UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Monitorización Inmunológica en Trasplante Cardiaco

Dª. Rosa María Blanco García

2013

A mis padres,

A mi marido

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados presentados en esta memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones:

✓ **Blanco-García RM**, López-Álvarez MR, Garrido IP, Salgado-Cecilia G, Campillo JA, Bolarín JM, Gimeno L, Muro M, García-Alonso AM, Martínez-Sánchez MV, Bernardo Pisa MV, Soriano-Díaz S, Pascual-Figal DA, Alvarez-López MR, Minguela A. Post-transplant increase in soluble human leukocyte antigen-G associated with non-severe cardiac allograft vasculopathy. Hum Immunol 2013, 74(3):318-324.

✓ **Blanco-García RM**, López-Álvarez MR, Garrido IP, Salgado-Cecilia G, Campillo JA, Bolarín JM, Legaz I, Muro M, García-Alonso AM, Martínez-Sánchez MV, Moral JM, Pascual-Figal DA, Alvarez-López MR, Miras M, Minguela A. CD28 and KIR2D receptors as sensors of the immune status in heart and liver transplantation. Hum Immunol 2011, 72(10):841-848.

✓ **Blanco-Garcia RM**, López-Alvarez MR, Pascual-Figal DA, Polo-Garcia L, Guerra N, Campillo JA, Muro M, Garcia-Alonso AM, Marin-Moreno I, Valdes M, Alvarez-López MR, Minguela A. Expression of HLA molecules on peripheral blood lymphocytes: a useful monitoring parameter in cardiac transplantation. Transplant Proc 2007, 39(7):2362-4.

Igualmente estos resultados han sido objeto de 5 comunicaciones a congresos nacionales y 5 comunicaciones a congresos internacionales.

<u>Nacionales:</u>

- **Blanco R**, López-Álvarez R, Pascual D, Garrido P, Botella C, Salgado G, Muro M, Garcia-Alonso AM, Álvarez-López MR, Minguela A. Soporte inmunológico en el diagnóstico de rechazo agudo en trasplante cardiaco. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. 25-30 de Mayo de 2008. Palacio de Congresos. Palma de Mallorca.

- **Blanco RM**, López-Álvarez MR, Marín-Moreno I, Bernal A, Salgado G, Campillo JA, Botella C, Muro M, García-Alonso AM, Pascual D, Álvarez-López MR, Minguela A. Expansión de células T $CD8^{+}CD28^{-}$ asociada a buena aceptación de injerto cardiaco. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. 28-31 de Marzo de 2007. Palacio de Congresos. Granada.

- **Blanco R**, López-Álvarez MR, Villar F, Marín-Moreno I, Botella C, Salgado G, Muro M, Garcia-Alonso AM, Pascual D, Álvarez-López MR, Minguela A. Expresión de CD28 y de moléculas HLA en células de sangre periférica, de utilidad en la monitorización inmunológica en trasplante cardiaco. XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. 28-31 de Marzo de 2007. Palacio de Congresos, Granada.

- **Blanco-García RM**, Pascual D., Guerra-Perez N, López -Álvarez MR, Gómez -Mateo J Marín-Moreno IM, Salgado- Cecilia G, Muro M, García-Alonso AM, Álvarez -López MR, Minguela A. Expresión de CD28 en linfocitos T de sangre periférica, útil en la monitorización inmunológica en trasplante cardiaco. 9º Congreso de la Sociedad Catalana de Trasplantes. 25-28 de febrero de 2007.

- **Blanco-García RM**, Pascual,D., Guerra-Perez N, López -Álvarez MR, Marín-Moreno IM, Gómez -Mateo J, Botella C, Muro M, García-Alonso AM, Álvarez -López MR, Minguela A. Monitorizacion inmunológica en trasplante cardiaco: expresión de moléculas HLA en células de sangre periférica. 9º Congreso de la Sociedad Catalana de Trasplantes. 25-28 de febrero de 2007.

<u>Internacionales</u>

- **Blanco-García RM**, MR López-Álvarez, B Las Heras-Ferre, S Soriano-Díaz, IP Garrido, G Salgado-Cecilia, JA Campillo, JM Bolarín, I Legaz, M Muro, MV Martínez-Sánchez, DA Pascual-Figal, MR Álvarez-López, M Miras, A Minguela. CD28 and KIR2D receptors as sensors of the immune status in heart and liver transplantation. 26^{th} European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. Liverpool, Reino Unido. 20 mayo - 3 junio de 2012.

- **Blanco-García RM**, MR López-Álvarez, C Botella, B Las Heras, S Soriano, MV Martínez-Sánchez, G Salgado-Cecilia, JA Campillo, JM Bolarín, L Gimeno, M Muro, DA Pascual-Figal, IP Garrido, MR Álvarez-López, M Miras, A Minguela. Upregulation of

soluble human leukocyte antigen-G after heart transplantation is associated with lower cardiac allograft vasculopathy. 26th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. Liverpool, Reino Unido. 20 mayo -3 junio de 2012.

- **Blanco-García RM**, López-Álvarez MR, Garrido Iris P, Bolarin JM, Legaz I, Salgado G, Las Heras B, Soriano S, Muro M, García-Alonso AM, Miras M, Pascual-Figal DA, Álvarez-López MR, Minguela A. Expression of CD28 on $CD4^+$ peripheral blood lymphocytes as a sensor for the immune-status of liver and heart graft recipients. 2nd European Congress of Immunology (ECI). Berlin, 13-16 de Septiembre 2009.

- **Blanco R**, López-Álvarez MR, Pascual D, Garrido I, Salgado G, Marín-Moreno I, Legaz I, Botella C, López-Álvarez MR, Campillo JA, Lucas D, Marin L, Gómez-Mateo J, Marín-Moreno I, Muro M, Garcia-Alonso AM, Álvarez-López MR, Minguela A. Immunology monitoring in liver and cardiac transplantation. 22st European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. 2-5 de Abril 2008. Centre Congress Pierre Boullin. Toulouse.

- **Blanco R**, López-Álvarez MR, Marín-Moreno I, Gómez-Mateo J, Salgado G, Muro M, Garcia-Alonso AM, Pascual D, Álvarez-López MR, Minguela A. Immunologic monitoring in cardiac transplantation: HLA class-I and class-II expression on peripheral blood cells. 21st European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. 5-8 de mayo de 2007. CCIB-Forum. Barcelona.

Por otro lado, en colaboración con otros grupos de investigación, aportando muestras y/o información obtenida de los pacientes incluidos en esta memoria de tesis, se han realizado las siguientes publicaciones:

✓ Pascual-Figal DA, Garrido IP, **Blanco R**, Minguela A, Lax A, Ordoñez-Llanos J, Bayes-Genis A, Valdés M, Moore SA, Januzzi JL. Soluble ST2 is a marker for acute cardiac allograft rejection. Ann Thorac Surg. 2011, 92(6):2118-2124.

✓ Muñoz-Esparza C, Garrido IP, **Blanco R**, Casas T, González-Cánovas C, Pastor-Pérez F, Peñafiel P, Minguela A, Valdés M, Pascual-Figal DA. Usefulness of high sensitivity troponin T assay in detecting acute allograft rejection after heart transplantation]. Rev Esp Cardiol. 2011, 64(12):1109-1113.

✓ Alvarez-Márquez A, Aguilera I, **Blanco RM**, Pascual D, Encarnación-Carrizosa M, Alvarez-López MR, Wichmann I, Núñez-Roldán A. Positive association of anticytoskeletal endothelial cell antibodies and cardiac allograft rejection. Hum Immunol. 2008, 69(3):143-148.

✓ Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Díaz-Peña R, Díaz-Molina B, **Blanco-García RM**, Alvarez-López MR, López-Larrea C. Post-transplant soluble MICA and MICA antibodies predict subsequent heart graft outcome. Transpl Immunol 2006, 17(1):43-46.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Igualmente se hace constar que el trabajo de Rosa María Blanco García y la parte experimental de esta memoria han sido financiados en parte por los proyectos de investigación del Fondo de Investigaciones sanitarias de la Seguridad Social (FIS), la Fundación Seneca y la Fundación para el Estudio y Desarrollo de la Inmunogenética en Murcia (FEYDIM):

- ✓ Proyecto FIS PI10/01964: Influencia de las interacciones de receptores KIR y LILRB1 y sus ligandos en el desenlace del trasplante hepático a corto y largo plazo. Papel de las patologías más representativas.
- ✓ Fundación Séneca: Beca de formación investigadora en proyectos de xenotrasplante de órganos II.
- ✓ Fundación FEYDIM.
- ✓ Red de Centros C03/03:"Estrategias para optimizar los resultados en donación y trasplante"

Agradecimientos

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A los directores de esta Tesis: El Dr. Alfredo Minguela Puras, por su ayuda, esfuerzo e incansable dedicación en la dirección de esta tesis; por todo lo que de él he aprendido. La Dra. Mª del Rocío Álvarez López, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su grupo y por su insistencia y confianza en la elaboración de esta memoria.

Al Servicio de Cardiología, en especial al Dr. Domingo Pascual y a la Dra. Iris Garrido, por su desinteresada colaboración en la aportación de muestras y datos clínicos de los pacientes incluidos en esta memoria.

Al Dr. Pedro Aparicio Alonso, por su ayuda como tutor de esta Tesis.

A los doctores José Antonio Campillo, Manuel Muro, Mª Rosa Moya, Pedro y Ana Mª García Alonso, por sus enseñanzas y apoyo. A José Miguel Alemany, Mª Carmen García Calatayud y Mª José Sanchís por la extracción de las muestras de pacientes. En general, a todo el personal del Servicio de Inmunología, en especial a Pepe, Toñi y Flori, por su colaboración profesional y por los gratos momentos que hemos pasado juntos.

A mis compañeros de investigación, que de una u otra forma han colaborado en que esta Tesis haya sido posible: A Rocío López-Álvarez e Isabel Marín porque con ellas inicié este camino y me enseñaron el procesamiento y marcaje de las muestras. Gracias Rocío por haberme facilitado los datos de trasplante hepático, que han permitido comparar los resultados con los datos de trasplante cardiaco de esta memoria. A Gema, Vicky, Isa Légaz, Bea, Sandra, Guadalupe y Ania. A José Miguel Bolarín, por haberme ayudado con la estadística aquellas tardes de agobio. Por los buenos momentos que hemos compartido.

A mis compañeros y amigos, Victoria, Estefanía, Lourdes, Jorge y Nati, por su infinita ayuda tanto profesional como personal. Por aquellas horas de conversación. De ellos me queda un gran recuerdo y una bonita amistad. Gracias por vuestro apoyo.

A mis padres, Juan y Mª Carmen, por su infinito sacrificio, confianza y apoyo en todas mis decisiones. Por haberme brindado la oportunidad de tener la mejor educación. No existen palabras para decir todo lo que os debo. A mi hermanos, Belén y Cesar, por apoyarme en esta andadura y tener siempre confianza en mí. A mis cuñados, por formar parte de esta familia. A mis sobrinos: Paula, Daniela, José Antonio, Julia, Víctor y a mi suegro Pepe, que también han aportado su granito de arena.

En especial, a los que se fueron demasiado pronto: A mi abuela Anselma, a mi primo José Antonio y a mi suegra Pili que sin su ayuda y apoyo no hubiese llegado este momento.

A mis amigas de siempre: Rosi, Charo y Paqui, porque nuestra amistad perdure. A Mónica y Ascen, por los buenos recuerdos, por la espera de tener un hueco para un café, gracias por vuestro ánimo y comprensión. A mi vecina y amiga Toli, por su confianza en mis posibilidades.

Sobre todo, a mi marido Joso, por haberle robado el tiempo empleado los fines de semana y noches dedicados a esta memoria; por su comprensión y paciencia en esos momentos. Gracias por no separarte de mí.

Esta tesis no hubiera sido posible sin la amabilidad y disponibilidad para la toma de muestras de los enfermos. Muchas gracias.

Espero no olvidar a nadie, de corazón, muchas gracias por todo y a todos.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

AcMo: Anticuerpo monoclonal

CPA: Célula presentadora de antígeno

APC: Aloficocianina

BCR: Receptor específico de antígeno de células B (del inglés, *B cell receptor*).

CAV: Vasculopatía del aloinjerto cardiaco (del inglés, *cardiac allograft vasculopathy*)

CD: Cluster de diferenciación

CI: Cardiopatía isquémica

CMV: Citomegalovirus

CNI: Cardiopatía no isquémica

CsA: Ciclosporina A

CTLA-4: Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (del inglés, *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*)

EVI: Enfermedad vascular del injerto

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FSC: Medida proporcional al tamaño celular (del inglés, *Forward Scatter*)

HLA: Antígeno leucocitario humano (del inglés, *human leukocyte antigens*)

ICOS: Coestimulador inducible (del inglés, *inducible costimulator*)

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

IL-2R: Receptor de IL-2

ILT: Receptores pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas (del inglés, *Immunoglobulin-like transcript*)

IMF: Intensidad media de fluorescencia

InfNo-CMV: Pacientes con infecciones diferentes a CMV

ISHLT: Sociedad internacional de trasplante de corazón y pulmón (del inglés, *International Society for Heart and Lung Transplantation*)

ITAM: Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif*)

ITIM: Motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*)

iTreg: Células T reguladoras inducidas

IVUS: Ultrasonido intravascular (del inglés, *intravascular ultrasound*)

KIR: Receptores de células NK pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas (del inglés, *Killer immunoglobulin-like receptor*)

MCDi: Miocardiopatía dilatada

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *mayor histocompatibility complex*)

MIC: Cadena relacionada con MHC de clase I (del inglés, *MHC class I Chain-related)*

MMF: Micofenolato de mofetilo

NCR: Receptor de citotoxicidad natural (del inglés, *natural citotoxicidad receptor*)

NF-kB: Factor nuclear kappa B (del inglés, *nuclear factor kappa B*)

NK: Célula asesina natural (del inglés, *, Natural Killer*)

NoInf: Pacientes sin infecciones

NRA: No rechazo agudo

nTreg: Células T reguladoras naturales

PE: Ficoeritrina

PerCP: Proteína clorofila peridrina

RA: Rechazo agudo

SSC: Medida proporcional a la complejidad de la estructura interna de la célula (del inglés, *Side Scatter*)

TCR: Receptor de la célula T para antígeno (del inglés, *T cell receptor*)

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, *Transforming Growth Factor beta*)

Th: Linfocito T colaborador (del inglés, *T helper*)

TLR: Receptores de tipo Toll (del inglés, *Toll-like receptor)*

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*)

Treg: Linfocito T regulador

Ts: Linfocito T supresor

ULBP: Proteína de unión a UL-16 (del inglés, *UL-16 Binding Protein)*

VEB: Virus de Epstein-Barr

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Índice

INTRODUCCIÓN 1

1. HISTORIA DEL TRASPLANTE CARDIACO 1

2. HISTOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL CORAZÓN 2

3. INDICACIÓN DEL TRASPLANTE CARDIACO ORTOTÓPICO 4

4. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR 7

5. COMPLICACIONES POST-TRASPLANTE CARDIACO 12

5.1. El rechazo inmunológico del injerto 13

5.2. Infecciones 19

6. RESPUESTA INMUNITARIA EN TRASPLANTE CARDIACO 21

6.1. El complejo mayor de histocompatibilidad 22

6.1.1. Características estructurales y funcionales de las moléculas HLA clase I y clase II 24

6.1.2. Papel de la compatibilidad HLA en trasplante cardiaco 26

6.1.3. Moléculas no clásicas: HLA-G y HLA-G soluble 27

6.1.4. Molécula relacionada con el MHC: MICA y MICA soluble 30

6.2. Reconocimiento alogénico 31

6.3. Células de la respuesta inmunitaria 35

6.3.1. Células presentadoras de antígeno 36

6.3.2. Células efectoras 38

6.3.2.1. Células NK y receptores KIR 38

6.3.2.2. Linfocitos B 41

6.3.2.3. Linfocitos T 42

6.3.2.4. Moléculas coestimuladoras 46

6.3.3. Células reguladoras 49

6.3.3.1. Linfocitos T reguladores $CD4^+$ 49

6.3.3.2. Linfocitos T supresores $CD8^+$ (Ts) 50

6.4. Factores solubles que regulan la respuesta alogénica 51

6.4.1. Citoquinas 51

6.4.2. Quimioquinas 55

6.4.3. Citoquinas y quimioquinas en trasplante cardiaco 56

7. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA E INMUNOREGULACIÓN 58

7.1. Tolerancia central 59

7.2. Tolerancia periférica 59

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 61

MATERIAL Y MÉTODOS 63

1. METODOLOGÍA DEL TRASPLANTE DE CORAZÓN 63

1.1. Técnica quirúrgica 63

1.2. Seguimiento clínico post-trasplante 63

1.3. Terapia inmunosupresora y anti-rechazo 64

1.3.1. Tratamiento de inducción 64

1.3.2. Tratamiento de mantenimiento 64

1.3.3. Tratamiento del rechazo 65

1.4. Diagnóstico de rechazo agudo 66

1.5. Control y prevención de infecciones 66

2. GRUPOS DE ESTUDIO: PACIENTES Y CONTROLES..... 67

3. PROTOCOLO DE MONITORIZACIÓN INMUNOLÓGICA..... 70

4. CITOMETRÍA DE FLUJO 71
4.1. Anticuerpos monoclonales 71
4.2. Poblaciones celulares y moléculas monitorizadas 72
4.3. Protocolo de tinción por inmunofluorescencia directa 72
4.4. Estandarización del citómetro de flujo..... 74
4.5. Sistemática de adquisición y análisis..... 75
4.6. Cálculo de los porcentajes de las subpoblaciones celulares y de la IMF..... 75
4.6.1. Identificación de las poblaciones celulares de sangre periférica..... 75
4.6.2. Cálculo del porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica 75
4.6.3. Estimación de la IMF..... 76
4.7. Cálculo del número absoluto de las subpoblaciones celulares 79

