



## PROGRESOS EN HEPATOLOGÍA

### Desarrollo de inmunotolerancia en el trasplante hepático

José Antonio Pons<sup>a,\*</sup>, Beatriz Revilla-Nuin<sup>b</sup>, Pablo Ramírez<sup>c</sup>,  
Alberto Baroja-Mazo<sup>b</sup> y Pascual Parrilla<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Aparato Digestivo, Unidad de Hepatología, Unidad de Trasplante Hepático, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España. CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)

<sup>b</sup> Unidad de Cirugía Experimental, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España. CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)

<sup>c</sup> Unidad de Trasplante Hepático, Departamento de Cirugía, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España. CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)

Recibido el 9 de noviembre de 2010; aceptado el 11 de noviembre de 2010

Disponible en Internet el 3 de marzo de 2011

#### PALABRAS CLAVE

Tolerancia clínica  
operacional;  
Retirada de  
inmunosupresión;  
Células T  
reguladoras;  
Trasplante hepático

**Resumen** El hígado es un órgano privilegiado, con una menor incidencia de rechazo que otros órganos trasplantados. Sin embargo, los regímenes inmunosupresores siguen siendo necesarios para controlar la respuesta de los linfocitos alorreactivos después del trasplante. Estos tratamientos pueden dar lugar a complicaciones severas, como infecciones, cáncer, enfermedades cardiovasculares e insuficiencia renal crónica. En el trasplante clínico existe una evidencia cada vez mayor de que algunos pacientes con trasplante hepático (TH) en los que se retira la inmunosupresión (IS) mantienen una función hepática normal, lo cual indica la posibilidad de la existencia de tolerancia. Esta estrategia es posible hasta en un 25-33% de los receptores de un TH. Una serie de observaciones experimentales y clínicas indican que los injertos hepáticos pueden tener propiedades «tolerogénicas» para otros órganos. En el ámbito clínico la tolerancia clínica operacional (TCO) se define como la ausencia de rechazo agudo o crónico y la supervivencia del injerto con función e histología normales, en un paciente inmunocompetente sin IS, generalmente después de la retirada exitosa de IS. Los mecanismos exactos involucrados en la tolerancia son todavía desconocidos, aunque los estudios en modelos animales indican una posible acción de las células T reguladoras (Treg). Datos recientes han demostrado un aumento de la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> y de la expresión de FoxP3 durante la retirada de IS en los pacientes tolerantes con TH. Los datos obtenidos del estudio del perfil transcripcional en sangre periférica en los pacientes con TH sin IS señalan que existe una huella de tolerancia, que podría utilizarse para identificar los receptores de TH tolerantes y que las células del sistema inmune innato parecen tener un papel importante en el mantenimiento de la TCO después del TH.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: joseapons@yahoo.es (J.A. Pons).

**KEYWORDS**

Operational tolerance;  
Immunosuppression withdrawal;  
Regulatory T cells;  
Liver transplantation

**Development of immune tolerance in liver transplantation**

**Abstract** The liver is a privileged organ and has a lower incidence of rejection than other organs. However, immunosuppressive regimens are still required to control the alloreactive T-lymphocyte response after transplantation. These treatments may lead to severe complications, such as infectious diseases, cancers, cardiovascular diseases and chronic renal insufficiency. In clinical transplantation there is increasing evidence that some liver transplant recipients who cease taking immunosuppressive (IS) drugs maintain allograft function, suggesting that tolerance is already present. This strategy is feasible in 25–33% of liver transplant recipients. A series of experimental and clinical observations indicates that liver allografts can even provide “tolerogenic” properties for other organ grafts. In the clinical setting, clinical operational tolerance (COT) is defined as the absence of acute and chronic rejection and graft survival with normal function and histology in an IS-free, fully immunocompetent host, usually as an end result of a successful attempt at IS withdrawal. The exact mechanisms involved in achieving transplant tolerance remain unknown, although animal models suggest a possible role for regulatory T cells (Treg). Recent data have demonstrated an increase in the frequency of CD4+ CD25<sup>high</sup> T cells and FoxP3 transcripts during IS withdrawal in operationally tolerant liver transplant recipients. The data obtained from transcriptional profiling of the peripheral blood of IS-free liver transplant recipients suggest that there is a molecular signature of tolerance that could be employed to identify tolerant liver transplant recipients and that innate immune cells are likely to play a major role in the maintenance of COT after liver transplantation.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

El trasplante hepático (TH) es el tratamiento más eficaz de las enfermedades hepáticas agudas y crónicas de carácter irreversible, consiguiendo una supervivencia superior al 85 y 70% al año y a los 5 años, respectivamente<sup>1,2</sup>. Con la introducción de los nuevos fármacos inmunosupresores, como la ciclosporina (Cs) y el tacrolimus (TAC), la incidencia de rechazo agudo y crónico ha disminuido de forma considerable, permitiendo además una disminución en la utilización de los esteroides, evitando sus efectos secundarios. Sin embargo, la toxicidad asociada con el uso crónico de estos fármacos anticalcineurínicos es importante, condicionando la aparición de hipertensión arterial, hiperlipidemia, diabetes, insuficiencia renal y tumores *de novo* en los pacientes trasplantados<sup>3,4</sup>.

Es un hecho conocido que el TH alógeno en especies animales como el cerdo y entre ciertas combinaciones de ratas y ratones puede realizarse sin inmunosupresión (IS)<sup>5–7</sup>. Esta observación experimental en animales y la posibilidad de retirar completamente los fármacos inmunosupresores en grupos de pacientes seleccionados con TH<sup>8–12</sup> permiten afirmar que el hígado es un órgano inmunológicamente privilegiado<sup>13</sup>, habiéndose comprobado que puede tolerarse tras el trasplante con menor inmunosupresión y que, en ocasiones, es posible retirar completamente los fármacos inmunosupresores sin daño histológico de rechazo, lo que se define como tolerancia clínica operacional (TCO)<sup>12,14</sup>.

Numerosos datos en experimentación animal<sup>15</sup> apoyan la posibilidad de inducir tolerancia en pacientes sometidos a trasplante de órganos. Aunque la inducción de tolerancia sería el objetivo ideal, la heterogeneidad de combinaciones posibles entre donante y receptor, el estado inmune del receptor, la enfermedad de base del paciente

trasplantado y las consecuencias imprevisibles de las infecciones hacen que una tolerancia estable sea extremadamente difícil de alcanzar en todos los pacientes<sup>16</sup>. Algunas experiencias en el ámbito del trasplante renal han obtenido un éxito parcial, pero a costa de requerir regímenes de condicionamiento inmunosupresor agresivos que limitan su aplicabilidad clínica<sup>17,18</sup>. En el ámbito del TH los estudios clínicos se han centrado en conocer los factores que favorecen o determinan la tolerancia espontánea o la tolerancia tras la retirada de los fármacos inmunosupresores.

Los mecanismos implicados en el rechazo y en la tolerancia de los órganos trasplantados son complejos y no bien conocidos, siendo actualmente los estudios de inmunotolerancia uno de los retos más importantes de investigación en el campo del trasplante. Diversos estudios han puesto de manifiesto el papel trascendente que tienen las células reguladoras del sistema inmune para determinar la aparición de tolerancia. Sin embargo, esta función no ha sido analizada hasta el momento actual, de forma prospectiva, en pacientes con TH ni en otro tipo de trasplantes de órganos o tejidos en humanos.

En el campo del TH, una línea de trabajo desarrollada para conocer cómo evitar la inmunosupresión ha sido la investigación de biomarcadores capaces de identificar la TCO. Dichos biomarcadores podrían ser la base de una guía que sirviera a los médicos implicados en el trasplante para retirar o minimizar la IS. Sin embargo, hasta el momento, ninguno de estos estudios de retirada de IS ha podido establecer una herramienta diagnóstica útil que identifique los pacientes con TCO.

En el contexto del TH clínico existen diversos motivos que confieren un gran interés al estudio de la TCO: a) es conocida la ausencia de consecuencias negativas del rechazo agudo precoz a largo plazo; b) la resolución

espontánea, en ocasiones, de los episodios de rechazo sin necesidad de IS adicional; c) la extremada baja frecuencia de rechazo crónico; d) la posibilidad de retirar completamente la IS en algunos pacientes con TH sin que se produzca el rechazo del órgano, y e) la retirada de IS podría mejorar el perfil de complicaciones renales y cardiovasculares.

Pese al avance acontecido en los últimos años en TCO, sería necesario definir de forma controlada y prospectiva diversos aspectos que surgen como preguntas desde la cabecera del enfermo. Basándonos en la experiencia clínica y en el manejo de los pacientes con TH nos planteamos las siguientes cuestiones clínicas: 1) ¿Es posible retirar la IS en los pacientes con TH?; 2) ¿Es peligroso para el paciente someterle a un protocolo de retirada de IS?; 3) ¿Es beneficiosa para el paciente la retirada de IS?; 4) ¿Existe algún parámetro que permita reconocer durante el proceso de retirada de IS al grupo de pacientes en los que podremos completar la retirada de IS?; 5) ¿Es el quimerismo de células endoteliales hepáticas un fenómeno relacionado con la TCO?, y 6) ¿Qué papel tienen las células T reguladoras en el desarrollo de la TCO?

En este contexto nos proponemos revisar, en el ámbito del TH, los mecanismos básicos de la tolerancia, los datos sobre los protocolos de retirada de IS y los biomarcadores de tolerancia estudiados hasta el momento.

