil de la respuesta inmune en la infección crónica

Una vez se ha establecido la infección persistente, la respuesta inmune parece estar compartimentalizada en el hígado. La frecuencia de precursores CD8⁺ antígeno-específicos es muy baja lo que dificulta su detección directamente *ex vivo*, excepto con técnicas muy sensibles (Lauer *et al.*, 2002). Con todo, tanto en hígado como en sangre periférica es posible detectar CTL que reconocen epítopos conservados y variables en todas las proteínas virales y con diversas restricciones HLA. Esta respuesta es, a menudo, policlonal y multiespecífica (Koziel *et al.*, 1995; Rehmann *et al.*, 1996a; Rehmann *et al.*, 1996b; Lauer *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque su detección en sangre periférica es más frecuente que en los individuos que resuelven la infección, su capacidad proliferativa, de secreción de citocinas y citolítica están alteradas y no

pueden restaurarse mediante estimulación *in vitro* en presencia de IL-2 (Wedemeyer *et al.*, 2002).

Por otra parte, la respuesta CD4⁺ también está compartimentalizada en el hígado y la amplitud de la respuesta CD4⁺ intrahepática está restringida a uno o dos antígenos, más frecuentemente dirigida frente a *core*, NS4 y muy raramente frente a NS3. De manera global los pacientes presentan un patrón de respuesta inmunológica tipo Th1 con secreción de IFN- γ y TNF- α . La secreción de IFN- γ es frente a *core*, con una mayor frecuencia en los pacientes con infección crónica que la observada en individuos que han resuelto la infección (Penna *et al.*, 2002; Rosen *et al.*, 2002). No ocurre lo mismo con la respuesta frente a antígenos no estructurales, que apenas es detectable y, cuando se detecta, con frecuencia induce secreción de IFN- γ e IL-10 (Tsai *et al.*, 1997; Tabatabai *et al.*, 1999; Penna *et al.*, 2002).

La incapacidad del huésped de controlar la replicación viral en la infección persistente es sorprendente. Con todo, aunque la respuesta inmune específica sea demasiado débil para eliminar la infección es todavía lo suficientemente activa como para inducir lesión hepatocelular de lenta evolución. Ello es posible ya que la capacidad citolítica de las células T VHC-específicas es relativamente fácil de inducir con pequeñas dosis de antígeno y ni tan siquiera requiere de la activación completa de los linfocitos T. Además, incluso linfocitos T no antígeno-específicos que constituyen la mayoría del infiltrado inflamatorio intrahepático podrían contribuir, mediante la liberación de citocinas, a amplificar la respuesta inmune específica y producir daño hepatocelular (Bertoletti *et al.*, 1997).

4.1.3 Persistencia viral

Aunque el mecanismo por el cual en la mayoría de pacientes el VHC evade la respuesta inmune y se consigue establecer una infección persistente es desconocido, es muy probable que la enorme variabilidad genética del VHC que se estructura, al igual que la mayoría de virus RNA, como una quasiespecies (Martell *et al.*, 1992) sea directamente responsable tanto del establecimiento como del mantenimiento de la persistencia viral.

I. Introducción

Estudios en chimpancés con infección persistente han demostrado la aparición relativamente precoz y sucesiva de mutantes de escape frente a la mayoría de epítomos de CTL inicialmente reconocidos (Erickson *et al.*, 2001). Dichas mutaciones quedan fijadas en la copia *master* de la población viral y persisten sin nuevos cambios durante años, en presencia de respuesta CTL frente a los epítomos originales. Hallazgos similares se han descrito en pacientes con hepatitis C crónica (Chang *et al.*, 1997). Sin embargo, aunque los mutantes de escape de CTL confieran ventaja para la supervivencia del virus, la multiespecificidad de la respuesta CTL durante la fase aguda hace muy improbable que estas mutaciones condicionen la persistencia viral, aunque es posible que contribuyan a mantener la cronicidad o incluso a hacerla irreversible. De hecho, en el VHC, al igual que en otras infecciones crónicas, la selección de estos mutantes tiene lugar en el contexto de una infección persistente, siendo ésta la que favorece la selección de los mutantes y no al revés (Wahl *et al.*, 2000).

Al comparar la respuesta inmune de los individuos que resuelven la infección con los que la cronifican, resulta evidente que la principal diferencia estriba en el vigor y la persistencia de la respuesta linfocitaria T CD4⁺ específica (Day *et al.*, 2002). Estudios de expresión génica en el tejido hepático en chimpancés demuestran una evidente correlación entre producción de IFN- γ e inhibición de la replicación viral (Bigger *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2002). Por otra parte, la significativa asociación entre determinados haplotipos HLA de clase II y resolución espontánea de la infección corroboran el papel crucial de la respuesta CD4⁺ en la resolución de la infección (Thursz *et al.*, 1999).

De hecho, la situación de la respuesta inmune en la hepatitis crónica por virus C remeda varias características de otras infecciones persistentes asociadas a un déficit de linfocitos T helper. Un ejemplo lo tenemos en la persistencia de linfocitos CD8⁺ virus-específicos con alteración de la capacidad efectora o la incapacidad de desarrollar respuestas *de novo* frente a mutantes de escape (Zajac *et al.*, 1998).

Actualmente se está sugiriendo que el mecanismo responsable de la disfunción inmune en la infección persistente reside en la tolerancia periférica frente a los antígenos virales por parte de los linfocitos T helper. En este sentido, se sabe que existen, a parte de la delección clonal, otros dos mecanismos por los cuales se puede desarrollar tolerancia periférica frente a un antígeno.

Uno de ellos es la inducción de linfocitos T reguladores (T reg) antígeno específicos los cuales suprimen la respuestas Th1 o Th2 por contacto celular directo o

mediante la secreción de citocinas inhibitoras tales como la IL-10 o el TGF- α (McGuirk and Mills 2002).

El otro mecanismo es el relacionado con la inducción de anergia antígeno-específica que se logra por la presentación del antígeno en ausencia de coestimulación. Este mecanismo puede ocurrir en el hígado cuando los antígenos son presentados por células no profesionales tales como los hepatocitos, las células dendríticas inmaduras o incluso por unión del TCR a un ligando peptídico alterado (APL). Esta variante se puede originar a partir de un epítipo antigénico que puede diferir del agonista en un sólo aminoácido. El resultado es la inducción de una activación parcial del linfocito hasta el desarrollo de un estado anérgico del mismo (APL antagonista) (Nicholson *et al.*, 2000).

La unión de un APL antagonista produce una activación parcial o subóptima de las vías de señalización intracelulares (Rabinowitz *et al.*, 1996), seguida de un estado refractario prolongado y caracterizado por la incapacidad de producir IL-2 y de proliferar frente al antígeno agonista cuando éste es presentado por una célula dendrítica totalmente activada.

La inducción de anergia es un proceso activo de señalización que requiere movilización de Ca^{2+} intracelular y fosforilación proteica, al igual que la activación normal. Sin embargo, las señales bioquímicas que tienen lugar durante la inducción de anergia dan como resultado un aumento en la expresión de p27kip1, déficit de activación de la kinasa Cdk2, hipofosforilación de la proteína de retinoblastoma y parada del ciclo celular en fase G1.

Aunque el estado de anergia afecta por definición a la capacidad de proliferación y secreción de IL-2, éste no impide que los linfocitos anérgicos mantengan cierta capacidad efectora como la de producir algunas citocinas o de mantener, incluso, actividad citolítica. Por otra parte, los linfocitos T CD4^+ anergizados *in vivo* o *in vitro* mediante APLs antagonistas, no sólo no proliferan ni producen IL-2 en respuesta a su estímulo antigénico específico, sino que se comportan como células reguladoras, inhibiendo la activación de linfocitos *naïve* o de memoria de forma antígeno-específica y dosis dependiente (Lechner *et al.*, 2001).

La prueba de que se produce un estado de tolerancia periférica, es que recientemente el grupo de Esteban (Bes *et al.*, 2008) ha conseguido revertir este fenómeno de tolerancia cultivando *in vitro* células CD4^+ de pacientes crónicos en ausencia de antígeno tolerogénico y presencia de interleucinas IL7 e IL15. Estos

I. Introducción

linfocitos reguladores son capaces, también, de inducir supresión asociada, es decir, de inhibir la respuesta CD4⁺ frente a otros antígenos copresentados por la misma célula presentadora de antígeno (Frasca *et al.*, 1997).

Así pues y dada la plasticidad funcional de los linfocitos T en cuanto al patrón de secreción de citocinas, en función de la dosis y de la naturaleza del ligando, de su estado de activación y de la funcionalidad de la célula presentadora de antígeno (Messi *et al.*, 2003, Nicholson *et al.*, 2000), no sería extraño que un virus tan variable como el VHC hubiera explotado al máximo su capacidad de presentar ligandos peptídicos alterados en epítomos de CD4 como estrategia de evasión.

4.2 El papel de las células dendríticas en la infección por VHC

4.2.1 Características de las células dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son las células presentadoras de antígeno por excelencia con un papel clave en la respuesta primaria por células T. Se localizan en la piel, en mucosas e incluso en el tejido hemático. Las DCs localizadas en tejido periférico captan el antígeno mediante fagocitosis (Inaba *et al.*, 1993), macropinocitosis o incluso por vía endocítica (Sallusto *et al.*, 1995). En situaciones de inflamación, las DCs circulantes son reclutadas por el tejido afectado en respuesta a la producción local de citocinas (McWilliam *et al.*, 1994; McWilliam *et al.*, 1996).

En ausencia de estímulo antigénico, las DCs residentes presentan un fenotipo denominado inmaduro y caracterizado por una baja expresión de moléculas MHC de clase I y II, de moléculas de adhesión y de moléculas de coestimulación siendo, éstas últimas, las que participan en la activación de las células T (Steinman, 1991; Banchereau and Steiman, 1998). Tras estímulo antigénico, las DCs adquieren un fenotipo denominado maduro caracterizado por una sobreexpresión de determinados marcadores de superficie celular (CD40, CD80, CD86, MHC de clase II y receptores de quimiocinas (CCR7) entre otros) (**Tabla 1.1**).

DCs inmaduras	DCs maduras
CD14 ⁻ ; CD11b ⁺ , CD1a ⁺	CD14 ⁻ ; CD11b ⁺ , CD1a ⁺
MHC ^{+/-}	MHC ⁺⁺
CD83 ⁻	CD83 ⁺
CD40 ^{+/-}	CD40 ⁺⁺
CD80 ^{+/-} ; CD86 ^{+/-}	CD80 ⁺⁺ , CD86 ⁺⁺
CD54 ^{+/-} , CD58 ^{+/-}	CD54 ⁺⁺ , CD58 ⁺⁺
ICOS L ⁻	ICOS L ⁺
ManR ⁺ , alta endocitosis	ManR ^{+/-} , baja endocitosis
CCR5 ⁺⁺ , CCR7 ⁻	CCR5 ⁻ , CCR7 ⁺
CD209 (DC SIGN) ⁻	CD209 (DC SIGN) ⁺
CD 205 ⁺⁺	CD 205 ⁻

Tabla 1.1 Marcadores de superficie celular para DCs. Diferencias entre los marcadores expresados en DCs inmaduras frente a los marcadores expresados en DCs maduras. Fuente: *Lagaraine C. and Lebranchu Y. Transplantation 2003, Vol 75, 37S-42S, No. 9, May 15*).

Este cambio de fenotipo es el resultado de la interacción entre ligandos inmunoestimuladores tales como lipopolisacáridos, fragmentos de RNA viral, CD40L y TNF- α entre otros, con receptores específicos localizados en la membrana celular de las DCs tales como los *Toll-like receptors* y los receptores para TNF (Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Caux *et al.*, 1994; Visintin *et al.*, 2001).

El proceso de maduración de las DCs empieza en el tejido periférico y continúa durante la migración de las DCs hacia los órganos linfoides secundarios. En ausencia de inflamación, las DCs mantienen el fenotipo inmaduro y los antígenos son presentados, en el órgano linfoide, a los linfocitos T pero en ausencia de moléculas de coestimulación lo que conduce la delección de células T antígeno específicas o bien a la generación de células T reg (**Figura 1.9 a**).

I. Introducción

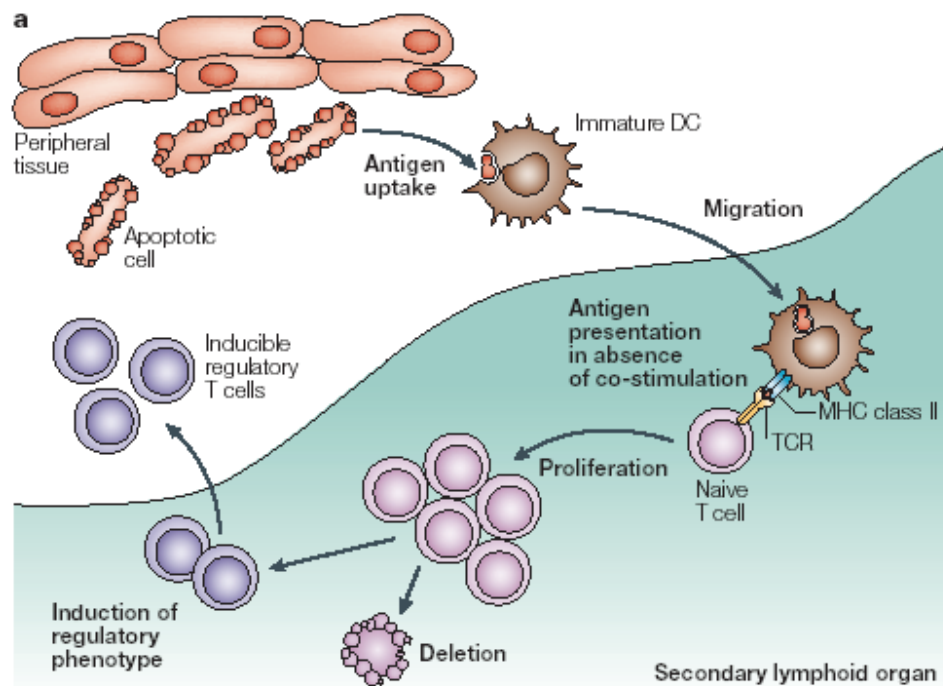


Figura 1.9 a) Inducción de tolerancia mediante DCs inmaduras. TCR, T-cell receptor. Fuente: Banchereau J. and Palucka A.K. *Nature Reviews Immunology* 2005, Vol. 5, 296-306).

Por el contrario, la inflamación del tejido induce la maduración de las DCs. Este proceso favorece la expresión de los complejos péptido-MHC en la superficie de las DCs así como la expresión de moléculas de coestimulación. El conjunto, péptido-MHC y las moléculas de coestimulación, permite la activación de linfocitos T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ así como la activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) y de células B como inicio de la respuesta inmune adaptativa. En este proceso también hay un control de la activación de la respuesta inmune vía células T reguladoras ($CD4^{+}CD25^{+}$) (**Figura 1.9 b**).

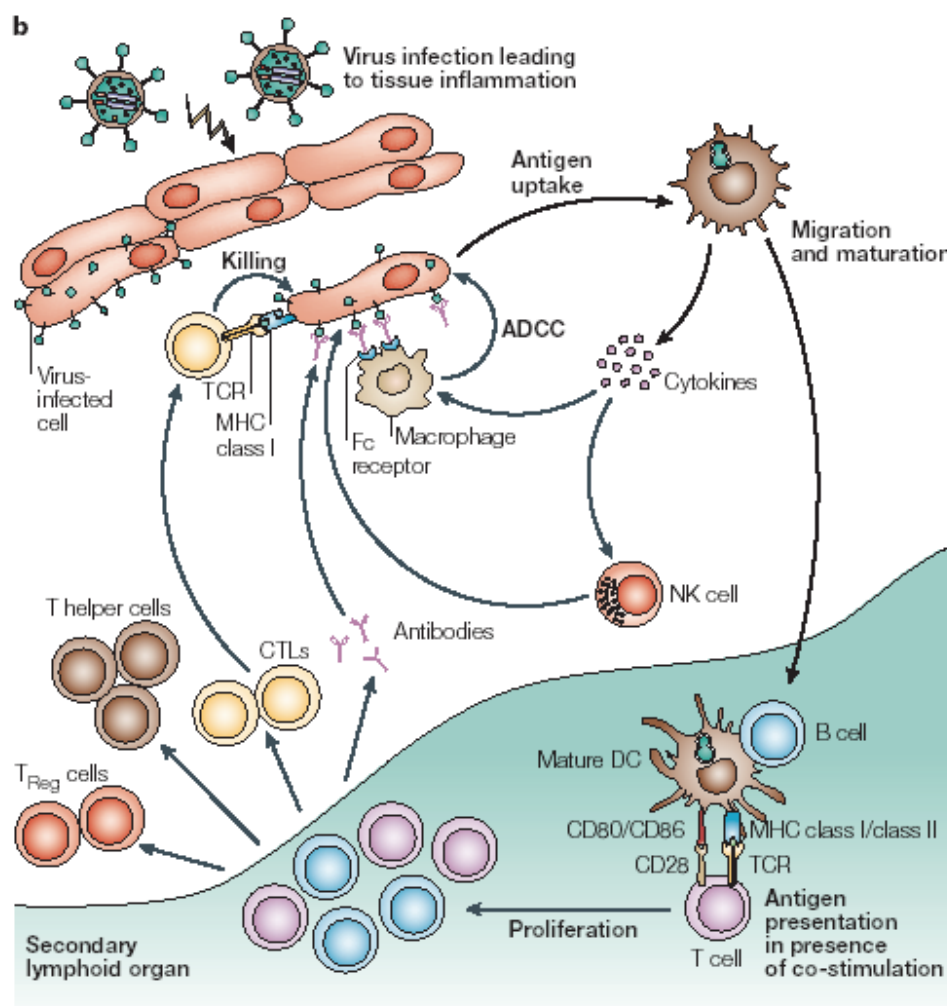


Figura 1.9 b) Activación de la respuesta inmune mediante DCs maduras. ADCC; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; NK, natural Killer; TCR, T-cell receptor. Fuente: Banchereau J. and Palucka A.K. *Nature Reviews Immunology* 2005, Vol. 5, 296-306).

La activación antigénica de las DCs promueve, también, la producción de varias citocinas tales como la interleucina 12 (IL-12) y la interleucina 18 (IL-18) que promueven, a su vez, la producción de IFN- γ por parte de las células T y células NK (Zhou *and* Tender, 1995).

4.2.2 Subpoblaciones de DCs

Hasta la actualidad se han caracterizado, desde el punto de vista inmunofenotípico y funcional, dos tipos de poblaciones de DCs en sangre periférica: las de origen mieloide y las de origen plasmacitoide.

Las DCs de origen mieloide son las típicas células presentadoras de antígeno, caracterizadas por presentar productos antigénicos degradados a las células CD4⁺ y CD8⁺. Además, la población mieloide secreta citocinas inflamatorias como la IL-12, esencial en la activación de una respuesta inmune efectiva (Guermonprez *et al.*, 2002). También secreta interferón de tipo I tras ser infectada por virus (Diebold *et al.*, 2003; Pollara *et al.*, 2004).

La población plasmacitoide, aunque puede actuar también como célula presentadora de antígeno, se caracteriza por secretar cantidades substanciales de interferón de tipo I por lo que se conocen también como células productoras de interferón (Sandberg *et al.*, 1989; Siegal *et al.*, 1999; Cella *et al.*, 1999). Sin embargo, la eficiencia en estimular células T en comparación con la población mieloide resulta, hasta el momento, controvertida. Algunos autores indican que su eficiencia es del orden de 10-50 veces inferior a la ofrecida por la población mieloide. Sin embargo, otros autores mantienen que la capacidad de presentación antigénica de ambas poblaciones resulta equiparable (Martin *et al.*, 2002; Fonteneau *et al.*, 2003).

Una característica común de las poblaciones mieloides y plasmacitoides es su capacidad para producir IL-12 e IL-10. La ratio entre ambas interleucinas permite definir la polaridad Th1 vs. Th2 de la respuesta inmune (Kapsenberg, 2003). En modelos experimentales de ratones se ha demostrado que ambas poblaciones celulares pueden originar una respuesta Th1 o Th2 dependiendo de la dosis de antígeno y el del *Toll-like receptor* activado, el cual dependerá a su vez del patógeno en cuestión (Kelleher *et al.*, 1999; Boonstra *et al.*, 2003). Por otra parte, parece ser que los virus pueden modificar la polarización de la respuesta inmune al afectar la funcionalidad tanto de la población mieloide como de la población linfoide.

Otra subpoblación de DCs de interés en el contexto de la infección por VHC es la población de DCs residentes en hígado cuya funcionalidad está afectada por otras células existentes en el hígado. Muy especialmente por las células de Kupffer y de las

células endoteliales del sinusoide que secretan IL-10 y TGF- β tras estrés por infección. En este sentido, el hígado puede favorecer un microambiente favorable a la inducción de DCs tolerogénicas (Bissell *et al.*, 1995; Lau *and* Thomson, 2003; Thomson *and* Lu, 1999) jugando un papel clave en la cronicidad de la hepatitis viral.

4.2.3 Cronicidad viral y DCs

Estudios basados en la valoración de la funcionalidad de las DCs tras infección vírica han sido claves para entender la patogénesis de determinadas infecciones por VIH, virus del herpes simple así como del citomegalovirus.

La unión viral a las DCs de tejido periférico o en DCs de circulación sanguínea parece facilitar la diseminación viral hacia los órganos linfoides (Geijtenbeek *et al.*, 2000) facilitando el acceso del virus a las células diana, tal como sucede en el caso de CD4⁺ para el VIH. Recientemente se han caracterizado dos tipos de receptores para VHC; los denominados DC-SIGN (expresados en DCs mieloides y plasmacitoides) y los L-SIGN (expresados en las células endoteliales del sinusoide hepático) (Geijtenbeek *et al.*, 2000; Pöhlmann *et al.*, 2003; Soilleux *et al.*, 2002). Los ligandos del VHC para DC-SIGN y para L-SIGN son las glicoproteínas E1 y E2 de la envuelta del virus (Gardner *et al.*, 2003; Kaimori *et al.*, 2004) que, tras su unión, se facilita su diseminación (Cormier *et al.*, 2004).

La bibliografía científica sugiere también la posibilidad de que el VHC pueda replicar en las DCs. Algunos estudios indican la posibilidad de que las células mononucleadas de sangre periférica, de manera particular los monocitos, pueden ser infectados por VHC (Muratori *et al.*, 1996; García *et al.*, 2000), detectándose copias del genoma del VHC en DCs derivadas de estos monocitos infectados (Navas *et al.*, 2002; Bain *et al.*, 2001). Gracias al empleo de técnicas de detección del VHC de alta sensibilidad se ha llegado a detectar, en las DCs de algunos pacientes con infección crónica, RNA de cadena positiva. En estos casos, la carga viral oscilaba entre 100 y 350 moléculas de RNA en extractos de 10⁴-10⁶ DCs (Navas *et al.*, 2002; Bain *et al.*, 2001). Por el contrario, estudios realizados en chimpancés infectados obtienen resultados opuestos (Rollier *et al.*, 2003).

4.2.4 La alteración de la funcionalidad de las DCs como posible mecanismo de persistencia viral

Algunos patógenos pueden originar cambios en la funcionalidad de las DCs siendo una estrategia considerada como un mecanismo de evasión de éstos a la respuesta inmune. Esta alteración en la funcionalidad de las DCs es motivo de controversia en el caso de la infección por VHC.

Algunos investigadores han propuesto que las DCs presentan una alteración en la presentación del antígeno debido, bien a la infección de las DCs por el VHC, y/o bien al efecto de las proteínas circulantes en sangre periférica (Sprecher *and* Becker, 1993; Dolganiuc *et al.*, 2003). En este sentido se han descrito cambios funcionales de las DCs en pacientes VHC+ crónicos. Estos cambios (**Figura 1.10**) hacen referencia a:

- a)** Una disminuida capacidad estimuladora en reacción mixta linfocitaria (Kanto *et al.*, 1999; Bain *et al.*, 2001)
- b)** Una baja expresión de moléculas coestimuladoras CD86 (Kanto *et al.*, 1999)
- c)** Una baja producción de IL-12 (Kanto *et al.*, 1999)

Aunque algunos investigadores consideran los cambios de funcionalidad de las DCs como una de las vías implicadas en la persistencia viral y, consecuentemente, en la cronicidad de la infección por VHC, otros han demostrado, en cohortes de chimpancés infectados con VHC, que la disfunción de las DCs promovida por el propio virus se observa solo en algunos casos y ello no parece ser un requisito en la persistencia de la infección (Rollier *et al.*, 2003).

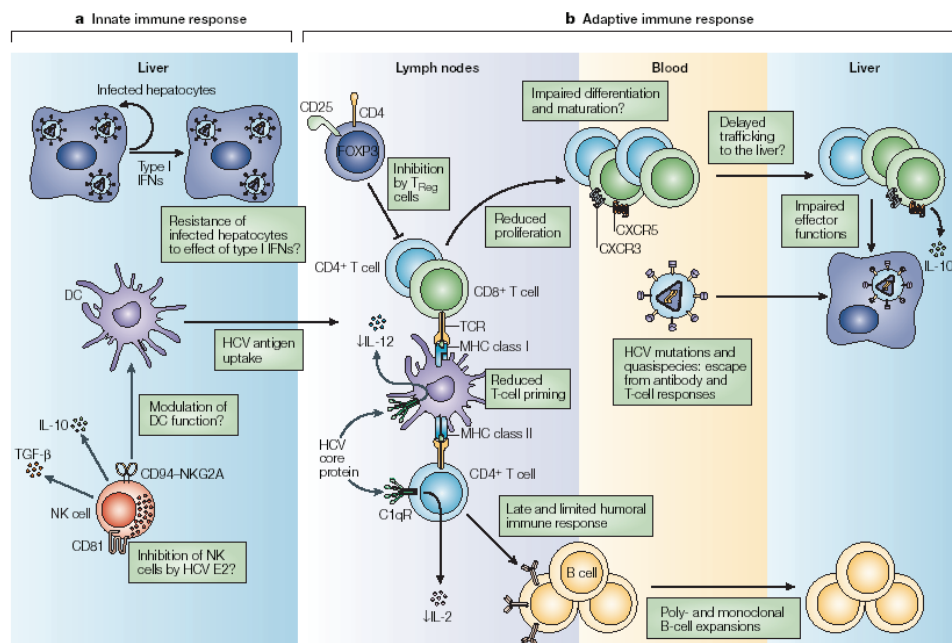


Figura 1.10 Mecanismos de evasión del VHC al sistema inmune. A) Respuesta inmune innata: Estudios en modelos experimentales con chimpancés indican que el VHC no es sensible al IFN de tipo I. Estudios in vitro han demostrado que las células *natural killer* pueden verse inhibidas por altas concentraciones de proteínas estructurales (E2) del VHC, alterando la producción de citocinas y, en consecuencia, inhibiendo la activación de DCs. B) Respuesta inmune adaptativa: caracterizada por una alteración de la funcionalidad de las DCs a través de la unión de proteínas del core del VHC al receptor del complemento C1q (C1qR). CXCR, receptor de citocina CXC; NKG2A, NK grupo 2A; TCR, receptor de células T. Fuente: Reherman B. and Nascimbeni M. *Nature Reviews*, 2005; Vol. 5, 215-229.

Hasta el momento se tienen muy pocos datos del papel que ejercen las DCs no solamente frente a la infección por VHC sino también frente a las proteínas estructurales del virus. En el caso de las DCs murinas se ha descrito que las proteínas estructurales del VHC son capaces de reducir su actividad estimuladora y de alterar la presentación de los antígenos clase II, lo cual sugiere una anormal presentación y una activación incompleta de los linfocitos CD4⁺ (Hiasa *et al.*, 1998; Sarobe *et al.*, 2002).

No se disponen de suficientes datos sobre el efecto de las proteínas no estructurales del VHC a pesar de que éstas pueden llevar a cabo un papel esencial en la cronicidad o en la curación espontánea de los pacientes infectados. En este sentido, se sabe que las proteínas no estructurales contienen los epítomos más frecuentemente reconocidos por los pacientes que resuelven espontáneamente la infección. En este sentido se han definido epítomos de CD4 inmunodominantes y promiscuos en el dominio helicasa (Diepolder *et al.*, 1995; Diepolder *et al.*, 1997) que codifican numerosas actividades enzimáticas imprescindibles para la replicación viral con

I. Introducción

constricciones tanto de secuencia primaria como estructurales que dificultan, al virus, la acumulación de mutaciones.

El conocimiento de la funcionalidad de las DCs en el procesado y presentación de las proteínas no estructurales del VHC y concretamente de ciertos epítomos resulta, en la actualidad, de gran interés científico dado que, la presentación de alguno de estos epítomos podría ser la causa del efecto anergizante de la respuesta inmune celular observado en la infección crónica.

4.3 Terapia en la infección crónica por VHC

*H*asta el momento, la opción terapéutica para los pacientes con infección crónica por VHC ha sido el tratamiento con IFN- α lográndose remisiones en tan solo un 15% de los pacientes (Hoffnagle *et al.*, 2003). No obstante, recientes estudios clínicos basados en el tratamiento combinado de IFN- α y ribavirina han demostrado remisiones de hasta un 80-90% en pacientes infectados por VHC de genotipos 2 y 3 (Poynard *et al.*, 1998) y de un 30-40% para genotipos 1 y 4.

Si bien se desconoce el mecanismo por el cual el tratamiento combinado consigue estos porcentajes de remisión, los estudios científicos sugieren que el éxito residiría por una parte en la capacidad inmunomoduladora de ambas drogas y, por otra, en la acción antiviral de estas (Tam *et al.*, 1999).

En este sentido, el IFN- α induce la producción, por parte de las células T CD4⁺, de IFN- γ así como la maduración de DCs (Luft *et al.*, 1998). La ribavirina, un análogo de nucleósido, reduce la inflamación hepática. Recientes estudios han demostrado, además, que la ribavirina potencia la respuesta inmune Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y, concomitantemente, inhibe la respuesta inmune Th2 (IL-4, IL-5, y IL-10) (Tam *et al.*, 1999).

4.4 El TxH en pacientes VHC+. La reinfección

Si bien los pacientes con hepatopatías producidas por el VHC son candidatos a TxH, el riesgo de reinfección del injerto por virus C representa, actualmente, uno de los mayores problemas en el seguimiento de estos pacientes, ya que la recurrencia de la enfermedad, ya sea de forma aguda o crónica, puede condicionar la pérdida del injerto o la muerte del paciente.

La infección del injerto y la recidiva de la infección se producen en el 100% de los casos dado que actualmente no se dispone de ningún tratamiento de profilaxis de la enfermedad (Wright *et al.*, 1992). En estos pacientes, la cirrosis puede aparecer antes de los 10 años postrasplante en comparación con los 20-30 años de un paciente inmunocompetente. La hepatitis aguda suele aparecer en un 40-50% de los casos con una evolución frecuente hacia la hepatitis crónica más o menos grave. Además, un porcentaje importante de los pacientes presenta hepatitis colestásica lo que conlleva un fracaso del injerto en un 10% de los casos (Vargas *et al.*, 1994).

Se han propuesto diversos factores pronóstico que pueden influir sobre la historia natural de la reinfección por VHC. Entre estos factores cabe citar los de tipo virológico (niveles de RNA-VHC serológico y genotipo viral), concordancia HLA entre donante y receptor, la infección del receptor por citomegalovirus, la respuesta inmunológica del receptor, la edad avanzada del donante así como la pauta inmunosupresora. En este último caso, el grupo de Sheiner observó una clara correlación entre los episodios de rechazo y la recurrencia del VHC (Sheiner, 1995).

Referente a los IS, el grupo de Papatheodoridis halló que los tratamientos inmunosupresores a base de la administración de una única droga se correlacionaban con altos niveles del RNA vírico a los tres meses del trasplante. No obstante, los altos niveles de RNA vírico hallados al cabo de doce meses del TxH estaban correlacionados con tratamientos prolongados a base de corticoesteroides (Papatheodoridis *et al.*, 1999).

Estudios posteriores llevados a término por el mismo grupo demostraron que los tratamientos inmunosupresores a base de múltiples drogas originaban una severa fibrosis del injerto a los tres años posteriores al TxH (Papatheodoridis *et al.*, 2001). El

I. Introducción

empleo de daclizumab, un antagonista del receptor de la interleucina 2, juntamente con micofenolato mofetil causa una mayor progresión de la fibrosis del injerto por VHC (Nelson *et al.*, 2001).

Los tratamientos actuales de la hepatitis C después del trasplante, ya sea con empleo de interferón o ribavirina administrados en monoterapia o incluso de forma conjunta, no han sido demasiado efectivos. No obstante, existen estudios que sugieren que la profilaxis de la reinfección, es decir, el empleo de interferón y ribavirina en el pretrasplante o incluso poco después del trasplante (segunda o tercera semana posterior al trasplante) y antes de que existiera evidencia de recurrencia, podría ser una opción de tratamiento para estos casos (Everson, 2003).

Las nuevas líneas de investigación en el tratamiento de la infección por VHC y la recurrencia vírica tras el trasplante se orientan hacia el empleo de análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa NS3 así como en la obtención de moléculas inhibidoras de los enzimas necesarios para la replicación viral. No obstante, es de vital importancia conocer el perfil de la respuesta inmune frente a la infección para avanzar en el tratamiento de esta enfermedad, ya sea durante el curso de la enfermedad previo al trasplante o bien en la fase posterior al mismo.

4.4.1 Inducción de DCs tolerogénicas. El papel de los inmunosupresores

Como ya se ha comentado con anterioridad, los pacientes sometidos a TxH ya sea por VHC o por otras causas son tratados, de por vida, con IS cuya acción reside, principalmente, en bloquear la producción de IL-2 por parte de las células CD4⁺ con la consecuente reducción de la respuesta inmune del receptor frente al aloinjerto. Con ello se consigue mejorar la supervivencia del injerto y, consecuentemente, la del paciente. No obstante, existen evidencias que demuestran que la diana de los IS no solo se centra en la población linfocitaria sino también en la población de DCs.

Se ha demostrado que los IS afectan a los mecanismos de expansión y migración de las DCs, en la captación y en el procesado de antígenos así como en su fenotipo, en la funcionalidad y en la supervivencia celular (**Figura 1.11**).

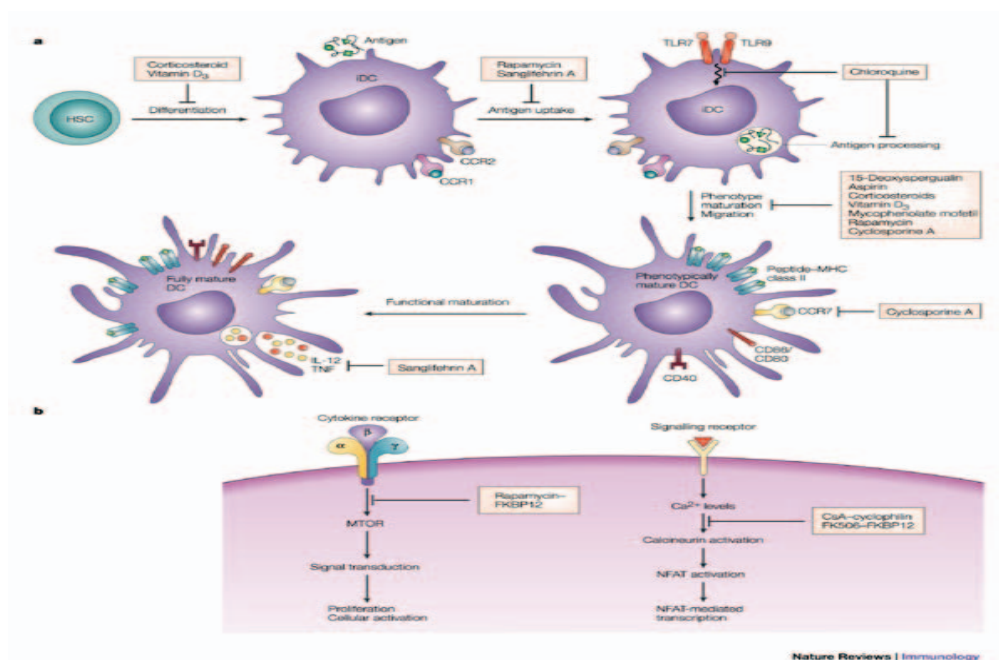


Figura 1.11 Acción de algunos inmunosupresores en DCs. Fuente: Hackstein and Thomson. *Nat Rev Immunol* 2004 Jan;(1):24-34.

Tal es el caso de los corticosteroides y la vitamina D3 que actúan inhibiendo la diferenciación y la maduración de las DCs. La rapamicina inhibe la captación de antígenos y posterior maduración de las DCs mientras que la sanglifehrina A bloquea, además de inhibir la captación antigénica, la producción de IL-12 y en última instancia la producción de TNF. La chloroquina bloquea la acidificación lisosomal impidiendo el procesado antigénico vía MHC de clase II. El mycophenolato mofetil, la 15-deoxyspergualina y el ácido acetil salicílico (aspirina) son los responsables de bloquear la capacidad madurativa de las DCs mientras que la CsA impide la migración celular.

Se han descrito, también, efectos de los IS a nivel intracelular. En este sentido se ha observado que la CsA y el tacrolimus se unen a la cyclophilina y a la FKBP12, respectivamente. El resultado final reside en una inhibición de la expresión de distintos genes por el bloqueo de las proteínas NFAT que actúan regulando la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria incluyendo la síntesis de interleucinas y de sus receptores (Hackstein and Thomson, 2004).

I. Introducción

Las anteriores observaciones demuestran un claro efecto de los IS sobre las DCs. Su acción se basa, en términos generales, en un bloqueo de la funcionalidad de estas células manteniéndolas con un inmunofenotipo inmaduro lo que condiciona una respuesta inmune deficiente. El conjunto de eventos que originan este fenotipo inmaduro dan lugar a lo que se conoce actualmente como DCs reguladoras o tolerogénicas.

El mecanismo de acción por el cual las DCs inmaduras son capaces de inducir tolerancia vía células T frente a autoantígenos o aloantígenos no está todavía esclarecido aunque se supone que más de un mecanismo podría estar implicado. Uno de ellos es la expresión de bajos niveles de moléculas de coestimulación y una disminución en la producción de citocinas de tipo Th1 tales como la IL-12p70.

A parte de los IS como drogas implicadas en la generación de DCs tolerogénicas, se han descrito otros mediadores que intervienen en el mantenimiento de este fenotipo tales como el TGF-beta, el VEGF (*Vascular endothelia growth factor*), y la vitamina D3. Algunos de estos factores actúan inhibiendo la translocación nuclear de factor nuclear κ -beta (NF- κ B) implicado en la activación de genes responsables de la síntesis de moléculas de adhesión/coestimulación. Este fenotipo tolerogénico también se puede obtener por manipulación genética mediante el empleo de vectores virales con el fin de promover la producción de IL-10 o TGF- β 1 (Vosters *et al.*, 2003).

Estudios *in vitro* han demostrado que las DCs con fenotipo inmaduro, ya sea por exposición a la N-acetil-L-cisteína o bien mediante exposición a IL-10, promueven la generación de células T reg (Vosters *et al.*, 2003).

Modelos experimentales *in vivo* han demostrado la importancia de las DCs tolerogénicas en la prevención del GVHD en el caso del trasplante alogénico de médula ósea. Las DCs tolerogénicas generadas *in vitro* con GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)+IL-10+TGF-beta+LPS (*Lipopolysaccharide*) y administradas posteriormente en animal de experimentación tras un trasplante alogénico de médula ósea prevenía el GVHD. En este modelo, las DCs con un fenotipo inmaduro empeoraban, drásticamente, la respuesta CD4⁺ y CD8⁺ contenida en el inóculo. Este efecto era dependiente de una diferenciación de los linfocitos del donante en una población de linfocitos T reg (CD4⁺CD25⁺CD152⁺) (Sato *et al.*, 2003).

I. Introducción

Estudios *in vitro* han demostrado que las DCs inmaduras expuestas a células CD8⁺CD28⁻ alogénicas o células T reg (CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺) experimentaban un incremento significativo de moléculas ILT3 y ILT4 (*Immunoglobulin-like transcript 3 or 4*). Actualmente se sabe que estas moléculas son necesarias para que las DCs mantengan un fenotipo tolerogénico. En estas condiciones, las DCs inhiben la capacidad proliferativa de las células CD4⁺ alloreactivas convirtiéndolas en células T reg las cuales, a su vez, actúan tolerizando otras células presentadoras de antígeno (Chang *et al.* 2002).

En pacientes sometidos a trasplante y concretamente en aquellos que no presentan rechazo, se ha observado que la población CD8⁺CD28⁻ está implicada en un aumento de ILT3 y ILT4 en las células presentadoras de antígeno del donante (Chang *et al.*, 2002).

Ante esta situación es obvio pensar que la administración de IS a los pacientes sometidos a TxH por VHC pueda ser una de las principales vías que promueva una baja respuesta inmune frente al VHC, favoreciendo la recidiva viral.