5. CUANTIFICACIÓN DE HLA-G EN SUERO 79

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 81

RESULTADOS..... 83

1. DATOS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS EN RECEPTORES CARDIACOS..... 83
1.1. Características demográficas y clínicas de la población trasplantada y su relación con el desarrollo de RA y CAV 83
1.2. Infecciones..... 84
1.3. Rechazo agudo y niveles de CsA en sangre periférica 85

2. POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA EN EL PRE-TRASPLANTE CARDIACO 86
2.1. Poblaciones leucocitarias generales..... 87
2.1.1. Leucocitos..... 87
2.1.2. Monocitos 88
2.1.3. Granulocitos neutrófilos 89
2.1.4. Linfocitos totales 89
2.2. Linfocitos B ($CD19^+$) 93
2.3. Linfocitos T ($CD3^+$) 93
2.3.1. Linfocitos T $CD4^+$ 96
2.3.1.1. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD4^+CD28^+$ 96
2.3.1.2. Niveles de expresión de CD28 en la membrana de linfocitos T $CD4^+$ (IMF) 96
2.3.1.3. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD4^+CD28^-$..... 99
2.3.2. Linfocitos T $CD8^+$ 101
2.3.2.1. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD8^+CD28^+$ 101
2.3.2.2. Expresión de CD28 en linfocitos T $CD8^+$ 101
2.3.2.3. Linfocitos T $CD8^+CD28^-$..... 104
2.4. Células NK 107

3. POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA EN EL POST-TRASPLANTE 109
3.1. Poblaciones leucocitarias generales..... 109

3.1.1. Leucocitos..... 109
3.1.2. Monocitos 110
3.1.2.1. Valores porcentuales y absolutos de monocitos..... 110
3.1.2.2. Expresión de CD80, CD86 y CD95 sobre Monocitos 112
3.1.3. Granulocitos neutrófilos 114
3.1.4. Linfocitos totales 115
3.2. Linfocitos B ($CD19^+$) 118
3.2.1. Valores porcentuales y absolutos de Linfocitos B..... 118
3.2.2. Expresión de CD80 y CD86 sobre Linfocitos B..... 120
3.2.3. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos B $CD80^+$ y $CD86^+$ 121
3.3. Linfocitos T ($CD3^+$) 125
3.3.1. Linfocitos T totales..... 125
3.3.1.1. Expresión de CD95 en linfocitos T 125
3.3.1.2. Expresión de CD80 y CD86 en linfocitos T..... 128
3.3.2. Linfocitos T $CD4^+$ 133
3.3.2.1. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD4^+CD28^+$ 134
3.3.2.2. Expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ 134
3.3.2.3. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD4^+CD28^-$ 135
3.3.3. Linfocitos T $CD8^+$ 140
3.3.3.1 Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD8^+CD28^+$ 140
3.3.3.2. Intensidad de expresión de CD28 en linfocitos T $CD8^+$ 143
3.3.3.3. Linfocitos T $CD8^+CD28^-$ 143
3.3.4. Linfocitos T $CD8^+$ que expresan receptores KIR2D..... 146
3.3.4.1. Linfocitos T $CD8^+CD158a/h^+$ 146
3.3.4.2. Linfocitos T $CD8^+$ $CD158b/j^+$ 146
3.4. Células NK ($CD3^-CD56^+$)..... 150
3.4.1. Células NK $CD3^-$ $CD158a/h^+$ 150
3.4.2. Células NK $CD3^-CD158b/j^+$ 150

4. CD28 Y RECEPTORES KIR2D COMO SENSORES DEL ESTADO INMUNE EN TRASPLANTE CARDIACO Y HEPÁTICO..... 154
4.1. Expresión diferencial de CD28 en linfocitos T de sangre periférica en receptores que sufren o no rechazo agudo celular 154
4.2. La infección por CMV y no otras infecciones bloqueó el aumento de CD28 asociado a los episodios de rechazo agudo 155
4.3. El aumento de la expresión de CD28 post-trasplante se relaciona directamente con la aparición de episodios de rechazo agudo..... 158
4.4. La expansión de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-KIR2D^+$ asociada a una mejor aceptación del trasplante, no se observó en receptores infectados por CMV 161

5. NIVELES SÉRICOS DE HLA-G EN TRASPLANTE CARDIACO Y SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN POR CMV Y EL DESARROLLO DE CAV..... 164
5.1. Incremento post-trasplante de HLA-G soluble detectado específicamente en receptores con CAV no severo..... 164
5.2. Perfiles de células T tolerogénicas asociados a CAV no severo y a un aumento de sHLA-G 167
5.3. La reactivación de CMV se asocia con una mayor expresión de CD86 en monocitos de sangre periférica 169

DISCUSIÓN 170

1. RECHAZO E INFECCIONES EN TRASPLANTE CARDIACO 170

2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DEL ESTADO INMUNITARIO EN RECEPTORES DE TRASPLANTE CARDIACO..... 172

2.1. Utilidad clínica de la monitorización inmunológica pre-trasplante..... 173

2.2. Monitorización de las poblaciones leucocitarias durante el primer año post-trasplante: relación con la aceptación del injerto y las infecciones. 176

2.2.1. Expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en linfocitos . 178

2.2.1.1. El aumento en la expresión de CD28 en linfocitos T se asocia al rechazo agudo 179

2.2.1.2. La expansión de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-KIR2D^+$ se asocia a una mejor aceptación del injerto cardiaco y hepático. 180

3. NIVELES POST-TRASPLANTE ELEVADOS DE sHLA-G MEJORAN LA ACEPTACIÓN DEL INJERTO CARDIACO 183

CONCLUSIONES 187

BIBLIOGRAFÍA 189

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. HISTORIA DEL TRASPLANTE CARDIACO

El trasplante cardiaco ortotópico constituye desde principio de los años 80 una alternativa terapéutica aceptada para el tratamiento de los pacientes con cardiopatías en estadio avanzado de diversas etiologías. Actualmente se ha consolidado como la principal opción terapéutica para el paciente con insuficiencia cardiaca terminal, ya que es capaz de conseguir un beneficio pronóstico muy importante.

Fueron los trabajos de experimentación animal del cirujano Alexis Carrel los que a principios del siglo XX abrieron la puerta al transplante de diversos órganos, entre ellos el corazón. Carrel en la Universidad de Chicago desarrolló las suturas vasculares y realizó el primer transplante heterotópico cardiaco y combinado de corazón y pulmón en el perro (Carrel y Guthrie, 1905; Carrel, 1907). Con estos trabajos obtuvo el premio Nobel.

La mejora de las técnicas quirúrgicas en los años 50 realizadas por los cirujanos Lower y Shumway en la Universidad de Stanford, posibilitaron la realización del trasplante cardiaco ortotópico.

En 1967 Christian Barnard realizó el primer trasplante cardiaco ortotópico en humanos. El receptor falleció a los 18 días por neumonía por Pseudomonas, pero la intervención supuso un hito histórico en el ámbito de la cirugía cardiaca y la trasplantología. Un mes después, en la misma institución se realizó otro trasplante; el receptor sobrevivió un año y medio y falleció de rechazo crónico (Barnard, 1967).

En la década de los setenta, una aportación a destacar en el diagnóstico del rechazo, fue realizada por P. Caves de la Universidad de Stanford que desarrolló el instrumento (biotomo), con el que realizar biopsias endomiocárdicas y por Margaret Billinghan, de la misma Universidad, que describió un sistema histológico para clasificar el rechazo (Caves y cols., 1974).

Fue la introducción en 1982 de la ciclosporina como tratamiento inmunosupresor lo que permitió alcanzar unas tasas de supervivencia post-trasplante que posibilitaron su aceptación como opción terapéutica en el paciente con insuficiencia cardiaca terminal, al reducir drásticamente la incidencia de rechazo agudo (Borel, 1982; Kahan, 1989).

En España el primer trasplante cardiaco se realizó el 18 de Septiembre de 1968 en la Residencia Sanitaria La Paz de Madrid por el Dr. Martínez-Bordiú, aunque el enfermo falleció a las pocas horas. En 1984 se realizó el primer trasplante cardiaco con éxito en el hospital de Santa Creu I San Pau de Barcelona por los Doctores Caralps y Harris (Figuera, 1995). El 8 de mayo de 1984, los cirujanos Josep María Caralps y Josep Oriol Boní realizaron en el Hospital San Pablo de Barcelona esta intervención con resultados positivos.

2. HISTOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL CORAZÓN

El corazón es la bomba que mantiene la circulación de la sangre a través de las arterias, capilares y venas (Valerie, 2007). Es un órgano relativamente pequeño, aproximadamente del mismo tamaño que un puño cerrado. Mide alrededor de 12 cm de largo, 9 cm en su punto más ancho y 6 cm de espesor, con un peso promedio de 250 y 300 gramos en mujeres y hombres adultos, respectivamente. El corazón descansa sobre el diafragma, cerca de la línea media de la cavidad torácica. Yace en el mediastino, una masa de tejido que se extiende desde el esternón hasta la columna vertebral, entre los pulmones.

El pericardio es una membrana que rodea y protege al corazón, mantiene al corazón en su posición en el mediastino y, a la vez, otorga suficiente libertad de movimientos para la contracción rápida y vigorosa (Figura 1). El corazón tiene cuatro cámaras: las dos superiores son las aurículas (atrios) y las dos inferiores los ventrículos (figura 2). La aurícula derecha recibe sangre de tres venas: la vena cava superior, la vena cava inferior y el seno coronario. Entre la aurícula derecha y la izquierda se encuentra un tabique delgado, denominado Septum ó tabique interauricular. La sangre pasa de la aurícula derecha hacia el ventrículo derecho a través de la válvula tricúspide. El ventrículo derecho forma la mayor parte de la cara anterior del corazón y está separado del ventrículo izquierdo por el tabique interventricular. La sangre pasa desde el ventrículo derecho, a través de la válvula pulmonar, hacia una gran arteria, llamada tronco pulmonar, que se divide en las arterias pulmonares derecha e izquierda. La aurícula izquierda forma la mayor parte de la base del corazón que recibe sangre proveniente de los pulmones a través de cuatro venas pulmonares. A través de la válvula mitral, la sangre pasa desde la aurícula izquierda al ventrículo izquierdo, este

forma el vértice ó ápex del corazón. La sangre pasa desde el ventrículo izquierdo a través de la válvula aórtica hacia la aorta ascendente y, de ahí, a todo el organismo. Parte de la sangre de la aorta ascendente se dirige hacia las arterias coronarias (Tortora y Derrickson, 2006).

El miocardio, tejido muscular cardiaco, genera la fuerza de contracción de las aurículas y los ventrículos. Está compuesto por células musculares cardíacas denominadas miocitos, células ramificadas que presentan un único núcleo y contienen abundantes mitocondrias. La acción de bombeo normal del corazón depende de la contracción sincronizada de todas las células cardíacas (Ward y cols., 2005).

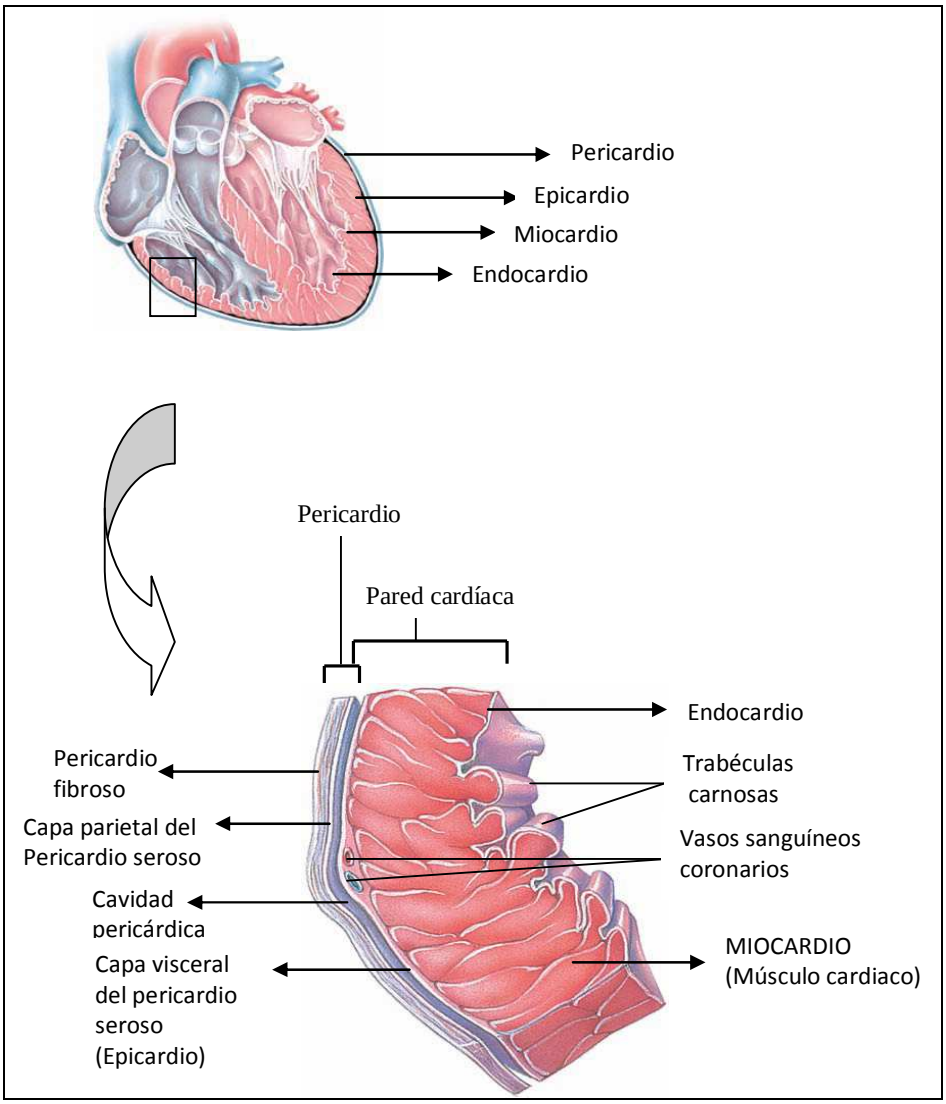

Figura 1. *Esquema de las divisiones del pericardio y las capas de la pared cardíaca del ventrículo derecho* (Tomada y modificada de Gerard J. Tortora y Bryan H. Derrickson, 11ª edición (Principios de anatomía y fisiología, 2006) y 12ª edición (principles of anatomy and physiology, 2008).