## Definiciones de tolerancia

Desde un punto de vista inmunológico la tolerancia es definida como un estado de no reactividad inmune frente a antígenos específicos y que se mantiene indefinidamente en ausencia de IS; es la llamada *tolerancia inmunológica*. En modelos experimentales, la tolerancia es inducida por terapias dirigidas a la producción de delección de células T alorreactivas citotóxicas y/o hacia la generación de células T reguladoras. En estos modelos, los receptores con tolerancia a un órgano son capaces de aceptar un segundo injerto del mismo receptor sin IS, pero rechazan rápidamente injertos de terceros no relacionados. Además, en los animales tolerantes las células T tienen una baja respuesta frente al donante y, en modelos de tolerancia periférica, pueden transmitir la tolerancia cuando se inyectan dentro de huéspedes vírgenes. La tolerancia inmunológica es una demostración formal de la posibilidad de tolerancia en animales y es difícil de aplicar en la clínica. En el ámbito clínico se ha definido la *tolerancia operacional*<sup>19</sup> o *tolerancia clínica operacional* (TCO)<sup>14</sup> para designar aquella situación en la que existe función normal del injerto y ausencia de rechazo agudo o crónico en un paciente inmunocompetente, al que se le retiró completamente la inmunosupresión. Una situación real en la práctica clínica es la de pacientes con IS en dosis significativamente reducidas con buena función del injerto. Esta situación se define como *tolerancia de mínima IS* (*Prope Tolerance* o *almost Tolerance*)<sup>16</sup> y generalmente puede seguir o no un tratamiento previo con IS depleción de linfocitos.

## Bases experimentales del fenómeno de tolerancia

El concepto de tolerancia a los órganos trasplantados fue descrito por primera vez de forma experimental en 1953

por Billingham, Brent y Medawar<sup>20</sup>. En su artículo publicado en 1953 en la revista *Nature*, titulado «*Activity acquired tolerance of foreign cells*», los autores comienzan el artículo con la siguiente frase: «Los experimentos que se describirán en este artículo proporcionan una solución —en el presente solamente una solución “de laboratorio”— al problema de cómo conseguir que homoinjertos de tejidos sean inmunológicamente aceptables al huésped que normalmente reaccionaría contra ellos». En realidad, todo parte de la observación de Owen, que en 1945 publica en *Science* sus hallazgos en ganado bovino, donde estudiaba los grupos sanguíneos<sup>21</sup>. Cuando se producían partos dobles de gemelos dicigóticos, que comparten la circulación placentaria, cada gemelo compartía sangre del otro gemelo por intercambio de sangre durante la etapa fetal, produciéndose una quimera hematopoyética. Previamente, Medawar y Billingham habían observado que se toleraban los trasplantes de piel entre gemelos dicigóticos de vacuno. Esto tenía importancia en el ámbito de la agricultura, puesto que la hembra gemela dicigótica es habitualmente infértil (fenómeno *freemartin*). Medawar conoció los trabajos de Owen a raíz de una publicación de F.M. Burnet y F. Fenner en 1949 donde se nombra por primera vez el artículo de Owen y se acuña el término «tolerancia», distinguiendo entre el reconocimiento de lo propio (*self-markers*) y la respuesta a los antígenos extraños. Pero es Medawar en 1953 el que desarrolla los primeros trabajos en los que se induce tolerancia y que le valieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1960, compartido con F.M. Burnet. La investigación, realizada por Ruppert Billingham, Lesli Brent y Peter Medawar, consistió en la inyección de una suspensión de células de testículo, riñón y bazo de una cepa de ratón adulto (*A-line mouse*) a una rata de la cepa CBA embarazada de 6 embriones. La inyección se realizó a los embriones, con una aguja hipodérmica hasta las membranas fetales a través del útero. Ocho semanas después de nacer los ratones, se les trasplantó piel de un donante adulto de la misma cepa A albino, y se observó tolerancia y supervivencia del injerto cutáneo a largo plazo en 3 de los 5 ratones trasplantados. Posteriormente, a dos de los ratones tolerantes se les inyectó por vía intraperitoneal una mezcla de fragmentos triturados de ganglios linfáticos de una misma cepa que ellos (CBA), que habían sido inmunizados previamente con piel de la cepa A. Los injertos cutáneos se rechazaron en 2-3 días después de haber sobrevivido normalmente durante 77 y 101 días. Los autores concluyeron:

1. Los ratones nunca desarrollan, o lo hacen en grado limitado, el poder de reaccionar contra aloantígenos inoculados en la vida fetal. Los animales inoculados así no solamente son tolerantes a los antígenos inoculados, sino también a injertos de piel trasplantados en la vida adulta del mismo donante o de un donante de la misma constitución antigénica.
2. La tolerancia inmunológicamente adquirida es específica. Los ratones tolerantes a un donante conservan la capacidad de reaccionar contra injertos de donantes con diferente constitución antigénica.
3. La tolerancia adquirida es debida a una insuficiencia específica de la respuesta inmunológica y no depende de las propiedades del antígeno.

**Tabla 1** Estrategias de inducción de tolerancia en modelos de ratón (adaptada de Kingsley Chl et al, ref. 15).

| Tipo de tolerancia | Modelo de ratón                        | Estrategia  | Mecanismo de acción sugerido   |
|--------------------|--|---|--|
| Central            | Injerto islotes en ratón               | Inyección intratímica de aloantígenos                         | Deleción de células T alorreactivas  |
|                    | Trasplante cardíaco en ratón           | Inyección intratímica de aloantígenos                         | Deleción de células T alorreactivas  |
|                    | Trasplante islotes y cardíaco en ratas | Inyección intratímica de péptidos de clase I                  | Supresión de CTL reactivos de donante  |
|                    | Trasplante de piel en ratón            | Infusión de médula ósea y bloqueo coestimulador               | Quimerismo mixto   |
| Periférica         | Trasplante de piel en ratón            | Infusión de médula ósea y bloqueo coestimulador + busulfán    | Quimerismo mixto   |
|                    | Trasplante cardíaco en rata            | Infusión de células madre en porta                            | Quimerismo mixto   |
|                    | Trasplante de piel en ratón            | Protocolo toleroénico: timectomía, Ac. anti-CD4 y anti-CD8    | Tolerancia infecciosa-Inactivación células T alorreactivas                                     |
|                    | Trasplante de piel en ratón            | Generación y transferencia adoptiva de células Treg CD4+CD25+ | Prevención de la activación óptima de células T/anergia y apoptosis de células T alorreactivas |
|                    | Trasplante de piel en ratón            | Bloqueo de coestimulación                                     | Prevención de la activación óptima de células T/anergia y apoptosis de células T alorreactivas |
|                    | Trasplante de islotes en ratón         | Bloqueo de coestimulación                                     | Prevención de la activación óptima de células T/anergia y apoptosis de células T alorreactivas |

Este mismo grupo de investigadores describió que el rechazo primario de aloinjertos estaba mediado por linfocitos y así sentaron las bases inmunológicas del rechazo de los injertos. Tras el primer rechazo, un segundo injerto de piel del mismo haplotipo era rechazado de una forma más agresiva. Es decir, las células T sensibilizadas en la primera exposición al antígeno guardaban memoria inmunológica. Además, la transferencia de estas células a ratones *naïve* que nunca recibieron un injerto confería a estos la capacidad de rechazar de forma más rápida y eficiente. De esta manera, Medawar y su grupo demostraron que el componente hematopoyético era un elemento clave no sólo en la inducción de tolerancia, sino también la causa última del rechazo de órganos.

Los hallazgos del grupo de Medawar sirvieron para establecer modelos experimentales animales para la investigación en el campo de la tolerancia en el trasplante de órganos. Conforme progresaban estos estudios, el trasplante de órganos iba pasando de ser un hecho experimental a ser una opción terapéutica real. Estos modelos animales han explorado distintos aspectos relacionados con el rechazo y la tolerancia que se resumen en la [tabla 1](#)<sup>22</sup>.

A pesar de que los órganos trasplantados se rechazan frecuentemente, un hallazgo inusual en los estudios experimentales es que, en ausencia de inmunosupresión, un TH es aceptado a menudo, a pesar de una discordancia en el sistema MHC. Este fenómeno fue inicialmente observado por Calne<sup>5</sup> en cerdos. En su trabajo, publicado en 1969, los cerdos trasplantados con hígados de otros cerdos no emparentados sobrevivieron de forma prolongada sin inmunosupresión y cerdos similares rechazaban los trasplantes de piel, riñón y corazón rápidamente. Además, el TH protegía del rechazo de trasplantes de piel, riñón y corazón del mismo donante, pero no de otros donantes, tal como demostraron posteriormente otros autores<sup>23,24</sup>. En este estudio ya se especulaba que el hígado podía

inducir tolerancia inmunológica en los cerdos. Este fenómeno de aceptación espontánea de un hígado trasplantado ocurre en una gran variedad de especies de mamíferos, incluyendo diversas cepas de ratones<sup>7</sup>, ratas<sup>25</sup>, cerdos no emparentados y primates<sup>5</sup>. Mucho más sorprendente es la reversibilidad del rechazo de injertos cardíacos<sup>26</sup>, de páncreas<sup>27</sup> o de piel<sup>7</sup> mediante el TH. Los hígados trasplantados actuarían así como inmunosupresores. Estos hallazgos demuestran que los modelos de tolerancia del TH son modelos muy eficaces en demostrar la tolerancia periférica en el trasplante. Además estos experimentos demuestran que el hígado, además de ser aceptado espontáneamente cuando se trasplanta, puede inducir tolerancia específica a trasplantes sucesivos de otros tejidos y tener efecto inmunosupresor, revirtiendo el rechazo de un órgano previamente trasplantado (corazón, páncreas y piel) de la misma cepa. Aun sin inmunosupresión, en estos experimentos se observa que existe un periodo de rechazo previo a la tolerancia, que en vez de destruir el injerto, revierte de manera espontánea. La base fisiopatológica de este fenómeno ha sido estudiada de forma extensa y actualmente conocemos que la activación inmune es imprescindible para la inducción de tolerancia en el TH<sup>28</sup>.