En resumen podemos decir que 1) las proteínas no estructurales del VHC pueden jugar un papel importante en la cronicidad o en la curación espontánea de los pacientes infectados, 2) uno de los posibles mecanismos de persistencia viral en los pacientes infectados reside en los cambios de funcionalidad de las DCs por el propio virus o incluso por las proteínas circulantes en sangre periférica y 3) que las pautas inmunosupresoras que reciben los pacientes VHC+ sometidos a TxH pueden bloquear la capacidad madurativa de DCs y, consecuentemente, favorecer el desarrollo de una respuesta inmune antiviral específica poco efectiva.

Por lo tanto es esencial profundizar, por una parte, en la funcionalidad de las DCs frente a proteínas virales y por otra estudiar la funcionalidad de estas células presentadoras de antígeno bajo la acción de los inmunosupresores.

5. Monitorización de la respuesta inmune en pacientes sometidos a TxH

Desde 2001, uno de los objetivos en el campo del TxH ha sido encontrar estrategias para minimizar la inmunosupresión impulsando la investigación orientada al diseño de nuevas pautas inmunosupresoras con el fin de aumentar la eficacia y/o seguridad de los tratamientos.

En la actualidad, la tendencia es eliminar o reducir los inhibidores de la calcineurina (CsA o Tacrolimus), eliminar los corticoides e inducir tolerancia con un claro objetivo: reducir los efectos adversos de la terapia inmunosupresora (infecciones y procesos malignos) (Hernandez-Fuentes *et al.*, 2003; Martínez-Llordella *et al.*, 2007).

El logro de este objetivo va ligado a un mayor conocimiento de la respuesta inmune del paciente trasplantado (que puede variar de un paciente otro) y adecuar, de forma individualizada, la pauta inmunosupresora. Por tanto, conocer qué pacientes serían candidatos a retirada parcial o completa de la inmunosupresión resulta clave para un correcto abordaje de esta propuesta.

La respuesta a esta cuestión requiere una actuación multidisciplinar (investigación básica y clínica) de la enfermedad. En este sentido sería conveniente disponer de técnicas inmunológicas, genéticas y de funcionalidad celular que ayudaran al clínico a predecir la evolución de la enfermedad. Estos ensayos deberían permitir identificar aquellos pacientes con tendencia a tolerar el injerto y, por tanto, candidatos a una retirada parcial o total de la inmunosupresión de aquellos que presentan una tendencia hacia rechazo y que por lo tanto, deberían seguir tratamiento inmunosupresor.

Los estudios *ex vivo*, con resultados de utilidad clínica, que persiguen tal fin reciben el nombre de ensayos de monitorización inmunológica (EMI). Se han descrito en la bibliografía científica diferentes EMI en pacientes trasplantados. Básicamente se agrupan en dos grandes grupos: los EMI antígeno específicos y los EMI antígeno no específicos. A continuación se analizan los ensayos que en el campo del TxH podrían cubrir esta necesidad. No obstante, la diversidad de ensayos con potencial clínico y la

I. Introducción

falta de estudios con series amplias de pacientes con resultados estadísticamente significativos resultan, en la actualidad, un impedimento en el momento de estandarizar un protocolo clínico de actuación.

5.1 Ensayos de monitorización inmunológica (EMI)

5.1.1 Antígeno específicos

Los ensayos de monitorización inmunológica antígeno específicos (MIAE), se basan en respuesta de células T a antígenos del donante. Esta respuesta puede ser por la vía directa o por la vía indirecta.

En la vía directa, las células T reconocen moléculas MHC de clase I o de clase II presentes en las células del donante. Las células T CD4⁺ del receptor son activadas al unirse a MHC de clase II del donante mientras que las células T CD8⁺ del receptor son activadas al unirse a MHC de clase I del donante.

En la vía indirecta, el proceso de reconocimiento antigénico está asociado a una internalización, un procesamiento y posterior presentación de los aloantígenos en forma de péptidos unidos a moléculas MHC.

La importancia de la vía indirecta en el rechazo de órganos trasplantados fue propuesta inicialmente por el grupo de Lechler en 1982 a raíz de un modelo experimental de trasplante de riñón en rata (Lechler *et al.*, 1982). Otros investigadores corroboraron, posteriormente, la implicación que tiene la vía indirecta en el rechazo (Benichou *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2001) así como la posibilidad de inducir tolerancia al ser bloqueada (Azuma *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 2001).

La activación temprana de células T frente al aloinjerto así como el rechazo agudo es mediado, esencialmente, a través de la vía directa sin embargo, se cree que la vía indirecta predomina a medida que transcurre el tiempo tras el trasplante (Chan C *et al.*, 2004). La inmunomodulación de ambas vías se consigue por mecanismos diferentes (**Figura 1.12**). En la vía directa, la inmunoregulación de las células T se obtiene por mecanismos de anergia y delección mientras que en la vía indirecta juegan

un papel relevante las células T reg. Esta combinación de factores implicados en la regulación de la respuesta inmune permite una doble aproximación a los EMI.

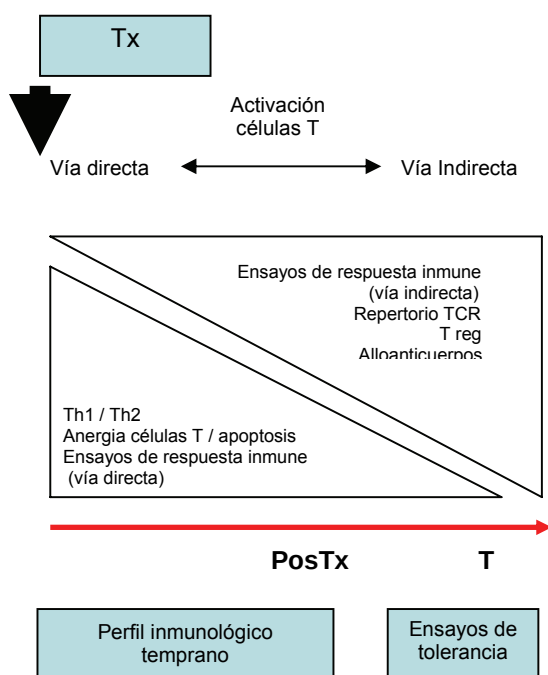


Figura 1.12 Activación de células T.

Dos modelos de estudio, en base a la cuantificación de citocinas, han sido hasta el momento de interés para la MI de los pacientes sometidos a TxH; la cuantificación de citocinas circulantes y la determinación de citocinas *in vitro*. Este último, apoyado por los estudios del grupo de Chen que demostraron una correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y la evolución clínica del paciente (Chen *et al.*, 1999).

Por otra parte, los ensayos de tolerancia aplicados en aquellos pacientes que, bajo tratamiento inmunosupresor evolucionan favorablemente al trasplante a medida que transcurre el tiempo del mismo, estarían orientados al estudio y análisis de células T reg tanto en sangre periférica como en el aloinjerto, determinación de anticuerpos frente al aloinjerto así como en la detección de alteraciones en el repertorio de TCRs (Game *et al.*, 2003).

5.1.1.1 Análisis de citocinas

Las citocinas no solo controlan la migración de los leucocitos hacia las áreas de inflamación, también juegan un importante papel en la activación y funcionalidad de los leucocitos, la modulación de la hematopoyesis y la angiogénesis así como también en el control del tráfico de leucocitos, macrófagos y DCs a través de los tejidos y órganos linfoides.

Una de las principales funciones de las células T activadas es la producción y posterior secreción de citocinas, las cuales actúan en otras poblaciones celulares que, de manera conjunta, contribuyen en los procesos de activación de la respuesta inmune. La mayoría de las citocinas son producidas por células T CD4⁺; Thelper (Th).

Las células Th se subdividen en Th1, Th2 Th3 y Th17. Las Th1, son células esencialmente productoras de citocinas proinflamatorias e implicadas en la inmunidad celular así como en los procesos de rechazo del aloinjerto por parte del receptor. Las Th2 están implicadas en la producción de citocinas reguladoras y tolerogénicas tales como IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Este grupo de células están involucradas en la respuesta humoral y en la aceptación del aloinjerto. Las células Th3 son productoras de elevadas concentraciones de TGF- β , una citosina tolerogénica que parece estar involucrada en la tolerancia infecciosa. Por último, las células del grupo Th17 son productoras de IL-17, una citocina proinflamatoria (Witowski *et al.*, 2004; Woltman *et al.*, 2000; Antonyamy *et al.*, 1999).

Aunque la relación Th1/Th2 ha sido en muchos casos empleada como herramienta de análisis de evolución del rechazo vs. tolerancia en modelos de tolerancia experimental, diferentes estudios han indicado que la expresión de citocinas Th1 (IFN- γ) se asocia con aceptación del aloinjerto (Strom *et al.*, 1996; Mele *et al.*, 2003) y que las citocinas Th2 pueden no resultar necesarias en la inducción de la tolerancia (paradigma Th1 / Th2) (Holzknecht *and* Platt 2000). Es por todo ello que la cronología y acumulación de citocinas en los pacientes trasplantados suele resultar, en la actualidad, de mayor importancia que el balance entre Th1 / Th2 en el momento de indagar en la inmunodesviación de estos pacientes frente al aloinjerto (Pirenne *et al.*, 2005).

5.1.1.1.1 Citocinas circulantes

Las publicaciones, orientadas a catalogar el estado inmunológico (rechazo vs. aceptación del injerto vs. tolerancia operacional) de los pacientes tras un TxH a partir de la determinación de citocinas circulantes han resultado, en algunos casos, contradictorias y confusas. Las citocinas circulantes no necesariamente son el reflejo de los niveles de citocinas del interior del órgano trasplantado o de los órganos linfoides del receptor.

Los factores que influyen en la disparidad de estos resultados están relacionados con los cambios en los niveles de citocinas circulantes debido a: estrés quirúrgico, daño del injerto por isquemia-reperfusión, transfusiones sanguíneas a las que se somete al paciente así como la regeneración hepática o incluso infecciones oportunistas (Asakura *et al.*, 2000; Cookson *et al.*, 2003; Conti *et al.*, 1999; Sankary *et al.*, 1993; Le Moine *et al.*, 1994). Por otra parte, se ha podido constatar que la producción de citocinas circulantes presenta variaciones entre individuos y que tales variaciones son debidas al polimorfismo genético. En este caso, el polimorfismo en los genes de citocinas se asocia a: 1) la magnitud de la producción de las mismas, actualmente catalogada como baja, intermedia o alta y, 2) la intensidad de la respuesta aloinmune. Los estudios de polimorfismo se contemplan en el caso de predecir la propensión de un determinado individuo a desarrollar rechazo agudo o crónico. De los estudios basados en el análisis de polimorfismos, solamente el polimorfismo de la IL-10 en posición 1082 está asociado con el riesgo de sufrir rechazo agudo de hígado (Turner *et al.*, 1997).

5.1.1.1.2 Citocinas *in vitro*

Los estudios clásicos referentes a la determinación *in vitro* de la aloreactividad de células T (Reacción Mixta Linfocitaria, MLR) han permitido que este análisis haya sido empleado como base a estudios complementarios que aporten información más detallada sobre el perfil inmunológico del paciente trasplantado.

I. Introducción

La MLR fue descrita en los años 60 y surgió como un modelo, *in vitro*, de respuesta primaria frente a moléculas alogénicas y empleada ampliamente para indagar en la respuesta inmune del receptor frente a antígenos del donante. Sin embargo, los resultados obtenidos por este modelo celular han sido de poco valor predictivo dado que el análisis no permite identificar el tipo de células T reactiva ni diferenciar, de manera consistente, entre pacientes con o sin tolerancia al aloinjerto. Por otra parte, la actividad proliferativa de las células T detectada en este modelo no puede considerarse, por sí sola, indicativa de la actividad inmunológica del receptor frente a los antígenos del donante. El modelo podría ser válido si se acompañara de determinaciones adicionales como la cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de estos cultivos.

En el caso del TxH, el grupo de Chung analizó los niveles y mRNA de diferentes ILs (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- β) en 15 pacientes entre el mes 5 y 7 tras el trasplante a partir de células mononucleadas de sangre periférica del receptor estimuladas, *in vitro*, con aloantígenos del donante (células de bazo). Los resultados mostraron una correlación significativa entre la producción de IL-4 e IL-10 y la clínica del paciente (estudios bioquímicos e histología del aloinjerto) y siendo independiente de los niveles de inmunosupresión (Chung *et al.*, 1998).

5.1.1.2 Detección de DCs

En humanos se han descrito dos subpoblaciones de DCs; las monocitarias y las plasmocitoides. Las DCs monocitarias (CD11c⁺) se obtienen a partir de monocitos circulantes estimulados con GM-CSF e IL-4. Las DCs plasmocitoides (CD123⁺) se originan tras la estimulación con IL-13 y CD40 ligando (CD40L). Tanto las DCs de origen monocítico (DC1), que dan lugar a una respuesta Th1 *in vitro*, como las DCs plasmocitoides (DC2), promotoras de una respuesta celular Th2, participan en los procesos de respuesta inmune; ya sea para inducir la respuesta a determinados antígenos (DC1) o bien para inducir tolerancia (DC2) (Rissoan *et al.*, 1999).

El grupo de Mazariegos estableció, en 2003, la hipótesis de que los niveles de precursores de DCs (pDC1 y pDC2) en sangre periférica de pacientes sometidos a TxH

podrían reflejar el estado inmunológico del receptor. Los autores observaron que la población pDC2 circulantes era más prevalente que la población pDC1 en pacientes estables al trasplante tras retirada de la inmunosupresión así como en aquellos pacientes sometidos a bajos niveles de drogas inmunosupresoras al ser comparados con los pacientes con tratamiento inmunosupresor mantenido.

El grupo sugirió que los pacientes con un valor de 0.1 en el cociente pDC2/pDC1 podrían ser considerados candidatos a la retirada de la pauta inmunosupresora (Mazariegos *et al.*, 2003). Dado que la población pDC2 puede movilizarse con GM-CSF, los tratamientos de movilización de dicha población celular podrían tener un potencial terapéutico fundamental en la inducción de tolerancia en trasplante de órganos sólidos (Arpinati *et al.*, 2004).

5.1.2 Antígeno no específico

Una estrategia alternativa que permitiría conocer el estado inmunológico de los pacientes sometidos a trasplante se basa en el estudio del fenotipo de determinadas poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune del receptor del aloinjerto, entendiéndose por inmunofenotipo celular aquellos marcadores de superficie celular asociados a un estado inmunológico y/o clínico del paciente.

5.1.2.1 Las células T reg

En el caso del TxH, el ejemplo lo tenemos en la identificación de las células T reg. La regulación de la respuesta inmune mediante células T reg está considerado como uno de los mecanismos implicados no sólo en la inducción sino también en el mantenimiento de una falta de respuesta del receptor frente a aloantígenos del donante, siendo clave, además, en el contexto de la autoinmunidad (Oluwole *et al.*, 2003).

Esta población celular actúa inhibiendo la proliferación de células T efectoras mediante un mecanismo de contacto celular. En el campo del trasplante se han identificado múltiples poblaciones de células T reg (CD4⁺CD25⁺, CD45RB, CTLA-4,

I. Introducción

CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD8⁺CTLA4⁺FoxP3⁺) con diferentes marcadores de superficie celular y con diferentes mecanismos de acción (Fischer *et al.*, 2005). Estos trabajos han promovido el desarrollo de estudios complementarios, tanto *in vitro* como *in vivo*, para que esta población celular forme parte de las técnicas de análisis empleadas en los EMI de los pacientes trasplantados.

Si bien los estudios *in vitro* basados en la funcionalidad de las células T reg han sido aplicados, hasta el momento, en trasplante renal (Salama *et al.*, 2003), los estudios *in vivo* han sido utilizados en el campo del TxH. En este caso, estudios llevados a cabo por el grupo de Li a partir de células mononucleadas de sangre periférica de pacientes pediátricos sometidos a TxH, indicaron que aquellos individuos con tolerancia operacional presentaban incrementos de la población CD4⁺CD425high⁺ en comparación con pacientes trasplantados de mayor edad o incluso con pacientes sometidos a dosis elevadas de inmunosupresión para evitar el rechazo (Li *et al.*, 2004). Otros estudios abogan también por la detección de poblaciones T reg (CD8⁺ y CD4⁺CD8⁻) a raíz de los resultados favorables obtenidos en modelos de tolerancia en animales de experimentación (Zhou *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2002).

5.1.3 Otras técnicas candidatas en los EMI en TxH

En la bibliografía se describen otras técnicas que podrían utilizarse como EMI en pacientes sometidos a TxH por los resultados obtenidos en otros modelos de trasplante de órgano sólido. En este caso cabe destacar:

5.1.3.1 Determinación de la fracción soluble de CD30 en el suero de los pacientes.

El CD30 es una glicoproteína de membrana que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral. Se expresa en células T activadas y preferentemente en las secretoras de citocinas Th2. Aunque no está considerado como marcador fisiológico de respuesta Th2, al ser una molécula de coestimulación puede modular el balance Th1/Th2 (Süsal *et al.*, 2004). Tras una activación de células CD30⁺ se libera, en suero, la fracción soluble (sCD30) la cual puede ser detectada.

En pacientes sometidos a trasplante de riñón, la detección de altos niveles de sCD30 en la fase de pretrasplante está considerado predictivo de rechazo agudo. Por otra parte y en la fase de postrasplante inmediato, una disminución en los niveles de sCD30 se observa en pacientes sin rechazo (Slavcev *et al.*, 2005).

5.1.3.2 Las células T Natural Killer (NKT). En un estudio llevado a cabo por el grupo de Li (Li *et al.*, 2004) se analiza las células mononucleadas de sangre periférica de pacientes pediátricos sometidos a TxH. El estudio pone de manifiesto una disminución de los niveles de Vα24+Vβ11^{hi} de células NKT en pacientes con tolerancia operacional.

5.1.3.3 ELISPOT. La base de este ensayo reside en la detección de citocinas producidas por células cultivadas *in vitro* tras una estimulación con antígenos o mitógenos. La citocina secretada se detecta mediante anticuerpos dando lugar a manchas (*spots*) que reflejan las células secretoras de citocinas. Esta técnica se emplea en el desarrollo de vacunas, cáncer, y enfermedades autoinmunes. En el contexto del trasplante se ha empleado en la monitorización de la alloreactividad indirecta en el trasplante renal; estudiando la frecuencia de células Th1, productoras de IFN-γ, y células Th2, productoras de IL-5 e IL-10 (Najafian *et al.*, 2002) a partir de linfocitos de sangre periférica estimulados con un panel de péptidos sintéticos correspondientes a secuencias de moléculas HLA-DR del donante (en sustitución de células del donante). Este estudio refleja la posibilidad de diferenciar aquellos pacientes con función renal estable de aquellos con una función renal alterada a partir de un punto de corte de 60 *spots* de IFN-γ /10⁶ células.

Si bien el ELISPOT se ha empleado, también, como test de evaluación de niveles de virus C en pacientes sometidos a TxH, no se ha empleado, hasta el momento, como herramienta de estudio de alloreactividad (Weston *et al.*, 2005). El grado de subjetividad que ofrece la técnica en el momento de analizar los resultados (tamaño e intensidad de los *spots*), así como el reducido número de citocinas que permiten ser evaluadas, limita su empleo como técnica para EMI en pacientes sometidos a TxH.

5.1.3.4 Aloanticuerpos. Existen evidencias que demuestran la importancia de la respuesta humoral tanto en el rechazo agudo como en el rechazo crónico siendo, por lo tanto, la detección de aloanticuerpos uno de los ensayos a tener en cuenta en el momento de monitorizar la respuesta inmune en pacientes trasplantados (Opelz, 2005; Zhang *et al.*, 2005). No obstante, su papel en el campo del TxH es dudoso.

5.1.3.5 Análisis de la expresión génica mediante *microarrays*. El término de *microarrays* de DNA hace referencia a miles de sondas de material genético de secuencia conocida colocadas en un soporte o matriz (de cristal, silicio o plástico). Al ponerse, en estas matrices, una muestra problema, aquellas cadenas con secuencia complementaria a las del *microarray* hibridarán con ellas. La recogida y el tratamiento computerizado de los datos permiten llevar a cabo estudios de regulación y/o expresión génica. En el contexto del trasplante de órganos, el análisis de la expresión génica mediante *microarrays* resulta ser un método de análisis prometedor para el hallazgo de biomarcadores que nos permitan monitorizar el rechazo (Chua and Sarwal, 2003; Martínez-Llordella *et al.*, 2007). No obstante, el coste de la técnica, la heterogeneidad de las muestras a testar, la variabilidad de los resultados obtenidos así como la complejidad en el momento de interpretar los resultados hacen que esta técnica sea poco empleada como herramienta de monitorización de pacientes sometidos a TxH.

Recientemente, el grupo de Martínez-Llordella presenta resultados prometedores en este campo al identificar diferentes genes con expresión diferencial entre el grupo de pacientes con tolerancia operacional (ausencia de rechazo agudo y crónico del injerto con una correcta funcionalidad de éste en ausencia de inmunosupresión) (Martínez-Llordella *et al.*, 2007).

Si bien el estudio se llevó a término con dos grupos de pacientes bien seleccionados, los resultados obtenidos son suficientemente alentadores como para emplear esta técnica con el fin de identificar un perfil genético asociado a tolerancia inmunológica.

Tal y como se ha constatado, existen una gran diversidad de técnicas de utilidad para la monitorización del paciente trasplantado. Estas técnicas, abordadas desde un punto de vista multidisciplinar (investigación básica e investigación clínica),

deberían permitir al clínico un conocimiento más estricto de la respuesta inmune de cada uno de los pacientes. Un seguimiento continuado durante los primeros meses tras el trasplante permitiría obtener un perfil inmunológico diferencial para cada paciente y la detección precoz del rechazo. Todo ello contribuiría al diseño de pautas inmunosupresoras individualizadas y adaptadas según la respuesta del receptor al injerto con el objetivo de disminuir, en aquellos casos que lo permita, la terapia inmunosupresora y, en consecuencia, minimizar los efectos adversos asociados a ella. Por todo lo anterior, creemos que resulta de gran interés profundizar en la respuesta inmune individualizada del paciente trasplantado.

II. JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

El trasplante hepático se ha consolidado como el tratamiento de elección de las enfermedades hepáticas en fase terminal, pues revierte casi de forma completa el conjunto de manifestaciones que se derivan de la mayoría de hepatopatías.

Si bien el trasplante hepático ha sido catalogado como uno de los actos quirúrgicos más complejos, éste ha avanzado notablemente desde sus inicios, con valores de supervivencia del 90% al año del trasplante y del 60 – 70 % a los 10 años. Este avance no sólo se ha debido a la mejora de la técnica quirúrgica, sino también a la mejora de los fármacos inmunosupresores; más potentes y más selectivos que permiten reducir las tasas de rechazo tanto agudo como crónico.

Ambas vías de avance, la quirúrgica y la inmunosupresora, promueve que la población de individuos trasplantados desarrolle enfermedades asociadas a la longevidad de éstos. Algunas de estas enfermedades se asocian a los efectos secundarios de la propia pauta inmunosupresora, lo que supone una causa frecuente de morbilidad y mortalidad a largo plazo. Un ejemplo de estas enfermedades es la nefrotoxicidad, osteoporosis, neoplasias *de novo*, infecciones oportunistas o incluso el riesgo cardiovascular. Pero los efectos adversos de las drogas inmunosupresoras no solo se asocian a su uso prolongado, sino que también pueden aparecer en el período postoperatorio temprano.

Los anteriores aspectos son los principales motivos por los cuales diversos grupos de especialistas dedicados al trasplante hepático se plantean nuevas estrategias de tratamiento inmunosupresor, entre las que se incluyen: la reducción de todos los agentes farmacológicos administrados en las pautas de doble o triple terapia, la retirada parcial de algunos de los fármacos administrados o incluso la retirada completa de los mismos. Si bien han sido pocos los estudios orientados a la retirada total de la inmunosupresión en aquellos pacientes que tras varios años de la intervención quirúrgica habían presentado una función hepática normal, los resultados son esperanzadores dado que un porcentaje significativo de pacientes mantenía una función hepática normal. Sin embargo, la falta de estudios clínicos amplios hace que no se haya podido establecer un protocolo eficaz. Tampoco se ha podido identificar los

II. Justificación

factores predictivos indicadores de una buena aceptación del injerto hepático o de su rechazo. Son diversas, pues, las preguntas que la mayoría de clínicos se plantean antes de abordar este tipo de protocolos; ¿resulta beneficiosa, a largo plazo, la retirada de la inmunosupresión?, ¿qué enfermedades, asociadas al trasplante hepático, podrían mejorar o por el contrario empeorar con estos protocolos? y la pregunta de mayor interés: ¿cuales son los mejores candidatos?.

Estas preguntas solamente pueden ser respondidas a partir de un trabajo conjunto entre clínicos e investigadores. Es por todo ello que consideramos plenamente justificado el planteamiento del presente trabajo basado en la identificación, mediante estudios de funcionalidad celular, de aquellos pacientes que tras someterse a trasplante hepático podrían ser candidatos a una retirada parcial o total de la pauta inmunosupresora así como también la identificación de aquellos pacientes con tendencia a desarrollar recidiva viral.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo reside en poner de manifiesto algunas técnicas, involucradas en el campo de la biología celular, cuyos resultados podrían ser de utilidad a la hora de establecerle el perfil inmunológico del paciente candidato a una modulación de la pauta inmunosupresora. Un perfil que debería de ser contrastado y completado con los datos obtenidos del seguimiento clínico (funcionalidad hepática, histología del hígado, parámetros inmunológicos...) y de expresión génica.

III. HIPÓTESIS

III. HIPÓTESIS

A) Pacientes sometidos a TxH

1. La respuesta celular *in vitro* de las células T CD4⁺ del receptor de un TxH, estimuladas con aloantígenos procedentes del bazo del donante, podría emplearse como herramienta analítica individual con carácter predictivo de la evolución clínica.
2. El Índice de Estimulación celular, los niveles de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α) y Th2 (IL-10) y la probabilidad de rechazo obtenido para cada uno de los pacientes y en cada una de las fases del estudio (preTxH y, posteriormente, durante el segundo y sexto mes del TxH) podrían ser valores, de interés clínico, que permitirían identificar aquellos pacientes candidatos a una retirada parcial o total de la inmunosupresión.
3. Es factible generar, *in vitro*, DCs a partir de monocitos procedentes de sangre periférica de los pacientes candidatos a TxH. También es posible obtenerlas tras el TxH.
4. La caracterización inmunofenotípica de las DCs de pacientes sometidos a TxH permitiría identificar aquellos pacientes candidatos a sufrir recidiva del VHC.

B) Efecto del FK en la maduración de DCs

- 1.** La proteína no estructural (NS3) del VHC es capaz de inducir maduración de las DCs generadas, *in vitro*, a partir de un cultivo de monocitos obtenidos de sangre periférica de donantes sanos.
- 2.** El FK, inmunosupresor de base en los pacientes estudiados, podría afectar a la capacidad madurativa de las DCs tras una estimulación con NS3.
- 3.** La disminuida capacidad madurativa de las DCs por acción del FK podría estar relacionada con una inhibición de la translocación del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) desde el citoplasma al núcleo celular. Este hecho daría lugar a un déficit en la expresión de moléculas de adhesión y de coestimulación así como también un déficit en la producción de IL-12p70.
- 4.** En aquellos pacientes infectados por VHC y sometidos a TxH, el déficit funcional de las DCs por acción de los inmunosupresores podría ser una de las posibles vías implicadas en la recidiva y en la persistencia viral.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

1. Estudio prospectivo de la correlación entre un modelo de respuesta celular *in vitro*, y la evolución clínica de los pacientes sometidos a TxH durante el segundo y el sexto mes del trasplante con el fin de catalogar aquellos pacientes candidatos a una posible retirada parcial o total de la inmunosupresión.

2. Estudiar, en el subgrupo de pacientes trasplantados y VHC+, el inmunofenotipo de las células dendríticas y su relación con la recidiva viral.

2.1 *Establecer un cultivo de células dendríticas a partir de monocitos obtenidos de sangre periférica durante la fase previa al TxH (libre de inmunosupresión) y, posteriormente, durante el segundo y sexto mes del mismo (con tratamiento inmunosupresor).*

3. Evaluar si el Tacrolimus (FK), como inmunosupresor, influye en el fenotipo y en la funcionalidad de las células dendríticas.

3.1 *Evaluar el efecto del FK en un cultivo de células dendríticas inmaduras procedentes de monocitos de sangre periférica de donante sano.*

3.2 *Inducir un fenotipo maduro mediante una estimulación con LPS o proteína recombinante no estructural (NS3) del VHC.*

3.3 *Evaluar el efecto del FK en la expresión de marcadores de madurez celular, en la producción de IL-12p70 y en la translocación del factor nuclear K β durante el proceso de maduración.*

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos de estudio

Durante Junio de 2001 y Marzo de 2004 se incluyeron, bajo consentimiento informado, 16 pacientes candidatos a TxH de los cuales, 10 se sometieron a estudio. El TxH se realizó por el equipo médico del *Servei de Cirurgiahepatobiliopancreàtica i Trasplantaments* del *Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona*. La edad media de los pacientes fue de 57.1 años (43-69) siendo todos ellos de sexo masculino. Las indicaciones del TxH fueron: infección por virus de la hepatitis C (6 pacientes), cirrosis criptogénica (1 pacientes), hepatocarcinoma (1 paciente) y cirrosis enólica (2 pacientes). La causa de exclusión de los 6 pacientes restantes fue por motivos técnicos y de coordinación entre el equipo extractor y la central de recogida de muestras del *Banc de Sang i Teixits* (BST). En 5 casos no se recibió biopsia de bazo en el momento de la extracción del hígado. En 1 caso, la central de recepción de muestras avisó al laboratorio al cabo de 40 h desde la recepción de la muestra, tiempo que excedía al establecido en los criterios de inclusión de las muestras (apartado 2.1).

Después del TxH los 10 pacientes de estudio recibieron un tratamiento inmunosupresor convencional basado en la combinación de FK $\pm$ corticoesteroides $\pm$ micofenolato mofetil $\pm$ anti-CD25. Tres pacientes recibieron tratamiento antiviral a base de interferón pegilado (PEG-IFN) + ribavirina durante el período de estudio. El seguimiento clínico y experimental de los pacientes fue prospectivo, con una duración máxima de seis meses.

2. Poblaciones celulares

En el momento de la extracción del hígado del donante se procedía, también, a la extracción del bazo. Éste se introducía en medio de cultivo celular (RPMI 1640, Gibco-BRL, Life Technologies) en presencia de antibióticos y se mantenía a 4°C hasta ser entregado al laboratorio.

Para el abordaje del modelo experimental se emplearon diferentes fracciones celulares; células mononucleares de bazo (MC) del donante y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del receptor. Las MC se obtenían a partir de biopsia de bazo del donante. Estas células se empleaban como células efectoras en los estudios linfoproliferativos. Las PBMC se obtenían de sangre periférica del receptor y se empleaban como fuente de monocitos (CD14⁺) y de linfocitos T (CD4⁺). Las PBMC se recogían en distintas fases del estudio; durante la fase previa al trasplante (PreTx) y posteriormente durante el segundo mes (2M) y el sexto mes (6M) del acto quirúrgico. Para ello, los pacientes fueron sometidos a tres aféresis llevadas a cabo por el personal de enfermería del BST. El concentrado leucoplaquetar de las aféresis se empleaba para la obtención de PBMC. De esta población celular se recogían células CD14⁺ y CD4⁺ (apartado 2.2) mediante método inmunomagnético de selección positiva. Las células CD14⁺ se empleaban para la obtención de células dendríticas (DCs) (apartado 4).

El procesamiento de las biopsias de bazo del donante, la obtención de las fracciones celulares de sangre periférica del receptor (PBMC, CD14⁺, CD4⁺ y DCs) y el modelo experimental se llevó a cabo en los laboratorios de Hemofilia y del *Banc de Teixits* del BST.

2.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión de los pacientes en el modelo experimental atendían tanto a la calidad como a la cantidad de las células obtenidas en cada una de las fases del estudio.

Los criterios de inclusión en relación a las muestras de bazo del donante fueron los que se detallan a continuación:

- a) Procesado de las biopsias: máximo de 36 h desde el aviso de la central de recepción de muestras.
- b) Número total de células recuperadas: $> 2 \times 10^8$.
- c) Viabilidad celular mediante azul tripan: $> 85 \%$.
- d) Criopreservación: inmediatamente tras la purificación celular y siempre en nitrógeno líquido.
- e) Análisis microbiológicos del medio de cultivo de recogida de la muestra: test de aerobios / anaerobios, negativo.
- f) Análisis microbiológico del medio de aislamiento celular previo a la congelación celular: test de aerobios / anaerobios, negativo.

Los criterios de inclusión en relación a las muestras de sangre periférica del receptor fueron los que se detallan a continuación:

- a) Procesado de las muestras: inmediatamente tras la recepción de los concentrados leucoplaquetares.
- b) Número total de células recuperadas: $\geq 3 \times 10^8$.
- c) Viabilidad celular mediante azul tripan: $> 85 \%$.
- d) Criopreservación: inmediatamente tras la purificación celular y siempre en nitrógeno líquido.
- e) Análisis microbiológico del medio de aislamiento celular previo a la congelación celular: test de aerobios / anaerobios, negativo.

Los análisis microbiológicos fueron realizados por el Servicio de Microbiología del *Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona* según el protocolo de recogida y procesado de las muestras establecido por el propio *Banc de Teixits* del BST.

Los criterios de inclusión en relación al abordaje experimental fueron los que se detallan a continuación:

V. Materiales y métodos

- a) Disponer de las correspondientes poblaciones celulares en la fase de PreTx.
- b) Disponer de las correspondientes poblaciones celulares en la fase postrasplante (2M y 6M) o bien disponer, como mínimo, de las poblaciones celulares de una de las fases; 2M ó 6M.

2.2 Obtención de las poblaciones celulares

2.2.1 Células mononucleadas de bazo

Las MC se obtenían a partir de una biopsia de bazo recogida durante el acto quirúrgico de la extracción del hígado. La biopsia, de unos 10 – 20 mg, se almacenaba a 4°C en presencia de medio de cultivo celular (RPMI 1640, Gibco-BRL, Life Technologies) con un 1% de antibióticos (penicilina-streptomicina, Gibco-BR, Life Technologies). La biopsia se entregaba al centro de recogida de muestras del BST el cual informaba al personal del laboratorio del *Banc de Teixits* del BST. En el laboratorio, la biopsia se sometía a disgregación mecánica mediante el empleo de un disgregador de tejido animal (Medimachine, Becton and Dickinson).

En una primera fase del proceso, la biopsia se colocaba en placas de petri con *buffer* salino libre de calcio y magnesio (PBS, Gibco-BR, Life Technologies) y se cortaba en fragmentos de un tamaño comprendido entre 2 - 4 mm.

En una segunda fase, los fragmentos obtenidos en la fase anterior se introducían en la cámara de disgregación tisular estéril (Medicons, Becton and Dickinson) provista de unas cuchillas que disgregaban el tejido tras ser accionadas.

El proceso de disgregación tisular duraba 5 min. Este tratamiento permitía recoger las células del tejido que eran almacenadas en nitrógeno líquido antes de su empleo en los estudios *in vitro*. Las muestras eran manipuladas en condiciones de esterilidad y siempre en cabina de flujo laminar (TELSTAR).

Células mononucleadas de sangre periférica

Las PBMC se obtenían del concentrado leucoplaquetar procedente de las aféresis realizadas durante el PreTx, 2M y 6M. Para ello, las células se sometían a un gradiente de densidad con *Lymphoprep*, $d=1.077 \text{ g/mL}$ (Nycomed). Las muestras se centrifugaban a $300 \times g$ durante 30 min. a temperatura ambiente y se lavaban con PBS libre de calcio y magnesio (*Gibco-BR, Life Technologies*). Para ello las células se centrifugaron a $450 \times g$ durante 15 min. con empleo de 35 ml de PBS (*Gibco-BR, Life Technologies*). El *pellet* obtenido se lavaba dos veces a $250 \times g$ durante 15 min en las mismas condiciones descritas anteriormente con el fin de reducir el contenido de plaquetas de las muestras. La población celular se criopreservaba en nitrógeno líquido antes de su empleo en los estudios *in vitro*.

2.2.3 Monocitos de sangre periférica

Una fracción de las PBMC obtenidas en el apartado anterior era sometida a una selección positiva inmunomagnética mediante el sistema MACS (*Miltenyi*) con el fin de obtener una población rica en monocitos.

Para ello se empleaban entre 3 y 4.5×10^8 PBMC que se incubaban, durante 15 min. con un anticuerpo monoclonal contra CD14 que estaba unido a una bola magnética. Tras una incubación de 15 min. (4°C) del anticuerpo monoclonal con la población celular, las células se sometían a un campo magnético con el fin de obtener una población CD14^{+} enriquecida. La población seleccionada se criopreservaba, también, en nitrógeno líquido antes de su empleo en los estudios *in vitro*, orientados, en este caso, a la generación de DCs.

En los estudios *in vitro* orientados al inmunofenotipaje de DCs bajo la acción del FK, éstas se obtenían a partir de una selección inmunomagnética de monocitos procedentes de donación de sangre (apartado 4).

2.2.4 Linfocitos T CD4⁺

La población de PBMC, previamente depleccionada de células CD14⁺, se empleaba para la selección positiva de una población rica en linfocitos T CD4⁺. Como en el apartado anterior, el método empleado fue el inmunomagnético (MACS, Miltenyi).

En este caso se utilizaba un anticuerpo monoclonal contra CD4 unido a una bola magnética. Después de una incubación de la población celular durante 15 min. (4°C) con el anticuerpo monoclonal contra CD4, las células se sometían a un campo magnético con el fin de obtener una población enriquecida de células T CD4⁺. Las células seleccionadas eran criopreservadas en nitrógeno líquido antes de su empleo en los estudios *in vitro*.

2.3 Análisis del inmunofenotipo celular

Las poblaciones celulares obtenidas (PBMC, CD14⁺ y CD4⁺) se sometían a un análisis por citometría de flujo antes de su criopreservación. En el caso de las DCs, obtenidas *in vitro* tras diferenciación de células CD14⁺, el inmunofenotipaje se realizaba una vez finalizado el cultivo celular.

En todos los casos se empleaban 2 x 10⁵ células que eran lavadas con PBS (Gibco-BR, Life Technologies) libre de calcio y magnesio a 450 x g durante 5 min. Las parejas de anticuerpos monoclonales utilizadas fueron: CD14-FITC (RMO52)/CD1a-PE (BL6), CD4 (FITC)/CD3(PE), CD64-FITC (22)/CD54-PE (84H10), HLA-DR-FITC (Immu-357)/CD80-PE (MAB104), CD83-FITC (HB159)/CD86-PE (HA5.2B7), IgG1-FITC (679.1Mc7)/IgG1-PE (679.1Mc7) y IgG2b-FITC (MOPC-195) (Coulter-Immunotech, IZASA, S.A., España).

No se emplearon en nuestro estudio, fracciones celulares con una pureza y una viabilidad, determinada con azul tripan, inferior al 90 %.

3. Estudios linfoproliferativos

Los estudios linfoproliferativos (MLR) se realizaron con dos propósitos. El primero de ellos, determinar la respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ del receptor del TxH frente a MC del donante en las distintas fases del estudio. El segundo, la cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de los correspondientes cultivos celulares (apartado 3.2).

En ambos casos, los resultados obtenidos en las fases posteriores al TxH (con tratamiento inmunosupresor) se contrastaron con los resultados obtenidos en la fase libre de inmunosupresión (PreTx).

3.1 Proliferación de linfocitos T CD4⁺ frente a MC

Para ello, las MC de cada uno de los donantes se irradiaban a 30 Gy (MCi) y se sembraban, posteriormente, en placas de 96 pocillos (Costar, *Cultek S.L.U. España*) con células T CD4⁺ del correspondiente receptor.

Cada uno de estos cocultivos se realizó con células CD4⁺ obtenidas en el PreTx y en el periodo posterior al TxH (2M y 6M). En todos los casos, la relación entre MCi y CD4⁺ fue de 1:1 (200.000 MCi: 200.000 CD4⁺). En todos los experimentos, las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 7 días en un volumen total final de 100µl. La capacidad proliferativa de las células T CD4⁺ del receptor frente a las MCi del donante se analizó al séptimo día del cocultivo con empleo de un test de proliferación celular no radioactivo.

Si bien la mayoría de estudios proliferativos se llevaban a cabo con el empleo de [³H]-*timidina*, las restricciones impuestas por el BST en cuanto al uso de material radiactivo obligaron a emplear un test no radiactivo. En nuestro caso el test empleado fue el *CellTiter 96® Assay (Promega)*. Este ensayo es una mejora del ensayo del MTT descrito por Mosmann (Mosmann, 1983).

V. Materiales y métodos

El test se basa en detectar la actividad celular mediante el análisis de la actividad mitocondrial. En este sentido el test se fundamenta en la capacidad que tienen las mitocondrias de las células metabólicamente activas en transformar un compuesto químico (tetrazolio), suministrado en el *kit*, en cristales de formazán. La adición posterior de una solución solubilizante de los cristales de formazán formados en el interior de las mitocondrias de las células vivas da lugar a una solución coloreada que es fácilmente cuantificable espectrofotométricamente (550 nm). La sensibilidad del test es de 1000 células / pocillo (en placas de 96 pocillos).