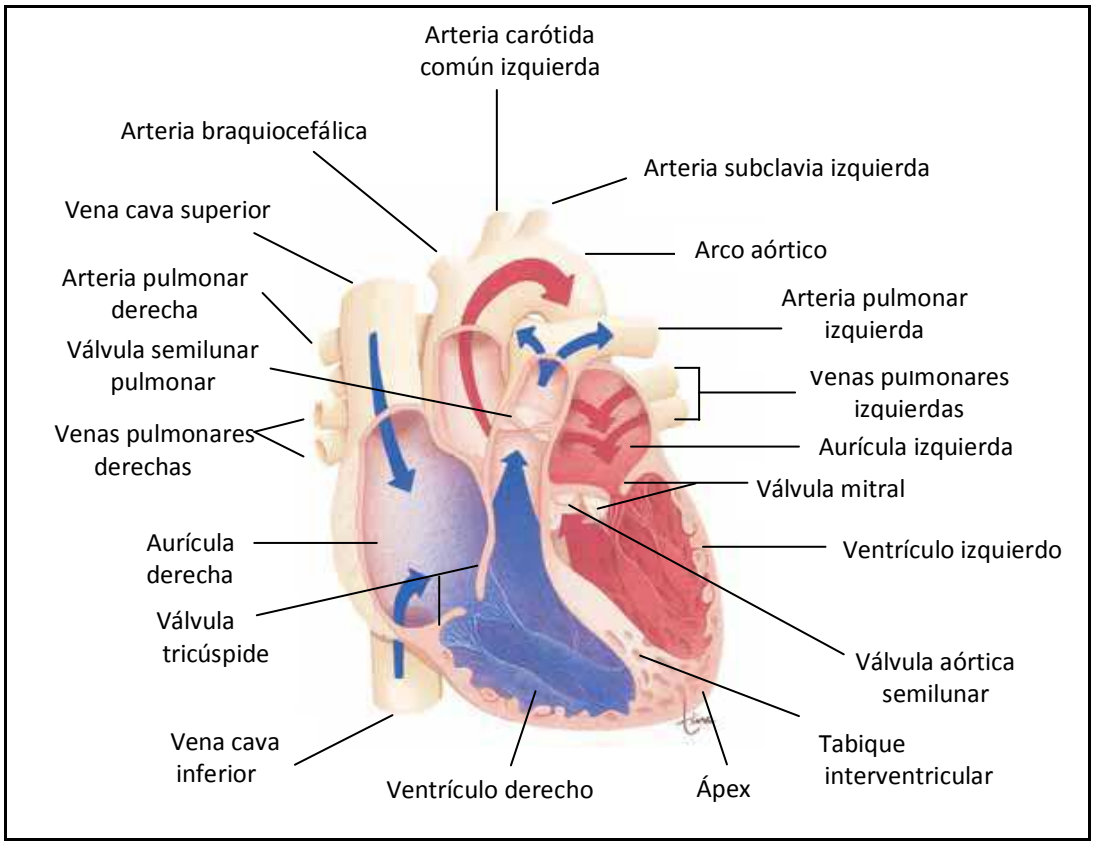

Figura 2. *Vista anterior de un corte frontal del corazón que muestra las estructuras internas* (tomada y modificada de Scanlon y Sanders, 2006).

3. INDICACIÓN DEL TRASPLANTE CARDIACO ORTOTÓPICO

El trasplante cardiaco ortotópico es considerado actualmente como el tratamiento de elección en la insuficiencia cardíaca terminal refractaria a tratamiento médico o quirúrgico. Debido a factores como la mayor esperanza de vida de la población y el manejo más eficaz de los síndromes coronarios agudos, cada vez hay un número mayor de personas que padecen fallo cardiaco. El problema está en que aún no es posible ofrecer esta modalidad terapéutica a todos los pacientes que la requieren, por consiguiente, se hace necesario optimizar los resultados del trasplante cardiaco mediante la selección de pacientes, la selección y manejo de donantes, el manejo perioperatorio y el control del rechazo del injerto.

En la mayoría de los casos, la indicación de trasplante es la miocardiopatía dilatada ó cardiopatía isquémica en fase dilatada con mala función ventricular; menos frecuente es la indicación por miocardiopatía hipertrófica, cardiopatías valvulares, cardiopatías congénitas, retrasplante, shock cardiogénico y miocarditis. En la figura 3,

se representan los porcentajes de las distintas patologías que indicaron el trasplante según el último informe del registro español de trasplante cardiaco (1984-2010).

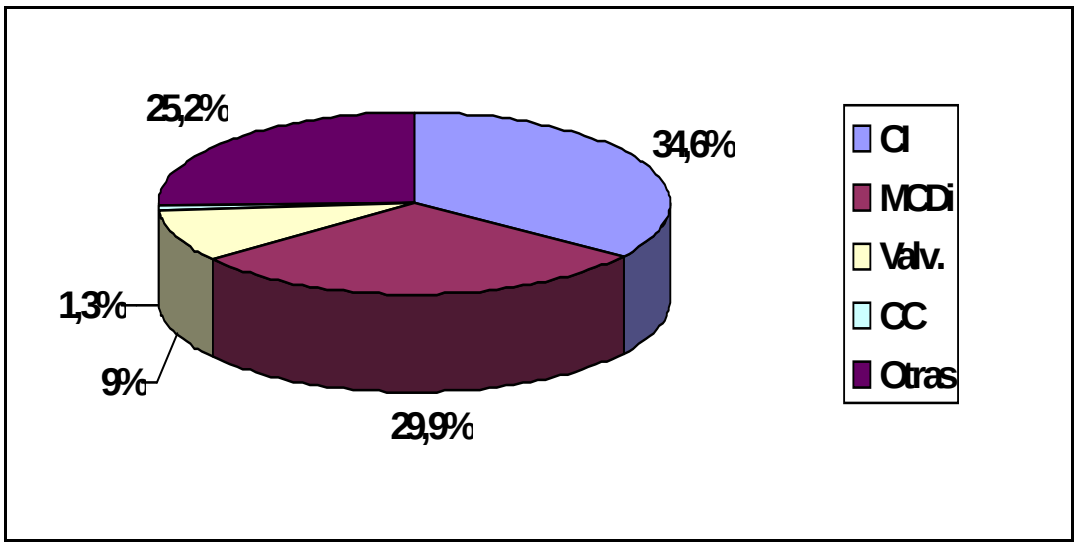

Figura 3. *Indicaciones de trasplante cardiaco en pacientes adultos (≥ 16 años*). CI: Cardiopatía isquémica; MCDi: Miocardiopatía dilatada; Valv.: Valvulopatía; CC: Cardiopatía congénita. Datos del registro nacional de trasplante cardiaco (1984-2010).

Las miocardiopatías se definen como el conjunto de enfermedades del miocardio que causan una mala función del mismo, y se clasifican en: miocardiopatía dilatada, hipertrófica, restrictiva, arritmogénica ventricular izquierda y las denominadas miocardiopatías específicas que incluyen la miocardiopatía isquémica, valvular y miocardiopatía inflamatoria ó miocarditis, entre otras (Richardson y cols., 1996).

El concepto de cardiopatía isquémica incluye una serie de alteraciones que tienen lugar en el miocardio como consecuencia de un aporte insuficiente de sangre por parte de las arterias coronarias. Su principal causa es la aterosclerosis ó estrechamiento de las arterias coronarias por la acumulación de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias, dando lugar a la denominada placa de ateroma (Stary y cols., 1995). Puede manifestarse de diversas formas: angina estable, angina inestable, infarto agudo de miocardio y muerte súbita. Se ha descrito que la etiología isquémica que motivó el trasplante puede favorecer el desarrollo posterior del rechazo crónico (Lindelow y col., 1999; Sharples y cols., 2003; Taylor y cols., 2009; Yamani y cols., 2002).

La miocardiopatía dilatada (MCDi) es causa frecuente de insuficiencia cardiaca. En la mayoría de los casos es de origen idiopático y es la principal causa de trasplante cardiaco. Desde el punto de vista clínico, se caracteriza por la dilatación y disfunción contráctil del ventrículo izquierdo o de ambos ventrículos. A nivel histológico, es típica la presencia de miocitos hipertróficos y muertos, sustituidos por fibrosis. Puede ser idiopática, genética/familiar, viral y/o inmune, alcohólica/tóxica o asociada a otras cardiopatías.

Los pacientes con MCDi idiopática presentan mayor frecuencia de antígenos HLA (del inglés, *human leukocyte antigens*) clase II de tipo HLA-DR4, Dqw4 o ambos (Carlquist JF y cols., 1991), que implicaría una predisposición al desarrollo de la enfermedad. También se ha relacionado con una disminución en la actividad de las células NK (del inglés, *Natural Killer*) (Anderson y cols., 1982) y linfocitos T supresores (Eckstein y cols., 1982), así como con el aumento en la activación de linfocitos T citotóxicos (Gerli y cols., 1986). Aunque se ha detectado la presencia de autoanticuerpos capaces de afectar o destruir los miocitos, se desconoce si estos intervienen directamente en la patogenia o son productos secundarios de las lesiones miocárdicas. A pesar de la aparente relación de la MCDi con el sistema inmunitario, hasta donde conocemos, no se ha investigado su relación con la posterior evolución del injerto y la aparición de la vasculopatía del aloinjerto cardiaco.

La miocardiopatía inflamatoria ó miocarditis es una causa importante de insuficiencia cardiaca en fase terminal y es responsable de hasta casi un 10% de los casos de MCDi idiopática. Se trata de un proceso inflamatorio que afecta al miocardio en respuesta a la acción de diversos agentes infecciosos, toxinas ó mediada inmunológicamente (Kishimoto y Hiraoka, 1994; Theleman y cols., 2001; Brady y cols., 2004). La etiología viral es la causa más frecuente, destacando el grupo de los enterovirus *Coxsackie* A y B. La evolución más frecuente es la recuperación espontánea, sin embargo, en su fase aguda puede ocasionalmente dar lugar a muerte súbita, presentando un patrón histopatológico caracterizado por infiltración intersticial de linfocitos, daño celular y edema intersticial. Aunque la ausencia de células inflamatorias se utiliza como criterio para diferenciar la MCDi de la miocarditis, en algunos casos de MCDi se detectan células T inflamatorias y células endoteliales

activadas, sugiriendo la posible contribución de un proceso inflamatorio crónico en la patogenia de MCDi (Mestroni y cols., 1999).

La indicación de trasplante cardiaco en pacientes con miocarditis ha sido cuestionada, ya que se ha asociado a un mayor riesgo postrasplante de rechazo y mortalidad precoz en comparación con otras patologías (O'Connell y cols., 1990; Höyer y cols., 1990).

4. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR

La inmunosupresión tiene como objetivo conseguir, con la menor toxicidad posible, una reducción de la respuesta inmunitaria que permita la aceptación del injerto cardiaco, preservando la función cardiaca y la supervivencia del paciente. La administración de fármacos inmunosupresores en estos pacientes comprende tres situaciones: tratamiento de inducción, tratamiento de mantenimiento y tratamiento antirrechazo.

✓ Tratamiento de inducción

El tratamiento de inducción incluye la potente inmunosupresión inicial en UCI a las pocas horas del trasplante. El beneficio demostrado de este tratamiento es la reducción de los episodios de rechazo agudo, sin comprometer la función renal, permitiendo retrasar la introducción de los inhibidores de la calcineurina y su nefrotoxicidad.

Tradicionalmente, la terapia de inducción en el trasplante cardiaco incluía el anticuerpo monoclonal OKT3, el primer anticuerpo monoclonal aceptado por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) para uso terapéutico en humanos e introducido en la práctica clínica por Cosimi en 1981. Es un anticuerpo de origen murino que se corresponde con una inmunoglobulina de tipo IgG2a, y actúa uniéndose a la subunidad CD3 del TCR (del inglés, *T cell receptor*) (Figura 4), provocando la desactivación del linfocito T maduro y la posterior endocitosis del receptor de los linfocitos T (Ruiz Cabello y cols., 2003; González-Molina y Alonso, 2005).

Hoy en día en la mayoría de los centros, entre los que se incluye nuestro hospital, se emplean dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de la interleuquina-2 (IL-2): daclizumab y basiliximab. Ambos han mostrado ser eficaces al

reducir los episodios de rechazo agudo, aunque presentan una serie de desventajas: 1) aumento del riesgo de infección (por tanto, de fundamental importancia el mantenimiento de las medidas de aislamiento); 2) aumento de la incidencia de neoplasias; y 3) su elevado coste. Daclizumab y basiliximab se unen específicamente a la subunidad α del receptor de IL-2 de la superficie de los linfocitos T activados, inhibiendo así la activación y proliferación de linfocitos T, una vía determinante en la respuesta inmunitaria de rechazo del injerto (figura 4).

- ✓ **Tratamiento de mantenimiento**

El tratamiento de mantenimiento consiste en una triple terapia farmacológica con glucocorticoides, micofenolato de mofetilo (MMF) y un inhibidor de la calcineurina (ciclosporina A (CsA) o tacrolimus).

Glucocorticoides:

Existen varios mecanismos moleculares de acción a través de los cuales los glucocorticoides pueden actuar suprimiendo las reacciones inmunitarias e inflamatorias. Es de destacar el efecto inhibidor que ejercen sobre el factor de transcripción NF-kB (del inglés, *nuclear factor kappa B*) (Akira y Kishimoto, 1997). Se sabe que en ciertos tipos celulares los glucocorticoides son capaces de inducir la síntesis de IkBα (Sheinman y cols., 1995 (a); Auphan y cols., 1995); como consecuencia, el factor NF-kB queda retenido en el citosol tras la interacción con dicho inhibidor. Otra posibilidad que opera en algunos tipos celulares, consiste en la interacción proteína-proteína entre el receptor activado de los glucocorticoides y el factor NF-kB localizado en el núcleo celular (Figura 4), que resulta inactivado (Sheinman y cols. (b), 1995). Además, los glucocorticoides tienen un efecto inmunosupresor generalizado, pues inhiben la síntesis y secreción de factores quimiotácticos y de agentes vasodilatadores, impidiendo la redistribución de los linfocitos al tejido linfático (Ruiz Cabello y cols., 2003; González-Molina y Alonso, 2005).

Los glucocorticoides tienen múltiples efectos secundarios perjudiciales en la calidad de vida de los pacientes y aceleran la progresión del rechazo crónico. Pese a ello, continúan formando parte de todos los regímenes de inmunosupresión en el

trasplante cardiaco, aunque muchos equipos de trasplante intentan retirarlos más ó menos precozmente tras el trasplante (Almenar y cols., 2010).

Agentes antiproliferativos

Dentro de este grupo se encuentra el MMF y la azatioprina. En nuestro centro, de forma habitual, se utiliza MMF, que es sustituido por azatioprina cuando existe intolerancia digestiva.

La azatioprina fue el primer inmunosupresor antiproliferativo utilizado en trasplante de órganos sólidos y, posteriormente, fue sustituida por el MMF, que conllevó mayor supervivencia en un estudio aleatorizado (Kobashigawa y cols., 1998). La Azatioprina actúa bloqueando la proliferación de los linfocitos tras estímulo antigénico al interferir la síntesis de DNA (Pascual, 2004; González-Molina y Alonso, 2005) (figura 4).

El MMF actúa como profármaco hasta que se convierte en ácido micofenólico por un proceso de desesterificación llevado a cabo en el estómago, intestino delgado y probablemente en el hígado. Circula en el plasma unido a la albúmina y su biodisponibilidad es del 94%. Produce la inhibición selectiva, no competitiva y reversible, de la enzima inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) en la vía *de novo* de síntesis de purinas. La mayoría de las células utilizan las dos vías de síntesis de las purinas, pero los linfocitos y monocitos usan la vía *de novo* y ello le confiere al ácido micofenólico un carácter inmunosupresor selectivo. En resumen, inhibe la proliferación y expansión clonal de los linfocitos T y B y de monocitos. Además inhibe la expresión de moléculas de adhesión en los linfocitos, afectando su unión a las células endoteliales (Pascual, 2004; González-Molina y Alonso, 2005).

La mayor potencia inmunosupresora del MMF respecto a la azatioprina ha permitido reducir las dosis de los inhibidores de la calcineurina en pacientes con insuficiencia renal (Angermann y cols., 2004; Groetzner y cols., 2004). También se ha observado un papel protector del MMF frente a la azatioprina en cuanto al rechazo crónico diagnosticado por ecografía intravascular (Pethig y cols., 2004).

Inhibidores de la calcineurina

La CsA es un polipéptido cíclico de 11 aminoácidos que se aisló del hongo *Tolipocladium inflatum* y posee efectos supresores sobre la respuesta inmunitaria humoral y mediada por células (Suthanthiran y Strom, 1998). Se une con alta afinidad a una familia de proteínas citoplasmáticas presentes en la mayoría de las células, conocida como ciclofilinas. El complejo heterodímero droga-receptor, se une específica y competitivamente a la calcineurina (una fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina) inhibiendo su actividad (Wiederrecht y cols., 1993). Este proceso impide la translocación del factor de transcripción NF-AT (figura 4), lo que conduce a una reducción en la transcripción de genes de citoquinas, importantes en las etapas tempranas de la respuesta inmunitaria (Timmerman y cols., 1996).

Tacrolimus es un antibiótico macrólido obtenido de un hongo del suelo, *Streptomyces tsukubaensis*. Tacrólimus se une a una familia de proteínas denominadas proteínas de ligamiento de FK506 (FKBP, del inglés, *FK506-binding proteins*), donde la proteína mayoritaria es una proteína de 12 kDa (FKBP12) (Fretz y cols., 1991). Como CsA, el complejo formado por tacrólimus y su receptor se une a calcineurina, por lo que comparten mecanismo de acción (figura 4).

Entre los efectos adversos que comparten los anticalcineurinicos el más importante es la nefrotoxicidad. En trasplante cardiaco se ha demostrado que tacrólimus es más eficaz que CsA. Aunque ambos presentan un perfil de toxicidad similar, tacrólimus es más diabetogénico pero muestra menor incidencia de hipertensión y dislipidemia tras el trasplante (Keogh, 2004; McCormack y Keating, 2006).

Otras pautas de inmunosupresión de mantenimiento

En este grupo se incluyen a los inhibidores de la señal de transducción de factores de crecimiento (inhibidores de la proteína mTOR) como son sirólimus o rapamicina y everólimus.