### El hígado como órgano inmune privilegiado

La estructura del hígado tiene profundas implicaciones para su función inmune. El hígado está expuesto continuamente a grandes cantidades de antígenos que llegan fundamentalmente a través del sistema portal. Aproximadamente un 30% de la sangre total pasa por el hígado cada minuto, transportando al hígado cerca de 10<sup>8</sup> linfocitos periféricos en 24h<sup>29</sup>.

El hígado, por sus propiedades anatómicas e inmunológicas, es un lugar donde los antígenos del tracto

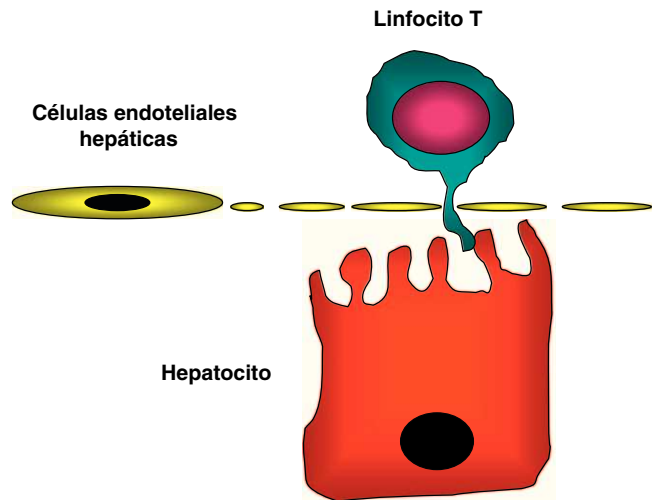
gastrointestinal y los aloantígenos, cuando se trata de un hígado trasplantado, son presentados por una compleja red de células sinusoidales y células presentadoras de antígeno (CPA) a los linfocitos. La población de linfocitos hepáticos es rica en NK (*natural killer*) y NKT (*natural killer T cells*), jugando un papel crítico como primera defensa contra los patógenos, modulando la lesión hepática y el reclutamiento de linfocitos circulantes. Recientemente se ha podido documentar la existencia de un porcentaje alto de linfocitos no convencionales en el hígado, que raramente se presentan en sangre periférica, incluyendo NK, NKT expresando el receptor de células T (TCR)  $\gamma\delta$  (célula T  $\gamma\delta$  y  $V\alpha 24J\alpha Q$  TCR) y células dendríticas (CD). Estas células NKT  $\gamma\delta$  tienen propiedades inmunorreguladoras y parecen reconocer CD1d, expresado en la superficie de las CPA (células de Kupffer), y en los hepatocitos<sup>16</sup>. Las células NK (CD3.CD16+CD56+) representan hasta un 45% de los linfocitos hepáticos, mientras que sólo suponen un 5-15% de las células mononucleares periféricas. Estas células NK parecen liberar señales negativas hacia los linfocitos T del receptor cuando migran al hígado después del TH (TH), contribuyendo a la tolerancia del injerto hepático.

El contexto en el que se presentan los antígenos en el hígado a los linfocitos T favorece un ambiente tolerogénico. Este depende de la naturaleza de las CPA del hígado donante, de la presencia o ausencia de moléculas coestimuladoras y del microambiente de citocinas. En particular, las CPA hepáticas tienen una capacidad constitutiva de inducir respuestas tolerogénicas en los linfocitos T<sup>30</sup>.

Las células endoteliales sinusoidales hepáticas (CESH) tienen un fenotipo único que expresa marcadores típicos de células de tipo mielóide (CD1, CD4, CD11c). Dichas CESH tienen parecido con CD inmaduras, constituyendo un nuevo tipo de CPA órgano-específica. Los linfocitos CD4+ activados por las CESH son incapaces de diferenciarse hacia células Th1 (productoras de IL-2), y expresan altos niveles de la IL-10 inmunosupresora<sup>31</sup>. Además, los linfocitos CD8+ estimulados por las CESH no pueden responder a nuevas estimulaciones antigénicas<sup>30</sup>.

Diversos estudios han planteado la cuestión sobre la renovación de las células endoteliales en los órganos trasplantados y su relación con la tolerancia o el rechazo. El recambio endotelial se ha demostrado en corazón<sup>32</sup>, riñones<sup>33</sup>, y en el hígado trasplantado<sup>34</sup>. Lagaaij et al<sup>33</sup> demostraron que, tras el trasplante renal, el recambio endotelial de las células endoteliales del donante por células endoteliales del receptor se correlacionaba con rechazo vascular. Se ha propuesto que, en el hígado trasplantado, el recambio endotelial por células endoteliales del donante procedentes de células de médula ósea podría favorecer la tolerancia del injerto<sup>34,35</sup>. Sin embargo, se pudo demostrar posteriormente que el quimerismo endotelial en el injerto hepático no se relaciona con la inducción de tolerancia en los pacientes trasplantados hepáticos después de la retirada completa de inmunosupresión<sup>8</sup>.

Recientemente, se demostró que la capacidad del hígado de inducir tolerancia se debe, en parte, a la capacidad de activación *in situ* de los linfocitos T. Es conocida la capacidad de los hepatocitos como células presentadoras de antígenos tolerogénicas. En contra del dogma que establece que los linfocitos T *naïve* no pueden interactuar con células parenquimatosas fuera de los órganos linfoides, se ha podido



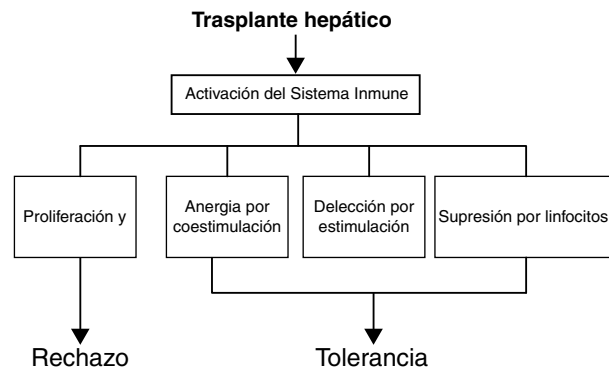
**Figura 1** Contacto de los linfocitos T con los hepatocitos, por medio de extensiones citoplasmáticas que atraviesan las fenestraciones de las células endoteliales sinusoidales.

observar que los linfocitos intrahepáticos y los linfocitos CD8+ *naïve* circulantes pueden interactuar con los hepatocitos a través de extensiones citoplasmáticas que pueden penetrar a través de las fenestraciones de las CESH<sup>36</sup> (fig. 1). Esta activación local de los linfocitos T por medio de los hepatocitos concede un papel importante a los hepatocitos como CPA y da lugar al desarrollo de tolerancia dentro del hígado<sup>37</sup>.

## Mecanismos de tolerancia en el trasplante hepático

### Paradigma dualístico de la tolerancia

Aunque los mecanismos exactos que establecen y mantienen la tolerancia de los órganos trasplantados no son bien conocidos, los distintos estudios de tolerancia en animales, y menos en humanos, demuestran que la tolerancia es un proceso activo y muy regulado. El proceso de activación inmune (proliferación y diferenciación de linfocitos) ocurre normalmente como una respuesta inmune al injerto hepático. Este proceso natural de respuesta puede resultar en dos vías de comportamiento distintas (fig. 2): 1) una vía (o grupo de



**Figura 2** Mecanismos de rechazo y tolerancia en el trasplante de órganos.

vías) inmune dirigida a la destrucción del injerto (vía del rechazo), y 2) una vía (o grupo de vías) orientada hacia la tolerancia (vía tolerogénica). Este paradigma dualístico postula la existencia de mecanismos comunes inducidos por el injerto hepático que dan lugar a rechazo o tolerancia, dependiendo del balance cuantitativo entre ambas vías<sup>28</sup>. Los mecanismos inmunes exactos que subyacen la vía de la tolerancia no son totalmente conocidos, pero pueden incluir los siguientes fenómenos<sup>38</sup>: 1) delección por apoptosis clonal de linfocitos T específicos de donante (tolerancia central o periférica), y 2) tolerancia periférica (regulación, anergia por coestimulación deficiente, delección por activación repetida).