Para ello, 50 µl del colorante de tetrazolio se adicionaron al cultivo celular. Después de 25 h de incubación a 37°C y 5 % CO₂ las células se incubaban con 100 µl de solubilizador que disolvía los cristales de formazán. Después de 4 h de incubación a 37°C, condiciones necesarias para favorecer la disolución de los cristales de tetrazolio, las placas se leían con empleo de un lector de placas (Anthos 2010) a 550 nm. Los incrementos en los valores de densidad óptica (O.D.) se relacionaron con incrementos del número de células inicialmente cultivadas. Contrariamente, los decrementos en los valores de O.D. se relacionan con una disminución del número de células del cultivo.

Para reducir la variabilidad interensayo, los cocultivos de cada una de las distintas fases del estudio (PreTx, 2M y 6M) se realizaban el mismo día y con empleo de los mismos lotes de medios de cultivo celular así como de los reactivos requeridos.

Los estudios linfoproliferativos se abordaron desde dos vertientes: a) por grupos de pacientes, según presentaban o no episodios de rechazo clínico durante el primer mes tras el TxH y, b) individualizado; por tratarse de una muestra poblacional con distintas indicaciones al TxH y distintas pautas inmunosupresoras. Los experimentos se realizaron por triplicado y con los correspondientes controles internos: proliferación de MCI y CD4⁺ así como los blancos del ensayo.

Para el primer abordaje del estudio, los valores de O.D. correspondiente a la proliferación de CD4⁺ frente a MCI (CD4⁺+ MCI) se obtuvieron a partir del cálculo siguiente:

$$O.D. (CD4^{+} + MCI)_{PreTx, 2M, 6M} = O.D. (CD4^{+} + MCI)_{PreTx, 2M, 6M} - O.D. blancos_{PreTx, 2M, 6M} - O.D. MCI_{PreTx, 2M, 6M}$$

En donde:

O.D. (CD4⁺+ MCI) *PreTx, 2M, 6M* corresponde a la densidad óptica (550 nm) de los cultivos entre células CD4⁺ del receptor del TxH y células de bazo del donante irradiadas a 30 Gy (MCI) en las diferentes fases del estudio (PreTx, 2M o 6M).

O.D. blancos *PreTx, 2M, 6M* corresponde a la densidad óptica (550 nm) de los blancos (medio de cultivo celular) intraensayo en las diferentes fases del estudio.

O.D. MCI *PreTx, 2M, 6M* corresponde a la densidad óptica (550 nm) del cultivo de células MCI.

Para el segundo abordaje del estudio, los resultados de proliferación de células CD4⁺ frente a MCI obtenidos en cada uno de los pacientes y en cada una de las fases del estudio fueron dados en términos de Índice de Estimulación (I.E.).

El I.E. obtenido en cada fase se definió como:

$$I.E._{PreTx} = O.D. (MLR_{PreTx}) / O.D. (CD4^{+})$$

$$I.E._{2M} = O.D. (MLR_{2M}) / O.D. (MLR_{PreTx})$$

$$I.E._{6M} = O.D. (MLR_{6M}) / O.D. (MLR_{PreTx})$$

En donde:

O.D. (MLR) es la densidad óptica (550 nm) de las correspondientes MLRs (en el PreTx, en 2M y en 6M) definida como:

$$O.D. = O.D. intraensayo - O.D. de los blancos (medio cultivo celular) - O.D. de MCI$$

V. Materiales y métodos

O.D. (CD4⁺) se define como la capacidad proliferativa, en valores de O.D., de las células T CD4⁺ sin estímulo antigénico (en este caso en ausencia de MCI).

Los valores de I.E. podían ser = 1, >1 ó < 1; indicativos de no activación de respuesta proliferativa, activación de la respuesta proliferativa o bien inhibición de la respuesta proliferativa de CD4⁺ frente a MCI, respectivamente.

3.2 Cuantificación de citocinas

La cuantificación de citocinas se realizó a partir de los sobrenadantes de las MLRs descritas en el apartado 3.1. Para cada uno de los pacientes y en cada una de las fases descrita se cuantificaron citocinas proinflamatorias (citocinas tipo 1 (Th1)) y citocinas tolerogénicas (citocinas de tipo 2 (Th2)). Dentro del grupo de citocinas Th1 se cuantificaron los niveles de IFN- γ y TNF- α . Dentro del grupo de citocinas Th2 se cuantificó los niveles de IL-10.

Para ello se empleó el *kit Cytokine Bead Array (CBA; Becton and Dickinson, San Jose, CA)*. Este *kit* permite detectar, en tan solo 50 μ l de sobrenadante de cultivo celular, un máximo de 6 citocinas mediante un sistema de *sandwich* en el cual las partículas unidas a las correspondientes interleucinas eran detectadas, mediante citometría de flujo (*FACS-Calibur system, Becton Dickinson*) gracias a la emisión de fluorescencia. Las muestras se adquirían y se cuantificaban mediante *Bead Array software (Becton and Dickinson)*.

4. Generación de DCs

Dentro de los posibles mecanismos favorecedores de la persistencia del VHC en pacientes sometidos a TxH cabe citar a la acción del propio virus en las DCs así como el efecto ejercido por la pauta inmunosupresora sobre esta población celular. En ambos casos, la pérdida de la funcionalidad celular parece ser el factor favorecedor de la progresión viral.

Con el fin de indagar en la acción de la pauta inmunosupresora sobre la población de DCs, nos planteamos el abordaje de los siguientes estudios:

a) caracterizar el inmunofenotipo de DCs procedentes de monocitos de sangre periférica de pacientes sometidos a TxH por VHC⁺ (apartado 4.1).

b) valorar el efecto del FK (inmunosupresor de base en las distintas pautas inmunosupresoras de nuestros pacientes) sobre la capacidad madurativa de las DCs (apartado 4.2).

Las DCs se generaban *in vitro* a partir de una población de monocitos de sangre periférica. No obstante, en los estudios orientados al efecto del FK en DCs estas células se obtenían a partir de monocitos purificados procedentes de donación de sangre.

4.1 Generación, *in vitro*, de DCs en pacientes sometidos a TxH

Las DCs se generaron *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica obtenidos durante el PreTx y posteriormente durante el 2M y 6M del estudio.

Los monocitos se sembraron en placas de 6 pocillos (Costar, *Cultek S.L.U.*) a una densidad final de 1×10^6 células / mL. El medio de cultivo celular empleado fue RPMI 1640 (*Gibco-BRL, Life Technologies*) suplementado con L-glutamina (1 %),

V. Materiales y métodos

piruvato sódico (1 %), penicilina-streptomina (1 %), β -mercaptoethanol (1 ‰) y 10 % suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor 60°C, 30 min. (Gibco-BR, Life Technologies).

Para obtener el fenotipo de DCs inmaduras (sin estímulo antigénico), las células CD14⁺ se suplementaban durante el primer (d+0) y tercer día (d+3) del cultivo con 800 U/mL de GM-CSF (*Leucomax 300*, Novartis Pharma, S.A. Huningue, France) y 1000 U/mL de IL-4 (*R & D Systems, Europe, Ltd.*). El fenotipo maduro se obtenía al incubar las DCs inmaduras con 300 ng/ml CD40L (*ProSpec-Tany TechnoGene LTD*) durante las 24 h finales del cultivo.

En todos los experimentos las células se incubaban a 37°C y 5% de CO₂ durante un máximo de 7 días. El cambio de fenotipo inmaduro a fenotipo maduro se confirmaba mediante citometría de flujo (*FACS-Calibur system*, Becton Dickinson) en el último día del cultivo (d+7). Con el fin de evitar variaciones en el patrón de expresión de marcadores, todos los experimentos se realizaban con empleo del mismo lote de FBS. La puesta a punto de este protocolo fue publicado por nuestro grupo (Ocaña *et al.*, 2005).

4.2 Generación, *in vitro*, de DCs de donantes sanos

El objetivo de este apartado fue doble. Por una parte conseguir DCs con fenotipo maduro a partir de una estimulación antigénica de DCs inmaduras con LPS de *Escherichia coli* (*Sigma*) o con proteína recombinante no estructural del virus C, NS3₁₃₅₃₋₁₄₅₅ (NS3) correspondiente al genotipo viral 1a (Choo *et al.*, 1991). Esta proteína, con una pureza del 99,5% fue cedida, gentilmente, por BIOKIT S.A. Por otra parte, estudiar el efecto del FK en el proceso de maduración de las DCs.

Los resultados obtenidos referentes al efecto del FK en DCs maduras por LPS fueron publicados por nuestro grupo (Cos *et al.*, 2002).

4.2.1 Generación de DCs inmaduras

*E*l cultivo se estableció siguiendo la metodología indicada en el apartado 4.1.

4.2.2 Generación de DCs expuestas al FK

*L*a administración de FK (*Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan*) en los cultivos celulares se realizó el d+1 a una concentración final de 5 µg/ml. Una concentración referenciada por otros investigadores y empleada en cultivos de monocitos, células B, células T y en DCs procedentes de células CD34⁺ (Kino *et al.*, 1987; Keicho *et al.*, 1991; McMichael *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 2000).

Tras la administración del FK, las DCs se mantenían expuestas al inmunosupresor durante 6 días adicionales. En todos los experimentos, las citocinas GM-CSF e IL-4 necesarias para diferenciar los monocitos a DCs fueron adicionadas el primer día del cultivo celular (d+0) y, posteriormente, durante el d+3 del mismo.

El fenotipo celular se analizó el d+7 mediante citometría de flujo (apartado 4.2.5). En las condiciones descritas se obtenía una población de DCs inmaduras expuestas al FK (FK+DCs).

4.2.3 Generación de DCs expuestas a NS3

*E*l cambio de fenotipo inmaduro a fenotipo maduro se logró tras una estimulación con 10 µg/ml de NS3. Esta estimulación se llevó a cabo durante las 24h finales del cultivo (d+6). La confirmación del fenotipo maduro se realizó por citometría de flujo tal y como se indica en el apartado 4.2.5.

En las condiciones descritas se obtenía una población de DCs maduras (DCs+NS3) presentadoras de epítomos de NS3 del VHC.

4.2.4 Generación de DCs expuestas al FK y NS3

Los estudios basados en el efecto del FK sobre la maduración de DCs por NS3 se realizaron atendiendo al siguiente diseño: el d+1 se adicionaba 5 µg/ml de FK y el d+6 se adicionaba 10 µg/ml de NS3. El d+7 se analizaba el fenotipo celular por citometría de flujo tal y como se indica en el apartado 4.2.5.

En las condiciones descritas se obtenía una población de DCs maduras presentadoras de epítomos de NS3 del VHC en presencia de FK (DCs+FK+NS3).

4.2.4.1 Funcionalidad de DCs expuestas al FK y NS3

El diseño experimental propuesto en el apartado anterior se utilizó para estudios de funcionalidad de la población celular basado en la cuantificación de la producción de IL-12p70 mediante ELISA (apartado 4.2.4.1.1).

El mismo modelo celular se empleó en los estudios de translocación nuclear de la subunidad p65 de NF-κβ. El análisis se llevó a término mediante microscopía confocal (apartado 4.2.4.1.2).

Con el fin de descartar una inhibición de la fagocitosis de las DCs inmaduras por acción del FK, se realizó un estudio de la captación de *FITC-dextrano* en presencia y ausencia del inmunosupresor (apartado 4.2.4.2).

4.2.4.1.1 Producción de IL-12p70

La funcionalidad de las DCs, DCs+FK, DCs+NS3 y DCs+FK+NS3 se determinó en términos de producción de IL-12p70. Para ello, los sobrenadantes correspondientes al d+7 de los cultivos anteriores se almacenaron a -80°C hasta el momento de proceder a la cuantificación de IL-12p70. La cuantificación se efectuó mediante ELISA (PIERCE ENDOGEN, USA). La sensibilidad del test era < 3 pg/mL.

4.2.4.1.2 Translocación del factor nuclear NF- κ B

La translocación de la subunidad p65 de NF- κ B en DCs+FK, en DCs+NS3 y en DCs+FK+NS3 se evaluó mediante microscopia confocal atendiendo al método reportado por el grupo de Blaecke (Blaecke *et al.*, 2002). Para ello se empleó el anticuerpo monoclonal NF- κ B p65 (sc-8008; Santa Cruz, CA). El sc-8008 reconoce epítomos amino terminales de NF- κ B p65 de origen humano. Como anticuerpo secundario se empleó una IgG NF- κ B p65 (A-11029; Molecular Probes, Europe BV).

Para llevar a cabo los marcajes, las células se sometían a un citospín (Shandon, Cytospin II) realizado a 500 rpm durante 5 min. Las células se fijaban durante 15 min a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) al 4 % preparado con PBS. A continuación las células se lavaban con PBS y se sometían a tratamiento con metanol al 100% y congelación a -20°C durante 5 min. Después de la fijación y de la permeabilización, las células se lavaban dos veces con PBS al 1 % de BSA y 0.001 % NaN_3 (PBSA-BSA). A continuación las células eran incubadas a temperatura ambiente con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-NF- κ B (sc-8008). Transcurrido el período de incubación, las células se lavaban dos veces con PBS-BSA y se incubaban con 50 μL de una dilución 1:20 del anticuerpo secundario (A-1129) preparado en PBS-BSA. Las muestras se analizaron en la Unidad Científico Técnica de Soporte (UCTS) del Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron y con empleo de un microscópio confocal (LEICA TCS-NT).

4.2.4.2 Ensayo de endocitosis

La actividad endocítica de las DCs y de las DCs+FK, valorada en términos de captación de FITC-dextrano, se determinó durante los días d+3 y d+6 del cultivo. Para ello se emplearon 2×10^5 células las cuales se incubaron con 1 mg/mL de FITC-dextrano durante 120 min a 37°C . Para los controles de captación de FITC-dextrano se emplearon monocitos. Después de las correspondientes incubaciones, las células se lavaron dos veces con PBS para, posteriormente, poder ser analizadas mediante citometría de flujo.

4.2.5 Análisis del inmunofenotipo celular

El análisis de los marcadores de superficie celular se realizó, tanto para las DCs como para las DCs+FK, durante los días d+3 y d+6 del cultivo. Para las células estimuladas con NS3 (DCs+NS3 y DCs+ FK+NS3) el análisis se realizó en el d+7 del cultivo. En todos los casos las células eran recogidas y lavadas con PBS libre de calcio y de magnesio.

Para los marcajes se utilizaban 2×10^5 células las cuales se sometían a una incubación de 15 min. con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína y ficoeritrina. Las células se sometían, posteriormente, a dos lavados con PBS libre de calcio y de magnesio antes de proceder a su adquisición en el FACS.

Las parejas de anticuerpos monoclonales utilizados fueron: CD14-FITC (RMO52)/CD1a-PE (BL6), CD64-FITC (22)/CD54-PE (84H10), HLA-DR-FITC (Immu-357)/CD80-PE (MAB104), CD83-FITC (HB159)/CD86-PE (HA5.2B7), IgG1-FITC (679.1Mc7)/IgG1-PE (679.1Mc7) y IgG2b-FITC (MOPC-195) (Coulter-Immunotech, IZASA, S.A., España). En todos los experimentos se adquirieron 10.000 eventos.

5. **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en el modelo linfoproliferativo por grupos de pacientes fueron analizados mediante una T de Student, empleándose para ello el programa de análisis SPSS.

5.1 **Método Bayesiano**

Los resultados obtenidos en el modelo linfoproliferativo individualizado fueron analizados mediante el método de simulación basado en la inferencia Bayesiana. Este método nos permite, a partir de la media y la varianza muestral, simular, a priori, valores de las MLRs y calcular una distribución estadística de las razones de MLR tal y como se expone a continuación.

A partir del modelo experimental *in vitro* se ha calculado la probabilidad de que un receptor de un TxH desarrolle o no rechazo al órgano transplantado. Para evaluar el rechazo se ha empleado el I.E. tal y como se ha definido en el apartado 3.1. y atendiendo a las fases PreTx, 2M y 6M. Por tanto, dada la fase *i*-ésima calculamos el I.E. como

$$IE_i = \frac{MLR_i}{MLR_{i-1}},$$

siendo I.E. > 1 asociado a rechazo mientras que I.E. ≤ 1 se considera no rechazo.

Para valorar la probabilidad de rechazo se ha calculado la probabilidad de que el I.E. sea superior a 1, es decir P (I.E. > 1), asumiendo que el cociente entre MLRs seguirá una cierta distribución estadística que deberá ser estimada mediante métodos de simulación, tal y como se ha realizado en otros trabajos (Chen *et al.*, 1997; Newton *et al.*, 2001; Abril *et al.*, 2008). Dichos métodos nos permitirán llevar a cabo la inferencia estadística.

Se han utilizado métodos Bayesianos para llevar a cabo la inferencia estadística. En el paradigma Bayesiano se asume que cada parámetro tiene una cierta distribución "a priori" en base a la información que tenemos de los datos

V. Materiales y métodos

(Gelman *et al.*, 2003). Dado que las MLR toman valores mayores o iguales a 0, debemos asumir una distribución definida en la recta real positiva para las MLR. Si asumimos que la distribución "a priori" de las MLRs es Gamma, tal que $MLR_i \sim \text{Gamma}(\alpha_i, \beta_i)$ entonces $E(MLR_i) = \frac{\alpha_i}{\beta_i}$ y $\text{Var}(MLR_i) = \frac{\alpha_i}{\beta_i^2}$, siendo α_i y β_i valores desconocidos "a priori" y que deben ser estimados para llevar a cabo una posterior simulación de los datos. Dado que $E(MLR_i)$ puede estimarse inicialmente mediante la media muestral de MLR_i , es decir $\bar{X}_i$, y a su vez $\text{Var}(MLR_i)$ puede estimarse inicialmente mediante la varianza muestral de MLR_i , es decir S_i^2 , podemos asumir $\frac{\bar{X}_i}{S_i^2} = \hat{\beta}_i$ y $\frac{\bar{X}_i^2}{S_i^2} = \hat{\alpha}_i$. A partir de estos valores iniciales podemos simular los datos de cada MLR_i .

Para llevar a cabo la inferencia Bayesiana se han utilizado técnicas de Monte Carlo mediante cadenas de Markov (MCMC). Las MCMC técnicas de Monte Carlo vía cadenas de Markov permiten generar, de manera iterativa, observaciones de distribuciones de probabilidad permitiendo que la representación de la solución de un problema sea en función de una población hipotética. Estos problemas dependen de factores aleatorios o se pueden asociar a un modelo probabilístico (Gelman *et al.*, 2003). En nuestro caso, la inferencia Bayesiana se ha llevado a cabo simulando 1.500 valores de cada MLR_i . Esto nos ha permitido calcular cada IE_i . A partir de dicha simulación, se ha obtenido la distribución "a posteriori" de dichos valores determinando las $P(IE_i > 1)$.

El software utilizado ha sido WinBUGS 1.4 (Spiegelhalter *et al.*, 2002) que ha sido ejecutado desde el paquete estadístico R (www.R-project.org) mediante la librería R2WinBUGS (Sturtz *et al.*, 2005). Se han generado 3 cadenas independientes de datos con 1500 iteraciones (1500 valores simulados de cada parámetro) cada una para evaluar el ajuste de los parámetros. La convergencia de dichos parámetros ha sido valorada mediante los gráficos de Gelman y Rubin y de secuencia temporal (Gelman *et al.*, 2003).

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

1. Datos clínicos

En la **tabla 6.1** se describen las indicaciones del TxH para los 10 pacientes estudiados así como los tratamientos aplicados y la evolución clínica tras un seguimiento de seis meses. La lesión de preservación del injerto fue leve (Quick >60%, y transaminasas (GOT y GPT) <1000) en un 90% de los casos y moderada (Quick 30-60% y transaminasas: GOT y GPT) entre 1000 y 5000) en un 10 %.

Pacientes	Indicaciones del TxH	Genotipo VHC	Rechazo No/d/M	Tratamiento IS	Recidiva No/mes	Tratamiento antiviral	Evolución del TxH (6M)
P1	Cr	-	No	FK+C+M	No	No	Favorable
P2	VHC	1b	No	FK+C	No	No	Favorable
P3	VHC	1b	No	FK+C	1,5	PegIFN+Rb	Favorable
P4	VHC	1b	No	FK+C	No	No	Favorable
P5	VHC	1b	No	FK+CD25	No	No	Favorable
P6	VHC	1b	No	FK+CD25	1,5	PegIFN+Rb	Favorable
P7	C.E.	-	d4	FK+C	No	No	Favorable
P8	H.C.C./VHB	-	d7	FK+C+CD25	No	No	Favorable
P9	VHC	1b	d6/M5	FK+C+M	3	PegIFN+Rb	Favorable
P10	C.E.	-	d10	FK+C	No	No	Favorable

Tabla 6.1 Características de los pacientes. C.E., Cirrosis enólica; H.C.C., Hepatocarcinoma; Cr, criptogénica; VHB, virus de la hepatitis B. FK, Tacrolimus (FK506); C, corticoesteroides; CD25, anti-CD25; M, Micofeonolato mofetil; PegIFN+Rb, Interferón pegilado + Ribavirina. No = No rechazo; d = día en que se detecta rechazo; M = mes en que se detecta rechazo.

El 40 % de los pacientes candidatos a TxH fueron VHC- y las enfermedades de base fueron: hepatocarcinoma y VHB (paciente 8 (P8)), criptogénica (P1) y cirrosis enólica (P7 y P10). Tres pacientes experimentaron episodios de rechazo durante los 10 primeros días postrasplante (P7, P8, P9 y P10) y uno, (P9) desarrolló un segundo episodio de rechazo durante el 5º mes. En estos pacientes, el rechazo se resolvió con la administración de bolus de inmunosupresión. El resto de pacientes (P1, P2, P3, P4 P5 y P6) no experimentaron, durante el periodo de seguimiento, ningún episodio de rechazo. En el 60 % restante, la causa del TxH fue por cirrosis

VI. Resultados

hepática por VHC; los 6 pacientes (P2, P3, P4, P5, P6 y P9) estaban infectados por VHC del genotipo 1b. El virus recidivó en un 50% de los casos (P3, P6 y P9) durante los tres primeros meses tras el TxH. Estos pacientes recibieron un tratamiento a base de PEG-IFN + Ribavirina. Solamente un paciente (P9) consiguió negativizar el virus tras el tratamiento. Indicar que nuestro Centro no realiza biopsias protocolarias. Aunque la recidiva del VHC tras el TxH es universal, en nuestro estudio la recidiva del VHC significa que el paciente ha experimentado una alteración del perfil hepático. En todos los pacientes el inmunosupresor de base fue FK. Al finalizar el estudio (6M), todos los pacientes tenían una función hepática correcta.

La **tabla 6.2** muestra los niveles plasmáticos de FK (ng/mL) durante el primer mes del TxH y, posteriormente, durante el segundo y sexto.

Pacientes	Mes 1 del TxH	Mes 2 del TxH	Mes 6 del TxH	Reducción (%) del FK (mes 2)	Reducción (%) del FK (mes 6)
P1	11,169 ± 5,819 (n=16)	12,8 ± 1,838 (n=2)	7,6 (*)	-	68,045
P2	6,475 ± 2,982 (n=16)	7,3 (n=1)	9,5 (n=1)	-	-
P3	10,25 ± 4,399 (n=14)	7,6 (n=1)	5,2 (n=1)	25,853	49,268
P4	12,05 ± 3,031 (n=14)	15,233 ± 3,683 (n=3)	10 (n=1)	-	17,012
P5	13,2 ± 3,033 (n=21)	13,7 ± 4,636 (n=3)	10,7 ± 1,552 (n=3)	-	18,939
P6	13,424 ± 5,227 (n=25)	7,1 ± 2,97 (n=2)	7,8 (n=1)	47,109	41,895
P7	13,311 ± 4,502 (n=18)	7,5 ± 1,556 (n=2)	12,2 (n=1)	43,655	8,346
P8	14,279 ± 4,172 (n=24)	13,4 ± 2,263 (n=2)	9,5 (n=1)	6,155	34,468
P9	7,488 ± 3,242 (n=17)	16,3 ± 2,263 (n=2)	13,567 ± 4,669 (n=3)	-	-
P10	15,136 ± 4,217 (n=22)	11,25 ± 1,072 (n=4)	10,1 (n=1)	25,673	33,271

Tabla 6.2 Niveles (ng/mL) promedio de FK plasmático durante el primer mes del TxH y, posteriormente, durante el segundo y sexto mes. Número de determinaciones realizadas (n). (*); Valor medio de los niveles de FK plasmáticos durante los meses anterior y posterior al 6 mes dado que en el historial clínico no figuraba los valores correspondientes al sexto mes.

VI. Resultados

Los resultados indican que los pacientes P1 (VHC⁻), P3 (VHC⁺) y P6 (VHC⁺) son los que experimentaron una mayor reducción de los niveles plasmáticos de FK, llegando a reducciones superiores al 40 % en 6M (P1: 68,04 %; P3: 49,26 %; P6: 41,89 %). Para el resto de pacientes, la reducción de los niveles fue mucho menor.

La disminución de los niveles plasmáticos de FK para el paciente P1 (VHC⁻) fue como resultado de una disminución de la dosis de inmunosupresión al presentar un perfil hepático estrictamente normal.

Para los pacientes P3 (VHC⁺) y P6 (VHC⁺), estas disminuciones fueron consecuencia directa de la recidiva viral tras el TxH. La recidiva del VHC y, en consecuencia, el daño hepático que ello comporta obligó a reducir las dosis de inmunosupresión con el fin de reestablecer la capacidad de respuesta inmunológica del paciente frente al VHC. La disminución de la dosis de inmunosupresión se refleja con una disminución de los niveles plasmáticos de FK. A pesar de esta reducción en los niveles de IS no se detectó, ni en P3 ni en P6, ningún episodio de rechazo.

Para los pacientes (P2, P4 y P5, todos VHC⁺), los niveles plasmáticos de FK se redujeron en mucho menor proporción porque el virus no recidivó y además mantuvieron un perfil estrictamente normal durante los 6 meses de seguimiento.

Los pacientes P7, P8 y P10 (todos ellos VHC⁻) experimentaron rechazo durante los primeros días tras el TxH, lo que obligó a mantener dosis altas de IS.

El paciente que experimentó un tratamiento IS y antiviral más comprometido fue el P9 (VHC⁺). El día 6 tras el TxH experimentó un rechazo, se le administró bolus de esteroides y se mantuvo alta la IS. Al tercer mes presentó recidiva viral con disfunción hepática severa lo que obligó a reducir la IS al mínimo y se inició tratamiento antiviral. Pero en el 5º mes tras TxH presentó, nuevamente, rechazo presumiblemente por la reducción tan importante de la IS y también por la acción del interferón. Es por ello que durante el 6º mes del TxH los niveles plasmáticos de IS se mantuvieron elevados.

2. Estudio linfoproliferativo

Los resultados linfoproliferativos se analizaron desde dos vertientes: a) por grupos de pacientes, según presentaban o no episodios de rechazo clínico durante el primer mes tras el TxH y, b) individualizado; por tratarse de una muestra poblacional con distintas indicaciones al TxH y distintas pautas inmunosupresoras.

2.1 Por grupos:

La figura 6.1 muestra los resultados, en términos de O.D. (550 nm), de la respuesta proliferativa de células T CD4⁺ del receptor frente MCI del donante en el grupo de pacientes que presentaron algún episodio de rechazo durante el primer mes tras el TxH (P7, P8, P9 y P10). Los resultados obtenidos en el PreTx se comparan tanto con los controles de proliferación de células T CD4⁺ (Figura 6.1 A) como con los resultados obtenidos durante el 2M y 6M del TxH (Figura 6.1 B).

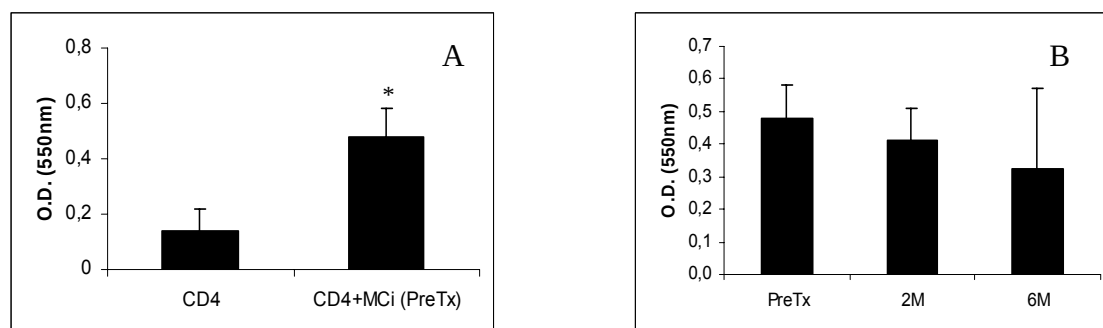


Figura 6.1. Grupo de pacientes con episodios de rechazo. A) Respuesta proliferativa (O.D. a 550 nm) de células T CD4⁺ tras 7 días de cultivo en ausencia (CD4⁺) o en presencia de MC del donante irradiadas a 30 Gy (MCI); (CD4 + MCI) en las fases de PreTx. **B)** Los resultados obtenidos en el PreTx se compararon con los resultados de CD4 + MCI obtenidos durante 2M y 6M. El valor promedio de O.D. del blanco fue $0,092 \pm 0,009$ (n=16). El valor promedio de O.D. de MCI (control) fue $0,105 \pm 0,030$ (n=12). (*) $P < 0,05$.

Los resultados muestran que en el PreTx, las MCI del donante promueven la proliferación de células T CD4⁺ del receptor, con diferencias en los valores de O.D. estadísticamente significativos en comparación con los controles de proliferación de CD4⁺ no estimuladas (Figura 6.1 A). Sin embargo, no se observan diferencias

VI. Resultados

estadísticamente significativas al comparar los valores de O.D. obtenidos en los cocultivos entre $CD4^+$ + MCI del PreTx, con los valores de O.D. de los correspondientes cocultivos realizados en las fases posteriores al TxH; 2M y 6M (Figura 6.1 B).

La **figura 6.2** muestra los resultados, en términos de O.D., de respuesta proliferativa de células T $CD4^+$ del receptor frente MCI del donante en el grupo de pacientes sin ningún episodio de rechazo tras el TxH (P1, P2, P3, P4, P5, y P6).

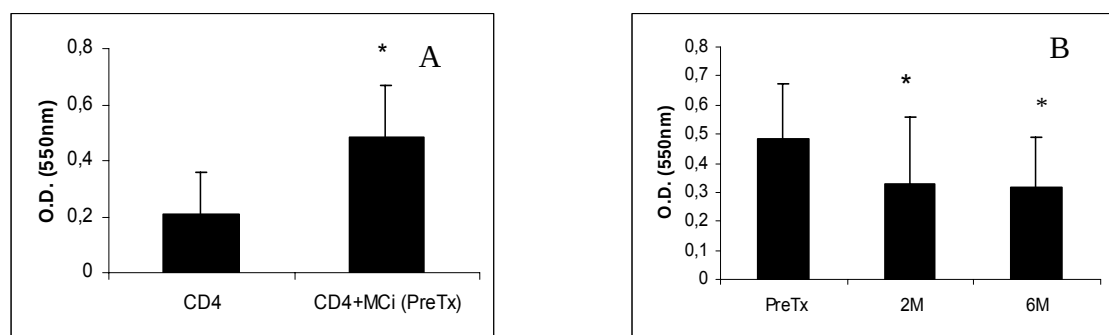


Figura 6.2. Grupo de pacientes sin episodios de rechazo. A) Respuesta proliferativa (O.D. a 550 nm) de células T $CD4^+$ tras 7 días de cultivo en ausencia ($CD4^+$) o en presencia de MC del donante irradiadas a 30 Gy (MCI) ($CD4^+$ + MCI) en la fase de PreTx. **B)** Los resultados obtenidos en el PreTx se compararon con los resultados obtenidos en 2M y 6M. El valor promedio de O.D. del blanco fue $0,099 \pm 0,011$ (n=20). El valor promedio de O.D. de MCI (control) fue $0,112 \pm 0,030$ (n=18). (*) $P < 0,05$.

De manera comparable a los resultados obtenidos en la figura 6.1, las MCI del donante promueven la proliferación de células T $CD4^+$ del receptor, con valores de O.D. estadísticamente significativos en comparación con los controles de proliferación de $CD4^+$ (Figura 6.2 A). No obstante, cuando los cocultivos se realizaron en las fases posteriores al TxH (2M y 6M), los valores de O.D. obtenidos fueron significativamente inferiores a los valores de O.D. obtenidos durante el PreTx.

Los resultados del estudio linfoproliferativo indican, en ambos grupos, que durante el PreTx, y por lo tanto en ausencia de tratamiento inmunosupresor, es posible detectar una activación de la capacidad proliferativa de células $CD4^+$ del receptor frente a antígenos del donante (MCI). Por otra parte, tras el TxH (2M y 6M), y por lo tanto bajo tratamiento inmunosupresor, éste parece controlar la respuesta proliferativa de $CD4^+$ frente a aloantígenos (Figura 6.1 B) o incluso reducirla (Figura 6.2 B).

Estos resultados sugerirían que los pacientes con episodio de rechazo clínico durante el primer mes tras el TxH podrían considerarse como no respondedores a la IS dado que ésta no disminuye la respuesta $CD4^+$ del receptor frente a antígenos del donante (se mantiene una respuesta $CD4^+$ frente a MCI comparable a la obtenida en la fase libre de inmunosupresión). Contrariamente, los pacientes que no experimentan episodios de rechazo podrían considerarse, según el modelo celular, como respondedores al tratamiento inmunosupresor dado que la respuesta $CD4^+$ frente a MCI disminuye, de manera estadísticamente significativa, a la obtenida en la fase libre de inmunosupresión. En este grupo, 5 pacientes (P1, P3, P4, P5 y P6) de 6 analizados, experimentaron en 6M una reducción importante en los niveles plasmáticos de FK (rango de 17,01 % - 68,05 %).

2.2 Por individuos:

La figura 6.3 muestra los I.E., por paciente, correspondiente al grupo de individuos con episodios de rechazo durante el primer mes tras el TxH.

En la fase de PreTx todos los pacientes presentaron valores de I.E. > 1 (P7: $1,81 \pm 0,25$; P8: $3,35 \pm 1,23$; P9: $6,28 \pm 2,27$ y P10: $7,43 \pm 1,88$).

En la fase 2M los valores de I.E. fueron < 1 en tres de cuatro pacientes (75 %) (P7: $0,99 \pm 0,2$; P8: $0,8 \pm 0,51$ y P10: $0,77 \pm 0,03$) y del orden de 1 en un paciente de cuatro (25 %) (P9: $1,03 \pm 0,2$).

En la fase 6M los valores de I.E. fueron semejantes a los obtenidos en la fase anterior; dos pacientes de tres (66,66 %) con I.E. < 1 (P8: $0,22 \pm 0,12$ y P10: $0,98 \pm 0,07$) y un paciente de tres (33,33 %) con I.E. > 1 (P7: $1,16 \pm 0,22$). No se obtuvo I.E. para el paciente P9 por no disponer de la suficiente cantidad de células para hacer el estudio.

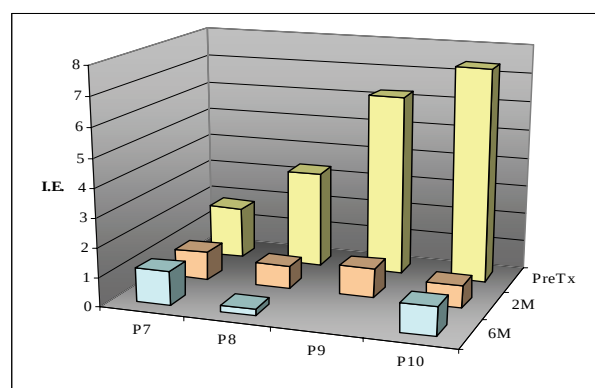


Figura 6.3 Grupo de pacientes con episodios de rechazo. Valores de I.E. por paciente obtenidos en las diferentes fases de estudio (PreTx, 2M y 6M). Mediante métodos de Monte Carlo, la inferencia bayesiana se ha llevado a cabo simulando 1.500 valores de cada MLR_i .

VI. Resultados

En la **figura 6.4** se muestran los I.E., por paciente, correspondientes al grupo de individuos sin episodios de rechazo durante las dos semanas posteriores al TxH.

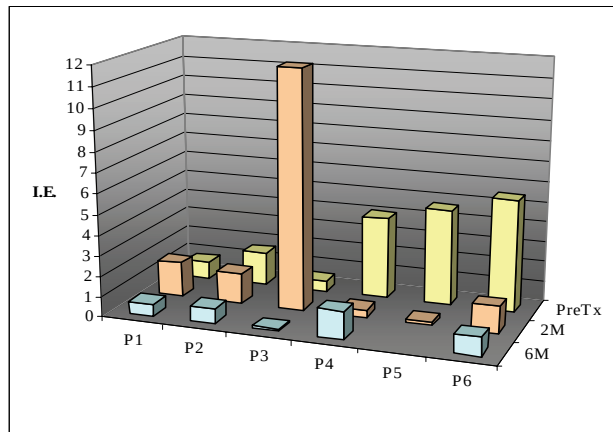


Figura 6.4 Grupo de pacientes sin episodios de rechazo. Valores de I.E. por paciente obtenidos en las diferentes fases de estudio (PreTx, 2M y 6M). Mediante métodos de Monte Carlo, la inferencia bayesiana se ha llevado a cabo simulando 1.500 valores de cada MLR_i .

En la fase de PreTx los valores de I.E. fueron > 1 en cuatro pacientes de seis (66,66 %) (P2: $1,63 \pm 0,47$; P4: $4,04 \pm 0,25$; P5: $4,72 \pm 2,07$ y P6: $5,51 \pm 0,63$) e < 1 en dos de seis (33,33 %) (P1: $0,84 \pm 0,22$; P3: $0,54 \pm 0,2$).

En la fase 2M, los valores de I.E. fueron > 1 en cuatro pacientes de seis (66,66 %) (P1: $1,72 \pm 0,17$; P2: $1,47 \pm 0,23$; P3: $11,75 \pm 3,24$ y P6: $1,3 \pm 0,1$) e < 1 en dos pacientes de seis (33,33 %) (P4: $0,4 \pm 0,15$ y P5: $0,19 \pm 0,04$).

En la fase 6M, los valores I.E. fueron > 1 en un paciente de cinco (20 %) (P4: $1,35 \pm 0,59$) e < 1 en cuatro pacientes de cinco (80 %) (P1: $0,58 \pm 0,058$; P2: $0,72 \pm 0,08$; P3: $0,12 \pm 0,15$ y P6: $0,9 \pm 0,12$). No se obtuvo I.E. para el paciente P5 por no disponer de la suficiente cantidad de células para hacer el estudio.

La **tabla 6.3** indica, de manera resumida, los valores de I.E. para cada una de las fases de estudio y la significación estadística, según el método de Bayes, aplicado al grupo de pacientes sin episodios de rechazo (A) o con algún episodio de rechazo (B).

Pacientes	I.E. Pre TX	I.E. 2M	I. E. 6M
P1	< 1	> 1 **	< 1 ***
P2	> 1	> 1 **	< 1 ***
P3	< 1 *	> 1	< 1
P4	> 1 *	< 1 **	> 1
P5	> 1 *	< 1 **	nd
P6	> 1 *	> 1 **	< 1

Tabla 6.3 A. Pacientes sin episodios de rechazo. (*, **, ***) $P < 0,05$ para PreTx vs. CD4⁺, 2M vs. PreTx y 6M vs. 2M. (nd): No determinado por falta de las poblaciones celulares correspondientes.

Pacientes	I.E. Pre TX	I.E. 2M	I. E. 6M
P7	> 1 *	< 1	> 1
P8	> 1 *	< 1	< 1
P9	> 1 *	= 1	nd
P10	> 1 *	< 1 **	< 1

Tabla 6.3 B. Pacientes con algún episodios de rechazo. (*, **) $P < 0,05$ para PreTx vs. CD4⁺, 2M vs. PreTx. (nd): No determinado por falta de las poblaciones celulares correspondientes.

Los resultados obtenidos en el grupo B (Tabla 6.3 B) indican que durante el preTx todos los individuos (100 %) presentan un I.E. > 1 (respuesta linfoproliferativa *in vitro*, activada). Un dato que concuerda con el hecho de que este grupo de pacientes desarrolla episodios de rechazo durante el primer mes del TxH.

Sorprendentemente, durante 2M del TxH el modelo celular *in vitro* nos indica que el 100 % de los pacientes logran un I.E. ≤ 1 (respuesta linfoproliferativa *in vitro* no activada o inhibida); un dato que podría explicarse por la acción de la pauta inmunosupresora administrada *in vivo*. Este comportamiento (I.E. < 1) se mantiene en un 66,6 % de los pacientes analizados (P8 y P10). El P9 no pudo analizarse.