Sirólimus, es un macrólido lipofílico de estructura química similar a tacrólimus que se aisla del hongo *Streptomyces hygroscopicus*. Everólimus se obtiene modificando la estructura química de sirólimus tras la inclusión de un grupo hidroxilo en la posición 40, aumentando la solubilidad en solventes orgánicos y excipientes galénicos y

reduciendo dos ó tres veces la afinidad de unión a su receptor citosólico, inmunofilina FKBP12. Ambos fármacos cuando se unen a FKBP12, forman un complejo capaz de inhibir a una quinasa citosólica denominada mTOR bloqueando así el ciclo celular en la fase G1 (figura 4) (Pascual, 2004; González- Molina y Alonso Ortiz, 2005).

La introducción de everólimus y sirólimus han contribuido en gran medida a la prevención del rechazo crónico, demostrándose que comparados con azatioprina reducen significativamente el crecimiento intimal en pacientes tratados en combinación con CsA y esteroides (Eisen y col., 2003; Keogh y cols., 2004).

Everólimus y sirólimus pueden sustituir tanto a los inhibidores de la calcineurina, como a los agentes antiproliferativos. En ocasiones en las que interese disminuir al máximo la inmunosupresión (neoplasias), se puede usar en monoterapia con esteroides.

- ✓ **Tratamiento antirrechazo**

Los episodios de rechazo celular agudo con evidencia histológica se tratan con bolos de esteroides (metilprednisolona) (las dosis se detallan en el apartado de material y métodos de esta memoria). Igualmente, se aplica tratamiento antirrechazo ante la existencia de hallazgos clínicos de rechazo celular agudo, como disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), incluso aunque la biopsia endomiocardica no presente evidencias histológicas de rechazo agudo celular. Cuando existen manifestaciones clínicas, además de los bolos de metilprednisolona se realiza plasmaféresis y/o tratamiento de inducción. Si los rechazos son recurrentes o severos se sustituye la administración de CsA por tacrólimus.

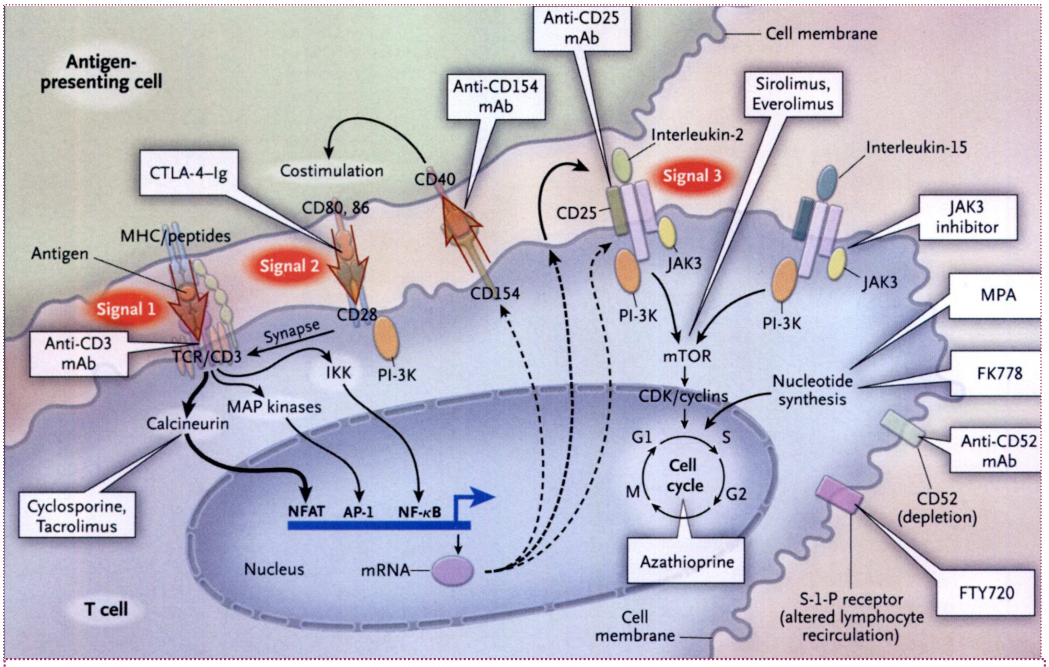

Figura 4. Mecanismo de acción de los principales fármacos inmunosupresores (Tomada y modificada de Halloran, 2004).

5. COMPLICACIONES POST-TRASPLANTE CARDIACO

Las principales complicaciones durante el primer año post-trasplante cardiaco son: el fallo agudo del injerto, las infecciones, el rechazo celular agudo y el rechazo crónico.

El fallo agudo del injerto es un fracaso temprano de la función sistólica del corazón implantado y es la complicación más frecuente post-trasplante. Se desconoce qué factores favorecen su aparición, entre ellos se encuentran la cardiopatía isquémica y las valvulopatías como causa del trasplante; la cirugía cardiaca previa (Segovia y cols., 1998; Young y cols., 2001); y otros factores como la desproporción de peso entre donante y receptor y el sexo femenino del donante (Martínez-Dolz y cols., 2003). Según los datos del Registro Español de Trasplante Cardiaco (1984-2010), el fallo agudo del injerto ocasiona aproximadamente el 45% de los fallecimientos tempranos y el 16,5% de los totales.

La segunda causa más frecuente de exitus son las infecciones (15,9%), seguido del combinado del rechazo crónico y muerte súbita (13,7%), tumores (11,9%) y rechazo agudo (7,8%). Estas causas de mortalidad se distribuyen de forma diferente a lo largo de la evolución post-trasplante, de manera que durante el primer mes post-trasplante

predomina el fallo agudo del injerto; del primer mes al primer año, el rechazo agudo y las infecciones y después del primer año, el rechazo crónico, las infecciones y los tumores. Como se puede ver en el gráfico (figura 5), tras el primer año, la infección junto a los tumores adquiere un alto protagonismo como causa de mortalidad (27,8%), a la vez que se reduce la incidencia de rechazo agudo (7,8%). Este desequilibrio podría estar favorecido por una excesiva inmunosupresión, que prevendrían el rechazo pero favorecería las infecciones y los tumores (Almenar y cols., 2011).

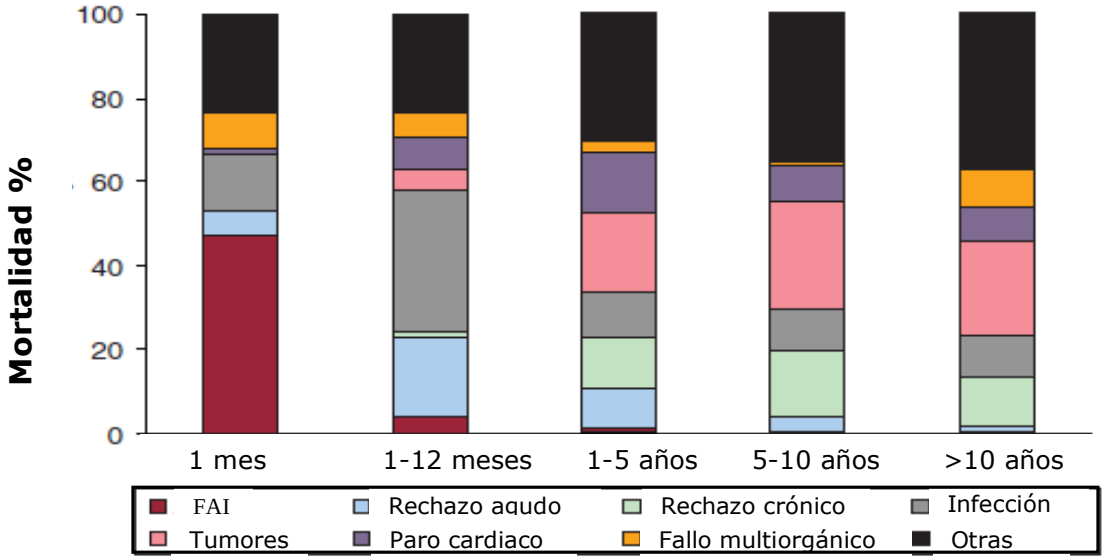

Figura 5. *Causas de mortalidad por periodos de tiempo*. FAI: fallo agudo del injerto. Registro Español de Trasplante Cardiaco (1984-2010) (tomada y modificada de Almenar y cols., 2011).

5.1. El rechazo inmunológico del injerto

El rechazo del injerto cardiaco sobreviene tras desencadenarse un proceso inmunológico cuyas vías efectoras actúan sobre el injerto cardiaco. Las células blanco ó diana de este ataque dentro del corazón trasplantado incluyen, entre otras, los miocitos y las células endoteliales que conforman la interfase entre las células del sistema inmunitario del receptor y el injerto procedente del donante. Se distinguen varios tipos de rechazo, siendo los más importantes el rechazo celular agudo y el rechazo crónico.

- ✓ **Rechazo hiperagudo**

Ocurre en las primeras horas post-trasplante y se media por anticuerpos preformados del receptor que se dirigen frente a epitopos del donante, bien del sistema HLA bien del sistema ABO (si se trasplantan corazones con incompatibilidad ABO). Suele conducir de forma irremediable a la pérdida del injerto.

- ✓ **Rechazo celular agudo**

El rechazo celular agudo se define como todo evento clínico que se resuelve con un incremento significativo en la inmunosupresión y que generalmente, aunque no de forma imprescindible, se acompaña de hallazgos histológicos compatibles en la biopsia (Kobashigawa y cols., 1993). El rechazo celular agudo es el más frecuente, a nivel histológico se caracteriza por la presencia de un infiltrado inflamatorio en las regiones perivasculares o en las fibras miocárdicas en el que predominan los linfocitos T con o sin fenómenos de necrosis de miocitos. La prueba diagnostica objetiva es la biopsia endomiocárdica (Caves y cols., 1973), que ha sido aceptada como el patrón oro en el diagnóstico de rechazo, siendo la forma más eficaz de detectar y cuantificar la severidad del rechazo y de monitorizar la respuesta al tratamiento (Delgado y cols., 2006). Según las alteraciones histológicas que se produzcan, la sociedad internacional de trasplante de corazón y pulmón (ISHLT, del inglés, *International Society for Heart and Lung Transplantation*) ha establecido una clasificación en diferentes grados de rechazo que van desde grado 0 o 0R, ausencia de rechazo, hasta grado 4 o 3R, que representa el grado más severo (tabla 1). Aunque en la mayoría de los casos de rechazo se encuentra una correlación clínico-patológica, en otros no es así. Las manifestaciones clínicas del paciente trasplantado que presenta un rechazo celular agudo son muy inespecíficas e incluyen irritabilidad, malestar, anorexia, astenia, vómitos, dolor abdominal y fiebre y en casos de rechazo severo aparecen signos de insuficiencia cardiaca. Con el objetivo de detectar de forma temprana y prevenir la aparición del rechazo, antes de que se manifieste clínicamente, en los centros en los que se realiza trasplante se lleva a cabo un estudio protocolizado de biopsias cardiacas, más frecuentes en los primeros meses post-trasplante y a partir del primer año post-trasplante se espacian para realizarse anualmente. Se administra tratamiento anti-

rechazo cuando el resultado de una biopsia muestra un grado de rechazo mayor ó igual a 1R o cuando el paciente presenta evidencias clínicas de rechazo.

Tabla 1. Clasificación de Rechazo agudo celular en trasplante cardiaco, según las categorías diagnósticas establecidas por la ISHLT (Billingham y cols., 1990 modificada por Stewart y col., 2005).

	Clasificación ISHLT 2004		Clasificación ISHLT 1990	
Rechazo Agudo celular	**0 R**	No rechazo	**Grado 0**	No rechazo
	Grado 1 R, leve	Infiltrado intersticial y/ó perivascular con hasta un foco de necrosis de miocitos.	**Grado 1, leve**	
			1A- Focal	Infiltrado linfocítico focal sin necrosis.
			1B- Difuso	Imfiltrado difuso sin daño miocítico.
			Grado 2, moderado (focal)	Un foco con infiltrado asociado a daño miocítico.
			Grado 3, moderado	
	Grado 2R, moderado	Dos ó más infiltrados con necrosis de miocitos.	**3A-**Focal	Infiltrado multifocal con daño miocítico.
			3B-Difuso	Infiltrado difuso con daño miocítico.
	Grado 3R, severo	Infiltrado difuso con múltiples focos de necrosis de miocitos ± edema ± hemorragia ± vasculitis	**Grado 4, severo**	Infiltrado difuso polimorfo con extensa necrosis de miocitos ± edema ± hemorragia ± vasculitis.

- ✓ **Rechazo humoral ó mediado por anticuerpos**

En este caso la lesión del injerto se debe a la formación de anticuerpos frente a antígenos del endotelio vascular del injerto y la activación del sistema del complemento. Histológicamente se manifiesta como una lesión aguda en los capilares miocárdicos, consistente en inflamación de los endotelios capilares con congestión y acumulación de macrófagos y neutrófilos intravasculares y edema intersticial. Para su detección se requiere la toma de biopsia y la aplicación de técnicas de

inmunofluorescencia. La no deteción del rechazo humoral, puede llevar a la pérdida del injerto. Actualmente se emplea la plasmaféresis como tratamiento más rápido y efectivo para la eliminación de anticuerpos donante específicos, que consiste en la eliminación de proteínas plasmáticas de forma no selectiva y su reemplazo con otras soluciones o plasma fresco. Siendo en algunos casos necesario utilizar Rituximab, anticuerpo monoclonal frente al antígeno CD20, que depleciona drásticamente los linfocitos B y, con ello, la generación de células productoras de anticuerpos donante específicos (Garrett y cols., 2005; Aranda y cols., 2002).

- ✓ **Rechazo crónico**

Conocido actualmente como enfermedad vascular del injerto (EVI) o vasculopatía del aloinjerto cardiaco (CAV, del inglés, *cardiac allograft vasculopathy*). Es la principal causa de fallo del injerto y muerte tras el primer año del trasplante. La lesión histológica de esta entidad consiste en un engrosamiento difuso y progresivo de la íntima de las arterias coronarias epicárdicas e intramiocárdicas, debido a la proliferación de las células musculares lisas. En trasplantados cardicacos, la presencia de esta alteración va a limitar la vida del injerto dando lugar a disfunción miocárdica, muerte súbita, síncope o infarto.

Las lesiones de CAV son diferentes a las de la aterosclerosis común de las arterias coronarias, ya que solo afecta a los vasos del injerto y se corresponde con un engrosamiento intimal de las células musculares lisas, de distribución difusa, concéntrico y que se extiende por las arterias epicárdicas penetrando en los vasos intramiocárdiacos; en cambio, la aterosclerosis coronaria suele afectar a la porción distal de los vasos, es excéntrica y focal (Tuzcu y cols., 1996; Mitchell, 2009). También pueden aparecer infiltrados inflamatorios compuestos por linfocitos T, macrófagos y células NK, que son diferentes en ambas patologías, distribuyéndose de forma difusa en el desarrollo de CAV y tendiendo a centrarse en los extremos de la típica placa de ateroma (Mitchell, 2009) (Figura 6).

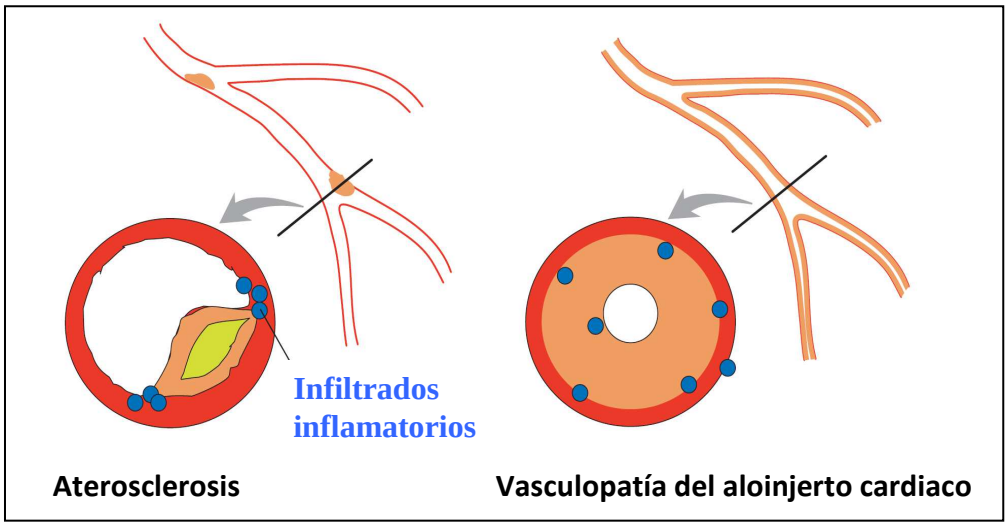

Figura 6. *Esquema que compara la aterosclerosis común de las arterias coronarias y CAV* (Tomada y modificada de Mitchell, 2009).