### Tolerancia central

Los fenómenos de tolerancia central se desarrollan fundamentalmente en el timo. Las células precursoras de los linfocitos T procedentes de las *stem cell* de la médula ósea maduran en el timo y aprenden a distinguir lo propio de lo extraño. Durante el proceso de diferenciación de las células T, los precursores linfoides CD4–CD8– se convierten en células T doble positivas CD4+CD8+ y posteriormente en CD4+TCR+ si se presentaron a moléculas HLA de clase II, o se convierten en CD8+TCR+ si se presentaron a moléculas HLA de clase I. Cuando la unión del linfocito T al complejo péptido-moléculas HLA presentado por las células epiteliales tímicas se realiza con un TCR linfocitario de baja afinidad se produce la llamada «selección positiva», que permite la supervivencia de dichos linfocitos, que pasan al torrente circulatorio para colonizar los órganos linfoides secundarios. Por el contrario, los linfocitos con receptores que se unen con alta afinidad a estos complejos experimentan muerte celular por apoptosis (selección negativa)<sup>39</sup>. Algunos linfocitos autorreactivos escapan a la periferia y, por este motivo, es necesario contemplar la existencia de mecanismos reguladores naturales periféricos que puedan controlar este tipo de autorreactividad. Estos mecanismos reguladores han recobrado una relevancia fundamental en la investigación del trasplante y la autoinmunidad, y están mediados por células T reguladoras y células dendríticas tolerogénicas.

El fundamento de la estrategia de inducción de tolerancia mediante el trasplante de médula ósea se basa en el establecimiento de un quimerismo hematopoyético mixto. Cuando el timo del receptor se coloniza por DC del donante se produce un quimerismo central. Durante el proceso de diferenciación de las células T en el timo, las CD del donante podrían participar en la purga de linfocitos T alorreactivos a través de selección negativa o delección clonal y así generar un repertorio de células T tolerantes frente a lo propio y a los aloantígenos del donante<sup>40</sup>. Sin embargo, si no se produce una delección completa de linfocitos alorreactivos a través del quimerismo mixto después del trasplante de médula ósea, persiste la posibilidad de rechazo y la tolerancia sólo es posible si se desarrollan mecanismos inmunorreguladores que controlen dichos linfocitos<sup>41,42</sup>.

La aplicación clínica de los modelos animales de trasplante de médula ósea con protocolos de acondicionamiento con irradiación linfóide total, o con protocolos no mieloablativos, ya sea con anticuerpos deplecionantes anti-CD4 y anti-CD40L o con proteínas de fusión CTLA4-IG que inhiben la

unión CD28 con CD80 o CD86, es difícil de establecer. Desde las primeras experiencias de Monaco et al<sup>43</sup> en trasplante renal, se han realizado diversos estudios en trasplante de hígado, páncreas, corazón y pulmón<sup>44</sup>, pero sin conseguir tolerancia completa. Quedan por resolver todavía muchos problemas y, en especial, se debe conseguir la depleción de las células alorreactivas periféricas que escapan a la delección central tras el quimerismo central conseguido con la transfusión de células de médula ósea<sup>45</sup>.

## Tolerancia periférica

### Células reguladoras y tolerancia

En los modelos de tolerancia espontánea del injerto hepático se produce precozmente una activación importante de los linfocitos del receptor en los órganos linfoides secundarios y una posterior delección por agotamiento de los mismos<sup>28</sup>. El estímulo es producido por la gran cantidad de leucocitos del donante que migran rápidamente a los tejidos linfoides y estimulan la producción de grandes cantidades de IL-2 e IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos CD4 del receptor, agotándose y muriendo posteriormente por apoptosis<sup>46</sup>.

Además de los mecanismos descritos de muerte celular inducida por activación, y otros mecanismos de tolerancia como la anergia o la desviación inmune o ignorancia, la presencia de células reguladoras parece jugar un papel central en los mecanismos de tolerancia hacia los órganos trasplantados<sup>47</sup>. Se han identificado diversos subtipos de células T reguladoras: células T CD4+CD25+ supresoras, células T reguladoras tipo 1 (Tr1) productoras de IL-10, células Th3 productoras de *transforming growth factor- $\beta$ -producing* (TGF- $\beta$ ), células NKT, CD8+CD28–CD27+ y CD4–CD8–<sup>48,49</sup>.

Los linfocitos T reguladores CD4+CD25+, junto a los NKT, aparecen de forma espontánea en el timo, ejercen su actividad inmunorreguladora de forma innata y su efecto no parece ser antígeno-dependiente<sup>50</sup>. Las células T reguladoras CD4+CD25+ fueron descritas por Sakaguchi et al en 1990<sup>51</sup> observando que suponían el 5-15% de las células CD4+ periféricas. Este tipo de células T reguladoras expresa también fenotipo de memoria (CD45RA<sup>neg</sup>CD45RO+CD45RB<sup>low</sup>), CTLA-4 o CD152 y GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*). Recientemente se demostró que un marcador discriminativo de células T reguladoras CD4+CD25+ era el factor de transcripción *Foxp3*<sup>52</sup>. Las células T reguladoras CD4+CD25+ disminuyen la respuesta inmune alterando la respuesta T alógena, la producción de anticuerpos, la secreción de citocinas y la presentación antigénica<sup>53</sup>. Este tipo de células reguladoras, además de inhibir la capacidad citolítica de los linfocitos T efectoras, convierten otras células T respondedoras CD4+CD25– mediante contacto intercelular, a fenotipo regulador, amplificando el efecto supresor de las células reguladoras (tolerancia infecciosa<sup>54</sup>). Este tipo de linfocitos T reguladores inducidos en sangre periférica suprimen la respuesta alógena a través de mediadores solubles como la IL-10 y/o TGF- $\beta$ <sup>55</sup>.

El hecho de que las células T reguladoras CD4+CD25+ de sangre periférica de humanos sean capaces de suprimir la respuesta a aloantígenos<sup>56</sup> ha despertado interés en la generación de este tipo de células como una herramienta

terapéutica que induzca tolerancia en trasplantes. Un ejemplo de ello sería estimular de forma repetitiva las células T *naïve* con CD inmaduras, lo cual induce la producción de linfocitos T reguladores CD4+CD25+<sup>57</sup>.

Recientemente se ha podido observar en sangre periférica de los pacientes con TH y tolerancia operacional (tolerancia sin inmunosupresión después de varios años con la misma) un incremento de células CD4+CD5+<sup>high</sup> *foxp3*<sup>58,59</sup>. Este hallazgo, junto a la mayor expresión de genes codificadores de células T $\gamma\delta$ , receptores NK y de proteínas involucradas en la finalización de proliferación<sup>59</sup>, parece constituir una huella de los pacientes trasplantados hepáticos capaces de tolerar la retirada de inmunosupresión.

### Células dendríticas y tolerancia

Las células dendríticas tienen un papel crucial en el establecimiento de tolerancia tanto central como periférica. En la periferia, las CD inducen tolerancia a través de la neutralización de linfocitos T reactivos (delección, anergia o inactivación). Además las CD inmaduras son capaces de inducir linfocitos T reguladores CD4+CD25+ de una forma antígeno-específica<sup>60</sup>. La generación de CD tolerogénicas mediante diversas estrategias, como la utilización de rapamicina<sup>61</sup>, podría inducir tolerancia como se ha demostrado en modelos animales. Clásicamente se ha considerado, por un lado, la existencia de CD monocitoides (CD1) que inducen una respuesta Th1 (IL-2) y, por otro, la de CD plasmocitoides (CD2) que inducen respuesta Th2 (IL-10)<sup>62</sup>. En trasplantados hepáticos a los que se pudo retirar la inmunosupresión de forma definitiva, se observó que existía una proporción de precursores inmaduros de CD2 mayor que en los que no toleraban la retirada de inmunosupresión<sup>63</sup>, aunque este hallazgo no ha sido confirmado por otros autores<sup>59</sup>.

### Quimerismo y tolerancia

El concepto de microquimerismo natural (estado en el que células alogénicas hematopoyéticas coexisten con células del receptor) que aparece después del trasplante de órganos sólidos fue sugerido por observaciones clínicas en las que el receptor de un riñón de un donante con pruebas cutáneas

positivas adquiría dicha positividad, que era negativa antes del trasplante<sup>64</sup>. En 1992 Starzl et al<sup>65</sup> describieron un bajo nivel de leucocitos del donante en receptores humanos de riñón e hígado a los que el trasplante se había realizado hasta 30 años antes. Starzl sugirió que la respuesta mutua de leucocitos de donante y receptor coexistiendo causaba agotamiento clonal seguido de delección periférica clonal de las células alorreactivas y de las células T del donante<sup>66</sup>. El fenómeno del microquimerismo se asoció con la existencia de tolerancia, pero se ha cuestionado posteriormente y actualmente se interpreta más como una consecuencia que como la causa de la tolerancia de los injertos<sup>67</sup>.

El hígado tiene una gran población de células hematopoyéticas que migran después del trasplante, por lo que se piensa que ocasiona un mayor grado de microquimerismo de *stem cells* y de leucocitos atípicos como las CD, que inducen hiporrespuesta de los linfocitos T alorreactivos, pero este mecanismo tolerogénico es distinto al propuesto por Starzl<sup>28</sup>.

### Experiencia clínica en tolerancia clínica operacional

Los casos de TCO pueden clasificarse en 4 grupos de acuerdo a la estrategia de retirada de IS (tablas 2–5). El primer grupo, que representa el más importante, identifica los casos de retirada de IS sin la utilización de ningún tratamiento previo. El segundo grupo incluye los casos de retirada de IS después de tratamiento con moléculas tolerogénicas. El tercer grupo comprende aquellos casos de retirada de IS después de una terapia celular tolerogénica. Finalmente, en el cuarto grupo se describen los casos de TCO desarrollada después de un trasplante de médula ósea.