Si nos centramos en el grupo A (Tabla 6.3 A), pacientes sin episodios de rechazo durante el primer mes del TxH, observamos que los valores para el I.E. son más diversos que los obtenidos en el grupo B. Sin embargo, de 4 pacientes (P2, P4, P5 y P6) de los seis analizados (66,6 %) con I.E. > 1, 2 pacientes (P2 y P6) logran al finalizar el estudio (6M) un I.E. < 1. Consideramos de interés resaltar que 2 pacientes (P1 y P3) que durante el PreTx obtuvieron un I.E. < 1, lo mantienen en la fase final del estudio (6M).

Estos resultados sugieren que el efecto fisiológico de la pauta inmunosupresora administrada *in vivo* sería detectada *in vitro* mediante el test de proliferación celular propuesto. Por lo tanto, la cuantificación del I.E. en el periodo

VI. Resultados

posterior al TxH podría considerarse como una herramienta predictiva de la evolución clínica del paciente; con tendencia a rechazar el injerto (I.E. >1) o bien con tendencia a aceptar el injerto (I.E. <1).

2.2.1 Probabilidad de rechazo. Análisis de Bayes

En base a los resultados correspondientes al I.E., se ha podido obtener la probabilidad de rechazo para cada paciente y en cada una de las fases del estudio. La **tabla 6.4** indica la probabilidad de rechazo ($P_{I.E.} > 1$) según el modelo de análisis por Bayes.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
PreTx	21,3	95	2,82	100	100	100	100	99,4	100	100
2M	100	99,2	100	0,22	0	99,9	46,9	25,3	54,3	0
6M	0	0,17	0	70,9	nd	22	76,9	0,26	nd	39,3

Tabla 6.4 Probabilidad de rechazo. Probabilidad de rechazo ($P_{I.E.} > 1$) en %, de cada uno de los pacientes (P1,...,P10) y en cada una de las fases del estudio según modelo de simulación por Bayes. (nd): No determinada por falta de las poblaciones celulares correspondientes.

En la fase libre de inmunosupresión (PreTx) se observó que la probabilidad de rechazar el injerto era > 50 % en un 80 % de los casos (P2, P4, P5, P6, P7, P8, P9 y P10). Bajo tratamiento inmunosupresor (2M), esta probabilidad se redujo al 50% de los individuos (P1, P2, P3, P6 y P9). Sin embargo, durante el último mes de estudio (6M) tan solo el 25% de los pacientes (P4 y P7) presentaron una probabilidad de rechazo > 50 %. El resto de los pacientes (75 %; P1, P2, P3, P6, P8 y P10) se mostraban, según el modelo probabilístico, como individuos con una probabilidad de rechazo inferior al 50 %; llegándose a detectar incluso tres pacientes (P1, P2 y P3) con una probabilidad de rechazo ≤ 17 %. Estos resultados estarían en consonancia con la hipótesis propuesta en el apartado anterior en la cual la acción de la pauta inmunosupresora administrada *in vivo* podría quedar reflejada en el modelo celular propuesto.

3. Cuantificación de citocinas

Si bien los resultados anteriores solamente aportan información referente a la capacidad proliferativa de las células T CD4⁺ en respuesta los antígenos del donante, éstos no informan sobre la funcionalidad de estas células entendida, en nuestro estudio, como la capacidad por parte de las células CD4⁺ en producir citocinas tras una estimulación antigénica.

Con el fin de averiguar si el tratamiento inmunosupresor *in vivo* podía afectar a la funcionalidad celular *in vitro* se procedió a cuantificar los niveles de citocinas implicadas tanto en el rechazo (tipo Th1; IFN- γ y TNF- α) como en la aceptación (Th2; IL-10) del injerto. Estas citocinas fueron cuantificadas a partir de los sobrenadantes de los cocultivos entre células T CD4⁺ (del receptor) y MCI (del donante) para cada una de las fases del estudio (PreTx, 2M y 6M).

3.1 Pacientes con episodios de rechazo

La **tabla 6.5** muestra los niveles (pg/ml) de citocinas correspondientes al grupo de pacientes con episodios de rechazo detectados durante el primer mes tras el TxH.

Pacientes	Citocinas [pg/mL]	PreTx	2M	6M
P7	IFN- γ	13615,8	1088,1	9034,1
	TNF- α	266,2	42,6	292,6
	IL-10	64,3	17,3	47,3
P8	IFN- γ	4951,4	701,4	<10
	TNF- α	27,8	35,4	<10
	IL-10	51,9	21	<10
P9	IFN- γ	4991,7	850,3	<i>nd</i>
	TNF- α	71,8	12,20	
	IL-10	154,4	254,6	
P10	IFN- γ	12295,8	16882,2	<10
	TNF- α	150,6	548,5	<10
	IL-10	44,6	13,7	<10

Tabla 6.5 Niveles (pg/ml) de citocinas en sobrenadante de cultivo celular. Pacientes con episodios de rechazo durante las dos primeras semanas tras el TxH. (*nd*): niveles no determinados por falta de las poblaciones celulares correspondientes.

VI. Resultados

La pauta inmunosupresora administrada durante el 2M se asoció con una alteración en los niveles de Th1 y Th2 en comparación con los niveles obtenidos en el PreTx. Las citocinas experimentaron, en términos generales, una reducción en sus niveles respecto al PreTx. Las que presentaron una mayor reducción (superior al 80%) correspondieron a las citocinas implicadas en el rechazo; el IFN- γ , en tres de cuatro pacientes (P7: 92 %; P8: 85,8 % y, P9: 82,9 %) y el TNF- α , en dos de cuatro pacientes (P7: 83,9 % y P9: 83 %).

La IL-10 experimentó una reducción intermedia (entre el 50 % y el 75 %) en tres de cuatro pacientes (P7: 73 %; P8: 59,5 % y, P10: 69,2 %).

Por el contrario, los niveles de TNF- α se incrementaron en dos de cuatro pacientes (P8: 27,3 % y en P10: 364,2 %) y los niveles de IL-10 en uno de cuatro pacientes (P9: 164,8 %).

En la fase 6M, los niveles de citocinas implicadas tanto en el rechazo como en la aceptación del injerto (IFN- γ , TNF- α e IL-10) fueron inferiores a 10 pg/ml en dos de cuatro pacientes (P8 y P10). No se obtuvieron resultados en 6M para el paciente P9 por no disponer de la suficiente cantidad de células para hacer el estudio.

3.2 Pacientes sin episodios de rechazo

La **Tabla 6.6** muestra los niveles (pg/ml) de citocinas Th1 y Th2 en el grupo de pacientes sin episodios de rechazo. De manera comparable a los resultados obtenidos en el grupo de rechazo, la pauta inmunosupresora recibida *in vivo* modificó los niveles de citocinas obtenidas en el PreTx.

En la fase 2M, las citocinas Th1 que experimentaron una mayor disminución (superior al 85 %) se detectaron en cinco de seis pacientes: P1 (88,5 % para TNF- α); P2 (89,2 % para IFN- γ ; 100 % para TNF- α); P3 (100 % para IFN- γ ; 100 % para TNF- α); P4 (89,4 % para IFN- γ ; 100 % para TNF- α) y P5 (99,6 % para IFN- γ). A ellas les siguen, con una reducción intermedia (entre el 60 y 85 %) para IFN- γ y TNF- α en tres de seis pacientes: P1 (75,1 % para IFN- γ); P5 (67 % para TNF- α) y P6 (78,2 % para IFN- γ). Para este último paciente, los niveles de TNF- α se redujeron a tan solo un 33,7 %.

VI. Resultados

Pacientes	Citocinas [pg/mL]	PreTx	2M	6M
P1	IFN- γ TNF- α IL-10	8102,7 107,8 47,9	2020,9 12,4 208,5	2823,9 39,3 88,7
P2	IFN- γ TNF- α IL-10	11432,8 42,5 141,6	1235,7 <10 16,3	8639,4 27,8 20,1
P3	IFN- γ TNF- α IL-10	321,3 188 <10	<10 <10 78,8	<10 <10 56
P4	IFN- γ TNF- α IL-10	10254,2 43 <10	1061,8 <10 30,7	3765,1 <10 19
P5	IFN- γ TNF- α IL-10	10341,7 328,7 15,5	343,1 108,4 <10	<i>nd</i>
P6	IFN- γ TNF- α IL-10	13484,7 211,9 <10	2949,1 140,6 39,1	6156 58,2 19,4

Tabla 6.6. Niveles (pg/ml) de citocinas en sobrenadante de cultivo celular. Pacientes sin episodios de rechazo tras el TxH. (*nd*): niveles no determinados por falta de las poblaciones celulares correspondientes.

Para la citocina de tipo Th2, en cuatro pacientes de seis se detectaron niveles cuantificables de IL-10 (P1: 208,5 pg/ml; P3: 78,8 pg/ml; P4: 30,7 pg/ml; y P6: 39,1 pg/ml) a diferencia de los niveles indetectables de IL-10, durante el PreTx, para los pacientes P3, P4 y P6. En P1 los niveles alcanzados fueron de 208,5 pg/ml, lo que representa un incremento de 4,3 veces los niveles obtenidos en el PreTx. Por el contrario, en el paciente P2 se obtuvo una disminución en los niveles de IL-10 del 88,4% mientras que en el paciente P5, no se detectó IL-10.

En 6M, el paciente P3 continuó con niveles indetectables de citocinas Th1 tal y como ya se había observado en 2M. Este patrón se observó, también, para el TNF- α del paciente P4. Para el resto de pacientes, los niveles de citocinas Th1 se redujeron, entre el 24 % y el 85 %, en comparación con el PreTx. Los niveles de IL-10 se incrementaron respecto los niveles obtenidos en el PreTx en cuatro pacientes de seis totales (P1, P3, P4 y P6), con un rango comprendido entre 19 pg/ml (P6) y 88,7 pg/ml (P1). De manera opuesta, en el paciente P2 los niveles de IL-10 se redujeron en un 85,8 %. No se obtuvieron resultados en 6M para el paciente P5 por no disponer de la suficiente cantidad de células para hacer el estudio.

VI. Resultados

Los resultados de funcionalidad celular, basados en la cuantificación de citocinas Th1 y Th2, ponen de manifiesto una importante reducción de los niveles de citocinas implicadas en el rechazo (Th1) bajo tratamiento inmunosupresor. Un dato que se observa tanto en el grupo de pacientes con episodios de rechazo como en el grupo de pacientes sin episodios de rechazo.

La diferencia más destacada entre ambos grupos está en función de la producción de IL-10 (Th2); en la mayoría de pacientes sin rechazo (4/6; 66,6 %) se observa un aumento de la expresión de IL-10 en 6M, mientras que en la mayoría de pacientes con episodios de rechazo (3/4; 75 %) se obtiene el efecto contrario, es decir, una disminución de esta citocina en comparación con los niveles obtenidos en el PreTx. Estos datos sugieren que la determinación, *in vitro*, de los niveles de IL-10 podría ser otra herramienta predictiva de la evolución clínica de los pacientes sometidos a TxH. Los resultados obtenidos están en consonancia con una favorable evolución clínica de los pacientes.

3.3 Pacientes VHC⁺

La **tabla 6.7** muestra los niveles (pg/ml) de citocinas Th1 / Th2 en los sobrenadantes de los cocultivos de CD4⁺ del receptor frente a MCi del donante en el grupo de pacientes con y sin recidiva viral tras el TxH. En el grupo de pacientes sometidos a TxH por VHC⁺ (n=6), la mitad (3/6) pacientes (P3, P6 y P9) presentaron episodios de recidiva viral durante los tres primeros meses del TxH, mientras que la otra mitad (P2, P4 y P5) no desarrollaron ningún episodio de recidiva del VHC⁺. Solamente el paciente P9 presentó un episodio de rechazo al injerto.

Grupo de pacientes con recidiva viral

Pacientes	Citocinas [pg/mL]	PreTx	2M	6M
P3	IFN- γ	321,3	<10	<10
	TNF- α	188	<10	<10
	IL-10	<10	78,8	56
P6	IFN- γ	13484,7	2949,1	6156
	TNF- α	211,9	140,6	58,2
	IL-10	<10	39,1	19,4
P9	IFN- γ	4991,7	850,3	nd
	TNF- α	71,8	12,20	
	IL-10	154,4	254,6	

Grupo de pacientes sin recidiva viral

Pacientes	Citocinas [pg/mL]	PreTx	2M	6M
P2	IFN- γ	11432,8	1235,7	8639,4
	TNF- α	42,5	<10	27,8
	IL-10	141,6	16,3	20,1
P4	IFN- γ	10254,2	1061,8	3765,1
	TNF- α	43	<10	<10
	IL-10	<10	30,7	19
P5	IFN- γ	10341,7	343,1	nd
	TNF- α	328,7	108,4	
	IL-10	15,5	<10	

Tabla 6.7 Niveles (pg/ml) de citocinas Th1 / Th2 en sobrenadante de cultivo celular en el grupo de pacientes sometidos a TxH por VHC+. (nd): niveles no determinados por falta de las poblaciones celulares correspondientes.

Los resultados obtenidos indican que el patrón de citocinas Th1 en todos los pacientes infectados por virus C fue comparable. Los niveles de Th1 descendieron durante el tratamiento inmunosupresor en comparación con los valores obtenidos en el PreTx. El resultado más interesante lo encontramos en los niveles de IL-10 (Th2). Los niveles de IL-10 fueron diferentes según el grupo. En todos aquellos pacientes con recidiva viral (P3, P6 y P9) los niveles de IL-10 aumentaron durante el segundo y sexto mes (en P9 no fue posible la medición a los 6M) en comparación con los niveles obtenidos en el PreTx. Por el contrario, en el grupo de pacientes sin recidiva viral, en 2 pacientes (P2 y P5) de 3 los niveles de IL-10 disminuyeron en relación a los niveles obtenidos en el PreTx.

VI. Resultados

Estos resultados sugieren que tras el TxH, si bien una disminución de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ juntamente con un aumento de IL-10 puede estar relacionada con un proceso de tolerancia inmunológica al injerto, esta situación podría repercutir negativamente en aquellos pacientes infectados por VHC. En este sentido, una disminución de citocinas Th1 juntamente con una elevación de IL-10 podría favorecer una progresión del VHC al disminuir la presión ejercida por el sistema inmune del huésped al virus.

4. Criterios para la identificación de pacientes candidatos a retirada de la inmunosupresión

La identificación de posibles candidatos que tras el TxH podrían ser sometidos a una retirada total o parcial de la pauta inmunosupresora serían aquellos que, desde un punto de vista experimental, cumpliesen durante el sexto mes del TxH los siguientes criterios:

- a) I.E. < 1
- b) Probabilidad de rechazo ($P_{I.E.} > 1$) $< 50 \%$.
- c) Reducción de citocinas Th1 ($IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$) $\geq 50\%$.
- d) Incremento de los niveles de IL-10 en relación a los niveles basales (PreTxH).

La **tabla 6.8** muestra los pacientes que reúnen algunos o la totalidad de los criterios anteriores a los 6M.

Criterios de inclusión		Pacientes (6M)
I.E. < 1		P1, P2, P3, P6, P8, P10
$((P_{I.E.} > 1)) < 50 \%$		P1, P2, P3, P6, P8, P10
Th1 $< 50 \%$	$IFN-\gamma$	P1, P3, P4, P6, P8, P10
	$TNF-\alpha$	P1, P3, P4, P6, P8, P10
Incrementos de IL-10		P1, P3, P4, P6

Tabla 6.8 Pacientes que reúnen los criterios de inclusión para la retirada total o parcial de la pauta inmunosupresora tras el sexto mes del TxH.

Como se muestra en la tabla 6.8, tan solo 3 pacientes (P1, P3 y P6) de un total de 10 pacientes estudiados cumplen con la totalidad de los criterios de inclusión y por lo tanto, podrían ser considerados como los únicos candidatos a una retirada total o parcial de la pauta inmunosupresora.

VI. Resultados

Esta propuesta vendría reforzada por los resultados obtenidos al analizar los niveles de FK plasmáticos en 2M y 6M. Curiosamente, los pacientes P1, P3 (VHC⁺) y P6 (VHC⁺) son precisamente los que experimentan una mayor reducción de los niveles plasmáticos de FK (P1: 68,04 % en 6M; P3: 25,85 % en 2M y 49,26 % en 6M; P6: 47,10 % en 2M y 41,89 % en 6M) (Tabla 6.2).

En este sentido, los resultados clínicos de P1, P3 y P6 (apartado 1 de los resultados) concuerdan con la propuesta de disminuir la dosis de inmunosupresión en base a los resultados obtenidos en el modelo experimental.

5. Caracterización inmunofenotípica de DCs en pacientes sometidos a TxH por VHC

El análisis por citometría de flujo realizado en las poblaciones monocitarias obtenidas tras una selección inmunomagnética de CD14⁺ a partir de PBMC de pacientes candidatos TxH por VHC reveló un fenotipo típico: CD14⁺, CD54⁺, CD64⁺, CD86⁺ y HLA-DR⁺.

Cuando los monocitos se incubaban durante 7 días en presencia de GM-CSF e IL-4, éstos experimentaron un cambio de fenotipo, adquiriendo la morfología característica de DCs inmaduras (DCsi); abundante citoplasma, una membrana celular irregular así como numerosas prolongaciones citoplasmáticas (Cos *et al.*, 2002).

El análisis, mediante citometría de flujo, de esta población celular confirmó la presencia de DCsi con un patrón de marcadores típico (CD14⁻, CD1a⁺, CD64⁻ CD83⁻, HLA-DR⁺, CD54⁺ CD80⁺ y CD86⁺) tal y como ya habíamos observado al generar DCs a partir de monocitos de sangre periférica de donante sano (Cos *et al.*, 2002).

5.1 En pacientes VHC+ con recidiva viral

La figura 6.5 muestra los perfiles correspondientes a los valores medios de intensidad de fluorescencia (FMI) para diferentes marcadores de DCs (HLA-DR, CD80, CD83 y CD86) en el grupo de pacientes VHC⁺ con episodios de recidiva viral tras el TxH.

VI. Resultados

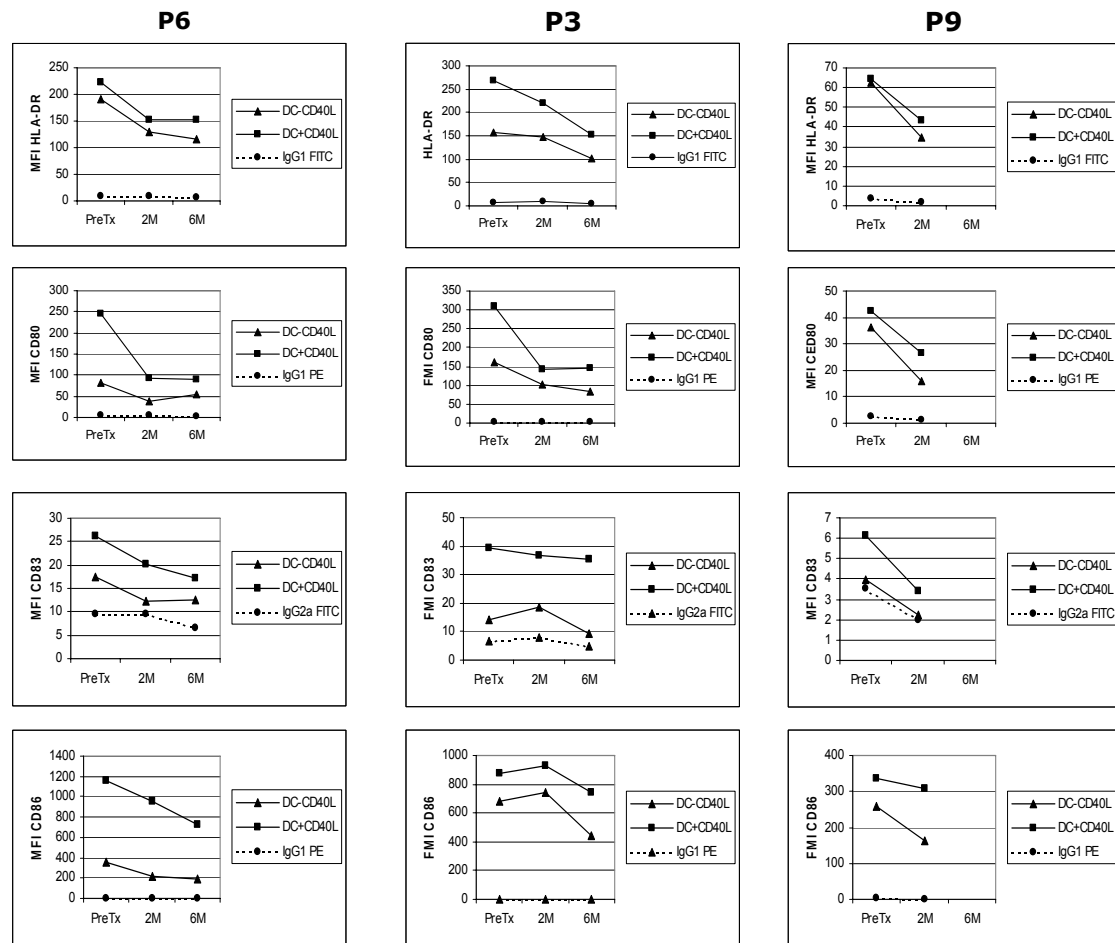


Figura 6.5 Intensidad media de fluorescencia en el grupo de pacientes VHC+ con recidiva viral. Se analizaron diferentes marcadores de DCs: HLA-DR, CD80, CD83 y CD86. DC+CD40L: Células dendríticas de pacientes VHC+ estimuladas con CD40L; DC-CD40L: Células dendríticas de pacientes VHC+ no estimuladas. IgG1-FITC/PE, IgG2a-FIT; Controles de isotipo.

Los resultados indicaron que la estimulación de DCsi con CD40L originó un cambio de inmunofenotipo, indicativo de la inducción de una población de DCs maduras al incrementarse los valores de FMI de todos los marcadores analizados (HLA-DR, CD80, CD83 y CD86), en todos los pacientes y en las distintas fases del estudio (PreTx, 2M y 6M).

No obstante, cuando éstos marcadores se analizaron durante el 2M y 6M (pacientes con tratamiento inmunosupresor) los valores de FMI para cada uno de los marcadores (en presencia o ausencia de CD40L) experimentaron, en general, una disminución en comparación con los valores de FMI obtenidos en la fase libre de IS (PreTx). Esta disminución en los valores de FMI se detecta a los dos meses del trasplante, período en que se produce la confirmación clínica de la recidiva viral.

Los resultados sugieren que si bien podemos inducir la generación, *in vitro*, de DCs a partir de células CD14⁺ de sangre periférica de pacientes sometidos a TxH por VHC, tanto el tratamiento inmunosupresor como el propio VHC podrían ser los responsables de la disminución en la expresión de HLA-DR, CD80, CD83 y CD86. No se descartaría un posible efecto sinérgico por parte de ambos factores. Parte de estos resultados fueron publicados por nuestro grupo (Ocaña *et al.*, 2005).

5.2 En pacientes VHC⁺ sin recidiva viral

La figura 6.6 muestra los perfiles correspondientes a los valores medios de FMI para diferentes marcadores de DCs (HLA-DR, CD80, CD83 y CD86) en el grupo de pacientes VHC⁺ sin episodios de recidiva viral tras el TxH.

Los resultados obtenidos fueron menos uniformes que los obtenidos en el grupo que presentó episodios de recidiva viral. El tratamiento inmunosupresor administrado a cada uno de los pacientes no parecía modificar, substancialmente, los valores de FMI de los marcadores analizados durante el 6M frente a los valores de FMI obtenidos para los mismos marcadores durante el PreTx.

Estos resultados sugieren que los pacientes sin recidiva viral son aquellos en que los valores de FMI (para aquellos marcadores analizados) al finalizar el seguimiento se mantienen comparables a los obtenidos durante la fase previa al TxH.

VI. Resultados

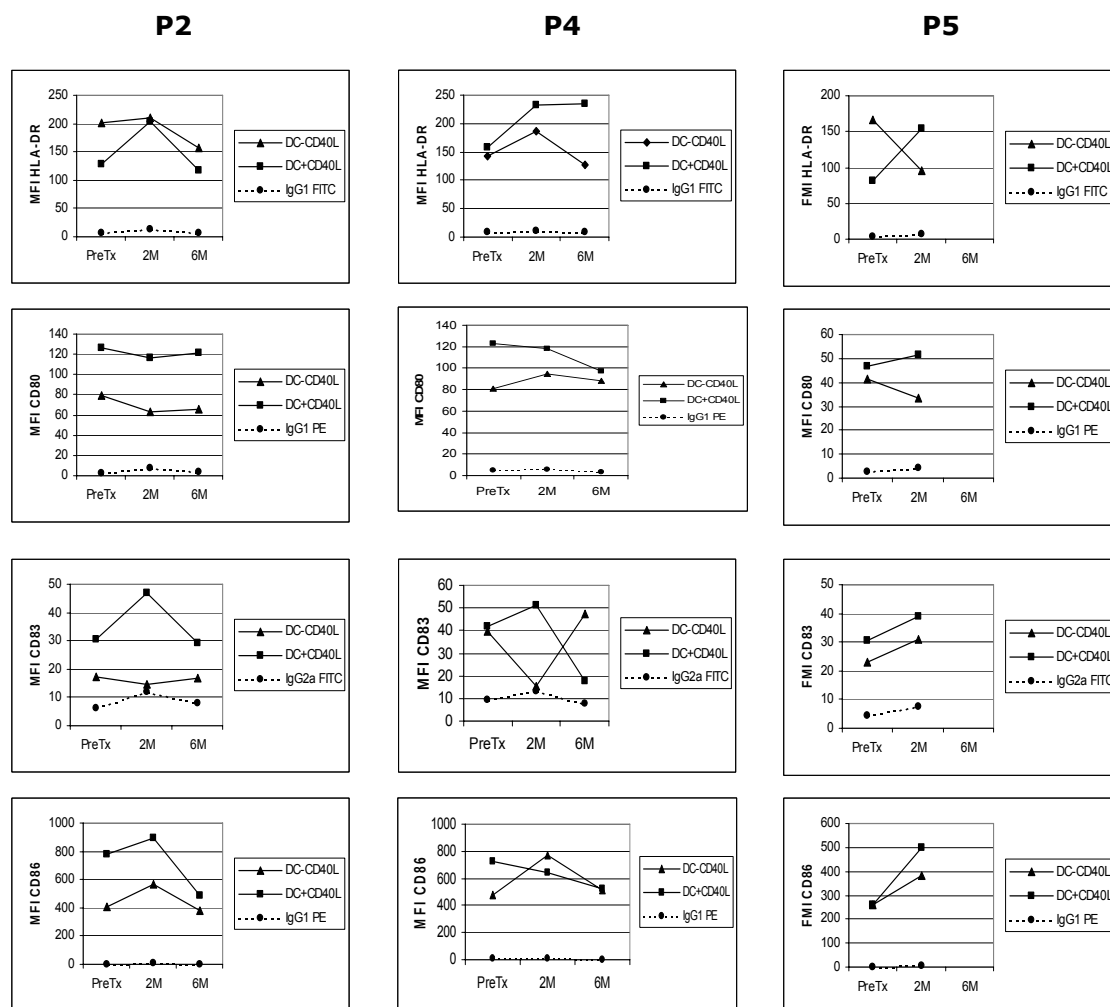


Figura 6.6 Intensidad media de fluorescencia en el grupo de pacientes VHC+ sin recidiva viral. Se analizaron diferentes marcadores de DCs: HLA-DR, CD80, CD83 y CD86. DC+CD40L: Células dendríticas de pacientes VHC⁺ estimuladas con CD40L; DC-CD40L: Células dendríticas de pacientes VHC⁺ no estimuladas. IgG1-FITC/PE, IgG2a-FIT; Controles de isotipo.

6. Efecto del FK en la maduración de DCs procedentes de donante sano

6.1 Análisis por citometría de flujo de DCs y DCs+FK

El análisis citométrico realizado en las muestras celulares tras la selección inmunomagnética con anti-CD14 a partir de PBMC indicó la presencia de un fenotipo típico de monocito ($CD14^+$, $CD54^+$, $CD64^+$, $CD86^+$ y $HLA-DR^+$) con purezas del orden del 85% al 95%.

La incubación de células $CD14^+$ con GM-CSF e IL-4 originó, al cabo de 7 días de cultivo, un fenotipo típico de DCsi ($CD14^-$, $CD1a^+$, $CD64^-$, $CD83^-$, $HLA-DR^+$, $CD54^+$, $CD80^+$ y $CD86^+$) (Figuras 6.7 y 6.8). Sin embargo, se observó una modesta disminución en los valores FMI para HLA-DR y CD54 en comparación con los valores de FMI obtenidos al inicio del cultivo celular. Por el contrario, se observó un incremento, tiempo dependiente, de CD80.

Cuando el análisis citométrico se aplicó a las células expuestas al FK se pudo observar que el inmunosupresor originaba una modesta disminución de la expresión de CD1a mientras que incrementaba la expresión de CD86. No obstante, bajo la acción del FK, las DCs continuaban manteniendo las características morfológicas e inmunofenotípicas características de inmadurez celular.

A partir de los resultados obtenidos por citometría de flujo podemos concluir que la adición de GM-CSF e IL-4 en los cultivos de célula monocitaria permite generar una población de DCs con un fenotipo inmaduro ($CD14^-$, $CD1a^+$, $CD83^-$) en tan solo tres días de cultivo. Además, el fenotipo inmaduro de DCs se puede mantener, *in vitro*, hasta la finalización del estudio.

VI. Resultados

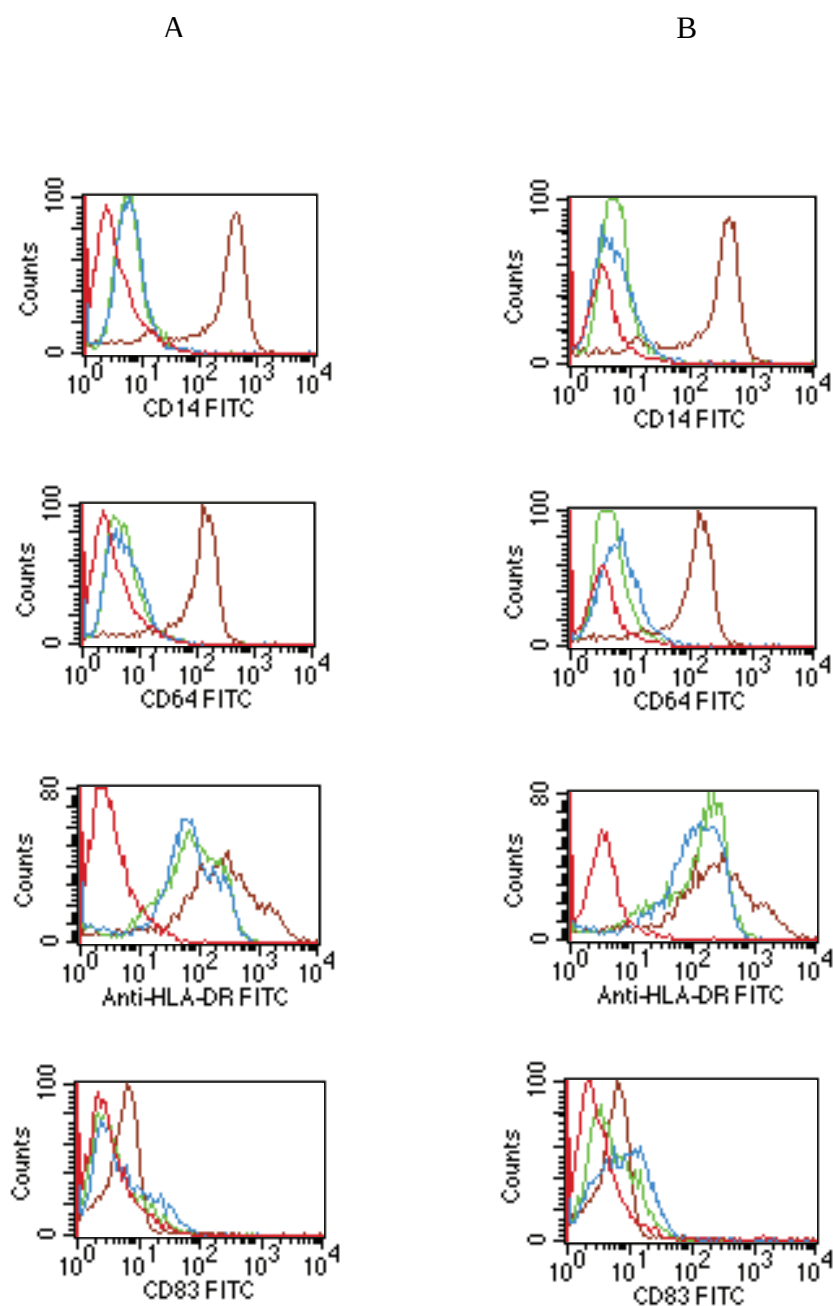


Figura 6.7 Marcadores de superficie celular para monocitos y DCs marcados con FITC en ausencia (A) o presencia (B) de FK. El análisis en monocitos se realizó tras la selección inmunomagnética (día 0 del cultivo). Las DCs se obtuvieron a partir de un cultivo de monocitos con medio de cultivo suplementado con 800 U/mL de GM-CSF y 1000 U/mL de IL-4 en ausencia (A) o presencia (B) de 5 µg/mL de FK administrado el día+1 del cultivo. El análisis citométrico para las DCs se realizó el día 3 y el día 6 del cultivo. El histograma en color rojo representa el control de isotipo. El histograma de color marrón representa el control de monocitos en ausencia de FK. El histograma de color verde representa a las DCs en presencia o ausencia de FK correspondiente al día 3 del cultivo celular. El histograma de color azul representa a las DCs en presencia o ausencia de FK correspondiente al día 6 del cultivo. Los histogramas corresponden a una muestra representativa de dos experimentos independientes.

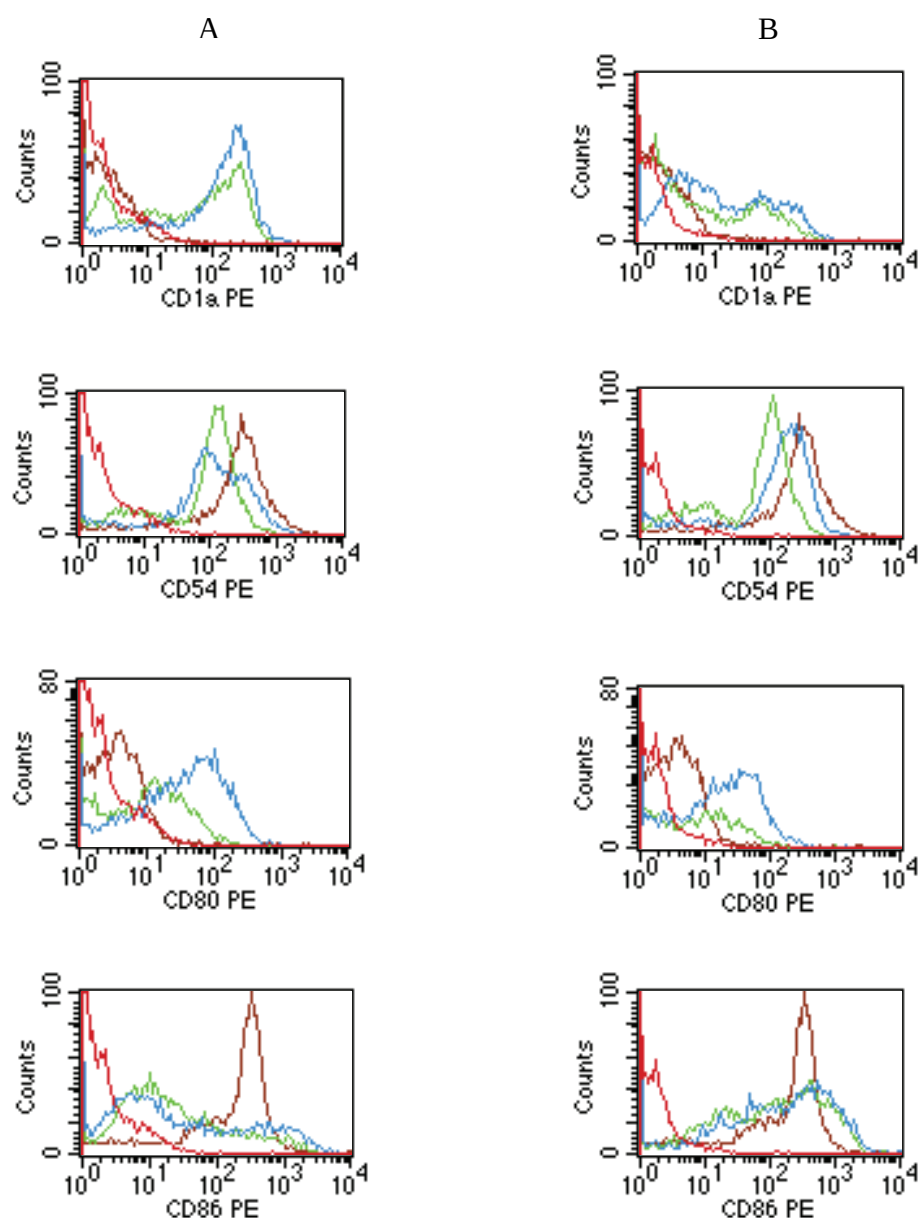


Figura 6.8 Marcadores de superficie celular para monocitos y DCs marcados con PE en ausencia (A) o presencia (B) de FK.

El análisis para los monocitos se realizó tras la selección inmunomagnética (día 0 del cultivo). Las DCs se obtuvieron a partir de un cultivo de monocitos con medio de cultivo suplementado con 800 U/mL de GM-CSF y 1000 U/mL de IL-4 en ausencia (A) o presencia (B) de 5 µg/mL de FK administrado el día+1 del cultivo. El análisis citométrico para las DCs se realizó el día 3 y el día 6 del cultivo. El histograma en color rojo representa el control de isotipo. El histograma de color marrón representa el control de monocitos en ausencia de FK. El histograma de color verde representa a las DCs en presencia o ausencia de FK correspondiente al día 3 del cultivo celular. El histograma de color azul representa a las DCs en presencia o ausencia de FK correspondiente al día 6 del cultivo. Los histogramas corresponden a una muestra representativa de dos experimentos independientes.

6.2 Análisis por citometría de flujo de DCs+NS3 y DCs+FK+NS3

Dado que los resultados obtenidos en el apartado anterior indicaron que era posible obtener una población de DCs a partir de un cultivo de monocitos incluso en presencia del FK, se planteó la pregunta de si el inmunosupresor FK podría afectar la maduración de las DCs hacia célula presentadora de antígeno. Para ello, nos planteamos generar un cultivo de DCs maduras a partir de una estimulación específica con proteína recombinante no estructural (NS3) del VHC administrando FK durante el primer día del cultivo.

Estudios control usando el lipopolisacárido bacteriano LPS como estímulo inespecífico de maduración de DCs, indicaron que la presencia del FK reducía significativamente el porcentaje de DCs maduras con el fenotipo CD83⁺/CD86⁺ en comparación con los cultivos no tratados con FK (Cos *et al.*, 2002).

La **figura 6.9** muestra los valores de FMI para DCs, DCs+NS3, DCs+FK, y DCs+FK+NS3 en el d+7 (final) del cultivo. Los resultados indicaron que las DCs estimuladas durante 24 h con NS3 no expresaban CD14 ni CD64. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para CD1a y HLA-DR de las DCs estimuladas con NS3 en comparación a las DCs controles (sin estimular). Sin embargo, NS3 incrementó la expresión de moléculas de coestimulación y de adhesión (CD80, CD83, CD86 y CD54) indicando que la proteína recombinante no estructural del VHC inducía el cambio de fenotipo inmaduro a maduro en tan solo 24 h de exposición.

Por el contrario, en el caso de estimulación con NS3 en presencia de FK, este reducía, significativamente, la expresión de CD1a y CD80 así como el marcador típico de maduración, el CD83.