El diagnóstico de CAV se establece bien mediante coronariografía o bien mediante ecografía intracoronaria o ultrasonido intravascular (IVUS, del inglés, *intravascular ultrasound*). La coronariografía se considera hoy en día el método estándar para el diagnóstico de CAV a pesar de que presenta varias desventajas. La principal limitación es su baja sensibilidad (Johnson y cols., 1991), que es más evidente en estadios tempranos de la enfermedad. Estudios *in vivo* han comparado la efectividad de ambas técnicas en pacientes trasplantados con un año o más de evolución, indicando que la mayoría de estos pacientes presentaron engrosamiento intimal no detectado por angiografía, concluyendo que el IVUS permite la detección y cuantificación de la enfermedad coronaria de forma más precoz y precisa (St Goar y cols.,1992). Sin embargo, la angiografía continúa siendo la técnica de referencia, fundamentalmente debido a la disponibilidad universal de la técnica tanto para adultos como para pacientes pediátricos y por tanto a su mayor aplicabilidad.

La ISHLT ha establecido una nomenclatura internacional de clasificación basada en la angiografía coronaria para diagnosticar la severidad de CAV (Mehra y cols., 2010). En esta clasificación se tiene en cuenta además de la angiografía, la función del injerto. Cada descripción angiográfica incluye la máxima estenosis del tronco común de la arteria coronaria izquierda (LM, del inglés *left main*), vasos primarios y secundarios. Además, en la disfunción del injerto se ha de tener en cuenta la FEVI, así como la insuficiencia cardiaca y fisiología restrictiva (tabla 2).

Tabla 2. Nomenclatura y gradación recomendada para CAV (Mehra y col., 2010).

	Clase	Grado	Patología
CAV	**CAV0**	No significativo	Ausencia de lesiones detectables por angiografía.
	CAV1	Leve	Angiografía LM <50%, estenosis en los vasos primarios ó ramas <70% sin disfunción del injerto.
	CAV2	Moderado	Angiografía LM <50%, estenosis en un único vaso primario ó ramas aisladas ≥70% en los dos sistemas (epicárdicas e intramiocárdicas), sin disfunción del injerto.
	CAV3	Severo	Angiografía LM ≥50%, estenosis en 2 o más vasos primarios y ramas aisladas ≥70% en los 3 sistemas; o CAV1 o CAV2 con disfunción del injerto (FEVI < 45% generalmente en presencia de alteraciones regionales en la pared) ó evidencia de fisiología restrictiva significativa (la cual es frecuente pero no significativa).

También existe una clasificación de la severidad de CAV mediante la utilización de IVUS, basada en la realización de una serie de mediciones cuantitativas que caracterizan de forma precisa la pared arterial. De modo que, la gravedad de CAV se ha clasificado según el engrosamiento intimal y el grado de circunferencia del vaso (Valantine y cols., 1992) (tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de la severidad de CAV según IVUS.

	Clase			
	I	**II**	**III**	**IV**
Severidad	Mínima	Media	Moderada	Severa
Grosor intimal (mm)	<0.3mm	>0.3mm	0.3-0.5mm	>0.5mm
Circunferencia del vaso	<180º	>180º	>180º	>180º

En definitiva, aunque el IVUS se considera actualmente la mejor herramienta diagnóstica de CAV por su gran sensibilidad, su coste elevado hace que no esté disponible en todos los centros.

En la patogénis de CAV influyen tanto factores inmunológicos como no inmunológicos. Entre los factores no inmunológicos se encuentran factores relacionados con el proceso quirúrgico, tiempo de isquemia prolongado, problemas en la extracción, preservación y reperfusión del órgano que dan lugar a lesiones en el endotelio (Yamani y cols., 2001; 2002), factores de riesgo cardiovascular en el receptor (obesidad, diabetes, hipertensión arterial, hiperlipidemias y tabaquismo) y la infección por CMV (citomegalovirus). Entre los factores de riesgo inmunológicos destacan: la incompatibilidad de antígenos HLA entre donante y receptor; el número y severidad de episodios de rechazo agudo (Valantine, 2004) y la activación y liberación de componentes de la respuesta inmunitaria (linfocitos T, macrófagos, anticuerpos, citoquinas, factores de crecimiento, entre otros), que llevarán a la proliferación de las células musculares lisas y desarrollo de CAV (Mitchell y Libby, 2007).

5.2. Infecciones

Durante el primer mes post-trasplante los microorganismos implicados en las infecciones de forma más frecuente fueron bacterias multiresistentes de origen nosocomial relacionadas con la cirugía/estancia en UCI, tanto gram positivas (Staphilococcus y Enterococcus), como gram negativas (Enterobacterias, Pseudomonas, Acinetobacter), seguidas de hongos (Cándida, Aspergillus).

La infección más frecuente y problemática entre 1 y 6 meses post-trasplante fue la infección por CMV. A partir de los 6 meses postrasplante, las infecciones fueron fundamentalmente nosocomiales respiratorias y de entre las infecciones persistentes más frecuentes fueron: CMV, VEB (virus de Epstein-Barr), VHB (virus de la hepatitis B) y VHC (virus de la hepatitis C).

CMV es un miembro de la familia de los herpesvirus que causa infección persistente y es la complicación viral más común en receptores de trasplante de órgano sólido (Pereyra y Rubin, 2004; Rowshani y cols., 2005).

La profilaxis de CMV incluye un tratamiento de inducción durante 2 semanas con ganciclovir intravenoso (5mg/Kg/12horas) o vanganciclovir vía oral (900mg/12horas) (dosis dependientes de la función renal), seguido de un tratamiento de mantenimiento durante 3 meses con vanganciclovir vía oral (900mg/24horas). Si el receptor es seronegativo para CMV y el donante seropositivo o desconocido, se

mantiene el tratamiento de inducción 4 semanas y el tratamiento de mantenimiento durante 6 meses. Además, en nuestro hospital, los pacientes que sufren episodios de rechazo y son tratados con bolos de esteroides, reciben terapia preventiva con vanganciclovir durante 7 días cuando presentan antecedentes de infección previa con CMV o son seronegativos. Esta terapia preventiva ha mostrado en algunas series reducir la incidencia de enfermedad por CMV (Paniagua y cols., 2002).

Mientras que la infección por CMV causa una enfermedad leve o no aparente clínicamente en receptores inmunocompetentes, es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeprimidos, como son los pacientes con VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), los receptores de aloinjertos (médula ósea y órganos sólidos) y neonatos (Crough y Khanna, 2009).

Los monocitos son una de las dianas más importantes del CMV siendo estos los responsables de la diseminación del virus por todo el cuerpo durante la fase aguda, latente y final de la infección. Así, los monocitos representan un tipo de célula clave en la patogenia de la infección de CMV, pues este tipo de célula representa un importante reservorio celular de virus latente (Taylor-Wiedeman y cols., 1993, 1991; Söderberg-Nauclér y cols., 1997).

En trasplante cardiaco se ha descrito que la infección por CMV aumenta la incidencia y gravedad de rechazo agudo y está intimamente involucrada en la patología de CAV (Valantine, 2004). La infección por CMV no solo produce daño endotelial directo (Epstein y cols., 1999; Valantine, 2004), sino que de forma indirecta las células infectadas por CMV aumentan la expresión de moléculas de superficie implicadas en la adhesión de leucocitos llevando a la activación de las células del sistema inmunitario y finalmente al desarrollo de CAV (Valantine, 2004). Los efectos indirectos de CMV en el desarrollo de CAV también se pusieron de manifiesto en un estudio que comparó pacientes que recibieron profilaxis sistemática frente a otros que recibieron tratamiento preventivo con vanganciclovir, presentando los primeros un menor engrosamiento intimal diagnosticado por IVUS a los 12 meses post-trasplante (Potena y cols., 2009).

Otros trabajos, por el contrario, no ven tan clara esta relación entre CAV/RA y CMV. Estudios in vitro han demostrado que los monocitos infectados por CMV bloquean la diferenciación (inducida por citoquinas) a células dendríticas, además de

provocar un aumento en la expresión de la molécula coestimuladora CD86 (Gredmark y Söderberg-Nauclér, 2003). Además, CMV expresa transcritos de la región UL111a que codifica para 2 homólogos de la citoquina inmunosupresora humana IL-10. En las células infectadas por virus este homólogo se denomina cmvIL-10 y se ha relacionado con la inhibición de la proliferación de células mononucleares en sangre periférica, de la síntesis de citoquinas proinflamatorias (INF-γ) y con la disminución de la expresión en superficie de moléculas MHC-I y II en monocitos (Spencer y cols., 2002). Estudios recientes han demostrado que CMV induce la expresión de HLA-G en monocitos y su secreción en forma soluble, pudiendo ser un mecanismo adicional que ayuda al virus a debilitar la respuesta de las células del sistema inmunitario (Yan y cols., 2009).

Por otra parte, CMV interviene en la diferenciación de las células T $CD8^+$. Se ha descrito que en receptores de trasplante de pulmón seropositivos para CMV, se produce una disminución de la expresión de la molécula CD28 en linfocitos T $CD8^+$ de sangre periférica, siendo esta disminución más significativa en episodios agudos de reactivación del virus (Westall y cols., 2007).

6. RESPUESTA INMUNITARIA EN TRASPLANTE CARDIACO

En el trasplante alogénico los linfocitos T del receptor reconocen como extrañas las proteínas expresadas por las células del donante o aloantígenos, iniciando una cascada de reacciones inmunológicas que lleva a la eliminación del injerto (Rogers y Lechler, 2001). La magnitud de esta respuesta, denominada respuesta alogénica, será la que determine que se desencadenen o no fenómenos de rechazo. Esta respuesta se produce como consecuencia de la activación del sistema inmunitario, participando tanto el sistema inmunitario *innato ó natural* como el *específico ó adquirido*. Ambos tipos de respuestas se potencian mutuamente, así los macrófagos, componentes celulares del sistema inmunitario innato, fagocitan los antígenos y los presentan a los linfocitos T, principales elementos conductores de la respuesta celular específica. La célula T activada libera sustancias llamadas citoquinas que controlan los componentes de la respuesta inmunitaria específica, como los linfocitos T citotóxicos, los linfocitos B (promoviendo la producción de anticuerpos) y de otras células de la respuesta innata con capacidad fagocítica.

6.1. El complejo mayor de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad, (MHC, del inglés, *Major Histocompatibility Complex*), es uno de los principales complejos génicos que intervienen en la regulación y funcionamiento del sistema inmunitario. Se trata de un sistema de genes ligados, altamente polimórfico, cuyos productos se expresan en la superficie de la mayoría de las células. El MHC en humanos se denomina HLA y está constituido por un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6, dentro de la región 6p21.3 (Figura 7), que cubre aproximadamente 4.000 Kilobases y codifican proteínas implicadas en el procesamiento de los antígenos proteicos y en la presentación de péptidos a los linfocitos T (Klein y Sato, 2000; Abbas y Lichtman, 2004). Este complejo esta compuesto por tres regiones: HLA de clase I, HLA de clase II y HLA de clase III (Figura 7).

La región HLA de clase I se encuentra en la posición más telomérica y abarca un segmento cromosómico de unas 1.600 Kilobases. Comprende 6 grupos de genes de los cuales 3 codifican para los antígenos "clásicos" del trasplante ó Ia, HLA-A, -B y -C y otros 3 para los antígenos "no clásicos" ó Ib, HLA-E, -F y –G. Además se ha identificado un nuevo conjunto de genes dentro de esta región denominados MIC (-A y -B) (del inglés, *MHC class I Chain-related*) (Bahram S y cols., 1994). La región HLA de clase II está situada en la posición más centromérica, comprende unas 900 Kilobases y engloba a los genes de la respuesta inmunitaria HLA-DR, -DQ y -DP. Entre la región de clase I y clase II se encuentra la región HLA de clase III con una longitud de 1000 Kilobases, que contiene genes que codifican factores del complemento (C4, C2 y Bf), citoquinas: TNF-α y TNF-β (factor de necrosis tumoral, del inglés, *Tumor Necrosis Factor*) proteínas de choque térmico (HSP, del inglés, *Heat Shock Proteins*) y otros genes que hasta ahora no se sabe que presenten una relación directa con el sistema inmunitario o la inflamación (Klein y Sato, 2000; Shiina y cols., 2004).

Las moléculas HLA clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas humanas, aunque con diferente intensidad de tejido a tejido. No se detecta su expresión en el endotelio corneal, neuronas del sistema nervioso central, glándulas de Brunner en el duodeno, trofoblasto velloso, porción exocrina del páncreas y las células acinares de la parótida. Su expresión es débil en el tejido endocrino (tiroides,

paratiroides, pituitaria, islotes de Langerhans en el páncreas), mucosa gástrica, músculo esquelético y miocardio (Daar y cols., 1984 (a)).

Las moléculas HLA clase II se expresan constitutivamente en la superficie celular de linfocitos B, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Además, también se encuentran en determinados endotelios vasculares y en células epiteliales de diversos órganos (lengua, amígdalas, epiglotis, tráquea, intestino delgado, uretra, epidídimo y túbulos proximales del riñón) (Daar y cols., 1984 (b)).

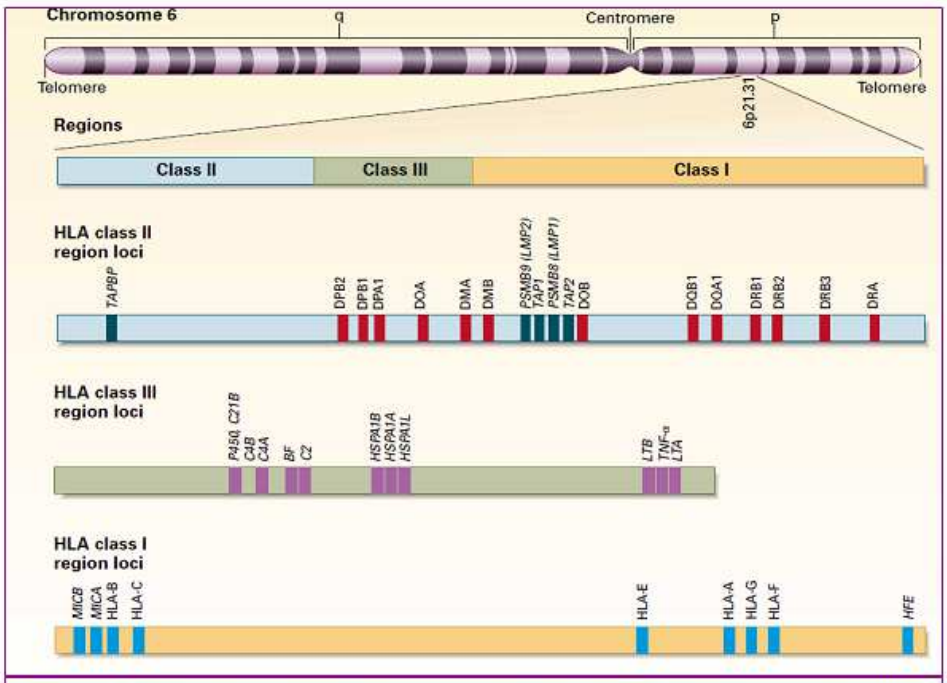

Figura 7. Estructura génica del complejo principal de histocompatibilidad (tomada de Klein y Sato, 2000).

Los miocitos cardiacos humanos expresan bajos niveles de moléculas HLA de clase I, estando la expresión de moléculas HLA de clase II limitada a infiltrados celulares y a estructuras intersticiales cardiacas. Varios estudios han demostrado un aumento en la expresión de HLA clase I en el miocardio y de HLA clase II en células intersticiales del corazón asociado con la aparición de episodios de rechazo agudo (Ahmed-Ansari y cols., 1988; Suitters y cols., 1987; Carlquist y cols., 1990).

La expresión de moléculas HLA clase I y clase II puede ser inducida o aumentada por citoquinas como INF-γ, que induce la expresión en fibroblastos, células T, endotelio vascular, epitelio tímico y un amplio rango de tejidos. En miocitos cardiacos, se ha

demostrado que la expresión de HLA clase I y clase II puede ser inducida ó aumentada por INF-γ y por combinación de INF-α y TNF-α (Wang y cols., 1991).

6.1.1. Características estructurales y funcionales de las moléculas HLA clase I y clase II

Las moléculas HLA clase I son glicoproteínas de membrana compuestas por dos cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente, una cadena pesada o alfa, altamente polimórfica, de un peso molecular de unos 44 kDa, y una cadena ligera no polimórfica de 12kDa denominada β_2-microglobulina. La cadena pesada consta de tres dominios extracitoplasmáticos (α1, α2 y α3), una región transmembrana y una región intracitoplasmática (figura 8). La cadena pesada es codificada en el MHC, mientras que la cadena ligera es codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 15 (Goodfellow y cols., 1975).