Sin duda los protocolos de retirada intencionada de IS en el TH sin utilización de tratamientos supuestamente tolerogénicos son los más importantes en número y de ellos se ha establecido la prueba de concepto de la TCO (tabla 2). Globalmente la TCO se pudo obtener en cerca del 30% de los pacientes, todos ellos seleccionados por distintos motivos, generalmente por efectos adversos de la medicación inmunosupresora. Estos estudios son de gran importancia dado que demuestran la posibilidad real de retirar completamente la IS en un grupo importante de pacientes con TH.

**Tabla 2** Experiencia clínica en tolerancia clínica operacional sin protocolos tolerogénicos.

| Centro/año                                 | Número de pacientes   | Media entre TH y retirada IS (meses) | % de retirada completa de IS | % de rechazo agudo/crónico | % de pérdidas de injerto | Seguimiento desde la retirada de IS (meses) |
|--|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|---|
| Pittsburg/1997 <sup>9</sup>                | 95                    | 70                                   | 29                           | 26/0                       | 0                        | 180   |
| Londres/1998 <sup>10</sup>                 | 18                    | 60                                   | 11                           | 22/5,5                     | 5,5                      | 120   |
| Kyoto/2001 <sup>11</sup>                   | 63                    | 24                                   | 38                           | 25                         | 0                        | 24  |
| Murcia/2003, 2008 <sup>8,68,70</sup>       | 22                    | 40                                   | 45,4                         | 27,2                       | 0                        | 61  |
| Roma/2008 <sup>69</sup>                    | 54                    | 63                                   | 23,5                         | 76,4/0                     | 0                        | 45  |
| Otros (Columbus, Bruselas, Taiwán, Sídney) | 4 (1 caso por centro) | 2-60                                 | 1 por centro                 | 0                          | 0                        | 36-60                                       |
| Total                                      | 256                   | 51,4                                 | 29,4                         | 35,2                       | 1,1                      | 86  |

**Tabla 3** Protocolos tolerogénicos basados en terapias moleculares.

| Centro/año         | Número de pacientes           | Media entre TH y retirada IS (meses) | Protocolo tolerogénico | n (%) de retirada completa de IS | % de rechazo agudo/crónico | % de pérdidas de injerto | Seguimiento desde la retirada de IS (meses) |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|---|
| Pittsburg/2003     | 82 (múltiples órganos), 17 TH | Al inicio                            | ATG                    | 0                                | ?                          | 0                        | 15  |
| Nueva Orleans/1998 | 18                            | ≥ 6                                  | ATG                    | 1 (6%)                           | 77                         | 0                        | 12  |
| Ontario/2007       | 26                            | 56                                   | AUDC                   | 2 (8%)                           | 58                         | 0                        | 12  |
| Total              | 61                            |                                      |                        | 3 (5%)                           |                            | 0                        | 13  |

**Tabla 4** Protocolos tolerogénicos basados en terapias celulares.

| Centro/año           | Número de pacientes | Media entre TH y retirada IS (meses) | Protocolo tolerogénico                   | n (%) de retirada completa de IS | % de rechazo agudo/crónico | % de pérdidas de injerto | Seguimiento desde la retirada de IS (meses) |
|----------------------|---------------------|--------------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|---|
| Innsbruck-Viena/2000 | 1                   | 2                                    | Trasplante células madre de su madre     | 1 (100)                          | 0                          | 0                        | 4   |
| Gothenburgh/2005     | 1                   | Al inicio                            | Trasplante células madre de su padre     | 1 (100)                          | 0                          | 0                        | 60  |
| Ghent-Bruselas/2004  | 3                   | Al inicio                            | Trasplante células madre de donante vivo | 3 (100)                          | 66 pero con TCO posterior  | 0                        | 16  |
| Miami/2005           | 104                 | ≥ 12                                 | Infusión células MO del donante          | 20 (19%)                         | 67/1,9                     | 0,96                     | 26  |
| Total                | 109                 |                                      |  | 25 (23)                          |                            | 0,24                     | 26,5  |



Tabla 5 Trasplante de médula ósea previo al TH por enfermedad hematológica.

| Centro/año       | Número de pacientes | Media entre TH y retirada IS (meses) | Protocolo tolerogénico            | n (%) de retirada completa de IS | % de Rechazo agudo/crónico | % de pérdidas de injerto | Seguimiento desde la retirada de IS (meses) |
|------------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|---|
| Innsbruck/2002   | 1                   | 71                                   | Trasplante de MO y TH por EICH    | 1 (100)                          | 0                          | 0                        | 30  |
| Zúrich/2003      | 1                   | Al inicio                            | Trasplante de MO previo por LLA   | 1 (100)                          | 0                          | 0                        | 12  |
| Chapel Hill/2004 | 1                   | 6                                    | Trasplante MO por anemia aplásica | 1 (100)                          | 0                          | 0                        | 24  |
| <b>Total</b>     | <b>3</b>            |                                      |                                   | <b>3 (100)</b>                   | <b>0</b>                   | <b>0</b>                 | <b>22</b>                                   |

En algunos de estos estudios se pudo demostrar un beneficio clínico a corto plazo, con mejoría de los parámetros de riesgo cardiovascular y de la función renal<sup>68,69</sup>. Sin embargo, en casi ninguno de estos estudios se identificaron los mecanismos responsables para el mantenimiento del estado de tolerancia, excepto en un estudio donde se pudo observar un aumento de células reguladoras CD4+CD5+<sup>high+</sup> y de la expresión de mRNA de FoxP3 durante y antes de alcanzar el estado de tolerancia<sup>70</sup>. El tiempo que pueda mantenerse la TCO no es bien conocido, dado el corto periodo de observación en la mayoría de los estudios, y la posibilidad de que pueda desarrollarse un grado leve de daño tisular en el injerto hepático no puede descartarse<sup>71</sup>.

## Monitorización de la tolerancia en el trasplante hepático

### Bases generales de la monitorización inmunológica en el TH y pruebas de monitorización

La evaluación clínica de la tolerancia en el TH se ha limitado a la valoración de laboratorio de la función del injerto. Otras herramientas son la monitorización histológica mediante biopsia hepática. Hasta el momento, no existe una prueba fiable que permita definir de forma exacta la posibilidad de TCO. Sin embargo, en los últimos años se han investigado diversos biomarcadores muy prometedores que incluyen el estudio de los distintos subtipos de células dendríticas, análisis funcional de células T, estudio de HLA-G y de anticuerpos específicos de donante y estudios de expresión genética mediante microarray. Los resultados de estos biomarcadores de tolerancia están dando información importante que podría hacernos comprender algunos aspectos de la tolerancia en el ámbito del TH (tabla 6). Estas pruebas varían considerablemente en cuanto a su dificultad, precisión, especificidad, reproducibilidad, coste y tipo de información relevante sobre la regulación del sistema inmune. Estos ensayos se realizan, en su mayoría, en sangre periférica, pero existen posibilidades para su aplicación en estudios en el propio tejido hepático, especialmente para el estudio de la expresión genética en el injerto hepático<sup>72</sup>.

### Análisis de subtipos de células dendríticas

Las CD son un componente fundamental del sistema inmune innato que, dependiendo de distintos factores microambientales (citocinas, productos microbianos, factores endógenos, quimocinas e interacción con otras células), induce y regula diversas respuestas inmunes. Existen 2 subtipos mayores de CD en humanos tanto en sangre como en tejidos: las células dendríticas convencionales mieloides (CD-m) y las células dendríticas plasmocitoides (CD-p). La expresión en su superficie de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) y moléculas coreguladoras (programmed death ligand-1 [PD-L1]; inducible costimulator ligand [ICOSL]), y su diferente secreción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, determina su capacidad para inducir la activación de las células T o para regular la función de las células T.

**Tabla 6** Biomarcadores de tolerancia en el TH.

| Prueba  | Descripción  | Estudio de tolerancia durante o antes de la retirada | Referencias    |
|---|--|--|----------------|
| <i>Células dendríticas</i>                          |  |  |                |
| Proporción CD-p/CD-m                                | Pacientes tolerantes tienen más CD-p circulantes que CD-m  | No   | 63, 75         |
| Proporción DCs-m/CD-p                               | Aumento DCs-m/CD-p se asocia con rechazo tardío  | No   | 76             |
| Proporción PD-L1/CD86                               | Pacientes tolerantes expresan más PD-L1/CD86 en las CD   | No   | 79             |
| <i>Análisis de células T</i>                        |  |  |                |
| Células Treg  | Aumento durante y después de la retirada de IS en pacientes tolerantes. Aumento dentro del injerto en pacientes tolerantes | Sí (Ref. 70)   | 58, 59, 70, 81 |
| Análisis funcional de células T (ImmunoKnow-Cyflex) | Pacientes con respuesta inmune alta tienen 30 veces más probabilidades de rechazo celular                                  | No   | 83             |
| Células T CD154+                                    | Aumento de células T memoria CD154+ pretrasplante se asocian con rechazo   | No   | 85             |
| <i>Factores solubles</i>                            |  |  |                |
| HLA-G en suero                                      | Niveles normales asociados a función hepática normal y niveles bajos asociados a peor función hepática                     | No   | 85, 86         |
| Anticuerpos anti-donante                            | Presentes en 30% de pacientes con IS mantenida y ausentes en pacientes con tolerancia                                      | No   | 75             |
| IL-17/IL-23   | Aumento durante episodios de rechazo agudo   | No   | 89             |
| <i>Estudio de genes</i>                             |  |  |                |
| Polimorfismo de genes                               | Pacientes con perfil bajo de TNF $\alpha$ y alto/intermedio de IL-10 tienen más probabilidad de tolerancia                 | No   | 90             |
| Huella genética de tolerancia (expresión genética)  | Un número bajo de genes en sangre periférica identifica los pacientes con tolerancia                                       | No   | 59, 92, 93     |