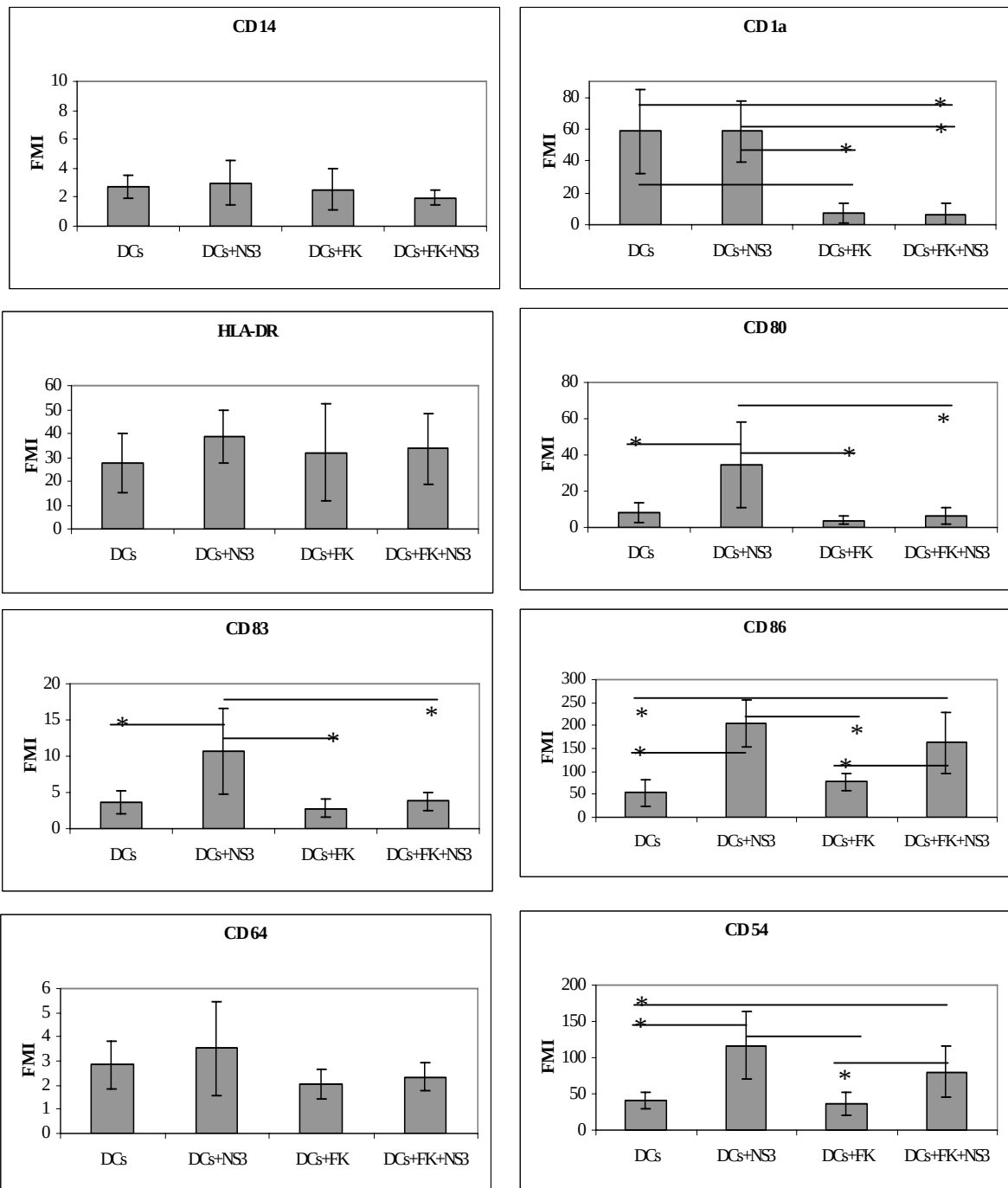


Figura 6.9 Efecto del FK y NS3 en los marcadores de superficie celular de DCs.

Las DCs se obtuvieron a partir de monocitos cultivados en medio de cultivo suplementado con 800 U/mL de GM-CSF y 1000 U/mL de IL-4 durante siete días de cultivo.

DCs: Células dendríticas control.

DCs+NS3: DCs expuestas a 10 µg/mL de NS3 durante las 24 h finales del cultivo.

DCs+FK: DCs expuestas a 5 µg/mL de FK desde el día 1 del cultivo.

DCs+FK+NS3: DCs expuestas a 5 µg/mL de FK desde el día 1 del cultivo y estimuladas con 10 µg/mL de NS3 durante las 24 h finales del cultivo. Los resultados se expresan como valores medio de intensidad de fluorescencia (FMI) obtenidos por citometría de flujo a partir de 5-7 experimentos independientes. Los resultados correspondientes a los controles (FITC) de anticuerpo para CD14, HLA-DR y CD64 fueron: $1,68 \pm 0,32$ DCs; $1,54 \pm 0,48$ DCs+FK; $1,71 \pm 0,43$ DCs+NS3 y $1,48 \pm 0,39$ DCs+FK+NS3. El control de anticuerpo (FITC) para CD83 fue $1,9 \pm 0,42$, DCs; $1,69 \pm 0,60$, DCs+FK; $1,82 \pm 0,62$, DCs+NS3 y $1,91 \pm 0,86$, DCs+FK+NS3. Los controles de anticuerpo (PE) para CD1a, CD80, CD86 y CD54 fueron: $1,45 \pm 0,27$, DCs; $1,45 \pm 0,45$ DCs+FK; $1,45 \pm 0,36$, DCs+NS3 y $1,42 \pm 0,44$, DCs+FK+NS3. (*) diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

VI. Resultados

Resultados similares se obtuvieron al analizar los porcentajes de células que marcaban positivamente para estos marcadores (Tabla 6.9). La proteína NS3 incrementó, significativamente, el porcentaje de DCs positivas para HLA-DR, CD80, CD83, CD86 en comparación a los resultados obtenidos en los controles de DCs.

En DCs+FK, el inmunosupresor reducía, significativamente, los porcentajes de células CD1a mientras que aumentaba los correspondientes a CD86.

En las células estimuladas con NS3 y tratadas con FK (DCs+FK+NS3), el inmunosupresor originó una reducción significativa de los porcentajes de células positivas para CD1a, CD80 y CD83 en comparación con los porcentajes obtenidos en las DCs+NS3.

	DCs	DCs+NS3	DCs+FK	DCs+FK+NS3
CD1a	82.958±15.346	82.438±18.129	15.855±8.755 *	13.132±9.398 *†
CD54	89.32±14.079	92.671±5.951	86.634±7.867	92.383±5.863
HLA-DR	63.96±15.579	90.08±6.339 *	74.914±21.511	79.395±17.292
CD80	28.25±25.899	70.821±23.738 *	8.445±9.596	11.06±10.787 †
CD83	3.018±3.578	36.781±33.757 *	0.694±0.659	1.764±0.749 †
CD86	44.465±20.711	91.494±7.503 *	79.572±25.078 *	89.74±12.697 *

Tabla 5.9. Efecto del FK y NS3 en el porcentaje de DCs positivas para CD1a, CD54, HLA-DR, CD80, CD83 y CD86.

Las DCs se obtuvieron a partir de monocitos cultivados en medio de cultivo suplementado con 800 U/mL de GM-CSF y 1000 U/mL de IL-4 durante siete días de cultivo.

DCs: Células dendríticas control.

DCs+NS3: DCs expuestas a 10 µg/mL de NS3 durante las 24 h finales del cultivo.

DCs+FK: DCs expuestas a 5 µg/mL de FK desde el día 1 del cultivo.

DCs+FK+NS3: DCs expuestas a 5 µg/mL de FK desde el día 1 del cultivo y estimuladas con 10 µg/mL de NS3 durante las 24 h finales del cultivo. Los resultados se expresan en % de DCs positivas para dichos marcadores ± SD obtenidos por análisis citométrico a partir de 5-7 experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas con p<0,05: (*) vs DCs; (†) vs DCs+NS3.

Los resultados obtenidos sugieren que el CD86 podría ser un marcador cuya expresión podría estar favorecida por el inmunosupresor y que el mecanismo de acción de esta droga podría ser el responsable de mantener a las DCs, tras estimulación con NS3, en un estado de baja capacidad madurativa.

6.3 Ensayo de endocitosis

Para comprobar que la disminución en la expresión de CD1a, CD80 y CD83 en FK+DCs no era debido a un bloqueo de la capacidad endocítica de las células cuando eran incubadas con NS3, procedimos a evaluar la capacidad endocítica en términos de captación de *FITC-dextrano* por parte de las DCs en presencia o en ausencia del inmunosupresor. Como control negativo de captación de FITC-dextrano se emplearon monocitos.

Tal y como se observa en la **figura 6.10**, las DCs inmaduras presentaron una notable captación de *FITC-dextrano*, alcanzándose los máximos niveles de endocitosis durante el d+6 del cultivo. Sin embargo, las células tratadas con FK no experimentaron cambios relevantes en la endocitosis, sugiriéndose que la disminución de la expresión de dichos marcadores no parecía estar relacionada con un bloqueo de la captación de la proteína recombinante por estas células cuando eran incubadas con el inmunosupresor.

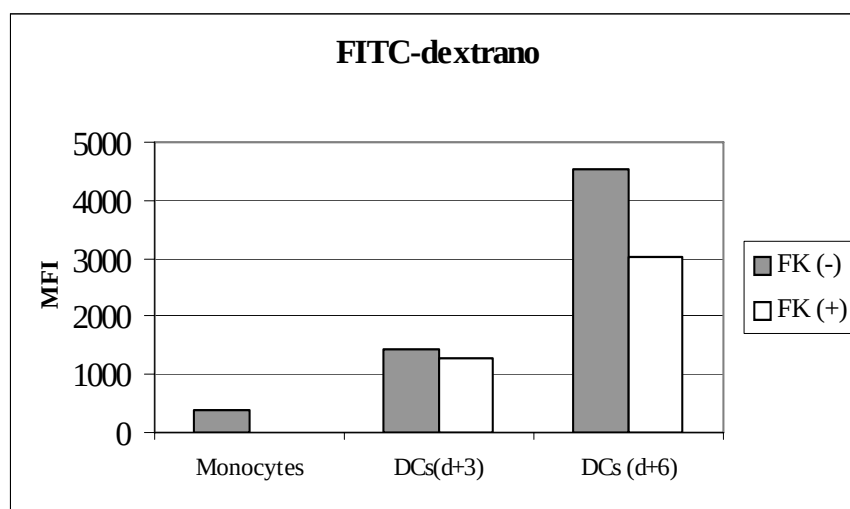


Figura 6.10 Actividad endocítica para monocitos y DCs en presencia o ausencia de FK.

Las DCs se obtuvieron a partir de monocitos cultivados en medio de cultivo suplementado con 800 U/mL de GM-CSF y 1000 U/mL de IL-4 durante siete días de cultivo. La endocitosis se evaluó a partir de la captación de 1 mg/mL de FITC-dextrano y se analizó mediante citometría de flujo durante el primer día del cultivo (monocitos) y durante los días 3 y 6 del cultivo celular para DCs inmaduras en presencia o ausencia de 5 µg/mL FK. Los monocitos se emplearon en este tipo de estudios como control negativo de endocitosis. Los valores se expresan como valores de intensidad media de fluorescencia (FMI).

6.4 Producción de IL-12p70

La IL-12 está implicada en la polarización de la respuesta inmune hacia Th1 promoviendo una respuesta inmune contra bacterias, protozoos, infecciones virales así como a antígenos solubles tales como péptidos y proteínas (Afonso *et al.*, 1994; Noguchi *et al.*, 1995). Aunque la IL-12 esta producida tanto por células hematopoyéticas como por células no hematopoyéticas, las células que producen mayores niveles de dicha citocina son las células presentadoras de antígeno profesionales tales como monocitos, las DCs y las células B activadas (Shu *et al.*, 1995).

En este sentido estudiamos la producción, por parte de las DCs, de la forma biológicamente activa (Trinchieri, 1995) de la IL-12 (IL-12p70) en tres situaciones experimentales distintas: DCs+NS3, DCs+FK y DCs+FK+NS3 (**Figura 6.11**).

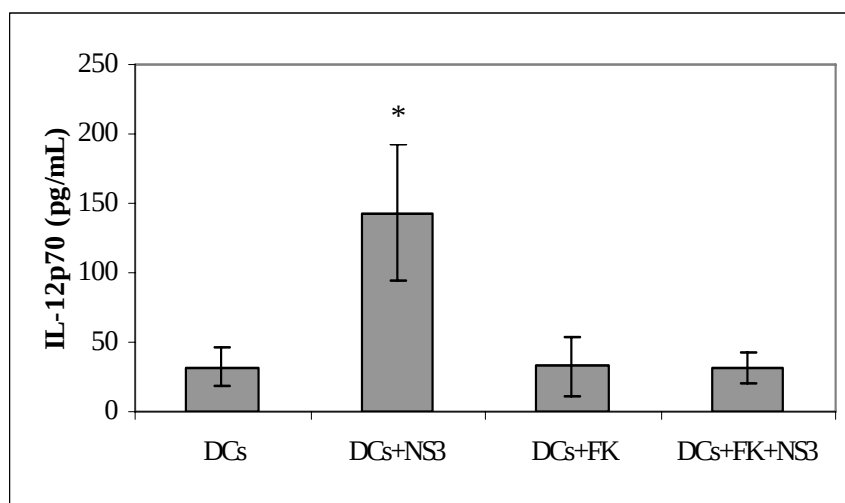
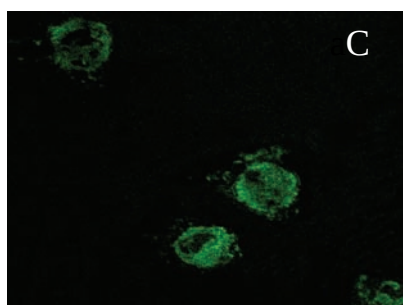
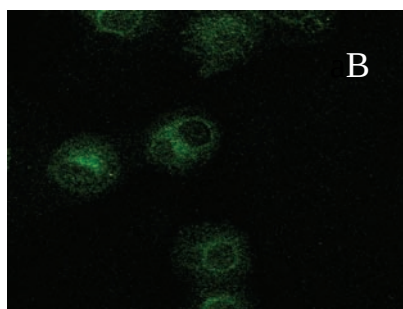
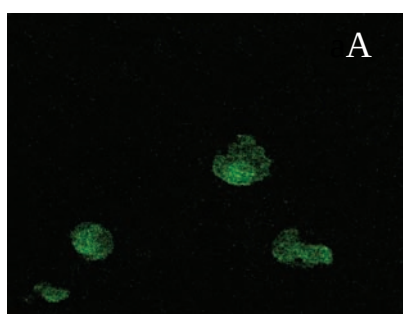


Figura 6.11 Producción de IL-12p70 en DCs tras 7 días de cultivo celular bajo distintas condiciones experimentales. Las DCs se obtuvieron a partir de monocitos cultivados en medio de cultivo suplementado con 800 U/mL de GM-CSF y 1000 U/mL de IL-4 durante siete días de cultivo. DCs: Células dendríticas control; DCs+NS3: DCs expuestas a 10 µg/mL de NS3 durante las 24 h finales del cultivo; DCs+FK: DCs expuestas a 5 µg/mL de FK desde el día 1 del cultivo; DCs+FK+NS3: DCs expuestas a 5 µg/mL de FK desde el día 1 del cultivo y estimuladas con 10 µg/mL de NS3 durante las 24 h finales del cultivo. Los resultados corresponden a triplicados de tres experimentos independientes. (*) diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tal y como se observa en la figura 6.11, las DCs estimuladas con NS3 producían grandes cantidades de IL-12p70 ($143,3 \pm 48,5$ pg/mL), sin embargo las células estimuladas con NS3 que se habían preincubado con FK reducían significativamente la producción de la forma activa de la citocina ($31,6 \pm 11,2$ pg/mL), alcanzándose niveles de producción comparables a las DCs ($32 \pm 13,7$ pg/mL) y a las DCs+FK ($32,63 \pm 21,9$ pg/mL).

A partir de estos resultados se planteó estudiar el posible mecanismo de acción del inmunosupresor (FK) sobre la maduración de las DCs.

6.5 Translocación del factor *NF- κ B*



La expresión de moléculas de adhesión, coestimulación y de citocinas inmunoestimuladoras tales como IL-12 dependen de la translocación de *NF- κ B* (p65) desde el citoplasma al núcleo celular. Por ello, nos propusimos analizar el efecto del FK sobre la translocación de p65 en DCs+NS3, en DCs+FK y en DCs+FK+NS3 mediante empleo de microscopía confocal (**Figura 6.12**).

Figura 6.12 Analisis de la translocación de la subunidad p65 de *NF- κ B*. A) en DCs+NS3, B) en DCs+FK y C) en DCs+FK+NS3. El día 7 del cultivo celular las DCs se fijaron y permeabilizaron con PFA-metanol y se marcaron, posteriormente, con anticuerpo contra *NF- κ B* (p65). Posteriormente se trataron con un anticuerpo secundario marcado con FITC. Las muestras se analizaron por microscopía confocal con empleo de un microscopio LEICA TCS-NT.

VI. Resultados

Los resultados obtenidos indicaron un intenso marcaje nuclear en las DCs+NS3. Sin embargo, cuando las DCs o las DCs+NS3 eran preincubadas con el inmunosupresor, el marcaje correspondiente a p65 quedaba retenido mayoritariamente en el citoplasma. Estas observaciones apoyarían la hipótesis de que el FK, a las concentraciones empleadas en este trabajo, sería el responsable del bloqueo de la translocación de NF- κ B hacia el núcleo celular de las DCs y, consecuentemente, de la inhibición de la transmisión de las señales necesarias para la obtención de un fenotipo de DCs maduras.

VII. DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

El Tx en general y el TxH en particular ha sido uno de los grandes logros de la medicina del siglo XX, incorporándose en la rutina terapéutica en un número cada vez mayor de centros en casi todos los países desarrollados.

Los factores que han favorecido este avance terapéutico han sido: a) una selección rigurosa de los receptores, b) una mejora en la técnica quirúrgica y anestésica, c) una mejora en los cuidados postoperatorios y, d) un mejor desarrollo de la farmacoterapia, con la aparición de nuevos y más potentes agentes inmunosupresores así como antibacterianos, antivíricos y antimicóticos.

Si bien estas mejoras han promovido una mayor supervivencia del injerto a corto plazo, la pérdida del injerto a largo plazo debido al rechazo crónico y los efectos secundarios de la inmunosupresión crónica continúa siendo un problema sin resolver. Es por ello que la investigación clínica y básica orienta una parte importante de sus esfuerzos en hallar marcadores (fisiológicos, genéticos...) con carácter predictivo. La incorporación, en la clínica, de técnicas que abarcaran estas necesidades podrían influir en el diseño de pautas inmunosupresoras individualizadas que probablemente podrían repercutir en una mejora del pronóstico clínico.

No cabe duda que la solución a la problemática asociada al TxH pasaría por la inducción de tolerancia inmunológica. En este sentido, múltiples estrategias terapéuticas a base de inactivar células T alorreactivas (anergia/delección) o también orientadas a promover la expansión de células T reguladoras han resultado efectivas en modelos experimentales. Desafortunadamente, estas estrategias no han resultado eficaces en humanos.

Recientemente, se ha observado que un 20 % de pacientes sometidos a TxH con retirada de la inmunosupresión han desarrollado tolerancia al hígado (tolerancia operacional) (Lerut *and* Sanchez-Fueyo, 2006), lo cual ha ayudado a promover la investigación orientada a detectar aquellos marcadores que podrían estar asociados a rechazo o a tolerancia, lo que ayudaría a identificar aquellos pacientes que, tras un TxH, podrían verse favorecidos por una retirada parcial o total de la IS.

VII. Discusión

Numerosos esfuerzos se han invertido, desde 2000, en la evaluación de técnicas de laboratorio que permitan monitorizar, inmunológicamente, al paciente trasplantado con el fin de predecir la evolución del paciente hacia el rechazo o hacia la tolerancia al aloinjerto (Woltman *et al.*, 2000; Mazariegos *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Martínez-Llordella *et al.*, 2007). Sin embargo, la gran mayoría de resultados obtenidos por estas técnicas (antígeno específico y antígeno no específico) no han dado lugar a conclusiones clínicas relevantes. Las principales causas residen en: a) series reducidas de pacientes, b) discrepancia de los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación, c) la mayoría de las técnicas se han utilizado a nivel comparativo (grupo de pacientes con episodios de rechazo vs. grupo de pacientes con tolerancia operacional), d) comparación de grupos de pacientes con diferentes pautas inmunosupresoras y, d) estudios, en muchos casos, retrospectivos.

Ante esta situación y dado el interés clínico en esta área, el *Servei de Cirurgia Hepatobiliopancreàtica i Trasplantaments* de l'Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona promovié, en 2001, un estudio de funcionalidad celular *in vitro* a partir de muestras de pacientes candidatos a TxH. El objetivo era estudiar, a partir de un modelo celular *in vitro*, el estado inmunológico de cada uno de los pacientes antes del trasplante y, posteriormente, durante la fase de mantenimiento (2M y 6M tras el TxH). Se pretendía identificar aquellos pacientes que podrían considerarse candidatos a una disminución o retirada parcial de la pauta inmunosupresora.

Los criterios para tal abordaje, a diferencia de otros estudios, fueron los siguientes: a) el estudio debería ser prospectivo, b) los ensayos de monitorización inmunológica del receptor del TxH deberían ser antígeno específico (EMIAE) y, c) las poblaciones celulares de estudio procederían de bazo (del donante) y de sangre periférica (aféresis) del receptor, obteniéndose éstas durante la fase previa al TxH (libre de inmunosupresión) y durante el 2M y 6M del TxH (con tratamiento inmunosupresor).

En el estudio se enrolaron 10 pacientes. Para los EMIAE se empleó el método clásico de reacción mixta linfocitaria (MLR) con la particularidad de que la aloreactividad de células T del receptor era frente a células de bazo del donante (a diferencia de otros estudios donde se emplean potentes mitógenos como el LPS). Los sobrenadantes obtenidos en la MLR de cada uno de los pacientes se emplearon para la cuantificación de citocinas proinflamatorias y tolerogénicas (Th1/Th2). Además, la

obtención de PBMC de cada paciente durante el preTx, 2M y 6M permitió disponer de una población de monocitos para generar DCs que se emplearían para estudios de inmunofenotipaje y de predicción a la recidiva viral en aquellos pacientes sometidos a TxH por infección por VHC.

Los resultados del estudio linfoproliferativo indicaron que tanto en el grupo de pacientes con algún episodio de rechazo (durante el primer mes del TxH) como en el grupo de pacientes sin episodios de rechazo, la presencia de aloantígenos del donante en los cultivos de células T CD4⁺ del receptor favorece una respuesta proliferativa, estadísticamente superior ($P < 0,05$) a la obtenida por los correspondientes controles (células T CD4⁺ no estimuladas). Si bien estos resultados eran los esperados por tratarse de un test de respuesta primaria, los resultados obtenidos en la fase de tratamiento con IS (2M y 6M) fueron sumamente interesantes.

Para el grupo de pacientes con algún episodio de rechazo (Figura 6.1) los resultados de proliferación de células T CD4⁺ frente a antígenos del donante en 2M y 6M fueron comparables con los resultados obtenidos en la fase de PreTx. No obstante, para el grupo de pacientes sin episodios de rechazo (Figura 6.2) los estudios de proliferación fueron, tanto en el 2M como en el 6M, significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los resultados obtenidos en la fase PreTx. Estos resultados sugieren, por una parte, que tanto la presencia de aloantígenos en el cultivo celular como la pauta inmunosupresora administrada *in vivo* inducen cambios detectables de proliferación celular, probablemente por tratarse de cultivos de corta duración (7 días).

Por otra parte, los cambios en la respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ estarían en concordancia con la evolución clínica para ambos grupos de pacientes. En aquellos pacientes que presentan algún episodio de rechazo la pauta inmunosupresora administrada *in vivo* parecería no ser lo suficientemente adecuada como para favorecer una disminución de la respuesta proliferativa de células T CD4⁺ *in vitro*. Por el contrario, la pauta inmunosupresora administrada a aquellos pacientes que no desarrollan episodios de rechazo parece, según el modelo celular, adecuada, dado que la proliferación de células CD4⁺ frente a antígenos del donante resulta inferior ($P < 0,05$) a la que presentaban las mismas células en la fase libre de inmunosupresión (PreTx).

Los resultados obtenidos anteriormente (por grupos de pacientes) estimularon a nuestro grupo a individualizar el modelo experimental propuesto. En este caso nos proponíamos encontrar una respuesta celular diferencial, capaz de identificar aquellos

VII. Discusión

pacientes susceptibles de ser candidatos a una disminución o retirada parcial de la pauta inmunosupresora. Los resultados obtenidos en el modelo celular propuesto permitieron identificar a estos pacientes. Los candidatos debían reunir, al finalizar el estudio, los siguientes criterios: un I.E. < 1 , una probabilidad de rechazo $< 50 \%$, unos niveles de citocinas proinflamatorias (Th1; IFN- γ y TNF- α) $< 50 \%$ así como niveles detectables de IL-10 en relación al PreTxH.

Para todos los pacientes que experimentaron algún episodio de rechazo (P7, P8, P9 y P10), los valores de I.E. (en el PreTxH) fueron > 1 , con una probabilidad de rechazo superior al 90% (Figura 6.3; Tabla 6.4). Estos resultados sugieren que un paciente con valores de I.E. > 1 y una probabilidad de rechazo alta ($> 50 \%$) podría ser indicativo de un paciente con tendencia a rechazo precoz al injerto.

Según la hipótesis anterior, los resultado que se esperarían obtener en aquellos pacientes que bajo régimen inmunosupresor no desarrollan rechazo clínico deberían concordar con I.E. < 1 y una probabilidad de rechazo baja ($< 50 \%$). Efectivamente, los resultados obtenidos en 2M indicaron que un 75% de los pacientes (3 pacientes; P7, P8 y P10 de 4 analizados) presentaron I.E. < 1 (Figura 6.3) y una probabilidad de rechazo $< 47 \%$ (Tabla 6.4). Durante 6M, un $66,6 \%$ de los pacientes (2 pacientes; P8 y P10) de 3 analizados continuaron con I.E. < 1 y una probabilidad baja de rechazo ($< 40 \%$). Ante estos resultados, los pacientes P8 y P10 podrían ser catalogados según el modelo experimental propuesto como pacientes respondedores al tratamiento inmunosupresor y posibles candidatos a una disminución o retirada parcial de la pauta inmunosupresora. Esta propuesta concuerda con los niveles plasmáticos de FK para estos pacientes. Como se muestra en la tabla 6.2, los niveles de FK para los pacientes P8 y P10 obtenidos durante 2M y 6M son más bajos que los niveles plasmáticos del inmunosupresor detectados en el primer mes del TxH. Esta disminución se correlaciona con una disminución de las dosis administradas de IS, tanto en 2M como en 6M, como consecuencia de que los pacientes presentaron, a partir del segundo mes del TxH, una normalización de la función hepática.

La propuesta, para estos pacientes, de disminuir la IS vendría reforzada, además, por los resultados obtenidos al cuantificar citocinas proinflamatorias (Th1: IFN- γ y TNF- α). Para P8 y P10 los niveles de IFN- γ y TNF- α experimentaron una disminución tiempo-dependiente, alcanzándose valores indetectables ($< 10 \text{ pg/mL}$) durante el 6M del trasplante (Tabla 6.5). No obstante, y ciñéndonos en el estricto cumplimiento de los criterios de inclusión propuestos en este estudio para la selección

de pacientes candidatos a la retirada parcial o total de la inmunosupresión, los pacientes P8 y P10 no formarían parte de este grupo dado que los niveles de citocina tolerogénica (IL-10) en el 6 M del TxH resulta indetectable (cuarto criterio de inclusión) (Tabla 6.5).

Para los pacientes P7 y P9 las probabilidades de rechazo al final del estudio fueron superiores al 50 %. Si bien en ambos pacientes los niveles de citocinas proinflamatorias experimentaron una disminución tiempo-dependiente entre el PreTx y el 2M, en la fase final del estudio (6M) los niveles de estas citocinas para el P7 ascendieron a niveles comparables a las obtenidas en el PreTx. Estos hallazgos también concuerdan con los niveles plasmáticos de FK (Tabla 6.2). Para P7, si bien en 2M los niveles del inmunosupresor fueron 43,65 % inferiores a los niveles obtenidos en el PreTx, éstos ascendieron, durante 6M, a niveles comparables a los observados en el PreTx (Tabla 6.2). Este aumento en los niveles de FK plasmático se explicaría por el tratamiento farmacológico contra *Tuberculosis pulmonary* al que fue sometido este paciente. Es conocido que los fármacos antituberculostáticos interfieren con el metabolismo del inmunosupresor (Hebert *et al.*, 1999). Con el fin de evitar nuevos episodios de rechazo se optó por aumentar la dosis de inmunosupresión.

Para P9, los niveles plasmáticos de FK son bajos en PreTx ($7,48 \pm 3,24$ ng/ml) aunque experimentan un aumento considerable tanto en 2M ($16,3 \pm 2,26$ ng/ml) como en 6M ($13,56 \pm 4,66$ ng/ml). Desde el punto de vista clínico, estos aumentos en los niveles de FK plasmáticos son debidos a que siendo portador del VHC este paciente presenta recidiva viral al tercer mes del TxH con lesión hepática. Ambos sucesos (recidiva viral y lesión hepática) obligan a reducir la dosis de IS. No obstante, la baja capacidad del hígado lesionado en metabolizar, adecuadamente, el fármaco hace que se detecten altos niveles de FK plasmáticos. Como consecuencia de la reducción de la IS administrada y el tratamiento antiviral al que fue sometido, el paciente desarrolla un segundo episodio de rechazo durante el 5º mes el TxH.

En ambos pacientes (P7 y P9), los resultados referente al perfil de citocinas así como la probabilidad de rechazo del injerto, superiores al 50 %, hace pensar que estos pacientes deberían ser catalogados como poco favorables a la aceptación del injerto, hipótesis que adquiere validez por los datos de evolución clínica.

Ante los resultados obtenidos podríamos concluir que ninguno de los pacientes del grupo que experimentaron episodio de rechazo podría ser sometido a una disminución parcial o total de la pauta inmunosupresora.

VII. Discusión

Referente al grupo de pacientes sin episodios de rechazo (P1, P2 (VHC⁺), P3(VHC⁺), P4(VHC⁺), P5(VHC⁺) y P6(VHC⁺)), 4 pacientes (P2, P4, P5 y P6) desarrollaron, durante el PreTxH, una respuesta linfoproliferativa con un I.E. > 1 y una probabilidad de rechazo ≥ 95 % (Tablas 6.3 y 6.4). Sorprendentemente, en 2M y bajo tratamiento inmunosupresor, los pacientes P1, P2, P3 y P6 continúan presentando valores de I.E. > 1 y una probabilidad de rechazo > 90 % indicativo, según el modelo experimental, de una falta de inhibición de la respuesta linfoproliferativa por acción de la pauta inmunosupresora recibida. Si bien detectamos una falta de concordancia entre los resultados experimentales y los clínicos (estos pacientes no experimentaron ningún episodio de rechazo), cuando se analizaron los niveles plasmáticos de FK en 2M se observa que precisamente en 3 pacientes (P2, P3 y P6) de los 4 analizados, los niveles plasmáticos del inmunosupresor fueron del orden de un 50 % más bajos (P2: 7,3 ng/ml; P3: 7,6 ng/ml; P6: $7,1 \pm 2,97$ ng/ml) que los niveles de FK para los pacientes P4 ($15,23 \pm 3,68$ ng/ml) y P5 ($13,7 \pm 4,63$ ng/ml). Estos niveles tan bajos de FK en los pacientes P2, P3 y P6 se explica por la patología de base. Son pacientes VHC⁺ lo que obliga a mantener unos niveles bajos de inmunosupresión con el fin de controlar la progresión viral y evitar toxicidad farmacológica motivada por una baja capacidad de metabolización hepática por la infección viral. Precisamente, ambos pacientes experimentan recidiva viral al mes y medio del TxH. La disminución de los niveles plasmáticos de FK podría explicar los resultados *in vitro* (I.E. > 1 y probabilidad de rechazo > 90 %).

Curiosamente los pacientes P4 y P5, aunque son VHC⁺, mantienen elevados niveles de inmunosupresión básicamente por dos motivos: a) por presentar un perfil hepático estrictamente normal (sin episodios de rechazo) y, b) por no haber desarrollado recidiva viral. Esta situación aconseja no modificar la pauta inmunosupresora, manteniéndose los niveles plasmáticos de FK altos. En ambos pacientes, la evolución clínica concuerda con los resultados experimentales: I.E. < 1 y una probabilidad de rechazo en 2M baja (≤ 22 %).

En la fase final del estudio (6M), el test de linfoproliferación *in vitro* reveló para P1, P3 y P6 unos valores de I.E. < 1 y una probabilidad de rechazo ≤ 22 % (Tabla 6.4). Estos resultados, juntamente con una disminución de las citocinas proinflamatorias entre el PreTx y el 6M, un incremento en los niveles de interleucina tolerogénica (IL-10) así como niveles plasmáticos bajos de FK (P1: 7,6 ng/ml; P3: 5,2 ng/ml y P6: 7,8

ng/ml) sugieren que estos tres pacientes serían candidatos, en 6M, a una disminución parcial o total de la pauta inmunosupresora.

Todas estas observaciones apuntan a que el modelo celular propuesto es sensible y permite detectar fluctuaciones en la pauta inmunosupresora de cada paciente.

El único paciente en que no obtuvimos concordancia clínico-experimental fue el P4. En este paciente, trasplantado por ser portador del VHC, los niveles de FK fueron elevados durante todo el estudio ($12,05 \pm 3,03$ ng/ml en PreTxH; $15,23 \pm 3,68$ ng/ml en 2M y 10 ng/ml en 6M), con un perfil hepático normal y sin experimentar recidiva viral. No obstante, el modelo celular indicó, en 6M, un I.E. > 1 , una probabilidad de rechazo $> 70 \%$ y un incremento de TNF- α en comparación a los valores de esta citocina en 2M. Creemos que para dar explicación a la discrepancia de resultados se requeriría una aproximación más inmunológica del paciente; información no disponible en el momento de finalizar el estudio.

Ante los resultados obtenidos concluiríamos que solamente 3 individuos (P1, P3, P6) del grupo de pacientes sin episodios de rechazo serían óptimos candidatos a someterse a una retirada parcial o total de la pauta inmunosupresora a partir de 6M.

Una observación de interés clínico sería los niveles de IL-10, obtenidos *in vitro*, para el grupo de pacientes VHC. Los resultados sugieren que la cuantificación *in vitro* de esta citocina podría tener un papel predictivo de recidiva viral. Cuando se analizó el perfil de IL-10 en los pacientes sometidos a TxH infectados por VHC se observó un patrón diferencial según el grupo analizado. En el grupo de pacientes con recidiva viral (P3, P6 y P9), los niveles de IL-10 obtenidos tras el TxH aumentaron en comparación con los niveles detectados en el PreTx (Tabla 6.7). Por el contrario, en el grupo de pacientes que no presentaron recidiva viral (P2, P4 y P5) los niveles de IL-10 disminuyeron en dos (P2 y P5) de tres pacientes (Tabla 6.7).

Estos resultados sugieren que tras el TxH, si bien una disminución de TNF- α e IFN- γ juntamente con un aumento en los niveles de IL-10 se relacionan con una aceptación del aloinjerto, esta situación podría favorecer, en los pacientes VHC, la progresión del virus al verse disminuida la presión inmunológica del huésped frente al virus. En este sentido, estudios científicos pone de manifiesto que las proteínas del VHC pueden actuar suprimiendo la funcionalidad de determinadas células del sistema

VII. Discusión

inmune (linfocitos T citotóxicos, células NK, DCs, células T reg) y alterando los niveles de INF de tipo 1 (Hiroishi *et al.*, 2008; Dolganiuc *et al.*, 2008). Estudios publicados por el grupo de Gramenzi (Gramenzi *et al.*, 2005) demostraron que las citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) producidas por PBMC de pacientes en diferentes estadios de la infección por VHC parecen tener una implicación directa tanto en la patogenia del VHC como en la severidad del daño hepático. Se ha observado que las proteínas del core o proteínas no estructurales como NS3 del VHC son responsables de disparar la producción de TNF- α y de IL-10 en DCs (Dolganiuc *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2008). Si bien los incrementos de TNF- α se correlacionan con daño hepático, incrementos de IL-10 provocan una inhibición en la producción de IL-12 por parte de las DCs, una disminución de la proliferación de células T (impidiendo una polarización de la respuesta inmune hacia Th1 e inhibiendo la respuesta de células T CD8⁺) y, muy probablemente, una inducción de anergia de células T al disminuir la expresión de CD28, una molécula implicada en la vía de coestimulación (Joss *et al.*, 2000; Corinti *et al.*, 2001; de Jong *et al.*, 2005). Los estudios del grupo de Steinbrink demostraron que el tratamiento de DCs con IL-10 promovía un población de DCs tolerogénicas (Steinbrink *et al.*, 1997).

Por el contrario, se ha comprobado, *in vitro*, que el bloqueo del receptor de IL-10 mediante anticuerpos monoclonales originan una respuesta CD4⁺ favorable frente al VHC en cuanto a que se incrementa la proliferación de estas células frente a distintas proteínas del VHC (core, NS3 y NS4) (Rigopoulou *et al.*, 2005). Estas observaciones llevaron a proponer que el bloqueo de los receptores de IL-10 podría ser una estrategia para aumentar la efectividad de los actuales tratamientos de la hepatitis crónica.

Todos estos trabajos apoyarían nuestra hipótesis, basada en que los incrementos de IL-10 detectado en los sobrenadantes de las MLRs de los pacientes sometidos a TxH podrían tener un valor predictivo de recidiva viral en aquellos pacientes infectados por VHC.

Si bien las publicaciones citadas anteriormente demuestran que determinadas proteínas virales modifican la funcionalidad de las DCs, nuestro grupo se propuso estudiar el inmunofenotipo de estas células y la posibilidad de que los resultados obtenidos fueran predictivos de recidiva viral. Creemos que la caracterización del inmunofenotipo de las DCs en diferentes momentos del TxH podría informar o ser una herramienta predictiva de recidiva viral dado que una de las vías de escape del VHC, al

sistema inmunitario del huésped, es por déficit de funcionalidad de las DCs cuando éstas adquieren un inmunofenotipo inmaduro.

Este déficit funcional es el resultado de: a) un mal procesamiento y presentación de los antígenos virales a los linfocitos T, b) un déficit en la producción de IL-12 y, c) una baja expresión de moléculas de coestimulación. Los factores que parecen estar directamente implicados en la pérdida de funcionalidad de las DCs serían la infección de las DCs por el VHC, el tratamiento antiviral así como el efecto de las drogas inmunosupresoras inherentes al TxH. No se descartaría el efecto combinado de los factores anteriormente mencionados.

Con el propósito de abordar este apartado nos planteamos identificar el inmunofenotipo de las DCs generadas *in vitro* a partir de una población de monocitos (CD14⁺) procedentes de PBMC en las distintas fases del estudio (PreTx, 2M y 6M).

Los resultados del inmunofenotipo de las DCs durante la fase previa al TxH tanto para el grupo de pacientes VHC- como VHC+ fueron los característicos de una población de DCs (CD14⁻, CD1a⁺, CD64⁻ CD83⁻, HLA-DR⁺, CD54⁺ CD80⁺ y CD86⁺) tal y como ya habíamos obtenido en un estudio previo (Cos *et al.*, 2002). Además se comprobó que, tras una estimulación con CD40L (Figura 6.5) las DCs experimentaban un incremento en los valores de MFI para aquellos marcadores típicos de un fenotipo maduro (HLA-DR, CD80, CD83 y CD86). No obstante, cuando el estudio se realizó tras el TxH (2M y 6M) se observó un patrón de inmunofenotipo diferencial en función de si los pacientes desarrollaban o no, recidiva viral. A diferencia de los resultados obtenidos en el grupo de pacientes sin recidiva viral, en donde el inmunofenotipo de DCs obtenido durante el 6M del TxH fue comparable al obtenido durante el PreTx, en los pacientes con recidiva viral se obtuvo una disminución en los valores de MFI para HLA-DR, CD80, CD83 y CD86 durante el postrasplante (2M y 6M), tanto en presencia como en ausencia de CD40L (Figura 6.5). Este patrón se correspondía al de una población de DCs con una menor capacidad madurativa y, en consecuencia (aunque estos estudios no fueron realizados), con una deficiente capacidad de inducir respuesta inmune.

En este sentido nuestros resultados indicarían una correlación entre pacientes con recidiva del VHC y presencia de una población de DCs inmaduras. Esta observación sugiere que la identificación del fenotipo de las DCs en pacientes VHC+ sometidos a TxH podría ser de utilidad como herramienta predictiva de recidiva viral.

VII. Discusión

Diferentes estudios apoyan nuestras observaciones. El grupo de Auffermann-Gretzinger (Auffermann-Gretzinger *et al.*, 2001) y el grupo de Kanto (Kanto *et al.*, 1999) ya habían observado una disminución en el porcentaje de DCs que expresaban las moléculas CD83 y CD86 en pacientes con infección crónica por VHC. Más recientemente, el grupo de Gelderblom ha demostrado que las DCs derivadas de monocitos procedentes de pacientes VHC+ se caracterizan por presentar un fenotipo inmaduro (expresión disminuida de CD83, CD86, y HLA-DR) juntamente con un patrón o perfil de citocinas aberrantes; elevada producción de IL-10 e IL-8 y una disminuida secreción de IL-6, IL-1 β , TNF- α así como ausencia de secreción de IL-12 (Gelderblom *et al.*, 2007).

Una posible explicación a favor de la presencia de DCs inmaduras en los pacientes con recidiva viral sería la capacidad del VHC por infectar las DCs o bien la transmisión de partículas virales desde los monocitos infectados a las DCs. Si bien los estudios llevados a cabo por el grupo de Gelderblom demostraron que las condiciones de cultivo *in vitro* para DCs son subóptimas para el mantenimiento de una replicación viral *in vitro* (Gelderblom *et al.*, 2007), otros estudios ponen de relieve que la pérdida de la funcionalidad de las DCs parece estar relacionada con la presencia de proteínas (estructurales y no estructurales) del propio virus (Dolganiuc *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002; Sarobe *et al.*, 2002). Los estudios del grupo de Sarobe ya demostraron en el año 2002 que la expresión de proteínas del core y E1 del VHC en DCs empeoraban la capacidad de estas células para estimular, *in vitro*, a linfocitos T (Sarobe *et al.*, 2002) y que en modelos experimentales de inmunización originaban una respuesta CD4⁺ y CD8⁺ deficiente (Sarobe *et al.*, 2003).