Los tres dominios extracelulares se extienden desde la región α3, adyacente a la membrana, a las regiones más distales, α2 y α1. La zona de mayor polimorfismo en la secuencia de estas moléculas se localiza en unas *regiones hipervariables*, situadas dentro de los dominios α1 y α2 (Arnett y Parham, 1995). El dominio α3 tiene un plegamiento similar al del dominio de inmunoglobulina, es menos polimórfico que los anteriores y en su estructura se encuentra el sitio de unión al correceptor CD8 de los linfocitos T. La β2-microglobulina o cadena ligera, se une de manera no covalente al dominio α3 de la cadena pesada y es necesaria para la estabilización de la expresión de la molécula HLA clase I en la superficie celular.

Los dominios α1 y α2 están unidos formando una única lámina de 8 hojas β antiparalelas, coronada por 2 regiones de hélices α entre las que se forma un surco cerrado donde se situará el péptido (Bjorkman y cols, 1987).

La función principal de las moléculas HLA clase I en la inmunidad adaptativa consiste en la presentación de péptidos a los linfocitos T citotóxicos o T $CD8^+$, que reconocen el complejo péptido/HLA-I a través de su receptor clonotípico, TCR. Junto a esto, las moléculas HLA clase-I también juegan un papel decisivo en la inmunidad innata, pues son los ligandos de moléculas que regulan la función de células NK, como los receptores KIR (del inglés, *Killer immunoglobulin-like receptor*) y CD94/NKG2.

Las moléculas HLA clase II están compuestas por dos cadenas polipeptídicas asociadas de forma no covalente, una cadena alfa de 32 a 34 kDa y una cadena beta de

29 a 32 kDa. Cada una de ellas consta de una región citoplasmática, una región transmembrana y una región extracitoplasmática formada por dos dominios (figura 8). Los dominios próximos a la membrana de cada cadena, α2 y β2, tienen un plegamiento similar al del dominio de inmunoglobulina, siendo el dominio β2 el sitio de unión para el correceptor CD4 de los linfocitos T. Los dominios distales, α1 y β1, forman la estructura de unión al péptido y son las más polimórficas.

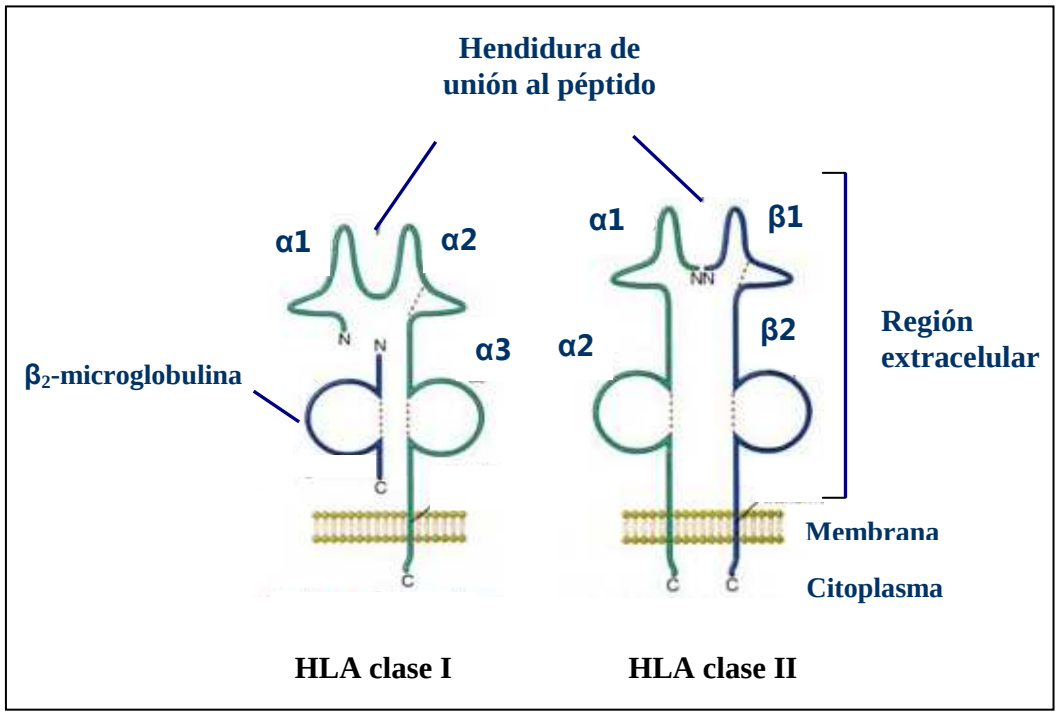

Figura 8. *Esquema de la estructura de la molécula HLA clase I y clase II donde se pueden observar las distintas regiones y dominios de cada molécula*. Las líneas discontinuas en azul, indican los puentes disulfuro que hay entre las moléculas. (Modificada de Abbas y Lichtman, 2004).

Las moléculas HLA clase I son las encargadas de presentar a los linfocitos T $CD8^+$ los antígenos que provienen de proteínas citosólicas (Figura 9A), propias o codificadas por virus. Las moléculas de clase II son las encargadas de presentar a los linfocitos T $CD4^+$ péptidos derivados de proteínas extracelulares o localizadas en la membrana celular que, por la vía endocítica, penetran al interior celular donde son degradadas en los lisosomas y posteriormente ligadas a las moléculas HLA para presentarse en la superficie, como se esquematiza en la figura 9B (Jensen, 2007).

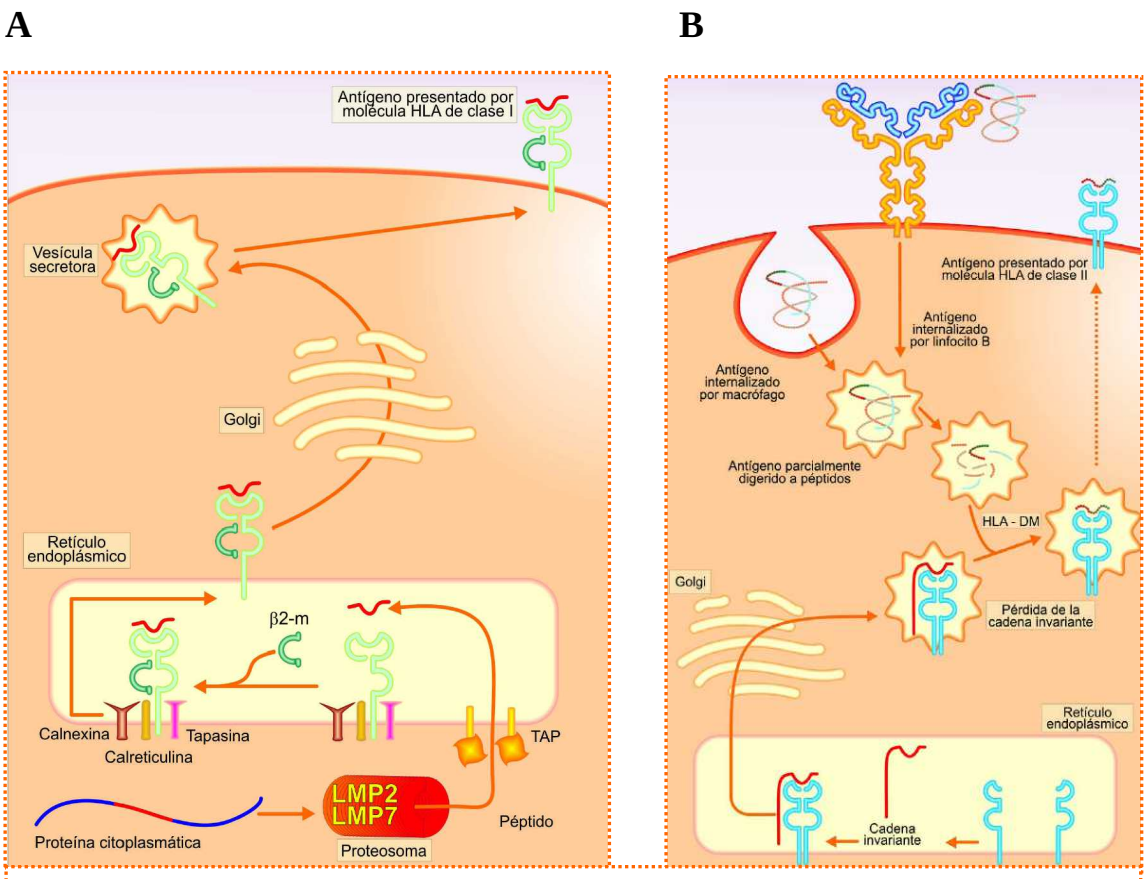

Figura 9. Vías de presentación antigénica. A, procesamiento y presentación de antígenos por moléculas HLA de clase I. B, procesamiento y presentación de antígenos por moléculas HLA de clase II. (Tomada de Gonzalez-Molina y Alonso, 2005).

6.1.2. Papel de la compatibilidad HLA en trasplante cardiaco

Las moléculas MHC clase I y II se codifican por genes altamente polimórficos que codifican proteínas especializadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T $CD8^+$ y $CD4^+$, respectivamente. Este elevado polimorfismo ha facilitado la supervivencia de las especies al favorecer la selección de las variantes alélicas de MHC que permitían una defensa más eficaz contra las infecciones de cada región geográfica. Sin embargo, el polimorfismo HLA es la principal barrera y la fuente mayoritaria de aloantígenos en el trasplante alogénico.

En trasplante cardiaco se ha estudiado ampliamente el efecto de la compatibilidad HLA entre donante y receptor y se ha considerado como un factor que puede influir tanto en la supervivencia del injerto como en el desarrollo del rechazo agudo y crónico. Los estudios parecen indicar que la mayor incompatibilidad de HLA clase II se asocia a mayor número de episodios de rechazo agudo (Zerbe y cols., 1991;

Smith y cols., 1995). Además, se ha demostrado una relación entre la incompatibilidad HLA y el desarrollo de EVI, aunque únicamente cuando esta se diagnosticaba por IVUS (Stempfle y cols., 1996). En trabajos más recientes, sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios, ya que mientras unos muestran que no existe asociación entre la compatibilidad HLA y la supervivencia (Shiba y cols., 2003; Almenar y cols., 2005), otros demuestran una menor supervivencia a largo plazo en trasplantes con mayor incompatibilidad HLA-DR (Kaczmarek y cols., 2006), posiblemente debido a una mayor incidencia de rechazo agudo.

6.1.3. Moléculas no clásicas: HLA-G y HLA-G soluble

HLA-G es una molécula HLA clase I no clásica (Ib), que a diferencia de los antígenos clásicos, se caracteriza por presentar un polimorfismo genético limitado, con 50 alelos descritos (información obtenida en Abril del 2013 de la base de datos IMGT/HLA: http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html).

HLA-G se puede encontrar en 7 isoformas diferentes, 4 isoformas unidas a membrana (HLAG1,-G2,-G3,-G4) y 3 solubles (HLA-G5,-G6,-G7), resultantes de un *splicing* alternativo a partir de un mismo RNA precursor (Torres y cols., 2001; Paul y cols., 2000). HLA-G1 presenta los dominios α1, α2, α3 y transmembrana junto a β2-microglobulina y por tanto con una estructura similar a los antígenos HLA de clase I clásicos. HLA-G2 presenta el dominio α1 y α3. HLA-G3 solo presenta el dominio α1 y la isoforma HLA-G4 el dominio α1 y α2, y todos ellos tienen en común la región transmembrana (Ishitani y Geraghty 1992; Kirszenbaum y cols., 1994; Paul y cols., 2000). La molécula soluble HLA-G5 contiene los dominios α1, α2, α3, la molécula β2-microglobulina y excluye el dominio transmembrana. La isoforma HLA-G6 solo presenta los dominios α1 y α3 y, finalmente, HLA-G7 solo contiene el dominio α1 (Paul y cols., 2000) (figura 10). De forma que, todas las isoformas de HLA-G, ligadas a membrana o solubles, tienen en común el dominio α1 de la región extracelular.

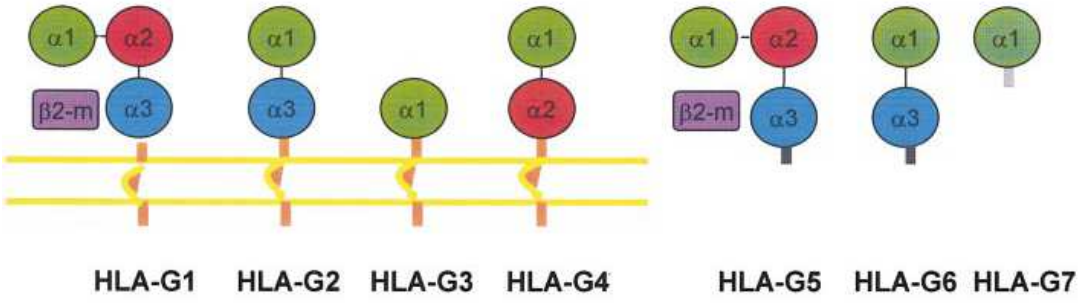

Figura 10. *Representación esquemática de la estructura de las 7 isoformas de HLA-G* (tomada de Moreau y cols., 2002).

La expresión de HLA-G, en situaciones no patológicas, está restringida a tejidos del citotrofoblasto extravelloso, a células del epitelio tímico y a células de la córnea (Ellis y cols., 1986; Crisa y cols., 1997; Le Discorde y cols., 2003). En condiciones patológicas HLA-G se expresa en: enfermedades inflamatorias, aloinjertos que muestran mejor aceptación, en tumores, infección por VIH, así como en infiltrados de células mononucleares en trasplantes alogénicos y tumores (Carosella y cols., 2003). Se ha demostrado la expresión de HLA-G en los injertos de pacientes trasplantados de corazón, hígado y riñón (LeMaoult y col., 2005).

En receptores de injertos de corazón se ha demostrado que una alta expresión tanto de HLA-G de membrana, en biopsias de miocardio, como de HLA-G soluble en muestras de suero previas y posteriores al trasplante, se asocia con un menor número de episodios de rechazo agudo y crónico (Lila y cols., 2002; Luque y cols., 2006; Sheshgiri y cols., 2008). De la misma manera, se ha podido identificar la expresión de HLA-G en biopsias de injertos de trasplante combinado hígado-riñón, en concreto en las células epiteliales biliares y, está correlacionada con la ausencia de rechazo de estos pacientes (Créput y cols., 2003a; Créput y cols., 2003b).

El papel fundamental de HLA-G no parece ser la presentación antigénica a linfocitos T, sino la regulación de la actividad de las células NK y otros tipos celulares responsables del rechazo de aloinjertos, mediante la unión a sus receptores inhibidores impidiendo así la activación de la respuesta alogénica.

Entre los receptores inhibidores de unión a HLA-G se encuentran los receptores ILT (del inglés*, Immunoglobulin-like transcript*), ILT-2 expresado en células linfoides y mieloides incluyendo células NK, T, B y células dendríticas (Colonna y cols., 1997) e ILT-4 expresado en monocitos, macrófagos y células dendríticas. KIR2DL4 es otro de los

receptores de unión a HLA-G, que se expresa en células NK y linfocitos T (Yu y cols., 2006). ILT-2 e ILT-4 son receptores inhibidores, aunque KIR2DL4 puede enviar señales activadoras (Van der Meer y cols., 2004; Rajagopalan y cols., 2006). Se han obtenido resultados que indican un papel para KIR2DL4 en la activación de las células NK en lugares donde existe expresión de HLA-G soluble (Rajagopalan y cols., 2006). En contraste con otros receptores activadores o inhibidores KIR (se verán con más detalle más adelante en esta memoria) que regulan la citotoxicidad de la células NK y la producción de citoquinas, KIR2DL4 activa la producción de citoquinas (INF-γ), pero no la citotoxicidad de las células NK en reposo (Rajagopalan y cols., 2001). En cualquier caso, la naturaleza de las interacciones entre HLA-G y KIR2DL4 necesita explorarse con más detalle ya que se han descrito resultados contradictorios.

Por otro lado, se ha descrito que la presentación del péptido lider de HLA-G en la molécula HLA-E, puede inhibir la actividad citolítica de las células NK de forma indirecta, al interacionar con el receptor inhibidor CD94/NKG2A (miembro de la superfamilia de las lectinas tipo C) (Llano y cols., 1998).

Entre las funciones más importantes de HLA-G en la inducción de tolerancia, se encuentran: 1) la inhibición de las funciones citolíticas de las células NK (Rouas-Freiss y cols., 1997) y de los linfocitos T citotóxicos (Le Gal y cols., 1999); 2) la inhibición de la diferenciación y maduración de las células presentadoras de antígeno (Horuzsko y cols., 2001; Le Friec y cols., 2003); 3) la inhibición de la alo-proliferación de las células T $CD4^+$ (Riteau y cols., 1999); 5) la inducción y activación de células T supresoras (Carosella y cols., 2008); 6) la inhibición de la proliferación de las células T y NK (Bahri y cols., 2006; LeMaoult y cols., 2007; Caumartin y cols., 2007); y 7) la generación de apoptosis en células endoteliales (Fons y cols., 2006).