En humanos, las DC-p (que son también las células principales productoras de IFN-1) y las CD-m (ambas HLA-DR<sup>+</sup>) pueden identificarse en sangre en función de su diferente expresión de antígenos de superficie (DC-p: CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> blood DC Ag [BDCA]2<sup>+</sup>; CD-m: CD11c<sup>+</sup> CD123<sup>-</sup> BDCA1<sup>+</sup>). Aunque ambos tipos tienen propiedades tolerogénicas en las personas sanas, existen evidencias de que las CD-p, más que las CD-m, podrían inducir tolerancia<sup>73,74</sup>. Debido a las propiedades tolerogénicas de las CD-p, Mazariegos et al<sup>63</sup> demostraron un aumento de CD-p (respecto a las CD-m) en pacientes con TH y TCO y en aquellos pacientes en retirada de IS con respecto a aquellos pacientes con IS a dosis habituales. Además, se demostró un aumento de la fracción CD-p2:CD-p1 en los pacientes con TCO respecto a los pacientes con IS mantenida. Distintos fármacos inmunosupresores no influyeron en el número de CD-p2 ni en la fracción CD-p2:CD-p1, lo que apoyaría la validez de esta prueba en la identificación de pacientes con TCO<sup>75</sup>. No obstante, estos

resultados no han sido reproducidos por otros autores<sup>59</sup>. Gupta et al<sup>76</sup> han demostrado recientemente en niños que recibieron globulina anti-timocitos humanos de conejo que una proporción DC-m/DC-p elevada se asocia con rechazo del injerto hepático tardío, pero no precoz.

Dado que la función de las CD y el resultado de la interacción célula T-CD puede depender de las señales coestimuladoras y correguladoras expresadas por las CD, el grupo de Pittsburg liderado por Mazariegos analizó la hipótesis de que la prevalencia de la expresión de moléculas coinhibidoras en las CD podría ayudar a identificar los pacientes con TCO. Las señales PD-L1/PD-1 regulan negativamente la activación de los linfocitos T y promueven supervivencia del injerto<sup>77,78</sup>. Los autores analizaron la expresión de PD-L1/CD86 en CD de los pacientes con TCO, en retirada de IS o con IS convencional. Los resultados demostraron que los pacientes con TCO expresaron una alta proporción de PD-L1/CD86 en las CD-p y ninguna en las CD-m que fue mayor

que en los pacientes con IS, relacionándose con una elevada incidencia de Treg CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup><sup>79</sup>. Los autores proponen este parámetro como potencialmente útil para detectar aquellos pacientes con bajo riesgo de rechazo, que podrían ser buenos candidatos para retirar la IS.

### Análisis de células T reguladoras

Se han descrito una mayor frecuencia de células CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup> en pacientes tolerantes con trasplante renal<sup>80</sup> y niños con TH de cadáver o de donante vivo<sup>58,59,79</sup>. El estudio más reciente sobre este tipo de células Treg, realizado, por primera vez de forma longitudinal, demostró que las células CD4+CD5<sup>+</sup>high<sup>+</sup> y la expresión de mRNA de FoxP3 aumentaron durante y antes de alcanzar el estado de tolerancia<sup>70</sup>. La expresión de FoxP3 se ha estudiado también en el injerto hepático, encontrando un aumento en los pacientes con TCO cuando se comparó con pacientes con TH estables con IS<sup>81</sup>. Aunque el significado biológico de estos hallazgos no está todavía bien definido, en conjunto sugiere que las células T CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup> podrían estar implicadas en el desarrollo o mantenimiento del estado de TCO en el TH.

La población de células T CD8+CD28<sup>-</sup> tiene propiedades supresoras. Aunque no existen estudios que analicen una asociación entre la población de células CD8+CD28<sup>-</sup> y tolerancia, sí se ha podido demostrar una asociación entre una mayor frecuencia de esta población y un menor grado de rechazo en pacientes con TH y trasplante renal<sup>82</sup>. Además, los pacientes con un aumento de esta población disminuyeron la IS de forma más eficaz.

Li Y et al<sup>58</sup> han descrito una menor frecuencia de células NKT V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11<sup>high</sup> en niños con TH de donante vivo y TCO comparando con controles sanos.

En conjunto, todos estos datos sugieren que el análisis de células T en sangre periférica, en especial las células Treg, puede ayudar a identificar a los pacientes que podrían ser candidatos para una retirada segura de la IS.

### Análisis funcional de las células T

La prueba de ImmunoKnow (Cylex), que mide la producción de ATP en las células CD4<sup>+</sup> circulantes tras estimulación 15-18 h con fitohemaglutinina, fue analizada por Kowalski et al<sup>83</sup> en receptores de diversos trasplantes (riñón, riñón-páncreas, hígado e intestino delgado). Se observó que una respuesta fuerte (más ATP intracelular) tenía 30 veces más riesgo de rechazo y una respuesta baja (menos ATP intracelular), 12 veces más probabilidades de infección. En un reciente estudio<sup>84</sup>, realizado en el Hospital Clínico de Barcelona en 84 pacientes trasplantados (50 renales y 34 hepáticos), la mayoría de los pacientes estaban en la zona de respuesta inmune moderada durante el periodo de mantenimiento. Los niveles de ATP intracelular fueron menores en los pacientes con infecciones. En ninguno de los 10 de 22 pacientes que retiraron de forma completa la IS se encontró ATP intracelular en la zona de fuerte respuesta inmune (riesgo de rechazo). En este estudio, el valor de esta prueba fue mayor para identificar aquellos pacientes con riesgo de infección (seguridad) que aquellos con riesgo de rechazo

(eficacia) (comunicación personal). Esta prueba no se ha utilizado para predecir o monitorizar la TCO.

La interacción CD40-CD154 (CDL) es importante en la interacción entre las células presentadoras de antígeno y las células T (señal 2 coestimuladora), y tiene un papel crítico en la evolución en el trasplante de órganos experimental. En un reciente estudio prospectivo con pacientes con TH, se demostró que la presencia de células T citotóxicas (CTL) de memoria CD154<sup>+</sup> específicas de donante se asociaba con rechazo (sensibilidad/especificidad: 92,3/84,6%). Una presencia elevada de estas células pretrasplante se asoció con un riesgo mayor de rechazo<sup>85</sup>. Tampoco se han analizado estas células para monitorizar la retirada de IS.

### Análisis de HLA-G

En los pacientes con TH, altos niveles de HLA-G soluble se correlacionan de forma positiva con pruebas de función hepática normales, mientras que su descenso se sigue rápidamente de un deterioro de la función hepática<sup>86</sup>. Estos datos indican que un aumento de HLA-G soluble inmediatamente después del TH se asocia a una menor incidencia de rechazo, debido a los efectos inmunosupresores de HLA-G. Datos no publicados todavía del grupo de Mazariegos de Pittsburg han demostrado una mayor expresión de HLA-G en las CD circulantes de los pacientes pediátricos con TH y TCO, en comparación con los pacientes con IS<sup>87</sup>. Deben realizarse más estudios que demuestren el valor pronóstico en el trasplante de órganos sólidos.

### Anticuerpos antidonante

Shapiro et al<sup>88</sup> publicaron que la monitorización seriada de AAD en pacientes con trasplante renal tratados con alemtuzumab podía servir para predecir el rechazo después de la retirada de IS. Además, la interrupción de la retirada de IS en aquellos pacientes que desarrollan AAD puede llevar a su desaparición y mantenimiento de una buena función renal.

En pacientes con TH y TCO los AAD están ausentes y estaban presentes en 5/17 pacientes con IS mantenida<sup>75</sup>.

### Niveles en suero de IL-17 e IL-23

La IL-17 y la IL-23 tienen un papel proinflamatorio. Recientemente Fabrega et al<sup>89</sup> demostraron que los niveles séricos de IL-23 e IL-17 en pacientes con rechazo y sin rechazo fueron similares en el periodo postrasplante inmediato, aumentando durante los episodios de rechazo agudo. Este hecho podría apoyar la idea de monitorizar estas IL durante la retirada de IS.

### Polimorfismos de genes

La presencia de diferencias en fenotipos genéticos podría dar lugar a respuestas aloinmunes diferentes. Por ello se han analizado diversos polimorfismos genéticos de citocinas, quimocinas, moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras y receptores que tienen un papel importante en la respuesta aloinmune.

Los pacientes pediátricos con TH y un perfil genético bajo de TNF $\alpha$  y alto/intermedio de IL-10 son más susceptibles de retirada completa de IS o mantenimiento con bajas dosis de IS<sup>90</sup>. Este hallazgo sugiere que el análisis de SNp podría ayudar a identificar pacientes susceptibles de TCO.

Se han descrito polimorfismos en el receptor Toll-like (TLR) 2 (Arg753Gln) y TLR4 (Asp299Gly y/o Thr399Ile). En el TH se describió que el polimorfismo homocigoto Arg753Gln de TLR2 se asocia con fracaso del injerto y mortalidad después del TH en pacientes con hepatopatía crónica por virus C<sup>91</sup>.