Existe también la posibilidad de que sea la propia terapia antiviral administrada a los pacientes que recidivan la causante de la pérdida de la capacidad madurativa de las DCs. No obstante esta hipótesis resulta dudosa a raíz de los estudios publicados hasta el momento. En este sentido diferentes estudios han puesto de manifiesto que la ribavirina tiene propiedades inmunomoduladoras tanto *in vitro* como *in vivo* (Hoofnagle *et al.*, 2003; Cramp *et al.*, 2000; Shiffman *et al.*, 2000) y que además puede atenuar la funcionalidad de las DCs tal y como lo demuestran los estudios *in vitro* (Barnes *et al.*, 2004) e *in vivo* (Goutagny *et al.*, 2004). En contraposición están los estudios llevados a término por el grupo de Tsubouchi que demostraron un impacto favorable de la terapia antiviral en la evolución de pacientes con infección crónica al

VHC. En su estudio se analizó la presencia de RNA viral en las DCs circulantes y su funcionalidad en dos fases; antes de tratamiento retroviral (IFN- α + Ribavirina) y tras 4 semanas de tratamiento. Los resultados indicaron que tras el tratamiento antiviral se obtenía una negativización del RNA viral en las DCs circulantes así como un notable aumento tanto de su capacidad aloestimuladora como en la producción de IL-12 (Tsubouchi *et al.*, 2004).

Otro factor que podría jugar un papel clave en el desarrollo de DCs inmaduras en los pacientes con recidiva viral tras el TxH sería la IS. Con el objetivo de esclarecer la posible implicación del FK en la inducción de un inmunofenotipo inmaduro, nuestro grupo se planteó estudiar el efecto del FK en relación a la capacidad madurativa de las DCs (obtenidas de donante sano) tras ser estimuladas con una proteína no estructural recombinante (NS3₁₃₅₃₋₁₄₅₅) del VHC.

El efecto del FK en DCs maduras fue evaluado atendiendo a marcadores de superficie celular, ensayos de endocitosis, producción de IL-12p70 y translocación nuclear de la subunidad p65 del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). El análisis microscópico realizado al final de los cultivos celulares en presencia de FK puso de manifiesto una población homogénea de DCs con características morfológicas típicas de DCs en todos y cada uno de los experimentos realizados tal como ya habíamos reportado en un estudio previo (Cos *et al.*, 2002).

Además, el análisis citométrico realizado en los controles de DCs mostraron un fenotipo característico de DCs (CD1a⁺, CD14⁻, CD64⁻, HLA-DR⁺, CD54⁺, CD80⁺, CD83⁻ y CD86⁺ (Di Nicola *and* Lemoli, 2000). Sin embargo, cuando el análisis citométrico se realizaba en las células que habían estado expuestas al FK se observó una reducción de la expresión de CD1a en tan sólo tres días de cultivo. Este efecto se mantenía hasta el día 6 del cultivo sin la necesidad de administrar, en los cultivos celulares, dosis adicionales del inmunosupresor (Figuras 6.7 y 6.8).

Por el contrario, el grupo de Shimizu (Shimizu *et al.*, 2000) reportó en su trabajo altos niveles de CD1a en DCs generadas a partir de células CD34⁺ y cultivadas durante 14 días en presencia de FK. Estos investigadores encontraron que las células expuestas a dicho inmunosupresor coexpresaban el CD1a y CD14 como si de un intermediario celular se trataran, con la capacidad de diferenciarse hacia DCs (CD1a⁺, CD14⁻) o hacia monocitos (CD1a⁻ CD14⁺) (Ratta *et al.*, 1998).

VII. Discusión

Aunque no conocemos la vida media del FK en cultivo celular, creemos que el tiempo de exposición de las células al inmunosupresor así como el progenitor de DCs empleado en estos estudios podría explicar la discrepancia de resultados obtenidos atendiendo al patrón de marcadores CD1a y CD14.

Con el fin de evaluar la capacidad madurativa de las DCs frente a la exposición de proteína no estructural del VHC, ésta se administró en los cultivos de DCs inmaduras durante el sexto día del cultivo, precisamente cuando las DCs mostraban la máxima actividad endocítica. Tras 24 h de exposición de las DCs inmaduras a NS3, éstas experimentaban un aumento de moléculas de coestimulación (CD80, CD83, CD86) y de moléculas de adhesión (CD54) en comparación a las DCs no expuestas (Figura 6.9). Estos resultados eran indicativos de que NS3 favorecía, en tan sólo 24 h, el cambio de un fenotipo inmaduro a un fenotipo maduro. Además se observó que el incremento de las moléculas de coestimulación se correlacionaba con un incremento significativo del porcentaje de células positivas para estos marcadores (Tabla 6.9). Estos resultados se contraponen a los resultados obtenidos por el grupo de Dolganiuc quienes observaron que las proteínas del core y de NS3 del VHC eran capaces de activar monocitos y de inhibir la diferenciación de las DCs con el consecuente efecto inhibitor, por parte del VHC, de la respuesta inmune (Dolganiuc *et al.*, 2003). Una posible explicación frente a esta discrepancia de resultados podría estar relacionada con el fragmento de NS3 empleado en ambos estudios. En nuestro estudio empleamos un fragmento recombinante de la proteína comprendido entre los aminoácidos 1353 y 1455 mientras que el grupo de Dolganiuc utilizó un fragmento comprendido entre los aminoácidos 1450 y 1643. Estudios funcionales han demostrado que diferentes epítomos de NS3 pueden modificar la capacidad proliferativa de las células T lo que podría favorecer la evasión del VHC a las defensas inmunológicas del huésped (Wang and Eckels, 1999).

Cuando las NS3+DCs eran incubadas con FK desde el d+1 del cultivo, se observaba una disminución significativa de los valores de MFI para CD1a, CD80 y CD83 así como en el porcentaje de células positivas para dichos marcadores (Figura 6.9; Tabla 6.9). Estos resultados estarían en concordancia con los resultados publicados anteriormente por nuestro grupo en los cuales se observó que dicho inmunosupresor modifica la expresión de determinados marcadores de DCs cuando estas células eran expuestas al LPS (Cos *et al.*, 2002). En estas condiciones, las células adquirirían un fenotipo característico de células inmaduras.

Se sabe que una correcta activación de la respuesta inmune cursa a través de una unión efectiva entre célula presentadora de antígeno y célula T. En este sentido, las moléculas B7 (CD80 y CD86) interactúan con el receptor CD28 lo que induce la proliferación de CD4 (Clark *and* Ledbetter, 1994). Sin embargo, la ausencia de CD80 y CD86 en célula presentadora de antígeno origina una anergia en células T. Nuestros estudios indican que el FK no sólo origina una disminución de la expresión de CD1a sino también un efecto negativo en la expresión de marcadores de maduración de estas células cuando eran expuestas a NS3.

Estos resultados podrían sugerir que el FK podría bloquear la capacidad endocítica de estas células y, en consecuencia, evitar la expresión de los marcadores de maduración. Sin embargo, los estudios basados en el análisis de captación de FITC-dextrano (Figura 6.10) en DCs y en FK+DCs sugieren que dicho inmunosupresor no bloquea sustancialmente la capacidad endocítica para estas células y que por lo tanto la disminución en la expresión de marcadores de madurez celular tienen que ser explicado por una vía distinta de acción del inmunosupresor sobre las DCs.

Cuando se analizó la capacidad de las DCs en producir IL-12p70 (Figura 6.11) se observó que las células estimuladas con NS3 producían altos niveles de dicha citocina. No obstante, el FK reducía de manera significativa ($p < 0.05$) los niveles de IL-12p70 en las células que habían sido incubadas con NS3.

Se sabe que la IL-12 es una citocina que interviene en la activación y en la proliferación de linfocitos T así como en la posterior producción de IFN- γ por parte de las células T helper (Curtsinger *et al.*, 1999). Atendiendo a los resultados obtenidos creemos que el FK compromete la respuesta de las DCs frente a la proteína no estructural del VHC. Este hallazgo estaría en concordancia con los bajos niveles de producción de IL-12 por parte de las DCs de pacientes infectados por el VHC (Kanto *et al.*, 1999).

Aunque en la actualidad no se sabe cuál es la causa principal de los bajos niveles de IL-12 producidas por las DCs de los pacientes infectados por VHC, se está sugiriendo que el propio VHC o incluso productos derivados del VHC pueden interferir de manera directa o indirecta con el mecanismo de transcripción de los genes p35 y p40 (Kanto *et al.*, 1999).

Aunque los inhibidores de la calcineurina como la ciclosporina A bloquean NF- κ B en DCs (Lee *et al.*, 1999), poco se conoce sobre el efecto del FK sobre NF- κ B de DCs activadas. Se sabe que las moléculas de adhesión, de coestimulación y las citocinas

VII. Discusión

inmunoestimuladoras tales como la IL-12 son NF- κ B dependientes (Yoshimura *et al.*, 2001). Además se sabe que el efecto del FK depende de la población celular estudiada. En células T, el inmunosupresor inhibe la activación nuclear de (NF)-AT y del NF- κ B. Vías críticas en la activación de las células T. Por el contrario el FK activa la vía del NF- κ B en células no linfoides tales como fibroblastos y célula renal (Muraoka *et al.*, 1996).

En nuestro modelo celular, los resultados obtenidos en los experimentos analizados por microscopía confocal demostraron un marcaje nuclear intenso para p65 en NS3+DCs. Por el contrario, en FK+DCs ya sea en presencia o en ausencia de NS3 se observó una disminución considerable de la intensidad de marcaje nuclear para p65 lo que sugiere que dicho inmunosupresor actúa bloqueando la translocación de p65 desde citoplasma a núcleo celular, afectando, por lo tanto, a la vía de señalización del NF- κ B (Figura 6.12).

Aunque la concentración empleada de FK en nuestro estudio es superior a las concentraciones utilizadas en pacientes, nuestros resultados muestran una inhibición en la translocación de NF- κ B y, consecuentemente, una reducción de la expresión de moléculas de adhesión, de coestimulación, de marcadores de madurez celular así como una baja producción de IL-12p70. Esta secuencia de eventos sugiere que el FK contribuye a mantener a NS3+DCs en un estado inmaduro.

Basándonos en los resultados de la acción del FK en DCs creemos que el FK administrado en pacientes sometidos a TxH por VHC podría contribuir a la persistencia del VHC al mantener a las DCs en un estado de inmadurez celular y, consecuentemente, comprometiendo la respuesta T CD4⁺. De ahí, la importancia del estudio del inmunofenotipo de las DCs en los pacientes VHC+ y sometidos a TxH con el fin de predecir la recidiva viral.

En resumen podemos decir que el modelo celular propuesto ha permitido, mediante el empleo de técnicas no invasivas, identificar unos parámetros (I.E., probabilidad de rechazo, niveles de citocinas proinflamatorias y tolerogénicas así como el inmunofenotipo de DCs de los pacientes sometidos a TxH) que ofrecen un perfil de respuesta inmunológica del paciente trasplantado en respuesta a aloantígenos de donante durante la fase de mantenimiento. La concordancia entre los resultados experimentales y la evolución clínica de cada paciente sugiere que los parámetros indicados podrían ser empleados como criterios a tener en cuenta en el momento de

VII. Discusión

identificar aquellos pacientes candidatos a una modificación de la pauta inmunosupresora. Además, la puesta punto del cultivo de DCs de pacientes trasplantados por VHC y la posterior caracterización inmunofenotípica de estas células permitiría predecir la recidiva viral.

Creemos que es necesario un estudio clínico-experimental más amplio, tanto en número de pacientes como en el empleo de técnicas de cribaje inmunológico, con el fin de obtener resultados significativos que permitan establecer un perfil inmunológico individualizado capaz de seleccionar aquellos pacientes con menor riesgo de rechazo del injerto para ser sometidos a un ajuste de la pauta inmunosupresora.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. Los cocultivos de células T CD4⁺ del receptor de un TxH con aloantígenos del donante procedentes de bazo permiten la monitorización inmunológica del paciente trasplantado al ser un método de análisis experimental no invasivo, simple, sensible (tanto a la presencia de aloantígenos del donante como al tratamiento inmunosupresor), reproducible y de corta duración.

2. El tratamiento inmunosupresor administrado *in vivo* origina, en el modelo *in vitro*, una respuesta CD4⁺ diferencial según los pacientes hayan presentado o no episodios de rechazo:

2.1 En el grupo de pacientes con episodios de rechazo, la respuesta proliferativa de células T CD4⁺ frente a aloantígenos de donante en presencia de IS se mantiene comparable a la obtenida en el PreTXH.

2.2 En el grupo de pacientes sin episodios de rechazo, la respuesta proliferativa resulta significativamente inferior ($p < 0,05$) a la obtenida en el PreTxH, indicativo de que éste último grupo de pacientes podrían ser candidatos a retirada parcial de la IS.

3. Los valores correspondientes al Índice de Estimulación (I.E.), la probabilidad de rechazo ($P_{I.E.} > 1$) y la cuantificación de citocinas (Th1 y Th2) en los sobrenadantes de los cocultivos celulares permiten obtener una aproximación, individualizada, de la evolución del paciente trasplantado hacia rechazo al injerto.

VIII. Conclusiones

3.1 Los pacientes candidatos a una retirada parcial o total de la IS presentan, en el modelo celular propuesto: a) un I.E. < 1 , b) una probabilidad de rechazo ($P_{I.E.} > 1$) inferior al 50 %, c) unos niveles de citocinas (Th1; IFN- γ y TNF- α) inferiores al 50 % y, d) incrementos en los niveles IL-10 tras el TxH.

3.2 Un 30% de los pacientes (P1, P3 y P6), cumplen con los criterios de inclusión expuestos anteriormente siendo, por lo tanto, candidatos a una disminución o retirada parcial de la pauta inmunosupresora.

3.3 Los resultados experimentales para estos pacientes presentan concordancia clínica dado que: a) los pacientes no desarrollan episodios de rechazo durante el seguimiento y, b) los pacientes experimentan, en 6M, una reducción en los niveles de FK plasmáticos superiores al 40 %.

3.4 El 70% de los pacientes analizados no son candidatos a una disminución o retirada parcial de la inmunosupresión dado que cumplen parcialmente los criterios de inclusión (P2, P4, P5, P8, P9 y P10) o no cumplen ninguno de ellos (P7).

4. La cuantificación, in vitro, de los niveles de IL-10 (citocina tolerogénica) resulta una herramienta predictiva de progresión del VHC tras el TxH.

4.1 El 100% de los pacientes con recidiva del VHC tras el TxH (P3, P6 y P9) presentan un incremento, tiempo-dependiente, de los niveles de IL-10. Este aumento va asociado a un descenso de citocinas proinflamatorias Th1 (IFN- γ y TNF- α).

4.2 El 66,6% de los pacientes (P2 y P5) que no desarrollan recidiva de VHC tras el TxH presentan unos niveles de IL-10 inferiores a los obtenidos en la fase previa al TxH.

Ambas observaciones sugieren que un aumento de IL-10 tras el TxH podría favorecer la progresión viral por escape del virus al sistema inmunológico de paciente.

5. El fenotipaje de DCs resulta una herramienta predictiva de recidiva viral tras el TxH.

5.1 La adición de GM-CSF e IL-4 en los cultivos de monocitos (CD14⁺, CD54⁺, CD64⁺, CD86⁺ y HLA-DR⁺) obtenidos de sangre periférica de los pacientes candidatos a TxH permite generar, en la fase previa al TxH o bien con posterioridad a ella, una población de DCs con un fenotipo inmaduro (CD14⁻, CD1a⁺, CD64⁻ CD83⁻, HLA-DR⁺, CD54⁺ CD80⁺ y CD86⁺). No obstante, tras un estímulo antigénico con CD40L, LPS (Cos et al. 2002) o proteína no estructural NS3 estas células adquieren un fenotipo maduro (HLA-DR⁺⁺, CD80⁺⁺, CD83⁺⁺ y CD86⁺⁺).

5.2 En el 100 % de los pacientes sometidos a TxH por VHC, la IS disminuye los valores de MFI para los marcadores de superficie celular de las DCs (HLA-DR, CD80, CD83 y CD86) dando lugar a un fenotipo celular inmaduro con déficit de respuesta adaptativa y, por lo tanto, una mayor probabilidad de progresión viral.

5.3 El FK, inmunosupresor de base en los pacientes estudiados, sería una droga involucrada en la generación de DCsi.

5.3.1 La adición de FK *in vitro* no impide la generación de DCs procedentes de monocitos de donantes sanos. No obstante, esta droga afecta significativamente ($p < 0,05$) a la capacidad madurativa de las DCs por LPS (Cos J. et al 2002) o por NS3

VIII. Conclusiones

dada la disminuida expresión de CD80 y CD83, la disminución en los porcentajes de poblaciones doblemente positivas ($CD80^+ / CD83^+$) así como por los bajos niveles de IL-12p70 secretada.

6. El fenotipo maduro de las DCs parece ser dependiente de la activación de la vía $NF-k\beta$ dado que NS3 es capaz de inducir una translocación de la subunidad p65 de $NF-k\beta$ desde citoplasma a núcleo celular. Sin embargo, la disminución tanto de los marcadores de maduración como de la producción de IL-12p70 parece ser debido, entre otros posibles factores (no abordados en este estudio), por un bloqueo de la translocación de la subunidad p65 de $NF-k\beta$ inducido, probablemente, por FK.

6.1 Creemos, por lo tanto, que la inducción de un inmunofenotipo de DCs inmaduro juntamente con unos niveles elevados de IL-10 podrían ser herramientas predictivas de recidiva del VHC.

7. Se requeriría un estudio con un mayor número de pacientes con el fin de poder indagar sobre el carácter predictivo del modelo celular propuesto.

CONSIDERACIONES FINALES

Nuestro grupo de investigación es consciente de las limitaciones del estudio planteado. Limitaciones que abarcan desde el número de pacientes incluidos en el estudio, la cantidad de células obtenidas en las aféresis así como las técnicas de análisis empleadas.

No obstante hemos sido capaces de definir, diseñar y abordar, de manera satisfactoria, una estrategia de recogida de muestras y de análisis experimental para dar cobertura a la propuesta del *Servei de Cirurgia hepatobiliopancreàtica i*

VIII. Conclusiones

Trasplantaments de l'Hospital General Vall d'Hebron; la monitorización prospectiva de la respuesta inmune del paciente trasplantado.

Este ha sido el primer estudio promovido por la Unidad con la finalidad de identificar aquellos pacientes que, tras ser sometidos a TxH, podrían candidatos a una retirada parcial o total de la pauta inmunosupresora. Sería necesario un abordaje más profundo para verificar la utilidad clínica del modelo propuesto.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abril J, de Heredia ML, González L, Clèries R, Nadal M, Condom E, Aguiló F, Gómez-Zaera M, Nunes V. Altered expression of 12S/MT-RNR1, MT-CO2/COX2, and MT-ATP6 mitochondrial genes in prostate cancer. Prostate. 2008 Jul 1;68(10):1086-96.

Adams D, Neuberger J. Graft rejection following liver transplantation. J Hepatol. 1991 Jan;12(1):126.

Afonso LC, Scharton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against Leishmania major. Science. 1994 Jan 14;263(5144):235-7.

Antonyamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Trout AB, Thomson AW. Evidence for a role of IL-17 in alloimmunity: a novel IL-17 antagonist promotes heart graft survival. Transplant Proc. 1999 Feb-Mar;31(1-2):93.

Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B, Bonifazi F, Bandini G, Sauntharajah Y, Zagnoli A, Stanzani M, Falcioni S, Perrone G, Tura S, Baccarani M, Rondelli D. Acute graft-versus-host disease and steroid treatment impair CD11c+ and CD123+ dendritic cell reconstitution after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2004 Feb;10(2):106-15.

Asakura T, Ohkohchi N, Satomi S. Changes of serum cytokines associated with hepatic regeneration after living-related liver transplantation. Transplant Proc. 2000 Nov;32(7):2199-203.

Auffermann-Gretzinger S, Keefe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. Blood. 2001 May 15;97(10):3171-6.

Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL, Sayegh MH. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 29;93(22):12439-44.

Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trépo C, Inchauspé G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. Gastroenterology. 2001 Feb;120(2):512-24.

Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat Rev Immunol. 2005 Apr;5(4):296-306.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.

Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. J Immunol. 2001 Dec 15;167(12):7199-206.

IX. Bibliografia

Barnes E, Salio M, Cerundolo V, Medlin J, Murphy S, Dusheiko G, Klenerman P. Impact of alpha interferon and ribavirin on the function of maturing dendritic cells. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Sep;48(9):3382-9.

Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. J Immunol. 1999 Jan 1;162(1):352-8.

Bertoletti A, D'Elios MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. Gastroenterology. 1997 Jan;112(1):193-9. ç

Bes M, Sauleda S, Quer J, Cubero M, Guàrdia J, Puig LI, Esteban R, Esteban JI, Selection, expansion and functional restoration of NS3-specific CD4 T cells from HCV-infected patients. AABF Annual meeting and TXPO. Montreal, Canada, 4-7 October 2008.

Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. J Virol. 2001 Aug;75(15):7059-66.

Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. J Clin Invest. 1995 Jul;96(1):447-55.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature. 1987 Oct 8-14;329(6139):506-12.

Blaecke A, Delneste Y, Herbault N, Jeannin P, Bonnefoy JY, Beck A, Aubry JP. Measurement of nuclear factor-kappa B translocation on lipopolysaccharide-activated human dendritic cells by confocal microscopy and flow cytometry. Cytometry. 2002 Jun 1;48(2):71-9.

Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system. Tissue Antigens. 1992 Apr;39(4):161-73.

Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. J Exp Med. 2003 Jan 6;197(1):101-9.

Bronowicki JP, Vetter D, Uhl G, Hudziak H, Uhrmacher A, Vetter JM, Doffoel M. Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients. J Infect Dis. 1997 Aug;176(2):518-22.

Burlingham WJ, Grailer AP, Fechner JH Jr, Kusaka S, Trucco M, Kocova M, Belzer FO, Sollinger HW. Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. Transplantation. 1995 Apr 27;59(8):1147-55.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J Exp Med. 1994 Oct 1;180(4):1263-72.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. Nat Med. 1999 Aug;5(8):919-23.

Chan C, Podgaetz E, Hernández D. Liver transplantation in hepatitis C. Rev Invest Clin. 2004 Jul-Aug;56(4):513-21.

Chang KM, Rehermann B, McHutchison JG, Pasquinelli C, Southwood S, Sette A, Chisari FV. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. J Clin Invest. 1997 Nov 1;100(9):2376-85.

Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suciú-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. Nat Immunol. 2002 Mar;3(3):237-43.

Chen Y, Dougherty ER, Bittner ML. Ratio-based decision and the quantitative analysis of cDNA microarray images. J Biomed Opt. 1997;2(4):364.

Chen Y, McKenna GJ, Yoshida EM, Buczkowski AK, Scudamore CH, Erb SR, Steinbrecher UP, Chung SW. Assessment of immunologic status of liver transplant recipients by peripheral blood mononuclear cells in response to stimulation by donor alloantigen. Ann Surg. 1999 Aug;230(2):242-50.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Mar 15;88(6):2451-5.

Chua MS, Sarwal MM. Microarrays: new tools for transplantation research. Pediatr Nephrol. 2003 Apr;18(4):319-27.

Chung SW, Yoshida EM, Cattral MS, Hu Y, Gorczynski RM. Donor-specific stimulation of peripheral blood mononuclear cells from recipients of orthotopic liver transplants is associated, in the absence of rejection, with type-2 cytokine production. Immunol Lett. 1998 Sep;63(2):91-6.

Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. Nature. 1994 Feb 3;367(6462):425-8.

Conti F, Calmus Y, Rouer E, Gaulard P, Louvel A, Houssin D, Zafrani ES. Increased expression of interleukin-4 during liver allograft rejection. J Hepatol. 1999 May;30(5):935-43.

Cookson S, Doherty DG, Todryk S, Gibbs P, Portmann B, O'Grady J, Rela M, Heaton N, Norris S. Hepatic expression of IL-15 mRNA is associated with liver graft acceptance. Transpl Immunol. 2003

IX. Bibliografia

Corinti S, Albanesi C, Ia Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. J Immunol. 2001 Apr 1;166(7):4312-8.

Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, Gardner JP, Dragic T. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Sep 28;101(39):14067-72. Epub 2004 Sep 15.

Cos J, Villalba T, Parra R, Gallardo D, Bilbao I, Margarit C, Massuet L. FK506 in the maturation of dendritic cells. Haematologica. 2002 Jul;87(7):679-87;

Cramp ME, Rossol S, Chokshi S, Carucci P, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. Gastroenterology. 2000 Feb;118(2):346-55.

Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. J Immunol. 1999 Mar 15;162(6):3256-62.

Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. Transplantation. 1984 Sep;38(3):287-92.

Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. J Virol. 2002 Dec;76(24):12584-95.

de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. Springer Semin Immunopathol. 2005 Jan;26(3):289-307. Epub 2004 Oct 14.

Demetris AJ, Murase N, Delaney CP, Woan M, Fung JJ, Starzl TE. The liver allograft, chronic (ductopenic) rejection, and microchimerism: what can they teach us? Transplant Proc. 1995 Feb;27(1):67-70.

De Ruvo N, Cucchetti A, Lauro A, Masetti M, Cautero N, Di Benedetto F, Dazzi A, Del Gaudio M, Ravaioli M, Zanello M, La Barba G, di Francesco F, Risaliti A, Ramacciato G, Pinna AD. Preliminary results of immunosuppression with thymoglobuline pretreatment and hepatitis C virus recurrence in liver transplantation. Transplant Proc. 2005 Jul-Aug;37(6):2607-8.

Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, Al-Shamkhani A, Flavell R, Borrow P, Reis e Sousa C. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. Nature. 2003 Jul 17;424(6946):324-8.

Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. J Virol. 1997 Aug;71(8):6011-9.

Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. Lancet. 1995 Oct 14;346(8981):1006-7.

Di Nicola M, Lemoli RM. Dendritic cells: specialized antigen presenting cells. Haematologica. 2000 Feb;85(2):202-7.

Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Mandrekar P, Szabo G. Additive inhibition of dendritic cell allostimulatory capacity by alcohol and hepatitis C is not restored by DC maturation and involves abnormal IL-10 and IL-2 induction. Alcohol Clin Exp Res. 2003 Jun;27(6):1023-31. Erratum in: Alcohol Clin Exp Res. 2003 Jul;27(7):1212.

Dolganiuc A, Paek E, Kodys K, Thomas J, Szabo G. Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes. Gastroenterology. 2008 Dec;135(6):2119-27. Epub 2008 Aug 7.

Duquesnoy RJ. Immunogenetics of the human major histocompatibility complex. Clin Lab Med. 1991 Sep;11(3):509-36.

Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. Immunity. 2001 Dec;15(6):883-95.

Everson GT. Treatment of patients with hepatitis C virus on the waiting list. Liver Transpl. 2003 Nov;9(11):S90-4.

Ferrari C, Valli A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti T, Schianchi C, Missale G, Marin MG, Fiaccadori F. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. Hepatology. 1994 Feb;19(2):286-95.

Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schughart L, Schmidt CA, Andreesen R, Mackensen A. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. Blood. 2005 Apr 1;105(7):2828-35. Epub 2004

Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Münz C, Liu YJ, Bhardwaj N. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. Blood. 2003 May 1;101(9):3520-6. Epub 2003 Jan 2.

Frasca L, Carmichael P, Lechler R, Lombardi G. Anergic T cells effect linked suppression. Eur J Immunol. 1997 Dec;27(12):3191-7.

Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part 1. N Engl J Med. 1996 Jun 6;334(23):1526-9.

Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. N Engl J Med. 1996 Jul 4;335(1):43-5.

Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Chaudhry AN, Lechler RI. CD4+CD25+ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients. J Am Soc Nephrol. 2003 Jun;14(6):1652-61.

García F Jr, García F, Roldán C, López I, Martínez NM, Alvarez M, Bernal MC, Hernández J, Maroto MC. Detection of HCV and GBV-CHGV RNA in peripheral blood

IX. Bibliografia

mononuclear cells of patients with chronic type C hepatitis. Microbios. 2000;103(404):7-15.

Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 15;100(8):4498-503.

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. Cell. 2000 Mar 3;100(5):587-97.

Gelderblom HC, Nijhuis LE, de Jong EC, te Velde AA, Pajkrt D, Reesink HW, Beld MG, van Deventer SJ, Jansen PL. Monocyte-derived dendritic cells from chronic HCV patients are not infected but show an immature phenotype and aberrant cytokine profile. Liver Int. 2007 Sep;27(7):944-53.

Gelman A, Carlin JB, Stern H, Rubin DB. Bayesian data analysis. London: Chapman and Hall; 2003

Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. Gastroenterology. 1999 Oct;117(4):933-41.

Goulmy E, van Leeuwen A, Blokland E, van Rood JJ, Biddison WE. Major histocompatibility complex-restricted H-Y-specific antibodies and cytotoxic T lymphocytes may recognize different self determinants. J Exp Med. 1982 May 1;155(5):1567-72.

Goutagny N, Vieux C, Decullier E, Ligeoix B, Epstein A, Trepo C, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C. Quantification and functional analysis of plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C virus infection. J Infect Dis. 2004 May 1;189(9):1646-55. Epub 2004 Apr 15

Gramenzi A, Andreone P, Loggi E, Foschi FG, Cursaro C, Margotti M, Biselli M, Bernardi M. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. J Viral Hepat. 2005 Sep;12(5):525-30.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2002;20:621-67.

Gugenheim J, Samuel D, Reynes M, Bismuth H. Liver transplantation across ABO blood group barriers. Lancet. 1990 Sep 1;336(8714):519-23.

Guidotti LG, Borrow P, Brown A, McClary H, Koch R, Chisari FV. Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. J Exp Med. 1999 May 17;189(10):1555-64.

Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. Nat Rev Immunol. 2004 Jan;4(1):24-34.

Hayes JM. The immunobiology and clinical use of current immunosuppressive therapy for renal transplantation. J Urol. 1993 Mar;149(3):437-48.

Hebert MF, Fisher RM, Marsh CL, Dressler D, Bekersky I. Effects of rifampin on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers. J Clin Pharmacol. 1999 Jan;39(1):91-6.

Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. Immunol Rev. 2003 Dec;196:247-64.

Hiasa Y, Horiike N, Akbar SM, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y, Onji M. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Aug 10;249(1):90-5.

Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Oct;23(10):1473-82. Epub 2008 Aug 28. Review.

Holzknacht ZE, Platt JL. The fine cytokine line between graft acceptance and rejection. Nat Med. 2000 May;6(5):497-8.

Hoofnagle JH, Ghany MG, Kleiner DE, Doo E, Heller T, Promrat K, Ong J, Khokhar F, Soza A, Herion D, Park Y, Everhart JE, Liang TJ. Maintenance therapy with ribavirin in patients with chronic hepatitis C who fail to respond to combination therapy with interferon alfa and ribavirin. Hepatology. 2003 Jul;38(1):66-74.

Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. J Exp Med. 1993 Aug 1;178(2):479-88.

Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. Eur J Immunol. 2000 Jun;30(6):1683-90.

Kaimori A, Kanto T, Kwang Limn C, Komoda Y, Oki C, Inoue M, Miyatake H, Itose I, Sakakibara M, Yakushijin T, Takehara T, Matsuura Y, Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. Virology. 2004 Jun 20;324(1):74-83.

Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. J Immunol. 1999 May 1;162(9):5584-91.

Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat Rev Immunol. 2003 Dec;3(12):984-93.

Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. Acta Med Okayama. 2001 Jun;55(3):133-59.

Keicho N, Sawada S, Kitamura K, Yotsumoto H, Takaku F. Effects of an immunosuppressant, FK506, on interleukin 1 alpha production by human macrophages and a macrophage-like cell line, U937. Cell Immunol. 1991 Feb;132(2):285-94.

IX. Bibliografia

Kelleher P, Maroof A, Knight SC. Retrovirally induced switch from production of IL-12 to IL-4 in dendritic cells. Eur J Immunol. 1999 Jul;29(7):2309-18.

Kim HS, Lee JK, Yang IH, Ahn JK, Oh YI, Kim CJ, Kim YS, Lee CK. Identification of hepatitis C virus core domain inducing suppression of allostimulatory capacity of dendritic cells. Arch Pharm Res. 2002 Jun;25(3):364-9.

Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. J Antibiot (Tokyo). 1987 Sep;40(9):1249-55.

Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Grakoui A, Rice CM, Choo QL, Houghton M, Walker BD. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus. Identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. J Clin Invest. 1995 Nov;96(5):2311-21.

Koziel MJ, Wong DK, Dudley D, Houghton M, Walker BD. Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte and T helper cell responses in seronegative persons. J Infect Dis. 1997 Oct;176(4):859-66.

Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A, Kanagawa O, Unanue ER, Colonna M, Cella M. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. J Exp Med. 2003 Apr 7;197(7):899-906. Epub 2003 Mar 31.

Lagaraine C, Lebranchu Y. Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. Transplantation. 2003 May 15;75(9 Suppl):37S-42S.

Land W, Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Abendroth D, Rutili G, Arfors KE, Messmer K. The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. Transplantation. 1994 Jan;57(2):211-7.

Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. Gut. 2003 Feb;52(2):307-14.

Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, Nguyen TN, Day CL, Purkis DR, Reiser M, Kim AY, Lucas M, Klenerman P, Walker BD. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. J Virol. 2002 Jun;76(12):6104-13.

Lechler RI, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. J Exp Med. 1982 Dec 1;156(6):1835-41.

Lechner O, Lauber J, Franzke A, Sarukhan A, von Boehmer H, Buer J. Fingerprints of anergic T cells. Curr Biol. 2001 Apr 17;11(8):587-95.

Lee JI, Ganster RW, Geller DA, Burckart GJ, Thomson AW, Lu L. Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. Transplantation. 1999 Nov 15;68(9):1255-63.

Le Moine O, Marchant A, Durand F, Ickx B, Pradier O, Belghiti J, Abramowicz D, Gelin M, Goldman M, Devière J. Systemic release of interleukin-10 during orthotopic liver transplantation. Hepatology. 1994 Oct;20(4 Pt 1):889-92.

Lerut J, Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation Am J Transplant. 2006 Aug;6(8):1774-80.

Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, Ueda M, Mori T, Kawamoto H, Tanaka Y, Sakaguchi S, Minato N, Wood KJ, Tanaka K. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. Am J Transplant. 2004 Dec;4(12):2118-25.

Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. Blood. 2004 Feb 1;103(3):1026-9. Epub 2003 Oct 2.

Lucey MR. Induction immunosuppression in hepatitis C virus-infected liver transplant recipients. Liver Transpl. 2002 Oct;8(10 Suppl 1):S44-6.

Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. J Immunol. 1998 Aug 15;161(4):1947-53.

Macián F, García-Cózar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. Cell. 2002 Jun 14;109(6):719-31.

Mañez R, Kusne S, Martin M, Linden P, Irish W, Torre-Cisneros J, Kramer D, Ho M, Starzl TE. The impact of blood transfusion on the occurrence of pneumonitis in primary cytomegalovirus infection after liver transplantation. Transfusion. 1993 Jul;33(7):594-7.

Mañez R, Mateo R, Tabasco J, Kusne S, Starzl TE, Duquesnoy RJ. The influence of HLA donor-recipient compatibility on the recurrence of HBV and HCV hepatitis after liver transplantation. Transplantation. 1995 Feb 27;59(4):640-2.

Markus BH, Duquesnoy RJ, Gordon RD, Fung JJ, Vanek M, Klintmalm G, Bryan C, Van Thiel D, Starzl TE. Histocompatibility and liver transplant outcome. Does HLA exert a dualistic effect? Transplantation. 1988 Sep;46(3):372-7.

Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. J Virol. 1992 May;66(5):3225-9.

Martín P, Del Hoyo GM, Anjuère F, Arias CF, Vargas HH, Fernández-L A, Parrillas V, Ardavin C. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. Blood. 2002 Jul 15;100(2):383-90.

Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernández-Fuentes M, Souillou JP, Sánchez-Fueyo A. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. Am J Transplant. 2007 Feb;7(2):309-19.

IX. Bibliografia

Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Ostrowski L, Flynn B, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. Am J Transplant. 2003 Jun;3(6):689-96.

McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. Trends Immunol. 2002 Sep;23(9):450-5.

McMichael J, Irish W, McCauley J, Shapiro R, Gordon R, Van Thiel DH, Lieberman R, Warty VS, Fung J, Starzl TE. Evaluation of a novel "intelligent" dosing system for optimizing FK 506 therapy. Transplant Proc. 1991 Dec;23(6):2780-2.

McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. J Exp Med. 1994 Apr 1;179(4):1331-6.

McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, Stumbles PA, Wells TN, Holt PG. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. J Exp Med. 1996 Dec 1;184(6):2429-32.

Mele TS, Kneteman NM, Zhu LF, Ramassar V, Urmson J, Halloran B, Churchill TA, Jewell L, Kane K, Halloran PF. IFN-gamma is an absolute requirement for spontaneous acceptance of liver allografts. Am J Transplant. 2003 Aug;3(8):942-51.

Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. Nat Immunol. 2003 Jan;4(1):78-86. Epub 2002 Nov 25.

Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. J Clin Invest. 1996 Aug 1;98(3):706-14.

Mor E, Kaspa RT, Sheiner P, Schwartz M. Treatment of hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis in the era of liver transplantation Ann Intern Med. 1998 Oct 15;129(8):643-53.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Muraoka K, Fujimoto K, Sun X, Yoshioka K, Shimizu K, Yagi M, Bose H Jr, Miyazaki I, Yamamoto K. Immunosuppressant FK506 induces interleukin-6 production through the activation of transcription factor nuclear factor (NF)-kappa(B). Implications for FK506 nephropathy. J Clin Invest. 1996 Jun 1;97(11):2433-9.

Muratori L, Gibellini D, Lenzi M, Cataleta M, Muratori P, Morelli MC, Bianchi FB. Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Blood. 1996 Oct 1;88(7):2768-74.

Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor

HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. J Am Soc Nephrol. 2002 Jan;13(1):252-9.

Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. J Med Virol. 2002 Jun;67(2):152-61.

Nelson DR, Soldevila-Pico C, Reed A, Abdelmalek MF, Hemming AW, Van der Werf WJ, Howard R, Davis GL. Anti-interleukin-2 receptor therapy in combination with mycophenolate mofetil is associated with more severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. Liver Transpl. 2001 Dec;7(12):1064-70.

Newton MA, Kendzierski CM, Richmond CS, Blattner FR, Tsui KW. On differential variability of expression ratios: improving statistical inference about gene expression changes from microarray data. J Comput Biol. 2001;8(1):37-52.

Nicholson LB, Anderson AC, Kuchroo VK. Tuning T cell activation threshold and effector function with cross-reactive peptide ligands. Int Immunol. 2000 Feb;12(2):205-13.

Noguchi Y, Richards EC, Chen YT, Old LJ. Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 14;92(6):2219-23.

Ocaña L, Cos J, Quer J, Bilbao I, Palou E, Parra R, Sauleda S, Esteban JI, Guàrdia J, Massuet LI, Margarit C. Analysis of INF-gamma, TNF-alpha and dendritic cells to predict hepatitis C virus recurrence in liver transplant patients. Transplant Proc. 2005 Nov;37(9):3951-6.

O'Grady JG, Alexander GJ, Sutherland S, Donaldson PT, Harvey F, Portmann B, Calne RY, Williams R. Cytomegalovirus infection and donor/recipient HLA antigens: interdependent co-factors in pathogenesis of vanishing bile-duct syndrome after liver transplantation. Lancet. 1988 Aug 6;2(8606):302-5.

O'Grady JG, Williams R.. Acute liver failure. Baillieres Clin Gastroenterol. 1989 Jan;3(1):75-89.

Oluwole SF, Oluwole OO, DePaz HA, Adeyeri AO, Witkowski P, Hardy MA. CD4+CD25+ regulatory T cells mediate acquired transplant tolerance. Transpl Immunol. 2003 Jul-Sep;11(3-4):287-93.

Opelz G; Collaborative Transplant Study. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. Lancet. 2005 Apr 30-May 6;365(9470):1570-6.

Papatheodoridis GV, Barton SG, Andrew D, Clewley G, Davies S, Dhillon AP, Dusheiko G, Davidson B, Rolles K, Burroughs AK. Longitudinal variation in hepatitis C virus (HCV) viraemia and early course of HCV infection after liver transplantation for HCV cirrhosis: the role of different immunosuppressive regimens. Gut. 1999 Sep;45(3):427-34.

Papatheodoridis GV, Davies S, Dhillon AP, Teixeira R, Goulis J, Davidson B, Rolles K, Dusheiko G, Burroughs AK. The role of different immunosuppression in the long-term histological outcome of HCV reinfection after liver transplantation for HCV cirrhosis. Transplantation. 2001 Aug 15;72(3):412-8.