HLA-G puede ejercer, a largo plazo, efectos inmunotolerogénicos a través de la generación de células T supresoras. Estas células T supresoras inducidas por HLA-G son independientes de la expresión de FOXP3 y se caracterizan por presentar un fenotipo asociado a bajos niveles de expresión de CD4 o CD8 ($CD3^+CD4^{low}$ o $CD3^+CD8^{low}$) en su superficie (Le Rond y cols., 2006). A pesar de que HLA-G está implicado en su generación, la actividad supresora de estas células no está mediada por HLA-G, sino que al parecer actúan a través de la liberación de factores solubles como IL-10. En receptores de injertos de hígado-riñón e hígado, existe una correlación entre una

mejor aceptación del injerto y los niveles plasmáticos elevados de HLA-G y de IL-10 junto con una mayor frecuencia de células $CD3^{+}CD4^{low}$ y $CD3^{+}CD8^{low}$ (Naji y cols., 2007).

Hasta la fecha se desconocen los mecanismos por los que HLA-G se expresa de novo en los injertos de pacientes trasplantados, aunque existen datos que sugieren que la misma alo-reacción lo podría estar promoviendo. De hecho, *in vitro* se ha demostrado que HLA-G se produce y secreta por células T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ aloreactivas en reacciones linfocitarias mixtas. Así mismo, se ha detectado su expresión en células de sangre periférica de receptores que recibieron un doble trasplante de riñón/hígado que no presentaron episodios de rechazo agudo (Le Rond y cols., 2004). Además, la reactivación de CMV podría promover la secreción de HLA-G por los monocitos (Yan y cols., 2009), efecto mediado por cmvIL-10 (Spencer y cols., 2002).

6.1.4. Molécula relacionada con el MHC: MICA y MICA soluble

Al igual que las moléculas HLA, los genes MICA se expresan de forma codominante (Molinero y cols., 2002) y son altamente polimórficos. El gen MICA codifica una proteína de membrana con un peso molecular de 43 kDa y presenta una estructura molecular muy similar a las moléculas HLA clase I, incluyendo tres dominios extracelulares (α1, α2 y α3), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, pero a diferencia de estas no se une a β2-microglobulina ni presenta péptidos en la superficie celular (Bahram y cols., 1994).

MICA se expresa en células epiteliales, especialmente en el tracto gastrointestinal (Groh y cols., 1998), en fibroblastos, células endoteliales, monocitos y células dendríticas, queratinocitos (Jinushi y cols., 2003; Zwirner y cols., 1999) y tumores (Groh y cols., 1999). Los linfocitos, por lo general, carecen de MICA, aunque su presencia puede ser inducida en linfocitos T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ activados (Molinero y cols., 2002). Además, en determinadas situaciones de estrés celular por choque térmico, inflamación, infecciones o durante la transformación tumoral, se observa un incremento de la expresión de MICA en la superficie celular (Gasser y cols., 2005; Groh y cols., 2001). Esto le permite actuar como una señal de peligro, alertando al sistema inmunitario.

En receptores de trasplante de riñón, la presencia de anticuerpos anti-MICA se correlacionan con el empeoramiento y/o pérdida precoz del injerto (Mizutani y cols., 2006; Zou y cols., 2009). También en trasplante cardiaco, dichos anticuerpos se asocian con el desarrollo de episodios de rechazo agudo (Suárez-Álvarez y cols., 2007).

Las moléculas MIC (MICA y MICB) actúan como ligandos de NKG2D. NKG2D, es un receptor activador tipo lectina, cuyo gen se localiza en el cromosoma 12. Se expresa en forma de homodímero en células NK, linfocitos Tγδ y Tαβ $CD8^+$ (Bauer y cols., 1999) y realiza su función activadora a través de la proteína adaptadora DAP-10 (Wu y cols., 1999). NKG2D también es capaz de unirse a otros ligandos anclados en la membrana celular, como las proteínas ULBPs (del inglés, *UL-16 Binding Proteins*).

La interacción MICA-NKG2D actúa como señal activadora en linfocitos Tγδ y células NK, estimulando la respuesta inmunitaria innata y, como co-receptor de co-estimulación en linfocitos T $CD8^+$, potenciando la respuesta inmunitaria específica (Lanier, 2005; Ogasawara y cols., 2005; Raulet, 2003). En infecciones por CMV se ha observado un incremento en la expresión de MICA en células endoteliales y fibroblastos (Zou y cols., 2005). Para contrarrestar la respuesta antiviral mediada por NKG2D, CMV ha desarrollado mecanismos de evasión, de forma que la glicoproteína del CMV, UL142, retiene las moléculas MICA en el citoplasma, inhibiendo su expresión en superficie e interfiriendo con la respuesta mediada por NKG2D (Chalupny y cols., 2006).

Por otro lado, MICA en su forma soluble en suero de receptores de injertos cardiacos, bloquea la interacción del receptor NKG2D con sus ligandos e induce su internalización interfiriendo la actividad citotóxica de los efectores citolíticos. MICA soluble, por tanto, actúa modulando la respuesta inmunitaria y contribuye a una mejor aceptación del injerto cardiaco (Suárez-Álvarez y cols., 2006).

6.2. Reconocimiento alogénico

El término reconocimiento alogénico o alorreconocimiento se utiliza para definir la respuesta inmunitaria que se establece frente a moléculas diferentes procedentes de un individuo de la misma especie. El principal desencadenante de la respuesta alogénica del receptor de un órgano son las moléculas HLA del donante, presentes en el tejido alogénico implantado (Rogers y Lechler, 2001). En este sentido,

la incompatibilidad de antígenos HLA entre donante y receptor es el primer evento que desencadenará la activación inmunitaria, provocando una respuesta inmunológica muy agresiva, que podrá conducir al rechazo del órgano. No obstante, aunque en menor grado, el rechazo del injerto también se puede producir cuando el trasplante se realiza entre individuos HLA compatibles, debido al reconocimiento de péptidos procedentes de antígenos menores de histocompatibilidad u otras moléculas que presenten variantes alélicas (Álvarez-Márquez y cols., 2008; Rogers y Lechler, 2001).

Los linfocitos T del receptor de un trasplante pueden reconocer los antígenos HLA del órgano trasplantado a través de tres vías de alorreconocimiento, no necesariamente excluyentes entre sí: la vía directa, la indirecta y la semidirecta.

- ✓ **Reconocimiento alogénico directo**

En condiciones fisiológicas los linfocitos T reconocen el antígeno extraño presentado sobre las moléculas de HLA propias. Sin embargo, en el trasplante la respuesta de las células T aloreactivas puede desencadenarse directamente por las moléculas MHC intactas del donante, es la llamada vía de aloreconocimiento directo (Hernandez-Fuentes y cols., 1999; Baker y cols., 2001). En esta vía los linfocitos T $CD4^+$ o $CD8^+$ del receptor reconocen directamente las moléculas HLA no propias del donante expresadas por las células del injerto, sin necesidad de que sean degradadas en péptidos y presentados en las moléculas MHC propias (Sherman y Chattopadhyay, 1993; Lechler y cols., 1990) (figura 11A). Como en el reconocimiento restringido por el MHC propio, las moléculas MHC clase I alogénicas estimularían mayoritariamente la respuesta de los linfocitos T $CD8^+$, mientras que las moléculas del MHC clase II activarían la respuesta de los linfocitos T $CD4^+$. Esta respuesta implicaría el reconocimiento de la propia estructura de las moléculas del MHC alogénicas, bien libres o unidas a un péptido del donante. En esta situación se podría pensar que el TCR confunde a la molécula HLA alogénica con una molécula propia que presenta un péptido extraño. Este mecanismo directo determina que el número de linfocitos T que reconocen aloantígenos sea aproximadamente 100 veces mayor que el de los que reconocen antígenos no alogénicos (Martorell, 1999). Este tipo de respuesta es una de las causas por las que los aloinjertos pueden desencadenar reacciones de rechazo tempranas y muy intensas.

Para entender cómo el sistema inmunitario del receptor de un trasplante alogénico desarrolla una reacción de rechazo frente a los antígenos del donante, de una magnitud tal que en pocos días es capaz de destruir totalmente el injerto, se han propuesto dos modelos moleculares que explican que la frecuencia de linfocitos alorreactivos sea mucho mayor que la de los linfocitos que reconocen antígenos convencionales:

- ✓ El modelo de "*alta densidad de determinantes*" propone que las células T reconocen de forma directa polimorfismos aminoacídicos en las moléculas de MHC del donante, sin importar la naturaleza del péptido unido al MHC. Por lo tanto, todas las células del donante con un MHC determinado actúan como ligandos de las células T del receptor.

- ✓ El modelo de "*múltiples complejos binarios*", propone que las células T pueden reconocer péptidos específicos del órgano injertado unidos al MHC del donante. Estos péptidos pueden derivar de proteínas celulares que pueden incluso provenir del paciente. No obstante, las diferencias en el MHC alogénico hacen que péptidos procedentes de proteínas homólogas pueden ser reconocidos como extraños. Por lo tanto, según esta teoría sería necesaria una única incompatibilidad entre el MHC del donante y del receptor para generar un número elevado de células alorreactivas (Rogers y Lechler, 2001; Bharat y Mohanakumar, 2007).

- ✓ **Reconocimiento alogénico indirecto**

En este tipo de reconocimiento, se requiere un procesamiento previo de los antígenos HLA del donante por parte de las células presentadoras de antígeno (CPAs) del receptor, para ser presentado en el contexto del MHC propio. Así, las proteínas HLA alogénicas son presentadas, a través de HLA clase II propio, a los linfocitos T $CD4^+$ para su reconocimiento (Shoskes y Wood, 1994; Gokmen y cols., 2008) (figura 11B). La vía directa de reconocimiento alogénico parece estar más implicada en el desarrollo del rechazo agudo del aloinjerto, mientras que la vía de presentación indirecta se relaciona de una forma más directa con el desarrollo del rechazo crónico del injerto (Heeger, 2003; Bharat y Mohanakumar, 2007).

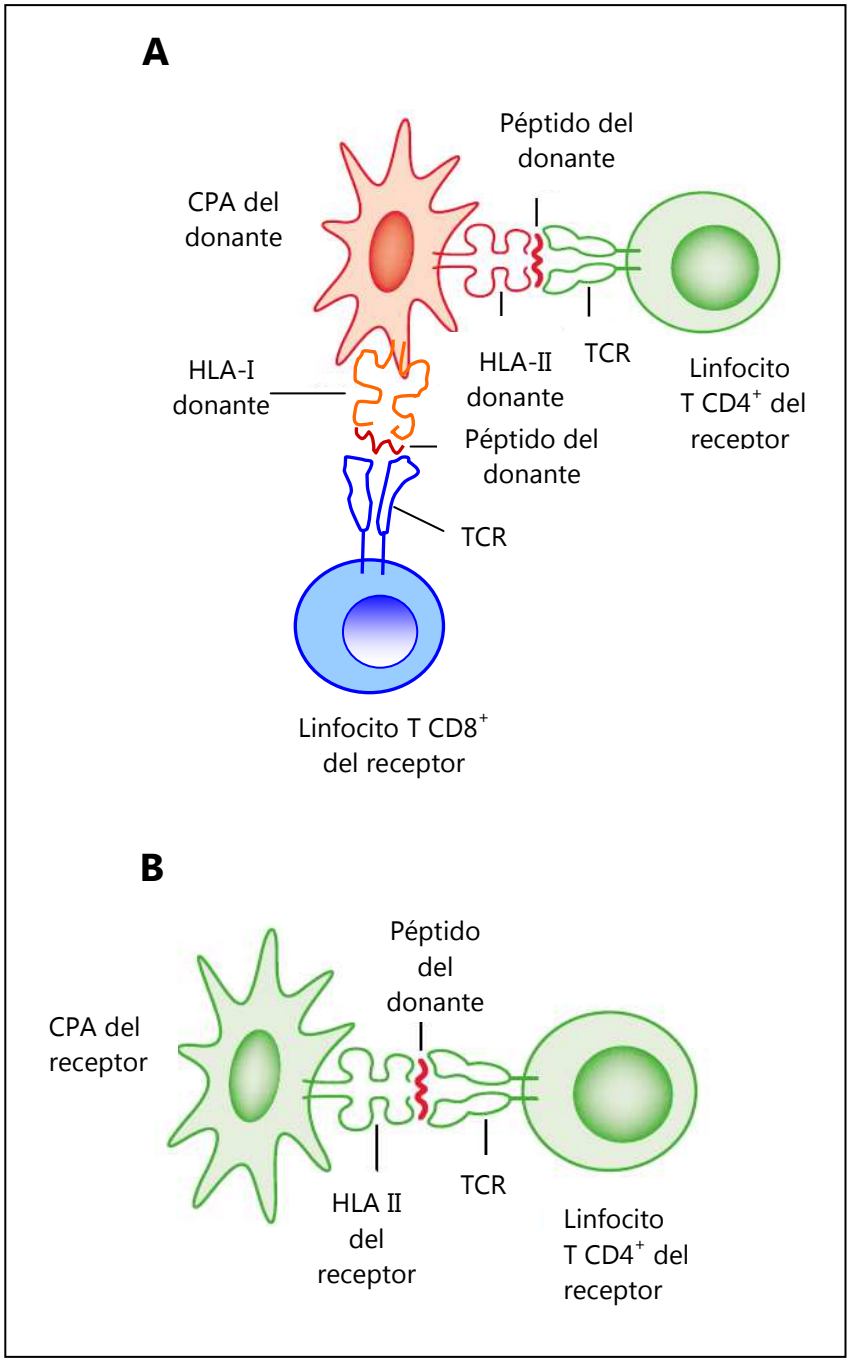

Figura 11. *Esquema de las vías directa e indirecta de alorreconocimiento.* **A**, vía de alorreconocimiento directo: las células efectoras del receptor reconocen directamente los antígenos HLA del donante cargadas con péptidos del donante. **B**, vía de alorreconocimiento indirecto: las moléculas HLA del donante, tras su procesamiento, son presentados por las CPAs del receptor (Tomada y modificada de Coates y cols., 2002).

- ✓ **Reconocimiento alogénico semidirecto**

En este tipo de reconocimiento, las CPAs del receptor del trasplante pueden adquirir complejos MHC-péptido alogénicos a través de la transferencia del MHC de las

CPAs del donante (Herrera y cols., 2004) (figura 12). De esta forma, en el reconocimiento semidirecto las CPAs del receptor pueden estimular a los linfocitos T por las vías directa, a través del MHC procedente de la CPA del donante, e indirecta, presentando péptidos alogénicos en el contexto del MHC propio (Afzali y cols., 2008; Afzali y cols., 2007 (a); Jiang y cols., 2004).

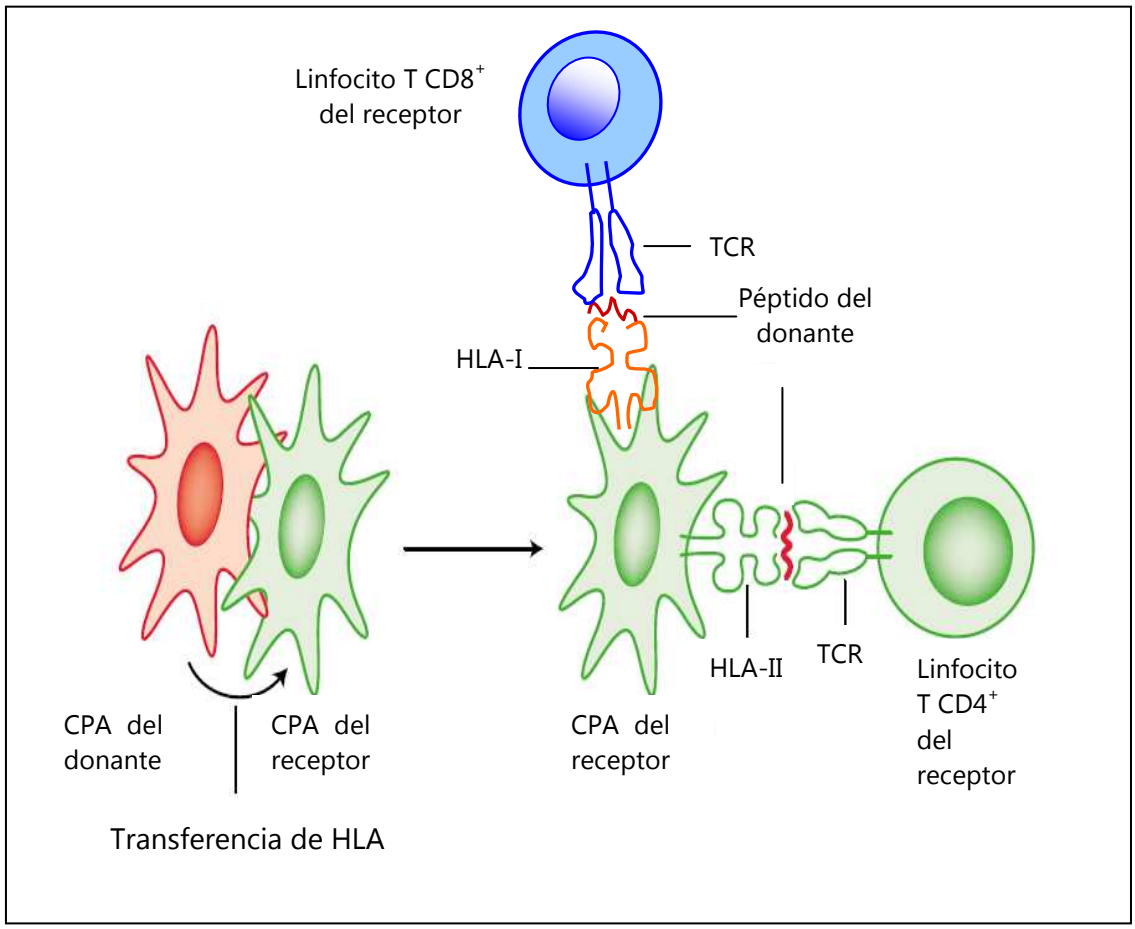

Figura 12. *Esquema de reconocimiento semidirecto o vinculado*. Las moléculas de HLA de las CPAs del donante se transfieren a las CPAs del receptor por lo que se vinculan las dos vías de alorreconocimiento (Tomada y modificada de Coates y cols., 2002).