### Expresión de genes y perfil transcripcional (análisis de Microarray)

En el campo del TH la TCO (que puede ocurrir hasta en un 20-30% de los pacientes) es más frecuente que en el ámbito del trasplante renal. Este hecho ha dado lugar a la posibilidad de estudiar más pacientes con TH y TCO que en pacientes con trasplante renal. El primer estudio utilizando el perfil de expresión de genes con microarray en el TH en humanos lo realizaron Martínez-Llordella et al<sup>59</sup> en el año 2007. En este estudio, se compararon muestras de células mononucleares en sangre periférica (CMSP) de 16 pacientes con TCO y 16 pacientes no tolerantes con TH, utilizando microarray comercial Affymetrix de análisis de oligonucleótidos de genoma completo. El grupo de receptores no tolerantes eran pacientes en los que se intentó la retirada de IS y fracasó debido a la aparición de rechazo agudo y el análisis genético se realizó una vez resuelto el episodio y cuando los pacientes recibían IS a dosis convencionales. La comparación de los pacientes con TCO y aquellos no tolerantes dio lugar a un perfil de expresión genética diferente en un total de 628 genes. Se validaron 22 genes mediante qPCR, confirmando la tendencia de expresión en el microarray. Entre los genes más destacados se encontró una mayor expresión de transcripción específica de células T  $\gamma\delta$  y varios genes relacionados con células NK. En los pacientes no tolerantes se observó una mayor expresión de genes asociados con estrés celular y respuestas inflamatorias. La mayor expresión de genes proinflamatorios estaba restringida a pacientes con virus C, lo que parece indicar que la diferencia en expresión genética podría estar relacionada con el efecto de la IS sobre la patogenia de la hepatitis C más que a un efecto sobre un estado de tolerancia. Los estudios de inmunofenotipado, realizados en paralelo, revelaron un mayor aumento de células T  $\gamma\delta$ , células T  $\gamma\delta$   $\delta$ 1TCR+ y células CD4+CD25+FoxP3+ en los pacientes con TCO con respecto a los pacientes no tolerantes.

Inmediatamente, a continuación de la anterior publicación, Kawasaki et al<sup>92</sup> publicaron un estudio similar comparando los perfiles de expresión genética en CMSP de 11 receptores de TH con TCO (> 6 meses sin IS) con los de 11 personas sanas. Utilizaron la plataforma comercial Agilent de microarray cDNA con 12.814 genes. Los autores encontraron 717 genes diferentemente expresados, muchos de los cuales estaban relacionados con la respuesta inmune. Diez genes se seleccionaron para validación mediante PCR (utilizando una técnica de PCR convencional semicuantitativa) y los resultados se correlacionaron con los obtenidos con los array.

El mismo equipo del Hospital Clínico de Barcelona, dirigido por Sánchez-Fueyo, en colaboración con nuestro grupo de Murcia y otros 2 grupos europeos de Bélgica e Italia, publicó recientemente un segundo estudio en el que los experimentos de expresión genética mediante microarray y qPCR se expandieron para analizar una población más amplia de pacientes con TH con TCO y de pacientes no tolerantes<sup>93</sup>. Los experimentos de microarray Affymetrix se realizaron, en primer lugar, en un grupo de entrenamiento de 17 pacientes con TCO y 21 con IS, encontrando 2.482 genes diferentemente expresados entre ambas condiciones. Posteriormente se utilizaron diferentes algoritmos predictivos bioinformáticos para definir clasificadores genéticos mediante pequeños grupos de genes. Los genes más informativos mediante estos clasificadores fueron validados mediante qPCR. Estos análisis identificaron 3 huellas de genes (que contenían 2, 6 y 7 genes, respectivamente) que podían clasificar adecuadamente la mayoría de las muestras incluidas en el grupo de entrenamiento (error de clasificación: 3-6%). Además, estas huellas fueron analizadas en una cohorte independiente de 11 pacientes con TCO y 12 pacientes no tolerantes con IS pudiendo clasificar a los pacientes con un error de entre el 13 y el 17%. La expresión de estos genes relacionados con tolerancia se midió, también, en un grupo de pacientes estables con IS, clasificando al 26% como potencialmente tolerantes (una proporción que es similar al porcentaje de pacientes con TCO entre los receptores de TH). El análisis funcional de los genes expresados diferencialmente identificó las señales celulares de NK como las vías moleculares asociadas con tolerancia. Este hallazgo se correlacionó con la expresión de genes medido en función de los distintos subtipos de CMSP. Se demostró que tanto el número de NK como de células T  $\gamma\delta$  se correlacionó con la expresión de 314 y 438 de los 2.482 genes de tolerancia respectivamente. Los biomarcadores de transcripción encontrados en este estudio están siendo validados, actualmente, en un estudio prospectivo multicéntrico europeo de retirada de IS (financiado por la Unión Europea bajo el consorcio Riset, [www.risetfp6.org](http://www.risetfp6.org)). En este estudio se analiza la expresión genética antes de la retirada de IS en pacientes con TH.

### Conclusiones

La mayoría de los pacientes con TH necesitan dosis bajas de IS para mantener una función normal del injerto. Además un número significativo de pacientes con TH seleccionados pueden retirar completamente los fármacos IS alcanzando la llamada tolerancia clínica operacional.

El hígado tiene unas propiedades tolerogénicas particulares que le permiten ser aceptado espontáneamente en algunas especies animales. Este proceso de tolerancia espontánea es un proceso activo dependiente de la transferencia de leucocitos del donante transportados con el hígado. La migración dentro del sistema linfóide del receptor da lugar a una activación inmune precoz de los linfocitos del receptor con la sucesiva deleción por agotamiento. Un mecanismo muy importante en la inducción de tolerancia es la supresión de la respuesta alogénica por linfocitos T reguladores. El microquimerismo leucocitario ha sido cuestionado como un mecanismo primordial en el mantenimiento de tolerancia.

En el contexto clínico, será importante monitorizar diversos parámetros inmunológicos de forma sistemática antes y después del trasplante, para poder identificar los fenotipos y quizás los polimorfismos genéticos que se asocian con la tolerancia del injerto.

Actualmente existen diversos estudios en marcha que analizan este aspecto, dirigidos a conocer parámetros que en un paciente concreto nos permitan predecir si podrá ser tolerante a la retirada de inmunosupresión tras un periodo de adaptación al nuevo órgano trasplantado. Las tecnologías del estudio completo del genoma, y, en particular, las tecnologías de alto rendimiento de expresión genética, son una base de gran oportunidad para estudio de los mecanismos y de la monitorización de la tolerancia. Estas tecnologías, junto a diversos biomarcadores señalados anteriormente, podrían ayudar a establecer algoritmos de decisión a la hora de plantear la retirada programada de IS en el TH.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver Transpl*. 2004;10:886–97.
- [http://www.eltr.org/publi/index\\_rv.php3](http://www.eltr.org/publi/index_rv.php3). 2010.
- Furukawa H, Todo S. Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. *Transplant Proc*. 2004;36:274–84.
- Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs*. 2003;63:1247–97.
- 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.
- Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery*. 1983;93:64–9.
- 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.
- Pons JA, Yelamos J, Ramirez P, Oliver-Bonet M, Sánchez A, Rodríguez Gago M, et al. Endothelial cell chimerism does not influence allograft tolerance in liver transplant patients after withdrawal of immunosuppression. *Transplantation*. 2003;75:1045–7.
- Mazariegos GV, Reyes J, Marino IR, Demetris AJ, Flynn B, Irish W, et al. Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1997;63:243–9.
- Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27:926–33.
- Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation*. 2001;72:449–54.
- Sanchez-Fueyo A, Strom TB. Immunological tolerance and liver transplantation. *J Hepatol*. 2004;41:698–705.
- Martinez OM, Rosen HR. Basic concepts in transplant immunology. *Liver Transpl*. 2005;11:370–81.
- Orlando G, Soker Sh, Wood K. Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol*. 2009;50:1247–57.
- Kingsley ChI, Nadig SN, Wood KJ. Transplantation tolerance: lesson from experimental rodent models. *Transpl Int*. 2007;20:828–41.
- Calne RY. Prope Tolerance: the future of organ transplantation from the laboratory to the clinic. *Transplantation*. 2004;77:930–2.
- Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Millan MT, Shizuru JA, et al. Tolerance and chimerism alter renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2008;358:362–8.
- Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance of immunosuppression. *N Engl J Med*. 2008;358:353–61.
- Lerut J, Sánchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:1774–80.
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953;172:603–6.
- Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science*. 1945;102:400–1.
- Kingsley ChI, Nadig SN, Wood KJ. Transplantation tolerance: lesson from experimental rodent models. *Transpl Int*. 2007;20:828–41.
- Rasmussen A, Davies HFS, Jamieson NV, Evans DB, Calne RY. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft-survival. *Transplantation*. 1995;59:919–21.
- Gonwa TA, Nery JR, Husberg BS, Klintmalm GB. Simultaneous liver and renal transplantation in man. *Transplantation*. 1988;46:690–3.
- Kamada N, Shinomiya T. Clonal deletion as the mechanism of abrogation of immunological memory following liver grafting in rats. *Immunology*. 1985;55:85–90.
- Kamada N, Wight DG. Antigen-specific immunosuppression induced by liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1984;38:217–21.
- Wang C, Sun J, Li L, Wang L, Dolan P, Sheil AGR. Conversion of pancreas allograft rejection to acceptance by liver transplantation. *Transplantation*. 1997;65:188–92.
- Bishop GA, McCaughan W. Immune activation is required for the induction of liver allograft tolerance: Implications for immunosuppressive therapy. *Liver Transpl*. 2001;7:161–72.
- Wick MJ, Leithauer F, Reimann J. The hepatic immune system. *Crit Rev Immunol*. 2002;22:47–103.
- Katz SC, Pillarisetty VG, Bleier JI, Shah AB, DeMatteo RP. Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells. *J Immunol*. 2004;173:230–5.
- O'Farrelly C. Immunoregulation in the liver and its extrahepatic relevance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39 Suppl 3:S727–8.
- O'Connell JB, Renlund DG, Bristow MR, Hammond EH. Detection of allograft endothelial cells of recipient origin following ABO-compatible, nonidentical cardiac transplantation. *Transplantation*. 1991;51:438–42.
- Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, Van Kemenade FJ, Van Es LA, Bruijn JA, Van Krieken JH. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet*. 2001;357:33–7.
- Gao ZH, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone marrow-derived cells. *Lancet*. 2001;357:932–3.
- Starzl TE. The "privileged" liver and hepatic tolerogenicity. *Liver Transp*. 2001;7:918–20.
- Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. T lymphocytes interact with hepatocytes through

- fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 2006;44:1182–90.
37. McAvoy EF, Kubes P. Holey endothelium: gateways for naïve T cell activation. *Hepatology*. 2006;44:1083–5.
  38. Reding R, Davies HFS. Revisiting liver transplant Immunology: from the concept of immune engagement to the Dualistic pathway paradigm. *Liver Transpl*. 2004;10:1081–6.
  39. Molina-Gonzalez M, Ortiz A, Tolerancia inmunológica. In: Molina-Gonzalez M, Ortiz A, editors. *Biología de la inmunosupresión del trasplante de órganos*. Barcelona: Novartis Farmacéutica; 2005. p. 180–98.
  40. Sykes M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity*. 2001;14:417–24.
  41. Cobbold S, Waldmann H. Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:518–24.
  42. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med*. 2002;195:1641–6.
  43. Monaco AP, Clarck AW, Wood ML, Sahyoun AI, Codish SD, Brown RW. Possible active enhancement of a human cadaver renal allograft with antilymphocyte serum (ALS) and donor bone marrow: case report of an initial attempt. *Surgery*. 1976;79:384–92.
  44. Fontes P, Rao AS, Demetris AJ, Zeevi A, Trucco M, Carroll P, et al. Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart, and pancreas islet transplantation. *Lancet*. 1994;344:151–5.
  45. Pauw L, Toungouz, Goldman M. Infusion of donor-derived hematopoietic stem cells in organ transplantation: clinical data. *Transplantation*. 2003;75(Suppl 9):465–95.
  46. Bishop GA, Sharland AF, McCaughan GW. High-dose/activation-associated tolerance model for allografts: Lessons from spontaneous tolerance of transplanted livers. *Curr Opin Organ Transplant*. 1999;4:58–64.
  47. Rife G, Hervé P. Regulatory (suppressor) T cells in peripheral allograft tolerance and graft-versus-host reaction. *Transplantation*. 2004;77 Suppl 1:55.
  48. Saas PH, Kleinclauss F, Tiberghien P. Immune regulation and transplantation. An exciting challenge *Transplantation*. 2004;77 Suppl 1:538–40.
  49. Schiopu A, Wood KJ. Regulatory T cells: hypes and limitations. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13:333–8.
  50. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol*. 2002;168:5558–65.
  51. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155:1151–64.
  52. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3. *Science*. 2003;1057–61.
  53. Taams L, Vukmanovic-Stejic M, Salmon M, Akbar A. Immune regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells: implications for transplantation tolerance. *Transplant Immunol*. 2003;11:277–85.
  54. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25q regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4q T helper cells. *J Exp Med*. 2002;196:255–60.
  55. Zhang GY, Hu M, Ming Wang Y, Alexander SI. FoxP3 as a marker of tolerance induction versus rejection. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009;14:40–5.
  56. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4qCD25q T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193:1303–10.
  57. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, non-proliferating CD4q T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;192:1213–22.
  58. Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant*. 2004;4:2118–25.
  59. Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7:309–19.
  60. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, et al. Direct expansion of functional CD25+CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;198:235–47.
  61. Abe M, Thomson A. Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells. *Transplant Immunol*. 2003;11:357–65.
  62. Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1999;29:2769–78.
  63. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplantation. *Am J Transplant*. 2003;3:689–96.
  64. Fung JJ. Toward tolerance: lessons learned from liver transplantation. *Liver Transpl Surg*. 1999;5 Suppl 1:S90–7.
  65. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ramos H, Zeevi A, Rudert WA, et al. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet*. 1992;340:876–7.
  66. Starzl TE. Chimerism and Tolerance in transplantation. *PNAS*. 2004;101 Suppl 2:14607–14.
  67. Wood K, Sachs DH. Chimerism and transplantation tolerance: cause and effect. *Immunol Today*. 1996;17:584–7.
  68. Pons JA, Ramirez P, Revilla-Nuin B, Pascual D, Baroja-Mazo A, Robles R, et al. Immunosuppression withdrawal improves long-term metabolic parameters, cardiovascular risk factors and renal function in liver transplant patients. *Clin transplant*. 2009;23:329–36.
  69. Orlando G, Manzia T, Baiocchi L, Sanchez-Fueyo A, Angélico M, Tisone G. The Tor vergata weaning off immunosuppression protocol in stable HCV liver transplant patients: the updated follow up at 78 months. *Transpl Immunol*. 2008;20:43–7.
  70. Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramirez P, Martínez-Alarcón L, Sánchez-Bueno F, et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation*. 2008;86:1370–8.
  71. Yoshitomi M, Koshiba T, Haga H, Li Y, Zhao X, Cheng D, et al. Requirement of protocol biopsy before and after complete cessation of immunosuppression after liver transplantation. *Transplantation*. 2009;87:606–14.
  72. Bohne F, Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Rimola A, Navasa M, Sánchez-Fueyo A. Transcriptional profiling of liver grafts in spontaneous operational tolerance [resumen] [accedido 11/2010]. Disponible en: <http://www.transplantation2010.org>.
  73. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:151–61.
  74. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med*. 2007;204:105–15.
  75. Mazariegos GV, Zahorchak A, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson A. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and nontolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transp*. 2005;5:314–22.

76. Gupta A, Kumar CA, Ningappa M, Sun Q, Higgs BW, Snyder S, et al. Elevated myeloid: plasmacytoid dendritic cell ratio associates with late, but not early, liver rejection in children induced with rabbit antihuman thymocyte globulin. *Transplantation*. 2009;88:589–94.
77. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol*. 2006;27:195–201.
78. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192:1027–34.
79. Tokita D, Mazariegos GV, Zahorchak AF, Chien N, Abe M, Raimondi G, et al. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation*. 2008;85:369–77.
80. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup>T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 2006;81:398–407.
81. Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, et al. The presence of FoxP3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation*. 2008;86:1837–43.
82. Cortesini R, Renna-Molajoni E, Cinti P, Pretagostini R, Ho E, Rossi P, et al. Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells. *Hum Immunol*. 2002;63:1010–8.
83. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a metaanalysis using an immune function assay. *Transplantation*. 2006;82:663–8.
84. Millán O, Sanchez-Fueyo A, Rimola A, Guillen D, Hidalgo S, Benitez C, et al. Is the intracellular ATP concentration of CD4<sup>+</sup>T-Cells a predictive biomarker of immune status in stable transplant recipients? *Transplantation*. 2009;88 Suppl 3:S78–84.
85. Ashokkumar C, Talukdar A, Sun Q, Higgs BW, Janosky J, Wilson P, et al. Allospecific CD154<sup>hi</sup> T cells associate with rejection risk after pediatric liver transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9:179–91.
86. Baştürk B, Karakayali F, Emiroğlu R, Sözer O, Haberal A, Bal D, et al. Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation. *Transplant Proc*. 2006;38:571–4.
87. Castellaneta A, Thomson AW, Nayyar N, De Vera M, Mazariegos GV. Monitoring the operationally liver allograft recipient. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:28–34.
88. Shapiro R, Zeevi A, Basu A, Tah HP, Kayler LK, Blisard DM, et al. Alemtuzumab preconditioning with tacrolimus monotherapy: the impact of serial monitoring for donor-specific antibody. *Transplantation*. 2008;85:1125–32.
89. Fabrega E, Unzueta MG, Cobo M, Casafont F, Amado JA, Romero FP. Value of soluble CD30 in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2007;39:2295–6.
90. Mazariegos GV, Reyes J, Webber SA, Thomson AW, Ostrowski L, Abmed M, et al. Cytokine gene polymorphisms in children successfully withdrawn from immunosuppression after liver transplantation. *Transplantation*. 2002;73:1342–5.
91. Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Association between toll-like receptor polymorphisms and the outcome of liver transplantation for chronic hepatitis C virus. *Transplantation*. 2007;84:511–6.
92. Kawasaki M, Iwasaki M, Koshiba T, Fujino M, Hara Y, Kitazawa Y, et al. Gene expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant livingdonor liver transplant recipients. *Int Surg*. 2007;92:276–86.
93. Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest*. 2008;118:2845–57.