IX. Bibliografia

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. Hepatology. 2004 Jan;39(1):5-19.

Penna A, Missale G, Lamonaca V, Pilli M, Mori C, Zanelli P, Cavalli A, Elia G, Ferrari C. Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. Hepatology. 2002 May;35(5):1225-36.

Pfeffer PF, Thorsby E. HLA-restricted cytotoxicity against male-specific (H-Y) antigen after acute rejection of an HLA-identical sibling kidney: clonal distribution of the cytotoxic cells. Transplantation. 1982 Jan;33(1):52-6.

Pirenne J, Kitade H, Kawai M, Koshiba T, Van Damme B, Mathieu C, Waer M. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. Transplantation. 2005 Feb 15;79(3 Suppl):S25-7.

Pöhlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. J Virol. 2003 Apr;77(7):4070-80.

Pollara G, Jones M, Handley ME, Rajpopat M, Kwan A, Coffin RS, Foster G, Chain B, Katz DR. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. J Immunol. 2004 Sep 15;173(6):4108-19.

Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT) Lancet. 1998 Oct 31;352(9138):1426-32.

Rabinowitz JD, Beeson C, Wülfing C, Tate K, Allen PM, Davis MM, McConnell HM. Altered T cell receptor ligands trigger a subset of early T cell signals. Immunity. 1996 Aug;5(2):125-35.

Ratta M, Rondelli D, Fortuna A, Curti A, Fogli M, Fagnoni F, Martinelli G, Terragna C, Tura S, Lemoli RM. Generation and functional characterization of human dendritic cells derived from CD34 cells mobilized into peripheral blood: comparison with bone marrow CD34+ cells. Br J Haematol. 1998 Jun;101(4):756-65.

Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. FEMS Microbiol Lett. 2001 Aug 21;202(2):149-56.

Rehermann B, Chang KM, McHutchison JG, Kokka R, Houghton M, Chisari FV. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. J Clin Invest. 1996a Sep 15;98(6):1432-40.

Rehermann B, Chang KM, McHutchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, Chisari FV. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. J Virol. 1996b Oct;70(10):7092-102.

Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol. 2005 Mar;5(3):215-29.

Rigopoulou EI, Abbott WG, Haigh P, Naoumov NV. Blocking of interleukin-10 receptor--a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus. Clin Immunol. 2005 Oct;117(1):57-64.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science. 1999 Feb 19;283(5405):1183-6.

Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 5th edition; 1998.

Rollier C, Drexhage JA, Verstrepen BE, Verschoor EJ, Bontrop RE, Koopman G, Heeney JL. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. Hepatology. 2003 Oct;38(4):851-8.

Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, Bouwer HG, Hinrichs DJ. Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. Hepatology. 2002 Jan;35(1):190-8.

Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. J Mol Biol. 2001 Oct 26;313(3):451-64.

Saito K, Ait-Goughoulte M, Truscott SM, Meyer K, Blazevic A, Abate G, Ray RB, Hoft DF, Ray R. Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production. J Virol. 2008 Apr;82(7):3320-8. Epub 2008 Jan 23.

Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. J Am Soc Nephrol. 2003 Jun;14(6):1643-51.

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J Exp Med. 1995 Aug 1;182(2):389-400.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med. 1994 Apr 1;179(4):1109-18.

Sandberg K, Gobl AE, Funa K, Alm GV. Characterization of the blood mononuclear leucocytes producing alpha interferon after stimulation with herpes simplex virus in vitro, by means of combined immunohistochemical staining and in situ RNA-RNA hybridization. Scand J Immunol. 1989 Jun;29(6):651-8.

Sankary H, Chong A, Frye E, Scuderi P, Foster P, McChesney L, Williams J. Daily determinations of serum lymphotoxin allows for accurate early diagnosis of hepatic allograft rejection. Transplant Proc. 1993 Feb;25(1 Pt 2):928-30.

IX. Bibliografía

Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, López-Díaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, García N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. J Virol. 2002 May;76(10):5062-70. Erratum in: J Virol. 2004 Oct;138(1):193.

Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribillaga L, Arina A, Melero I, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. J Virol. 2003 Oct;77(20):10862-71.

Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. Immunity. 2003 Mar;18(3):367-79.

Scognamiglio P, Accapezzato D, Casciaro MA, Cacciani A, Artini M, Bruno G, Chircu ML, Sidney J, Southwood S, Abrignani S, Sette A, Barnaba V. Presence of effector CD8+ T cells in hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors. J Immunol. 1999 Jun 1;162(11):6681-9.

Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, Schluger LK, Theise N, Kishikawa K, Kolesnikov V, Bodenheimer H, Emre S, Miller CM. Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. Hepatology. 1995 Jan;21(1):30-4.

Shiffman ML, Verbeke SB, Kimball PM. Alpha interferon combined with ribavirin potentiates proliferative suppression but not cytokine production in mitogenically stimulated human lymphocytes. Antiviral Res. 2000 Nov;48(2):91-9.

Shimizu K, Fujii S, Fujimoto K, Kawa K, Yamada A, Kawano F. Tacrolimus (FK506) treatment of CD34+ hematopoietic progenitor cells promote the development of dendritic cells that drive CD4+ T cells toward Th2 responses. J Leukoc Biol. 2000 Nov;68(5):633-40.

Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, Gatelly M, Delespesse G. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. Eur J Immunol. 1995 Apr;25(4):1125-8.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. Science. 1999 Jun 11;284(5421):1835-7.

Slavcev A, Lácha J, Honsová E, Sajdlová H, Lodererová A, Vitko S, Skibová J, Striz I. Soluble CD30 and HLA antibodies as potential risk factors for kidney transplant rejection. Transpl Immunol. 2005 Jun;14(2):117-21.

Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. J Leukoc Biol. 2002 Mar;71(3):445-57.

Spiegelhalter DJ, Thomas A, Best N, Lunn D. WinBUGS User Manual, version 1.4. MRC Biostatistics Unit. Cambridge (England):2002.

Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the liver in humans Surg Gynecol Obstet. 1963 Dec;117:659-76.

Sprecher E, Becker Y. Role of Langerhans cells and other dendritic cells in viral diseases. Arch Virol. 1993;132(1-2):1-28.

Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, Ramos H, Todo S, Tzakis A, Fung JJ, et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. Hepatology. 1993 Jun;17(6):1127-52.
Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J Immunol. 1997 Nov 15;159(10):4772-80.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol. 1991;9:271-96.

Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, Zheng XX, Nickerson PW, Wood K, Bushell A. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. Curr Opin Immunol. 1996 Oct;8(5):688-93.

Sturtz S, Ligges U, Gelman A. R2WinBUGS: A Package for Running WinBUGS from R. J Stat Soft. 2005; 12(3):1-16.

Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 20;99(17):11181-6. Epub 2002 Aug 12.

Süsal C, Pelzl S, Simon T, Opelz G. Advances in pre- and posttransplant immunologic testing in kidney transplantation. Transplant Proc. 2004 Jan-Feb;36(1):29-34.

Tabatabai NM, Bian TH, Rice CM, Yoshizawa, Gill J, Eckels DD. Functionally distinct T-cell epitopes within the hepatitis C virus non-structural 3 protein. Hum Immunol. 1999 Feb;60(2):105-15.

Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. Nat Med. 2000 May;6(5):578-82.

Tam RC, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. J Hepatol. 1999 Mar;30(3):376-82.

Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15661-8. Epub 2002 Nov 19.

Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? Immunol Today. 1999 Jan;20(1):27-32.

Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C

IX. Bibliografia

European Network for Cooperative Research. Lancet. 1999 Dec 18-25;354(9196):2119-24.

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol. 1995;13:251-76.

Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. Hepatology. 1997 Feb;25(2):449-58.

Tsubouchi E, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. J Gastroenterol. 2004 Aug;39(8):754-62.

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet. 1997

Uehling DT, Hussey JL, Weinstein AB, Wank R, Bach FH. Cessation of immunosuppression after renal transplantation. Surgery. 1976 Mar;79(3):278-82.

Vargas V, Comas P, Castells L, Quer J, Esteban JI, Allende E, Esteban R, Guardia J, Margarit C. Incidence and outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation. Transpl Int. 1994;7 Suppl 1:S216-20.

Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. J Immunol. 2001 Jan 1;166(1):249-55.

Vosters O, Nève J, De Wit D, Willems F, Goldman M, Verhasselt V. Dendritic cells exposed to nacystelyn are refractory to maturation and promote the emergence of alloreactive regulatory t cells. Transplantation. 2003 Feb 15;75(3):383-9.

Wahl LM, Bittner B, Nowak MA. Immunological transitions in response to antigenic mutation during viral infection. Int Immunol. 2000 Oct;12(10):1371-80.

Wang H, Eckels DD. Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition. J Immunol. 1999 Apr 1;162(7):4177-83.

Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. J Immunol. 2002 Sep 15;169(6):3447-58.

Weston SJ, Leistikow RL, Reddy KR, Torres M, Wertheimer AM, Lewinsohn DM, Chou S, Davey MP, Corless C, O'Farrelly C, Nelson DR, Rosen HR. Reconstitution of hepatitis C virus-specific T-cell-mediated immunity after liver transplantation. Hepatology. 2005 Jan;41(1):72-81.

Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F; International Liver Transplantation Society Expert Panel. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel

consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. Liver Transpl. 2003 Nov;9(11):S1-9.

Witowski J, Ksiazek K, Jörres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. Cell Mol Life Sci. 2004 Mar;61(5):567-79.

Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. Eur J Immunol. 2000 Jul;30(7):1807-12.

Wright TL, Donegan E, Hsu HH, Ferrell L, Lake JR, Kim M, Combs C, Fennessy S, Roberts JP, Ascher NL, et al. Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. Gastroenterology. 1992 Jul;103(1):317-22.

Yamada A, Chandraker A, Laufer TM, Gerth AJ, Sayegh MH, Auchincloss H Jr. Recipient MHC class II expression is required to achieve long-term survival of murine cardiac allografts after costimulatory blockade. J Immunol. 2001 Nov 15;167(10):5522-6.

Yoshimura S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM, Feldmann M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. Int Immunol. 2001 May;13(5):675-83.

Young KJ, Yang L, Phillips MJ, Zhang L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. Blood. 2002 Nov 1;100(9):3408-14.

Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. J Exp Med. 1998 Dec 21;188(12):2205-13.

Zhang ZX, Young K, Zhang L. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. J Mol Med. 2001 Aug;79(8):419-27.

Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, Pham PT, Danovitch GM, Gritsch HA, Reed EF. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. Transplantation. 2005 Mar 15;79(5):591-8.

Zhou J, Carr RI, Liwski RS, Stadnyk AW, Lee TD. Oral exposure to alloantigen generates intragraft CD8+ regulatory cells. J Immunol. 2001 Jul 1;167(1):107-13.

Zhou LJ, Tedder TF. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. Blood. 1995 Nov 1;86(9):3295-301.

Zoller KM, Cho SI, Cohen JJ, Harrington JT. Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey. Kidney Int. 1980 Jul;18(1):110-4.

IX. Bibliografía

Paginas Web consultadas

A) R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, R foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org> 2006, available at: URL: <http://www.R-project.org>

B) Inmunologiaonline. José Peña Martínez. Universidad de Córdoba y Sweden *Diagnostics*. www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/

Tesis Doctorales consultadas

Estudio hemodinámico del trasplante hepático: Análisis de la isquemia-reperfusión y valoración de la administración intraportal de prostaglandina E1 en la fase de revascularización.

Autor: Ernest Hidalgo Llompart

Director de Tesis: Dr. Carlos Margarit Creixell

X. ABREVIACIONES

X. ABREVIACIONES

A

Ag:	Antígeno
Anti-:	Anticuerpo monoclonal contra-
APC:	Célula presentadora de antígeno
APL:	Ligando Peptídico Alterado

B

BST:	Banc de Sang i Teixits
------	------------------------

C

CBA:	<i>Cytokine Bead Array</i>
CD4+:	Linfocito T CD4
CD8+:	Linfocito T CD8
CPA :	Célula Presentadora de Antígeno
CsA:	Ciclosporina A
CTL:	Linfocito T citotóxico

D

Da:	Daltons
DC-SIGN:	<i>Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesión Molecule 3 Grabbing non-integrin</i>
DCs:	Células Dendríticas
DCsi:	Células Dendríticas Inmaduras
DCs+FK+NS3:	DCs expuestas al FK y a NS3
DCs+NS3:	DCs expuestas a NS3
DC1:	Células Dendríticas de origen monocítico
DC2:	Células Dendríticas de origen plasmacitoide
DNA:	Ácido Desoxirribunucleico
d+:	Día+

E

ELISA:	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMI:	Ensayos de Monitorización Inmunológica

F

FBS:	<i>Foetal Bovine Serum</i>
FK+DCs:	DCs expuestas al FK
FK/FK506:	Tacrolimus

G

GM-CSF:	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GVHD:	Enfermedad del injerto contra el huésped
GY:	Greys

H

HLA:	Antígeno Leucocitario Humano
------	------------------------------

I

ICAM:	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
I.E.:	Índice de Estimulación
IFN:	Interferón
IL:	Interleucina
ILT:	<i>Immunoglobulin-like transcripts</i>
IS:	Inmunosupresor

L

LDLr:	Lipoproteínas de baja densidad
LPS:	Lipopolisacárido
L-SIGN:	<i>Liver/lymph Node-Specific Intracellular Adhesion Molecule 3 grabbing Non-Integrin</i>

M

MC:	Células Mononucleares de bazo
MCi:	Células Mononucleares de bazo irradiada a 30 Gy
MFI:	Intensidad Media de Fluorescencia
MHC:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MI:	Monitorización Inmunológica
MIAE:	Monitorización Inmunológica Antígeno Específico
MLR:	Reacción Mixta Linfocitaria
mRNA:	RNA mensajero
MTT:	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>

N

NFAT:	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-k β :	Nuclear Factor - k β
NK:	<i>Natural-Killer</i>
nm:	Nanómetros
NS3:	Proteína no estructural 3 del virus de la hepatitis C (Serin-proteasa/helicasa)

O

O.D.: Densidad Óptica

P

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
PBS: *Phosphate Buffer Saline*
pDC: Precursor de Célula Dendrítica
PEG-IFN : Interferón pegilado
PFA: Paraformaldheído
PreTx : Pretrasplante

R

RNA: Ácido ribonucleico

S

sCD30: Fracción Soluble de CD30
SCHBPiT Servei de Cirurgiahepatobiliopancreàtica i Trasplantaments

T

TAP: Transportador Asociado con el Procesamiento del antígeno
TCR: Receptor de Células T
TGF-: *Transforming Growth Factor-*
Th: Células *T helper*
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
Treg: Linfocitos T reguladores
TxH: Trasplante Hepático

V

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*
VHC: Virus de la Hepatitis C
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

2M: Segundo mes del trasplante hepático
6M: Sexto mes del trasplante hepático

XI. PUBLICACIONES

XI. PUBLICACIONES

Artículos publicados y relacionados con la tesis:

- 1. FK506 in the maturation of dendritic cells.** Cos J, Villalba T, Parra R, Gallardo D, Bilbao I, Margarit C, Massuet L. Haematologica. 2002 Jul;87(7):679-87; discussion 687.
- 2. Analysis of INF-gamma, TNF-alpha and dendritic cells to predict hepatitis C virus recurrence in liver transplant patients.** Ocaña L, Cos J, Quer J, Bilbao I, Palou E, Parra R, Sauleda S, Esteban JI, Guàrdia J, Massuet LI, Margarit C. Transplant Proc. 2005 Nov;37(9):3951-6.

FK506 in the maturation of dendritic cells

JOAN COS,* TERESA VILLALBA,° RAFAEL PARRA,*

DOMINIQUE GALLARDO,† ITXARONE BILBAO,‡

CARLOS MARGARIT,‡ LLUÍS MASSUET*

*Centre de Transfusió i Banc de Teixits, Barcelona; °Servei d'Hematologia de l'Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona;

†Unitat de Recerca del Centre de Transfusió i Banc de Teixits, Barcelona; ‡Servei de Cirurgia General i Digestiva, Unitat de Trasplantament Hepàtic de l'Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Background and Objectives. FK506 (tacrolimus) is a potent immunosuppressive agent that inhibits interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ production by CD4⁺ cells. The effect of this agent on dendritic cells (DCs), the highly professional antigen-presenting cells for T-cells, has not been completely defined. We investigated the effect of FK506 on DC differentiation from monocytes, and on the shift from immature to mature immunophenotypes.

Design and Methods. DCs were generated *in vitro* from monocytes of healthy donors. Cells were exposed to lipopolysaccharide (LPS) and two doses of FK506, with variations in time of exposure and sequence of FK506 and LPS addition. Immunophenotype analysis in immature and mature DCs under FK506 treatment was performed by flow cytometry at the end of cell culture. The Student's t-test was used for statistical analyses.

Results. FK506 did not affect dendritic cell generation or viability. There were no changes in cell surface markers with addition of FK506 at physiologic concentrations (10 ng/mL). We found a decrease in CD1a median fluorescence intensity (MFI) and an increase in percentage of CD86-positive cells with lengthy exposure (6 days) to FK506 at 5000 ng/mL. In the sequential study, 5000 ng/mL FK506 before LPS addition resulted in a significant decrease in CD1a MFI and in the percentage of cells co-expressing CD83 and CD86.

Interpretation and Conclusions. Our results indicate that lengthy exposure to 5000 ng/mL FK506 modified the expression of some DC-cell surface markers, maintaining DCs in a low maturity stage.

©2002, Ferrata Storti Foundation

Key words: FK506, dendritic cells, cell-surface markers.

Correspondence: Joan Cos, Centre de Transfusió i Banc de Teixits, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.
Phone: international +34.93.2749025 (Ext.: 9061).
Fax: international +34.93.2749027. E-mail: jcos@hg.vhebron.es

Transfusion Medicine



research paper

haematologica 2002; 87:679-687

http://www.haematologica.ws/2002_07/679.htm

The survival of patients with solid-organ transplants has increased significantly since the introduction of cyclosporine and tacrolimus (FK506) as immunosuppressive agents. FK506 (Prograf, Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) is a macrolide lactone antibiotic isolated from a Japanese soil fungus (*Streptomyces tsukubaensis*). This agent, which has the same mechanism of action as cyclosporine, but is 10 to 100 times more potent, was introduced in 1989 by Starzl *et al.*¹ as an alternative to cyclosporine in liver transplant patients and, subsequently, in other solid-organ recipients. These drugs bind to various immunophilins and inhibit the activity of calcineurin, inducing quantitative limitations in interleukin (IL)-2 production by T-helper cells and in downstream lymphocyte proliferation.^{2,3} Despite improvements in the prevention of rejection provided by immunosuppressive agents, chronic rejection remains among the main causes of long-term graft loss.

Experimental studies in mice,⁴ in several rat strain combinations,⁵ and in pigs⁶ have demonstrated that in successful liver transplants, donor-specific tolerance across major histocompatibility complex barriers can be induced without immunosuppression. Tolerance to the allograft has also been observed in some patients after withdrawal of immunosuppression due to major toxicity, such as renal dysfunction, neurotoxicity or hypertension. This tolerogenicity is attributed to establishment of a stable mixed hematopoietic chimerism of recipient and donor bone marrow cells.⁷⁻¹²

Apart from microchimerism, professional antigen-presenting cells (APCs), such as dendritic cells (DCs), can also play an important role in the inherent tolerogenicity of liver allografts.^{8,13} DCs, first described by Steinman and Cohn in 1973,¹⁴ are the most potent APCs and are considered potential modulators of the peripheral immune response

because of their ability to generate primary and secondary immune responses against specific antigens.^{15,16} DCs take up and internalize exogenous antigens by phagocytosis, macropinocytosis or adsorptive pinocytosis pathways. Peptides in the context of major histocompatibility complex (MHC) class I or class II molecules are then presented on the DC surface. With antigen exposure, DC immature phenotypes change to mature phenotypes and stimulate responses from naive and memory T-cells in the paracortical area of secondary lymphoid organs. Although B-cells and macrophages can also trigger T-cells, only DCs are able to induce primary responses in naive T-cells.^{17,18} They efficiently internalize soluble antigens and constitutively express high levels of co-stimulatory and adhesion molecules required for antigen presentation to T-cells.^{19,20} Subsequently, immunoregulatory and immunomodulatory cytokine production by DCs plays an important role in the cascade of events during T-cell priming.²¹ Several groups have designed experimental models to determine the effects of immunosuppressive agents on APCs, based on the production of IL-12 p70, tumor necrosis factor- α and IL-6.²²⁻²⁴

Until now, FK506 exposure has been investigated mainly in T-lymphocytes, with special focus on its inhibition of the activation of transcription factors involved in IL-2 gene expression, such as nuclear factor (NF)- κ B transcription factor.^{25,26} More recently, Shimizu *et al.*²⁷ studied the ability of FK506 to modify the function of DCs derived from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. These authors demonstrated that DCs cultured in the presence of FK506 display a reduced capacity to stimulate an allogeneic T-cell response and significantly lower interleukin-12 production. However, the effect of FK506 on the shift of monocyte-generated DCs from immature to mature phenotypes has been little studied.

Given that: a) APCs are responsible for the initiation of T-cell-mediated immunity, b) DCs are involved in the inherent tolerogenicity of liver allografts, c) deficiency or blockade of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80 or CD86 is consistent with DC tolerogenicity, both in allograft models and experimental autoimmune disease,^{13,28} and d) DCs can be generated *in vitro* from monocytes,²⁹ our group investigated the effect of FK506 on the immunophenotype and maturative capacity of DCs generated from monocytes of healthy donors and exposed to lipopolysaccharide (LPS).

Design and Methods

Monocyte separation

Peripheral blood monocytes were isolated by Lymphoprep, density=1.077 g/mL (Nycomed) gradient centrifugation of buffy coats from 10 healthy blood donors at our hospital Transfusion Center and Tissue Bank. Briefly, mononuclear cells were isolated by centrifugation at 300 $\times$ g for 30 min at room temperature, and then washed at 450 $\times$ g for 15 min in 35 mL of phosphate-buffered saline (PBS) without Ca⁺⁺ or Mg⁺⁺. The pellet obtained was washed twice at 250 $\times$ g for 15 min in the same conditions described above to eliminate platelets. The monocyte population was further enriched using MACS technology (MACS, Miltenyi). Between 3 $\times$ 10⁸ and 4.5 $\times$ 10⁸ mononuclear cells were labeled with CD14⁺ microbeads during 15 min at 4°C and then separated using a high gradient magnetic separation column placed in a strong magnetic field. The monocyte population was analyzed by flow cytometry (FACS analysis), as described below. Monocyte yield was greater than 85% and cell viability was over 90%. Monocytes were frozen at -80°C until culture.

Generation of immature DCs

Monocytes were dispensed in 6-well culture plates (Costar) at a final density of 3 $\times$ 10⁶ cells per well in 2.9 mL of culture medium (RPMI 1640, Gibco-BRL, Life Technologies), supplemented with 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin-streptomycin, 1% 2- β mercaptoethanol and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BR, Life Technologies). In all experiments, incubation was carried out in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. To induce immature DCs from monocytes, the culture medium was supplemented with 800 U/mL of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Leucomax 300) and 1000 U/mL IL-4 (R & D Systems) on the first day of culture (day 0) and on day 3. Immature DCs were collected after 7 days of culture by pipetting and were subsequently washed with PBS without Ca⁺⁺ or Mg⁺⁺ at 450 $\times$ g for 5 min (see *Diagram 1*). An amount of 2 $\times$ 10⁵ immature DCs was used for cell morphology and FACS analysis (see below). All experiments were performed with the same batch of FBS to avoid variations in the pattern of CD14 and CD1a expression.

Generation of FK506-DCs

After 24 h (d+1) of culture (3 $\times$ 10⁶ cells per well in 2.9 mL), 100 μ L of medium containing FK506

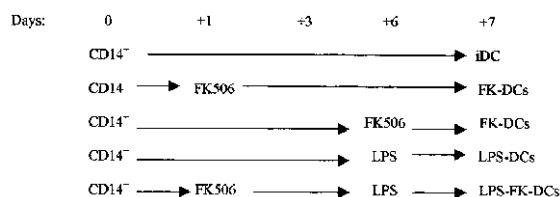
Experimental design

Diagram 1. Experimental design. The culture medium was supplemented with 800 U/mL GM-CSF (Leucomax 300) and 1000 U/mL IL-4 on the first day of culture and on day 3. FK506 was added at concentrations of 10 ng/mL and 5000 ng/mL at the two time points indicated. The concentration of LPS was 1000 ng/mL. CD14⁺: monocytes. iDC: immature dendritic cells. FK-DCs: dendritic cells exposed to FK506 on day 1 or day 6 of 7 days of culture. LPS-DCs: LPS-stimulated dendritic cells on day 6 of culture. LPS-FK-DCs: LPS-stimulated FK-DCs.

(Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) at a final concentration of 10 ng/mL (physiologic concentration) or 5000 ng/mL were added to each experimental well and plates were incubated for the remaining 6 days of the culture protocol. Under these conditions, we obtained a population of DCs that had been exposed to immunosuppressant agent (FK-DCs) for a lengthy period. To study the effect of a brief exposure to the agent, 10 ng/mL and 5000 ng/mL of FK506 were added at day 6 (d+6) and plates were incubated for the last day of the culture protocol. In all experiments, cytokines (GM-CSF and IL-4) were added on days 0 and 3 (Diagram 1). Control wells received 100 μ L of culture medium and all wells contained a final volume of 3 mL of culture medium.

Maturation of DCs and FK-DCs

DC and FK-DC maturation was performed on 3×10^6 cells per well in 6-well culture plates (Costar) using LPS (*Escherichia coli*, serotype 0128:B12) purchased from Sigma. LPS was reconstituted in RPMI 1640 medium and stored at -20°C before use. For maturation, 1000 ng/mL LPS were added to the cells on day 6. Cell morphology and cell-surface markers were analyzed on day 7 (Diagram).

Analysis of cell morphology

DC and FK-DC morphology with and without LPS-induced cell maturation was studied in 2×10^5 cells. Cells on microscope slides were centrifuged at 600 rpm for 5 min in a Cytospin centrifuge (Shandon, Cytospin II). Cytospins were stained using May Grünwald-Giemsa stain, then examined by light microscopy (Olympus).

Analysis of cell-surface markers and cell viability by flow cytometry

Analysis of cell surface markers in immature DCs, LPS-stimulated DCs, FK-DCs and LPS-stimulated FK-DCs was performed on day 7 of cell culture. Cells were washed with Ca^{++} and Mg^{++} free PBS before flow cytometry analysis. An amount of 2×10^5 cells was double-stained with fluorescein isothiocyanate and phycoerythrin monoclonal antibodies in Ca^{++} and Mg^{++} free PBS for 15 minutes and washed twice before FACS analysis. The pairs of mouse anti-human monoclonal antibodies used for immunofluorescence staining of leukocyte population, monocyte yield and DCs were: CD45-FITC (J.33)/CD3-PE (UCHT1), CD14-FITC (RMO52)/CD1a-PE (BL6), CD64-FITC (22)/CD54-PE (84H10), CD83-FITC (HB159)/CD86-PE (HA5.2B7), IgG1-FITC (679.1Mc7)/IgG1-PE (679.1Mc7) and IgG2b-FITC (MOPC-195) (Coulter-Immunotech).

Cell viability was determined by a method using carboxyfluorescein diacetate (CFDA, Sigma). CFDA is internalized into living cells and subsequently hydrolyzed into a polar compound whose fluorescence is determined by flow cytometry. Briefly, 2×10^5 cells were incubated at 37°C for 15 min with CFDA at a final concentration of 0.5 mg/mL. Cells were washed twice with Ca^{++} and Mg^{++} free PBS ($450 \times g$, 5 min) before flow cytometry analysis using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Generally, 10,000 events were analyzed. Cell-surface markers were determined by means of a forward-versus-side scatter gate. All isotype controls were set to be within 2% positive for statistical analysis.

Statistical analysis

Descriptive statistics are used to report the mean values and standard deviation (SD) of the experimental data. Statistical analysis was performed using the Student's t-test with the SPSS computer software program. Significance for a two-tailed test was set at a p value of less than 0.05.

Results**Analysis of cell morphology**

Figure 1 shows the morphologic appearance of immature DCs (A), LPS-stimulated DCs (B), FK-DCs (C) and LPS-stimulated FK-DCs (D). A homogeneous population of large cells displaying characteristic DC morphology (abundant cytoplasm, irregular membrane ruffling and cytoplasm protrusion) was observed in each experiment. Cell viability studies yielded results of around 90% viability for each experiment, indicating that FK506, even at the high

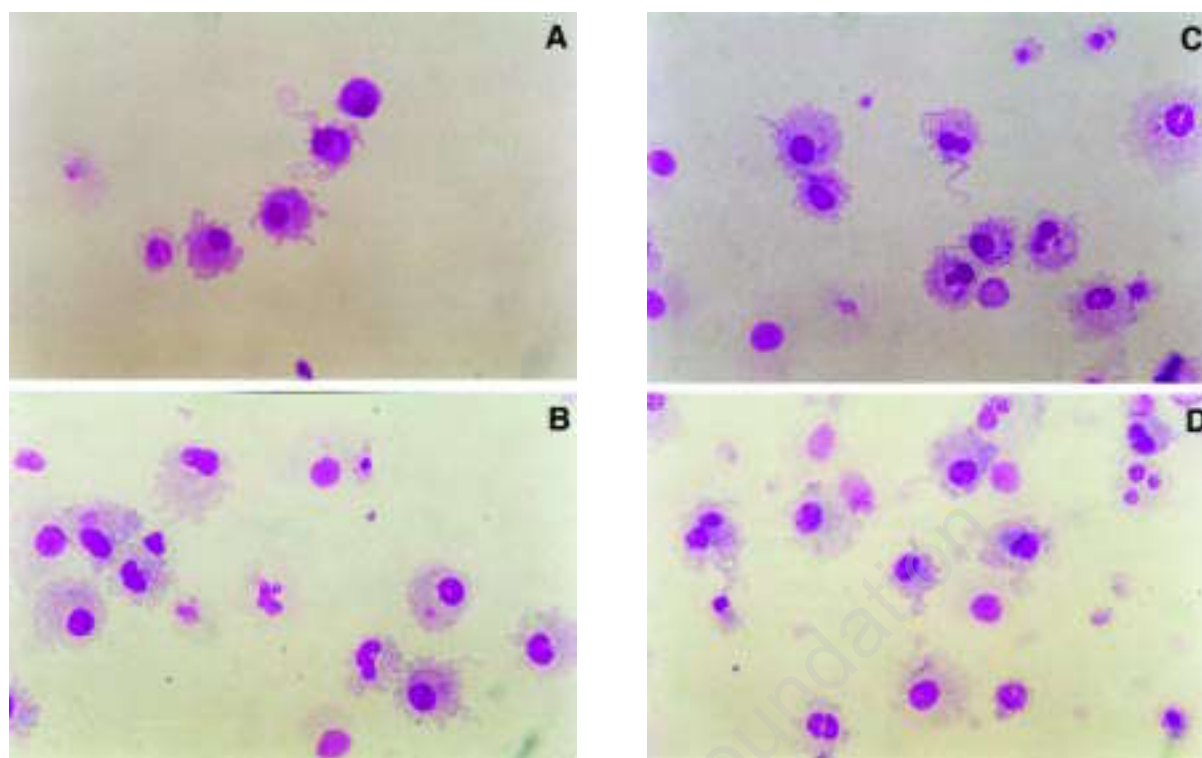


Figure 1. Morphology of monocyte-generated DCs with GM-CSF + IL-4 (May Grünwald-Giemsa staining). Immature DCs (a); LPS-stimulated DCs on day 6 of culture (b); FK-DCs on day 1 of culture (c); FK-DCs on day 1 of culture + LPS on day 6 of culture (d). The final concentrations used were: 1000 ng/mL LPS; 5000 ng/mL FK506. No drastic morphologic changes were seen under these culture conditions. Magnification $\times 400$. The figure shows representative data from 5 independent experiments.

dose studied, was not cytotoxic in our experimental conditions.

Flow cytometry analysis of monocytes, immature and mature DCs

Figure 2 shows the surface phenotypes of monocytes, immature DCs and DCs stimulated by 1,000 ng/mL LPS at day 6 of culture. The process of differentiation and maturation of DCs from monocyte precursors was achieved with loss of CD14 and acquisition of CD1a. A new marker, CD83, as well as accessory molecules, such as CD54 and CD86, were expressed in DCs when they were stimulated by LPS.

Flow cytometry analysis of cell surface markers in immature DCs, LPS-stimulated DCs, FK-DCs and LPS-stimulated FK-DCs

The median fluorescence intensity (MFI) values of CD45, CD1a, CD54, CD83 and CD86 on DCs produced after exposure to FK506 are listed in Table 1. There were no significant differences in MFI values between control DCs and FK-DCs exposed to physiologic concentrations (10 ng/mL) of immunosuppressant. However, in cells exposed to the high

concentration of FK506, changes were found in CD1a, CD86 and CD83/CD86 expression according to the duration of exposure. Brief exposure caused a decrease in CD86 MFI values (Table 1), with no changes in the percentage of CD86-positive cells (Figure 3B), whereas long exposure reduced CD1a expression. Additionally, the percentage of cells co-expressing CD83 and CD86 was slightly decreased at both experimental times (Figure 3A). In LPS-pulsed DCs, the CD54 and CD86 FMI values and percentage of CD83/CD86-positive cells were statistically increased as compared to those of the control group (Table 1). However, significant decreases in CD1a values (Table 1) and percentage of CD83/CD86-positive cells were found in LPS-stimulated DCs previously incubated with 5,000 ng/mL of FK506 (Figure 3A). In the same set of experiments, an increase in the percentage of CD86-positive cells as compared to control DCs was observed with 5000 ng/mL FK506 (d+1) (Figure 3B), suggesting that the surface-marker was up-regulated by FK506 at this high concentration.

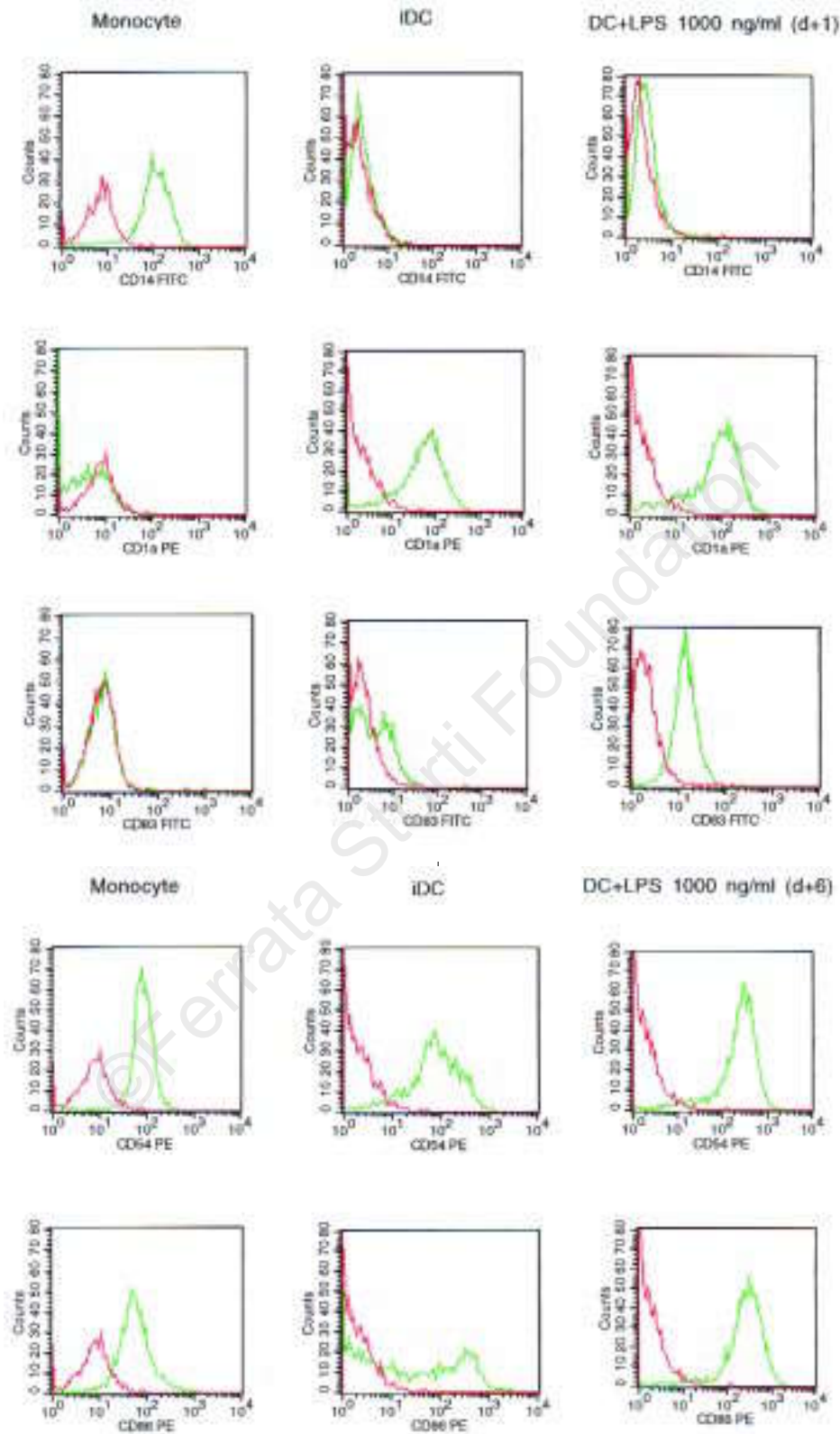


Figure 2. Surface phenotypes of monocytes, immature DCs and mature DCs. Monocytes were cultured for 7 days with complete culture medium without cytokines. Immature DCs were cultured with complete medium and GM-CSF plus IL-4. For DC maturation, 1,000 ng/mL LPS were added to cultures on day 6. Flow cytometry analysis was performed on day 7. The red line represents the isotypic control. The figure shows representative data from 4 independent experiments.

Table 1. Effect of FK506, LPS, and FK506 plus LPS on DC surface markers. DCs were exposed to 10 ng/mL (FK10) and 5000 ng/mL (FK5000) FK506 for a short period (d+6: FK506 was added on day 6 and incubation was continued for the one remaining day) and a long period (d+1: FK506 was added on day 1 and incubation was continued for the 6 remaining days). Immature DCs were activated to mature DCs with addition of 1000 ng/mL LPS on day 6. Results are given as mean $\pm$ SD of median fluorescence intensity (MFI) in several independent experiments (n) from 10 healthy blood donors. Immature DCs (control cells) (n=10), FK10 (d+1) (n=6), FK10 (d+6) (n=4), FK5000 (d+1) (n=7), FK5000 (d+6) (n=5), LPS 1000 (d+6) (n=4), FK10 (d+1) + LPS 1000 (d+6) (n=5) and FK5000 (d+1) + LPS 1000 (d+6) (n=5). *p values of < 0.05 were considered statistically significant.

Treatments	Cell-surface markers						
	CD45-FITC	CD83-FITC	Control antibody (FITC)	CD1a-PE	CD54-PE	CD86-PE	Control antibody (PE)
Control cells	92.65 $\pm$ 1.64	5.57 $\pm$ 1.24	3.10 $\pm$ 0.73	105.03 $\pm$ 30.97	162.76 $\pm$ 38.93	128.97 $\pm$ 67.79	2.80 $\pm$ 0.91
FK10(d+1)	93.97 $\pm$ 1.25	5.10 $\pm$ 0.96	3.23 $\pm$ 0.81	111.05 $\pm$ 27.55	159.16 $\pm$ 45.19	113.16 $\pm$ 89.08	2.99 $\pm$ 1.04
FK10 (d+6)	93 $\pm$ 2.60	4.33 $\pm$ 0.84	2.79 $\pm$ 0.22	111.31 $\pm$ 24.17	173.31 $\pm$ 20.43	87.56 $\pm$ 31.10	2.41 $\pm$ 0.22
FK5000 (d+1)	96.08 $\pm$ 1.13	4.61 $\pm$ 1.20	3.46 $\pm$ 1.37	31.99 $\pm$ 20.90*	155.18 $\pm$ 56.18	143.26 $\pm$ 103.19	3.80 $\pm$ 1.60
FK5000 (d+6)	92.99 $\pm$ 1.90	4.10 $\pm$ 0.64	3.22 $\pm$ 0.35	86.11 $\pm$ 22.13	142.91 $\pm$ 19.09	77.27 $\pm$ 9.89*	2.82 $\pm$ 0.51
LPS1000 (d+6)	96.69 $\pm$ 1.89	13.65 $\pm$ 6.60	3.24 $\pm$ 1	113.93 $\pm$ 23.92	280.91 $\pm$ 48.22*	272.35 $\pm$ 119.67*	2.85 $\pm$ 0.52
FK10 (d+1) + LPS1000 (d+6)	95.58 $\pm$ 1.61	11.17 $\pm$ 5.57	3.02 $\pm$ 0.44	107.02 $\pm$ 18.52	261.15 $\pm$ 45.95*	218.77 $\pm$ 138.84	3.07 $\pm$ 0.70
FK5000 (d+1) + LPS1000 (d+6)	95.22 $\pm$ 1.25	8.57 $\pm$ 1.96	3.31 $\pm$ 1.19	25.60 $\pm$ 5*	234.55 $\pm$ 44.48*	294.48 $\pm$ 139.27	3.69 $\pm$ 1.40

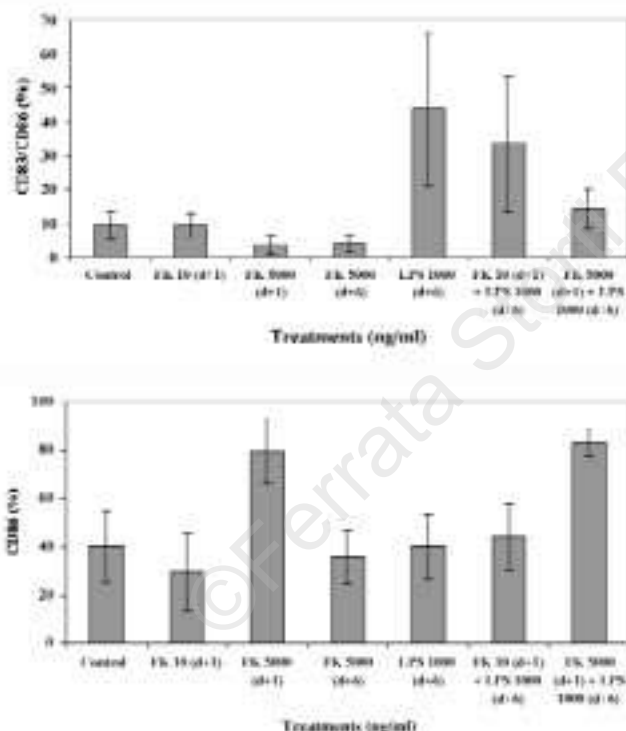


Figure 3. Effect of FK506, LPS, and FK506 plus LPS on percentage of cells positive for CD83/CD86 (A) and CD86 (B). DCs were treated with 10 ng/mL (FK10) and 5000 ng/mL (FK5000) of FK506, 1000 ng/mL LPS (LPS 1000) and with sequential treatment consisting in administration of 10 ng/mL (FK10) or 5000 ng/mL (FK5000) with 1000 ng/mL LPS (LPS1000). d+1 indicates the longer exposure time (FK506 concentrations were added on day 1 of culture). d+6 indicates the shorter exposure time (FK506 concentrations were added on day 6 of culture). Data are given as mean $\pm$ SD of MFI in several independent experiments (n) from 10 healthy blood donors. Immature DCs (control cells) (n=10), FK10 (d+1) (n=6), FK5000 (d+1) (n=7), FK5000 (d+6) (n=5), LPS 1000 (d+6) (n=4), FK10 (d+1) + LPS 1000 (d+6) (n=5), FK5000 (d+1) + LPS 1000 (d+6) (n=5). *p values < 0.05 were considered statistically significant.

Discussion

Immunosuppressive drugs such as cyclosporin A and tacrolimus are essential for prolongation of allograft survival. In this context, the persistence of donor-derived leukocyte populations such as DCs in recipient tissues seems to play an important role in the induction of organ tolerance.³⁰ The DCs used in the present study were generated from monocytes of healthy donors cultured in the presence of GM-CSF and IL-4.²⁹ FK-506 concentrations were deter-

mined on the basis of the interaction of this immunosuppressant agent in monocytes, B-cells, T-cells, and CD34⁺-derived DCs, and concentrations in plasma and whole blood during clinical use.^{27,31,32,33} The effect of FK506 on DCs was tested in a set of experiments evaluating the following: the concentration of FK506 (10 ng/mL vs. 5,000 ng/mL), the period of exposure to FK506 (6 days vs. 1 day) and the sequence of FK506 treatment and LPS addition.

Under our culture conditions we found the features of mature DCs^{34,35} and typical DC morphology without cytotoxic effects in LPS-stimulated DCs, FK-DCs and LPS-stimulated FK-DCs. There were no differences in MFI values between control DCs and FK-DCs exposed to physiologic concentrations (10 ng/mL) of the immunosuppressant. Thus, contact with FK506 did not influence the generation of morphologically normal DCs (Figure 1), i.e., high MFI levels for CD45, CD1a, CD54, CD86, low levels for CD83 (Table 1), presence of CD83/CD86 (Figure 3A), absence of CD14 and CD64, as well as percentage of double staining $\leq 1.6\%$ for CD45/CD3, $\leq 3\%$ for CD14/CD1a and $\leq 5\%$ for CD64/CD54 (data not shown). Similar results were obtained by Woltman *et al.*³⁶ when freshly isolated monocytes were cultured with GM-CSF, IL-4 and 10^{-6} M (804 ng/mL) FK506 for 6 days, and by Szabo *et al.*³⁷ when myeloid DCs were exposed to 10^{-8} M FK506. However, when FK506 was added at the high concentration, changes in CD1a, CD86 and CD83/CD86 expression were found according to the duration of exposure. Although low levels of CD1a were detected, long exposure to FK506 blocked normal generation of DCs during their differentiation from monocytes, as evidenced by the significant decrease in MFI values for this marker. Recent studies by Shimizu's group²⁷ showed high levels of CD1a on DCs generated from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells cultured for 14 days in the presence of FK506. Moreover, they found that FK-DCs co-expressed CD1a and CD14, as if they had the characteristics of an intermediate precursor cell with the ability to differentiate into either DCs (CD1a⁺ CD14⁻) or monocytes (CD1a⁻ CD14⁺).³⁸ In our experiments, using the monocyte precursor, these intermediate precursor cells were not detected. Though the half-life of FK506 in cell culture conditions is unknown, the different exposure periods to the immunosuppressive agent and DC-progenitor used in each study could explain the changes in CD1a and CD14 patterns.

In the present study results for mature DC generation with or without long exposure to FK506 indicate a loss of maturative capacity in the presence of the agent. The maturation process, characterized by an up-regulation of co-stimulatory and adhesion molecules, confers the DCs a greater capacity for T-cell recruitment and activation.^{39,40} According to the CD54 and CD86 FMI values and percentage of CD83/CD86 positive cells (Table 1), LPS-DCs displayed the characteristic changes to the mature state⁴¹ with 24 hours of exposure to LPS (Figure 3A). However, significant decreases in

CD1a MFI values (Table 1) and percentage of cells co-expressing CD83 and CD86 were found when LPS-stimulated DCs had been previously incubated with 5,000 ng/mL of FK506 (Figure 3A). Some features that predispose DCs to tolerogenicity are: exposure to IL-10, ultraviolet B radiation, inhibition of IL-12 production by prostaglandin E₂, co-stimulatory molecule deficiency, blockade of co-stimulatory molecule expression by CTLA4-Ig and transduction with genes encoding immunosuppressive molecules.³⁰ Other immunosuppressive agents, such as corticosteroids, transforming growth factor- β and IL-10 can render monocyte-derived DCs tolerogenic.^{42,43} However, little is known about the biochemical pathways that regulate the maturation process in these cells.

Mature DCs express high levels of nuclear factor (NF)- κ B transcription factor. In DC culture systems, LPS induces nuclear translocation of NF- κ B, which plays an important role in the expression of genes involved in DC maturation.⁴⁴⁻⁴⁷ In our experiments the loss of the maturation process could be due to inhibition of NF- κ B activation by FK506. Several groups have demonstrated that DC antigen presentation is NF- κ B-dependent when this transcription factor is inhibited by serine protease inhibitor, proteasome inhibitor, SN50 synthetic peptide and adenoviral transfer of the endogenous inhibitor of NF- κ B. These observations suggest that NF- κ B is an important target for blocking DC antigen presentation and inhibiting T-cell-dependent immune responses.^{45,48-51}

Though 5,000 ng/mL FK506 is not used in clinical trials, we conclude that this concentration is not toxic to DCs and can operate, at least in our experimental conditions, as a drug maintaining DCs in a low maturity stage to confer immunologic privilege. Further studies are needed to elucidate the importance of changes in DC immunophenotype in liver transplant patients receiving FK506 and the possible significance of these alterations in the immune response to the allograft. Along this line, knowledge of the capacity of DCs for antigen uptake and the molecular basis underlying FK506's capacity to block the shift from the immature to mature stage could contribute to explaining the therapeutic potential of tacrolimus. The application of these findings might be useful in future trials aimed toward reducing the dose of this immunosuppressant agent and, therefore, its toxic effects.

Contributions and Acknowledgments

JC designed the study, performed all the *in vitro* assays and wrote the paper. TV contributed to the

positive selection of monocytes and the generation of dendritic cells. RP contributed to the flow cytometry analysis and reviewed the paper. DG contributed to the experimental design and analysis of results. IB and CM performed the literature review and gave advice on manuscript preparation. LM supplied the buffy-coats from healthy donors, offered technical support, and contributed to the analysis of results and the review of the paper. The authors thank Dr. Acebedo and Dr. Irriguible (Servei d'Hematologia, Vall d'Hebron Hospitals) for technical support in the cell morphology analysis and Ms. Celine Cavallo for English language editing.

Funding

This study was supported by Fundació La Marató de TV3 (nº 002110), Spain.

Disclosures

Conflict of interest: none.

Redundant publications: no substantial overlap with previous papers.

References

- Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataraman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* 1989; 2:1000-4.
- Pazderka F, Enns J, Batiuk TD, Halloran PF. The functional consequences of partial calcineurin inhibition in human peripheral blood mononuclear leucocytes. *Transpl Immunol* 1996; 4:23-31.
- Halloran PF. Immunosuppressive agents in clinical trials in transplantation. *Am J Med Sci* 1997; 313:283-8.
- Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 1994; 19:916-24.
- Kamada N, Davies HS, Roser B. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. *Nature* 1981; 292:840-2.
- Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969; 223:472-6.
- Reyes J, Zeevi A, Ramos H, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, et al. Frequent achievement of a drug-free state after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25:3315-9.
- Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992; 339:1579-82.
- Starzl TE. Cell migration and chimerism – a unifying concept in transplantation – with particular reference to HLA matching and tolerance induction. *Transplant Proc* 1993; 25:8-12.
- Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Thomson AW, Trucco M, Ricordi C. Donor cell chimerism permitted by immunosuppressive drugs: a new view of organ transplantation. *Immunol Today* 1993; 14:326-32.
- Suberbielle C, Caillat-Zucman S, Legendre C, Bodemer C, Noel LH, Kreis H, et al. Peripheral microchimerism in long-term cadaveric-kidney allograft recipients. *Lancet* 1994; 343:1468-9.
- Schlitt HJ, Hundrieser J, Hisanaga M, Uthoff K, Karck M, Wahlers T, et al. Patterns of donor-type microchimerism after heart transplantation. *Lancet* 1994; 343:1469-71.
- Thomson AW, Lu L, Murase N, Demetris AJ, Rao AS, Starzl TE. Microchimerism, dendritic cell progenitors and transplantation tolerance. *Stem Cells* 1995; 13:622-39.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-62.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
- Watts C, Powis S. Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet* 1999; 1:60-74.
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96.
- Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 1996; 17:273-8.
- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Witmer-Pack M, Steinman RM. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int Rev Immunol* 1990; 6:197-206.
- Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nadler LM. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 1994; 84:3261-82.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000; 290:92-7.
- Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158:5589-95.
- Vieira PL, Kalinski P, Wierenga EA, Kapsenberg ML, de Jong EC. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J Immunol* 1998; 161:5245-51.
- de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Kapsenberg ML. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 201-4.
- Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kincaid RL, et al. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I κ B/MAD3, an inhibitor of NF- κ B. *EMBO J* 1994; 13: 861-70.
- Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR, et al. The actions of cyclosporine A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J* 1990; 9:4425-33.
- Shimizu K, Fujii S, Fujimoto K, Kawa K, Yamada A, Kawano F. Tacrolimus (FK506) treatment of CD34+ hematopoietic progenitor cells promote the development of dendritic cells that drive CD4+ T cells toward Th2 responses. *J Leukoc Biol* 2000; 68:633-40.
- Khoury SJ, Gallon L, Verburg RR, Chandraker A, Peach R, Linsley PS, et al. Ex vivo treatment of antigen-presenting cells with CTLA4Ig and encephalitogenic peptide prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Immunol* 1996; 157:3700-5.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 1994; 179:1109-18.
- Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* 1999; 20:27-32.
- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot [Tokyo]* 1987; 40:1249-55.
- Keicho N, Sawada S, Kitamura K, Yotsumoto H, Takaku F. Effects of an immunosuppressant, FK506, on interleukin 1 α production by human macrophages and a macrophage-like cell line, U937. *Cell Immunol* 1991; 132:285-94.

33. McMichael J, Irish W, McCauley J, Shapiro R, Gordon R, van Thiel DH, et al. Evaluation of a novel "intelligent" dosing system for optimizing FK506 therapy. *Transplant Proc* 1991; 23:2780-2.
34. Caux C, Liu Y, Banchereau J. Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunol Today* 1995; 16:2-4.
35. Di Nicola M, Lemoli RM. Dendritic cells: specialized antigen presenting cells. *Haematologica* 2000; 85:202-7.
36. Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2000; 30:1807-12.
37. Szabo G, Gavala C, Mandrekar P. Tacrolimus and cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells. *J Invest Med* 2001; 49:442-9.
38. Ratta M, Rondelli D, Fortuna A, Curti A, Fogli M, Fagnoni F, et al. Generation and functional characterization of human dendritic cells derived from CD34 cells mobilized into peripheral blood: comparison with bone marrow CD34⁺ cells. *Br J Haematol* 1998; 101:756-65.
39. Kapsenberg ML, Kalinski P. The concept of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. *Immunol Lett* 1999; 69:5-6.
40. Ferlazzo G, Semino C, Melioli G. HLA class I molecule expression is up-regulated during maturation of dendritic cells, protecting them from natural killer cell-mediated lysis. *Immunol Lett* 2001; 76:37-41.
41. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
42. Lu L, Khoury SJ, Sayegh MH, Thomson AW. Dendritic cell tolerogenicity and prospects for dendritic cell based therapy of allograft rejection and autoimmunity. In: Lotze MT, Thomson AW, editors. *Dendritic Cells*. San Diego: Academic Press; 1998. p. 487-511.
43. Vanderheyde N, Verhasselt V, Goldman M, Willems F. Inhibition of human dendritic cells functions by methylprednisolone. *Transplantation* 1999; 67:1342-7.
44. Granelli-Piperno A, Pope M, Inaba K, Steinman RM. Coexpression of NF- κ B/Rel and Sp1 transcription factors in human immunodeficiency virus 1-induced, dendritic cell-T-cell syncytia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10944-8.
45. Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 1998; 188:2175-80.
46. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649-83.
47. Koski GK, Lyakh LA, Cohen PA, Rice NR. CD14⁺ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF- κ B/RelB. *Crit Rev Immunol* 2001; 21:179-89.
48. Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995; 270:14255-8.
49. Ardeshtna KM, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2000; 96:1039-46.
50. Yoshimura S, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Role of NF- κ B in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. *Eur J Immunol* 2001; 31:1883-93.
51. Yoshimura S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM, Feldmann M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol* 2001; 13:675-83.

PEER REVIEW OUTCOMES

Manuscript processing

This manuscript was peer-reviewed by two external referees and by Professor Mario Cazzola, Editor-in-Chief. The final decision to accept this paper for publication was taken jointly by Prof. Cazzola and the Editors. Manuscript received January 23, 2002; accepted May 6, 2002.

What is already known on this topic

FK506 (tacrolimus) is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-2 and INF- γ production by CD4-positive cells. Its effects on dendritic cells are largely unknown.

What this study adds

This study shows that lengthy exposure to high concentrations of FK506 can modify the immunophenotype of dendritic cells, apparently preventing their maturation.

Potential implications for clinical practice

These findings may allow better immunosuppressive strategies after transplantation to be implemented.

Mario Cazzola, Editor-in-Chief

Analysis of INF- γ , TNF- α and Dendritic Cells to Predict Hepatitis C Virus Recurrence in Liver Transplant Patients

L. Ocaña, J. Cos, J. Quer, I. Bilbao, E. Palou, R. Parra, S. Sauleda, J.I. Esteban, J. Guàrdia, L.I. Massuet, and C. Margarit

ABSTRACT

Introduction. Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the leading causes of chronic liver disease and the reason for more than 50% of liver transplantations (OLT). Recurrent HCV infection occurs in almost all transplant recipients and has an unfavorable course. Although immunosuppressive agents are necessary to avoid allograft rejection, these drugs may favor viral replication facilitating viral-mediated graft injury.

Methods. To predict the evolution of two HCV⁺ patients who underwent OLT, we studied INF- γ and TNF- α production and the maturation capacity of dendritic cells (DCs) at three time points: before transplantation (Pre-Tx) and at 2 (2M) and 6 (6M) months after transplantation. Cytometric bead assays were used to quantify INF- γ and TNF- α production in the supernates of mixed leukocyte reactions (MLR) between spleen cells from the liver donor and CD4⁺ cells from the recipients. Immature and mature DCs were generated in vitro from patient monocytes.

Results. The one patient who experienced recurrent HCV showed loss of CD4⁺ responses to donor antigens and INF- γ and TNF- α production after OLT. In contrast, the other patient maintained detectable levels of these cytokines after OLT. It was possible to generate mature DCs from monocytes with the aid of CD40L in both cases, but decreased expression of HLA-DR, CD80, and CD86 markers was observed upon posttransplantation analyses in the patient with recurrent HCV.

Conclusion. Loss of the proliferative response as well as INF- γ and TNF- α production, together with a decreased HLA-DR, CD80, and CD86 (markers of mature DCs), indicated an inadequate immune response to viral progression in the liver transplant recipient with relapsing HCV infection.

HEPATITIS C VIRUS (HCV) infection affects approximately 2% of the world's population. Among HCV-infected patients, 80% develop chronic infection, and 20%, liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. HCV-related liver failure is the single-most common indication for orthotopic liver transplantation worldwide.¹ Reinfection is virtually universal after transplantation; up to 97% of recipients develop recurrent histological hepatitis in the allograft, indicating the high capacity of HCV to adapt to the new environment.²

Administration of immunosuppressive agents is necessary to reduce allograft rejection, but this treatment favors viral replication and facilitates viral-mediated graft injury.³ Type 1 and type 2 cytokine profiles and the effect of immunosuppressive agents on antigen-presenting leuko-

cytes known as dendritic cells (DCs) determine allograft acceptance or rejection as well as viral progression. En-

From the Banc de Sang i Teixits (BST), Barcelona, (L.O., J.C., E.P., R.P., S.S., L.I.M.); Liver Unit, Internal Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, (J.Q., J.I.E., J.G.); and Cirurgia General, Unitat de Trasplantament Hepàtic, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona (I.B., C.M.), Spain.

Supported by La Fundació La Marató de TV3 002110 and 002010, Red Temática de Investigación Cooperativa de Trasplantes (C03/03), Red Nacional de Investigación en Hepatología y Gastroenterología (RNIHG-C03/02), MCyT SAF2003-08724 and FIS (PI030274).

Address reprint requests to Laura Ocaña, Banc de Sang i Teixits (BST), Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: locana@vhebron.net

hanced type 2 in parallel with decreased type 1 cytokine expressions occur in the majority of transplant acceptance models.^{4,5} However, the beneficial effects of immunosuppressive agents to induce allograft acceptance may compromise effective immune responses to viral infections. Some immunosuppressive agents have been shown to prevent activation of DCs, which play a pivotal role linking innate and adaptive antiviral immunity. Dendritic cells are considered potential modulators of the peripheral immune response because of their ability to generate primary and secondary responses against specific antigens.⁶⁻¹⁰ In experimental models, several mediators have been used to maintain DCs in an immature stage to obtain tolerogenic or regulatory dendritic cells. It has been shown that immunosuppressants such as corticosteroids, cyclosporine, rapamycin, deoxyspergualin, and mycophenolate mofetil prevent DC maturation and synthesis of Th1-driving cytokines in vitro. Some of these immunosuppressive agents prevent nuclear translocation of a specific member of the NF- κ B family of transcription factors required for DC activation.

Considering the effect of immunosuppressants on T cells and DCs, we investigated whether assessment of cytokines present in culture medium supernates from mixed leukocyte reactions as well as ex vivo generation of DCs from liver transplant recipients may prospectively afford information about the immunologic and clinical status of these patients.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Between June 2001 and March 2002, two OLT patients with chronic HCV infection (patient 1, 69 years old and patient 2, 43 years old) were included in this study after informed consent was obtained. Both patients received conventional immunosuppression consisting of tacrolimus plus corticosteroids and were followed prospectively for 6 months with clinical examinations and in vitro testing to assess graft stability and HCV recurrence. Patient 1 developed recurrent HCV infection at 3 months posttransplantation and was treated with interferon plus ribavirin antiviral therapy. The patient died at 9 months following transplantation. Patient 2 experienced neither recurrent HCV nor allograft rejection during the 6-month follow-up.

Cell Isolation

The mononuclear effector cells (MECs) for the mixed leukocyte reaction were obtained from a spleen biopsy of the liver donor. To obtain the CD4⁺ responder cell population, the two patients underwent apheresis at three time points: pretransplantation (Pre-Tx) and at 2 (2M) and 6 (6M) months following liver transplantation (OLT). CD4⁺ cells were enriched using MACS technology (MACS, Miltenyi).

Mixed Leukocyte Reaction

Mixed leukocyte reactions (MLRs) were performed to detect production of Th1 cytokines (INF- γ and TNF- α) in cultured cells supernates. For the MLR, 200,000 MECs from the spleen biopsy were irradiated at 30 Gy and then incubated with 200,000 CD4⁺ cells from the OLT recipient. Cells seeded in 96-well experimental

plates (Costar) were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 7 days. MLRs were performed at three time points (Pre-Tx, 2M, 6M) for each patient. The proliferative capacity of CD4⁺ cells was measured using a nonradioactive cell proliferation kit (Cell Titer, Promega). The results were reported as optical density (OD) at 550 nm.

Cytokine Analysis

To measure the amount of Th1 cytokines present in MLR supernates, we used the Cytokine Bead Array kit (Becton Dickinson, San Jose, Calif) following the manufacturer's instructions. Flow cytometric analysis was performed using the FACS-Calibur system (Becton Dickinson; Madrid, Spain). Data were acquired and analyzed using Becton Dickinson Bead Array software.

Generation of Dendritic Cells

Immature DCs were generated in vitro from monocytes (CD14⁺) recovered from the two patients, as we have previously reported.¹¹ Briefly, peripheral blood mononuclear cells were obtained by apheresis at three time points (Pre-Tx, 2M, 6M) and further enriched using MACS technology. CD14⁺ cells were dispensed in six-well culture plates (Costar) at a final density of 3×10^6 cells per well. The culture medium consisted of RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies), supplemented with 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin-streptomycin, 1% 2- β mercaptoethanol and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco-BRL, Life Technologies). To induce immature DCs from monocytes, the culture medium was supplemented with 800 U/mL of granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF; Leucomax 300) and 1000 U/mL of IL-4 (R & D Systems) on the first day of culture (day 0) and on day 3. Immature DCs were collected after 7 days. Mature DCs were obtained by incubating DCs with 300 ng/mL CD40L (ProSpec-Tany TechnoGene LTD) on day 6. Cell-surface markers were analyzed on day 7 by the FACS-Calibur flow cytometer. All experiments were performed with the same batch of FBS to avoid variations in the pattern of CD14 and CD1a expression.

Analysis of Cell-Surface Markers by Flow Cytometry

Analysis of cell surface markers on immature (DCs-CD40L) and mature DCs (DCs + CD40L) was performed on day 7 of cell culture. The following mouse anti-human monoclonal antibodies were used for immunofluorescent staining of the leukocyte population, monocyte yield and DCs: CD14-FITC (RMO52), CD1a-PE (BL6), CD54-PE (84H10), CD64-FITC (1M 1604), CD83-FITC (HB159), CD86-PE (HA5.2B7), IgG1-FITC (679.1Mc7)/IgG1-PE (679.1Mc7), and IgG2b-FITC (MOPC-195) (Coulter-Immunotech). Generally, 10,000 events were analyzed. Cell-surface markers were determined using a forward-versus-side scatter gate. All isotype controls were set to be within 2% positive for statistical analysis. Cell viability (>90%) was determined by the trypan blue test.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were used to report the mean values and standard deviation (SD) of the experimental data. Statistical analyses were performed using Student's *t* test with SPSS software. Significance for a two-tailed test was set at a *P* < .05.

RESULTS

Figure 1 shows the proliferative capacity of CD4⁺ cells alone and in MLRs. In the Pre-Tx analysis of patient 1, the

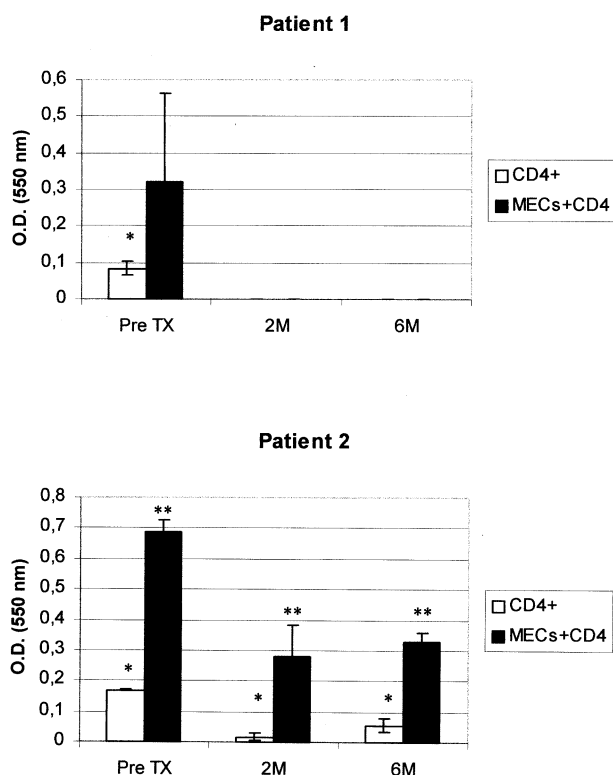


Fig 1. Mixed leukocyte reaction. *, ** $P < .05$. *CD4+ vs. MECs+ CD4+; **MECs+ CD4+ (2M) vs. MECs+ CD4+ (Pre Tx) and MECs+ CD4+ (6M) vs. MECs+ CD4+ (Pre Tx).

proliferative capacity of CD4+ cells in response to MECs was significantly greater than that of CD4+ cells alone. In contrast, after OLT, no proliferative activity of CD4+ cells was detected with or without the presence of MECs. Patient 2 showed proliferative capacity at all times, but there was a significant decrease in activity after transplantation compared to pretransplantation.

Table 1 shows cytokine production in MLR supernates. Patient 1 never showed more than 10 pg/mL production of any cytokine after OLT using supernates of CD4+ cells alone or in MLRs. In Pre-Tx samples, we saw INF- γ and TNF- α production only in CD4+ cells cultured in the presence of MECs. Patient 2 displayed INF- γ production at

various concentrations, depending on the time, when MECs and CD4+ were cultured together. A decreased concentration of this cytokine was observed in the posttransplant analyses. The lowest concentration of INF- γ was detected at 2M, probably due to the effect of the immunosuppressives. TNF- α production was observed only in MLRs at Pre-Tx and 6M. IL-2 concentrations were below 10 pg/mL in both patients at all times. The effect of tacrolimus on T cells or IL-2 metabolism may explain this observation.

Figure 2 shows the median fluorescence intensity (MFI) values for immature (DCs-CD40L) and mature (DC + CD40L) DCs from the two patients (Fig 2A, patient 1 and Fig 2B, patient 2). In all cases, the markers for immature DCs were CD1a⁺⁺, CD54⁺⁺, HLA-DR⁺⁺, CD80⁺⁺, CD86⁺⁺, and CD83⁺. MFI values for patient 1 were constant for all markers at all times after transplantation. They rose with the addition of CD40L to the culture medium; nevertheless, after transplantation, MFI values decreased for HLA-DR, CD80, and CD86, with and without CD40L.

DISCUSSION

A large number of experimental and clinical studies have examined the relationship between cytokine gene transcription and graft rejection or tolerance.^{12,13} Many of these investigations were performed retrospectively and do not provide any prospective clinical information. In the present study we developed an experimental model to indicate the immunological status of HCV-positive transplanted patients. We assessed the Th1 cytokine pattern in supernates of CD4+ T cells against MECs, and the immunophenotype of DCs from these patients. Our results showed a significant decrease in the proliferative activity of CD4+ T-cells cultured with MECs from patient 1 at 2M and 6M after liver transplantation compared to the activity of these cells before transplantation. Moreover, no Th1 cytokines (eg, INF- γ or TNF- α) were detected following liver transplantation.

In contrast, patient 2 maintained considerable levels of INF- γ and TNF- α at the posttransplant time points. No evidence of allograft rejection was seen in either patient. These observations suggest that immunosuppressive agents administered in vivo reduce T cell functions in vitro. It is

Table 1. Cytokine Production in MLR Supernates

Cytokines (pg/mL)	Pre-Tx		2 Months		6 Months	
	CD4+	MEC+ CD4+	CD4+	MEC+ CD4+	CD4+	MEC+ CD4+
Patient 1						
INF- γ	<10	321.3	<10	<10	<10	<10
TNF- α	<10	188	<10	<10	<10	<10
IL-2	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Patient 2						
INF- γ	89.3	10254.2	<10	1061.8	<10	3765.1
TNF- α	<10	43	<10	<10	<10	52.7
IL-2	<10	<10	<10	<10	<10	<10

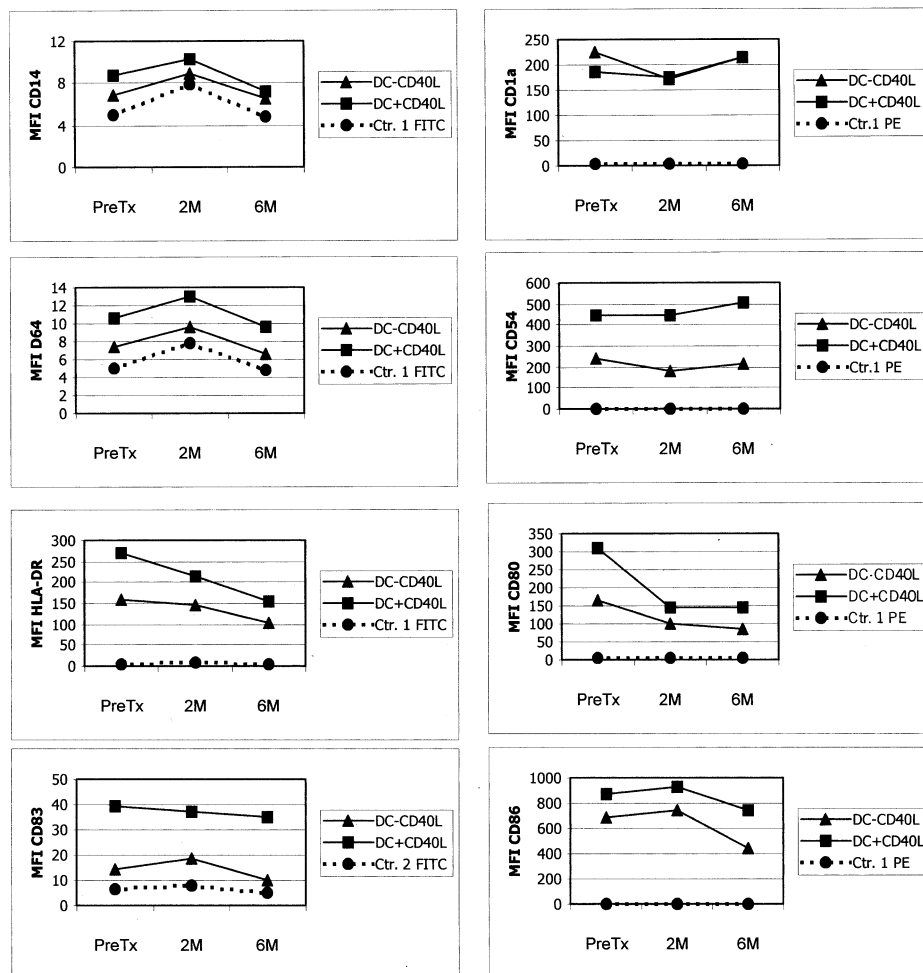


Fig 2A. Median fluorescence intensity (MFI) values for immature (DCs-CD40L) and mature (DC+CD40L) DCs for patient 1. Ctr. 1 and Ctr. 2 controls of FITC and PE.

known that the immunosuppressive actions of corticosteroids are focused mainly on T cells and monocytes/macrophages. This drug profoundly inhibits several aspects of T-cell immunity, largely through inhibition of cytokine expression at the transcriptional and posttranscriptional levels.¹⁴ Tacrolimus (FK506) binds to intracellular immunophilins known as FK506-binding protein (FKBP). The FK506-FKBP complexes inhibit the phosphatase activity of calcineurin, thereby inhibiting T-cell receptor-mediated signal transduction in T lymphocytes.¹⁵ The results from the present study agree with those of Chen et al¹⁶ who reported that cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells from orthotopic liver transplant patients in response to stimulation by donor alloantigens is helpful to predict the clinical status of the allograft. Patients without rejection showed increased levels of IL-4 and TGF- β and decreased levels of IL-2, INF- γ , and TNF- α from PBMCs stimulated by donor-specific alloantigens.

When we evaluated the phenotype of immature dendritic cells (unexposed to CD40L) from our patients, we found

that the cells displayed adhesion (CD54) and costimulatory (CD80 and CD86) molecules, HLA-DR, and CD1a at PTx, 2M, and 6M. Moreover, CD40L exposure increased MFI values for CD54, CD80, CD83, CD86, and HLA-DR on DCs at all the time points. These observations suggest that monocytes obtained from patients treated with corticosteroids and tacrolimus can be differentiated in vitro into immature and mature DCs. However, a decrease in MFI values for HLA-DR, CD80, and CD86 was observed in mature DCs from patient 1 at 2M and 6M as compared to the MFI values for these markers in mature DCs from patient 2.

Although T cells are the most widely recognized cellular target for glucocorticoids, a direct effect of this drug on DCs has also been reported. Glucocorticoids strongly interfere with the differentiation and function of human monocyte-derived DCs in vitro.^{17,18} Although we observed different patterns of HLA-DR, CD80, and CD86 expression in the two patients studied, we do not know whether these differences were related to a synergistic effect of glucocorticoids

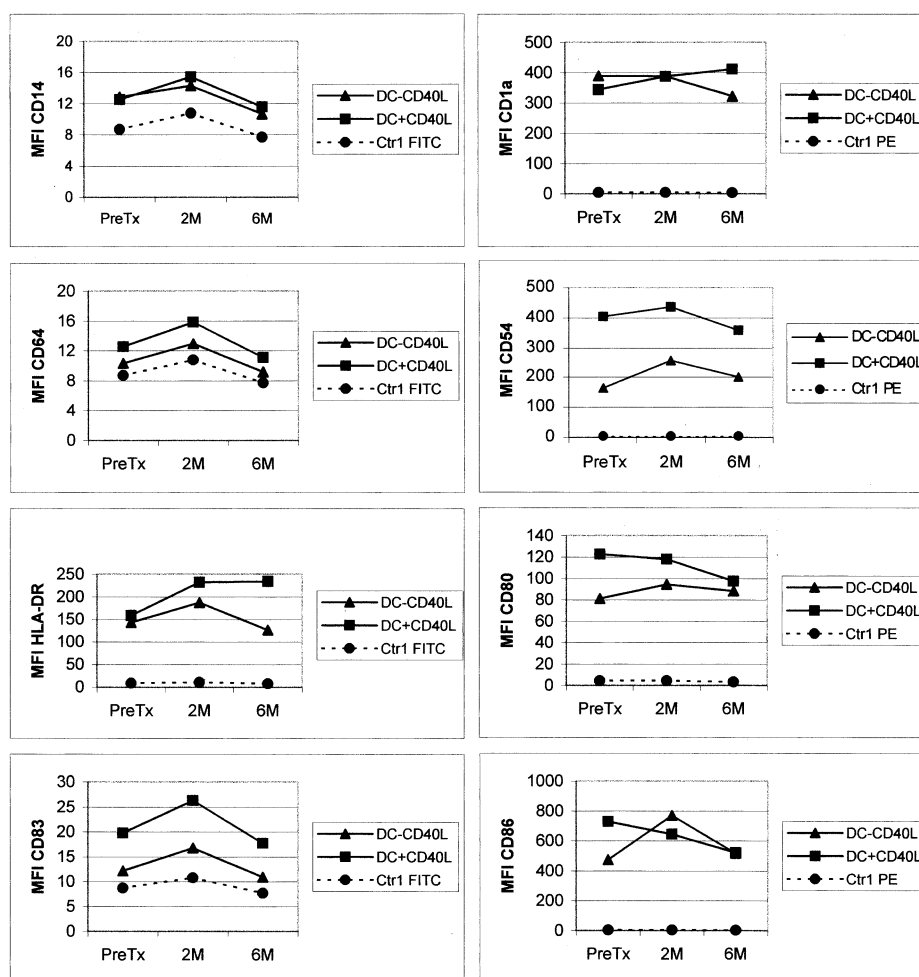


Fig 2B. Patient (Continued)

plus tacrolimus on DCs. A feasible hypothesis to explain these data is the effect of HCV on DCs. It is known that several viruses, such as herpes simplex, measles virus, Epstein-Barr virus, and HCV diminish DC function.^{19,20} Hence, DCs from chronically infected patients cannot be stimulated to a mature phenotype. However, DCs from patients whose HCV infection resolves after antiviral therapy behave like DCs from healthy donors.²¹ In our study, HCV relapsed in patient 1 at the third month; he died due to hepatitis at the ninth month after liver transplantation. In contrast, recurrent HCV was not detected during the study period in patient 2. Due to the ability of HCV to infect monocytes,²² it is possible that this virus can cause a defect in the molecular mechanism of expression of adhesion and costimulatory molecules in DCs, promoting a population of cells in a low maturity stage. This low maturity stage of DCs and the loss of INF- γ and TNF- α production by CD4+ T may explain the fatal clinical evolution of patient 1. In contrast, the presence of DCs with a mature phenotype and moderate production of INF- γ and TNF- α by CD4+ T cells

after liver transplantation in patient 2 were associated with allograft survival and control of viral progression.

In summary, our results suggest that: (1) it is possible to detect perturbations in the production of CD4+ T-cell cytokines in response to donor spleen mononuclear effector cells using an in vitro model; (2) it is possible to generate DCs from monocytes of liver transplant patients under immunosuppressive treatment; and (3) perturbations in cytokine production and the maturation process of DCs may be an indication of graft instability and HCV progression. More patients should be studied using this experimental model to determine the predictive value of the cytokine analysis and the dendritic cell assessment to anticipate hepatitis C virus recurrence in liver transplant patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M^a Carmen Martínez (Banc de Sang i Teixits, [BST]) for technical support in apheresis method and Ms. Celine Cavallo for English language editing.

REFERENCES

1. Rosen HR, Martin P: Hepatitis B and C in the liver transplant recipient. *Semin Liver Dis* 20:465, 2000
2. Garcia-Retortillo M, Forn SX, Feliu A, et al: Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 35:680, 2002
3. Berenguer M, Prieto M, San Juan F, et al: Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 36:202, 2002
4. Takeuchi TR, Lowry RP, Koziechny B: Heart allografts in murine system: the differential activation of Th2-like effector cells in peripheral tolerance. *Transplantation* 53:1281, 1992
5. Chen N, Gao Q, Field EH: Prevention of TA1 response is critical for tolerance. *Transplantation* 61:1076, 1996
6. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245, 1998
7. Watts C, Powis S: Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet* 1:60, 1999
8. Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, et al: Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 84:3261, 1994
9. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, et al: Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int Rev Immunol* 6:197, 1990
10. Lanzavecchia A, Sallusto F: Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92, 2000
11. Cos J, Villalba T, Parra R, et al: FK506 in the maturation of dendritic cells. *Haematologica* 87:679, 2002
12. Dallman MJ, Monygomery RA, Larsen CP, et al: Cytokine gene expression: Analysis using Northern blotting polymerase chain reaction, and in situ hybridization. *Immunol Rev* 119:163, 1991
13. Martinez OM, Krams SM, Sterneck M, et al: Intragraft cytokine profile during human liver allograft rejection. *Transplantation* 2:449, 1992
14. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, et al: Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 60:563, 1996
15. Flanagan RJ, Corthesy B, Bram RJ, et al: Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK506 and cyclosporine A. *Nature* 352:803, 1991
16. Chen Y, McKenna GJ, Yoshida EM, et al: Assessment of immunologic status of liver transplant recipients by peripheral blood mononuclear cells in response to stimulation by donor alloantigen. *Ann Surg* 230:242, 1999
17. Piemonti L, Monti P, Allavena P, et al: Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 162:6473, 1999
18. Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, et al: The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 30:1807, 2000
19. Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, et al: Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cells stimulatory capacity. *J Virol* 74:7127, 2000
20. Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivallier P, et al: Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* 186:813, 1997
21. Auffermann-Gretzinger S, Keffe EB, Levy S: Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 97:3171, 2001
22. Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, et al: In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 91:3841, 1998