6.3. Células de la respuesta inmunitaria

Entre las principales células implicadas en la respuesta alogénica se encuentran las células con capacidad de presentar antígeno (células dendríticas y fagocitos mononucleares, principalmente) y las células efectoras que incluyen a los linfocitos T, B y las células NK y los diferentes subtipos de linfocitos T con función reguladora.

6.3.1. Células presentadoras de antígeno

Las CPAs tienen como misión captar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos T en el contexto de las moléculas HLA, proporcionando señales que estimulan su proliferación y diferenciación.

Antes de que la CPA y el linfocito T entren en contacto, los receptores asociados al reconocimiento antigénico de ambas células se encuentran dispersos en la membrana citoplasmática. Cuando el linfocito T reconoce al antígeno, los TCR seleccionados y las moléculas de membrana asociadas a ellos (correceptores CD4 y CD8, moléculas de adhesión, CD2, LFA-1 y LFA-3), entre otras, se polarizan en la membrana celular formando entre el linfocito T y la CPA lo que se denomina una *sinapsis inmunológica* (González- Molina y Alonso, 2005; Beaudreuil y cols., 2007). Para que la presentación del antígeno sea efectiva y se produzca la activación del linfocito T, la interacción entre el complejo péptido-MHC-I/II y el TCR, debe complementarse con las denominadas segundas señales, mediante la interacción de moléculas coestimuladoras a nivel del linfocito T y sus ligandos sobre las CPAs, y de este modo la célula T puede diferenciarse a célula efectora $CD4^+$ (capaz de liberar citoquinas proinflamatorias) o $CD8^+$ (con capacidad citotóxica) (Abbas y cols., 1996). En los últimos años se han descrito numerosos pares de moléculas con capacidad accesoria, pero las primeras descritas, y quizás también las más importantes son CD28/CTLA-4 (antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico, del inglés *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*)/B7 y CD40/CD40L (Klaus y cols., 1994), que se verán con detalle más adelante en esta memoria. Además deben de participar señales terciarias mediadas por citoquinas que son indispensables para la proliferación y diferenciación hacia células efectoras y la generación de células de memoria, así como quimiocinas que guían la migración a los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos) y a los tejidos donde se produce la reacción inmune/inflamatoria (Sallusto y cols., 2000).

- ✓ **Células dendríticas**

Las células dendríticas son las células más eficientes en la presentación de antígenos y en la activación del linfocito T, por lo que también se las conoce como CPAs profesionales. Las células dendríticas derivan de la médula ósea desde donde migran en estado inmaduro a los tejidos periféricos. Se identifican morfológicamente

por sus proyecciones membranosas, localizándose por debajo del epitelio y en la mayor parte de los órganos, donde están preparadas para captar antígenos extraños y transportarlos a los órganos linfáticos periféricos (Abbas y Litchman, 2004).

Constituyen una familia de células caracterizada por la expresión de altos niveles de moléculas HLA clase II y su función específica es la de presentar antígenos y estimular a los linfocitos (Guery y Adorini, 1995; Klinkert, 1990).

El proceso de maduración de las células dendríticas comienza en presencia de citoquinas inflamatorias, tales como TNF-α e IL-12. Durante este proceso aumenta la expresión de moléculas HLA clase I y II, moléculas coestimuladoras y la secreción de IL-12, pero disminuye la capacidad de captar y procesar el antígeno. En estas condiciones, las células dendríticas migran hacia los órganos linfoides secundarios donde se produce la presentación del antígeno al linfocito T iniciando así la respuesta inmunitaria (Sumpter y cols., 2007).

- ✓ **Fagocitos mononucleares**

Las células de este sistema se originan en la médula ósea. El primer tipo celular que entra en la circulación periférica después de abandonar la médula ósea no está totalmente diferenciado y se denomina monocito. Los monocitos son células fagocíticas que cuando entran en los tejidos, maduran y se convierten en macrófagos, y desempeñan una triple función:

1) Eliminar por fagocitosis material sobrante y desechos, igualmente son capaces de fagocitar y matar patógenos invasores.

2) Procesar antígenos que posteriormente presentarán a través de las moléculas HLA. Los monocitos y macrófagos no activados expresan niveles bajos de HLA en su superficie, al activarse aumenta la expresión de moléculas HLA clase II y moléculas accesorias y con ello su capacidad de presentación antígenica.

3) Secretar citoquinas como consecuencia de la activación, tales como IL-1, IL-8, IL-12, TNF e INF α/β, que reclutan y activan a otras células de la respuesta inmunitaria como linfocitos T, neutrófilos y células NK, dirigiendo la respuesta innata y adaptativa en las fases iniciales (Martín y Jaraquemada, 2003; Abbas y Litchman, 2004; Dale y cols., 2008).

6.3.2. Células efectoras

6.3.2.1. Células NK y receptores KIR

Las células NK son una subpoblación de linfocitos que representan del 5% al 20% de las células mononucleadas circulantes. Son células con capacidad citotóxica y de secreción de citoquinas que forman parte de la inmunidad innata y actúan en la primera línea defensiva frente a virus, parásitos, bacterias y tumores (Lodoen y Lanier, 2006, Vesely y cols., 2011). Se caracterizan por presentar en su superficie moléculas como CD16 (Fc-γRIII) y CD56, pero no receptores específicos para el antígeno como los linfocitos T y B (Moretta y cols., 1992; Coudert y cols., 2005). Se han descrito 2 subpoblaciones de células NK, una mayoritaria (>90%) con expresión moderada de CD56 ($CD56^{DIM}$) y fuerte de CD16 y otra minoritaria (10%) con CD56 fuerte ($CD56^{Brigth}$) y expresión débil o negativa de CD16 (Cooper y cols., 2001; Caligiuri, 2008). Las células NK $CD56^{DIM}$ son células NK con función citotóxica (Nagler y cols., 1989), mientras que las células $CD56^{Brigth}$ muestran poca capacidad citotóxica, pero producen grandes cantidades de citoquinas, incluyendo INF-γ y TNF-α, lo que sugiere juegan un papel primordial en la inmunoregulación (Cooper y cols., 2001; Fan y cols., 2008).

La actividad citotóxica de las células NK se media fundamentalmente por secreción de proteínas como perforina y las granzimas, pero también a través de la vía CD95/CD95-L. La activación de las células NK depende de diversos mecanismos: 1) a través del receptor CD16 que reconoce la fracción Fc de los anticuerpos unidos a células infectadas, tumorales ó alogénicas (Trinchieri, 1989), provocando la lisis celular en un proceso denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; 2) a través de citoquinas como INFα/β, IL-12, IL-15 e IL-18 secretadas por macrófagos ó células dendríticas (Long, 2007; Walzer y cols., 2005); y 3) a través de un repertorio muy variado de receptores activadores e inhibidores de su superficie, que pueden actuar individualmente o en combinación, dependiendo de los ligandos presentes en la célula diana.

Receptores activadores

Entre los receptores activadores se encuentran: los receptores NCRs (del inglés, *natural citotoxicidad receptors*) que incluyen NKp30, NKp44 y NKp46; receptores de la

superfamilia tipo lectina-C como NKG2D y NKG2C; el receptor CD16; los correceptores 2B4 (CD244), NKp80, DNAM-1 (CD226), NTB-A y los miembros de tallo corto de la familia KIR, que se verán con mayor detalle más adelante. Los NCRs juegan un papel importante en la destrucción mediada por células NK de líneas celulares tumorales (Biassoni y cols., 2001; Vivier y cols., 2011).

Desafortunadamente los ligandos de los NCRs en las células tumorales son aún desconocidos, aunque las hemaglutininas virales y la proteína pp65 del CMV humano se han descrito como potenciales ligandos (Mandelboim y cols., 2001; Arnon y cols., 2001; Arnon y cols., 2005). NKG2D se expresa como homodímero en células NK, Tγδ, T $CD8^+$ y macrófagos (Wu y cols., 1999) y reconoce proteínas inducidas por estrés como MICA/B y ULBP (Raulet, 2003). NKG2C forma heterodímeros con CD94 y tiene como ligando a la molécula HLA-E (Lanier, 2009; López-Botet y Bellón, 1999).

Otros receptores activadores de las células NK son los TLRs (del inglés, *Toll-like receptors*) (Hart y cols., 2005; OM; Hornung y cols., 2002; Sivori y cols., 2004), cuyos ligandos son motivos conservados presentes en virus y bacterias. En trasplante cardiaco, la expresión TLR4 en monocitos aumenta significativamente en pacientes con CAV (Methe y cols., 2004), ya que este es capaz de inducirse por ligandos liberados tras la isquemia/reperfusión del órgano (Shirali y Goldstein, 2008; Zou y cols., 2008).

Receptores inhibidores

Entre los receptores inhibidores expresados por las células NK se encuentran: 1) el heterodímero tipo lectina-C CD94/NKG2A, cuya actividad inhibidora está determinada por secuencias citoplasmáticas ITIM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) (Le Dréan y cols., 1998) y su ligando es la molécula HLA-E (Braud y cols., 1998; Gunturi y cols., 2004); 2) el receptor ILT2 que se une a moléculas HLA clase-I y a UL18, un homólogo de HLA clase-I codificado por CMV humano (Chapman y cols., 1999); y 3) en general los miembros de tallo largo de los receptores KIR.

Los receptores KIR fueron descritos inicialmente en células NK (Moretta y cols., 1990; Litwin y cols., 1994), pero después se observó que también se expresaban por linfocitos $T\alpha\beta^+$ tanto $CD8^+$ como $CD4^+$ y $T\gamma\delta^+$ (Mingari y cols., 1996; 1997; Speiser y cols., 1999; Parham, 2005 (a)). Las subpoblaciones de linfocitos T $CD8^+$ que expresan

KIR son efectoras y de memoria, y se caracterizan por ser $CD28^-$, tener un repertorio del TCR restringido y telómeros cortos lo que implica una extensa expansión clonal (Vivier y Anfossi, 2004). Por tanto, la unión de los receptores KIR con sus ligandos específicos, es capaz de regular tanto la actividad de las células NK como de las células T citotóxicas/supresoras.

Los receptores KIR son proteínas tipo Ig cuyos genes se agrupan en el cromosoma 19q13.4. Atendiendo al número de dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, se pueden clasificar en KIR2D y KIR3D, con dos ó tres dominios, respectivamente. A la vez, se pueden clasificar según la longitud de su región citoplasmática, larga (L, del inglés, *long*) con motivos ITIM, que al ser fosforilados intervienen en su función supresora (Vivier y Daeron, 1997), y corta (S, del inglés, *short*) sin motivos ITIM, pero tienen un aminoácido cargado (Lisina ó Arginina) en su región transmembrana a través del cual se asocian a la molécula adaptadora DAP12, que contiene en su estructura motivos ITAM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif*), produciendo una señal activadora. El receptor KIR2DL4, aunque posee un tallo citoplasmático largo con un motivo ITIM, presenta en su región transmembrana el aminoácido arginina cargado, que le confiere función activadora (Rajagopalan y cols., 2001).

Los ligandos de los receptores KIR2D son específicos para HLA-C. Los alelos de HLA-C se pueden clasificar en dos grupos en función de una variación en el aminoácido de la posición 80 de la hélice α-1 (Biassoni y cols., 1995; revisado por Boyington y Sun, 2001). Los alelos del grupo C1 se caracterizan por presentar el aminoácido asparagina y los del grupo C2 lisina. Los alelos del grupo C1 son ligandos específicos de KIR2DL2, KIR2S2 y KIR2DL3, que son reconocidas por el anticuerpo monoclonal CD158b/j, mientras que los del grupo C2 son los ligandos específicos de KIR2DL1 y KIR2DS1, reconocidas por CD158a/h (Parham, 2005 (b)).

Cada célula NK expresa un conjunto diferente de receptores de activación y de inhibición seleccionado del repertorio genético del individuo. Los receptores activadores estimulan la citotoxicidad natural y la secreción de citoquinas, mientras que los receptores inhibidores envían señales inhibitorias y contrarrestan las activadoras (Lanier, 2005; Chiesa y cols., 2005). Por lo que la actividad de las células NK

está finamente regulada por un equilibrio entre las señales que se generan a partir de ambos tipos de receptores (Moretta y cols., 2002).

Estos receptores reconocen un número aún por determinar de ligandos diferentes, pero quizás el ligando conocido más importante de muchos de ellos sean las moléculas HLA clase-I. La hipótesis del *missing self* ("perdida de lo propio", Ljunggren y Karre, 1990) propone que niveles normales de HLA clase I protegen frente al ataque de las células NK, mientras que niveles reducidos o nulos de HLA clase I pueden inducir la activación de las células NK y eliminar estas células potencialmente peligrosas. Por tanto, la disminución en el nivel de HLA clase I es una estrategia para evadir el sistema inmunitario específico usada por células tumorales e infectadas por virus, sin embargo, constituye una señal inmediata para el ataque de las células NK (Das y Saxena, 2004).

6.3.2.2. Linfocitos B

Los linfocitos B se originan y maduran en la médula ósea y son las únicas células que producen anticuerpos o inmunoglobulinas. Los linfocitos B son capaces de reconocer y responder frente antígenos solubles y también pueden reconocer antígenos sobre la superficie de las CPAs, como las células dendríticas (Huang y cols., 2005; Wykes y cols., 1998) y los macrófagos (Koppel y cols., 2005). En los linfocitos B, los anticuerpos se encuentran bien en compartimentos citoplasmáticos para ser secretados (retículo endoplasmático y complejo de Golgy) o bien en la superficie celular, donde se expresan como proteínas integrales de membrana. Las formas secretadas de anticuerpos se encuentran en el plasma, en las secreciones y en el líquido intersticial de los tejidos (Abbas y Lichman, 2004). En la membrana celular, conforman el receptor específico de antígeno de los linfocitos B, que se denomina complejo BCR (del inglés, *B cell receptor*). Complejo formado por una inmunoglobulina de membrana (mIg) asociada a dos glicoproteínas Ig α e Ig β (también conocidas como CD79a y CD79b, respectivamente) cuyos dominios citoplasmáticos contienen motivos basados en tirosinas ITAM, los cuales son necesarios para la transmisión de señales activadoras al interior de la célula (Reth, 1989).

Cuando el antígeno se une al BCR de los linfocitos B, induce su activación y con ello, la expansión del clon de células específicas de ese antígeno, y la diferenciación en

linfocitos que secretan anticuerpos activamente (ó células plasmáticas) y linfocitos B de memoria. Además de producir anticuerpos, los linfocitos B activados pueden actuar como CPAs. Una vez que el BCR reconoce al antígeno, la célula B lo endocita y procesa en vesículas endosómicas para después presentarlo a los linfocitos T $CD4^+$ en forma de péptidos en el contexto de HLA clase II. Para una presentación eficiente, además de la presentación antigénica en MHC, es necesaria la interacción de las moléculas coestimuladoras del linfocito B activado con sus correceptores presentes en los linfocitos T. En este contexto, se produce un aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras B7-2 (CD86) y B7-1 (CD80), que interaccionan con la molécula CD28 del linfocito T $CD4^+$ virgen, induciendo su activación (Minguela y cols, 2000). Además, en una segunda etapa la interacción de las moléculas CD40 presentes en el linfocito B, con su ligando CD40L (CD154), expresada sobre el linfocito T $CD4^+$ activado, mantiene la activación del linfocito B y promueve el aumento del procesamiento de antígenos, de la expresión de HLA clase II y la estabilización de las moléculas B7 en la membrana celular (Rodríguez-Pinto, 2005), lo que favorece la condición de CPA del linfocito B. Igualmente, la interacción CD40/CD40L induce el cambio de isotipo de inmunoglobulina y su posterior maduración a célula plasmática.

6.3.2.3. Linfocitos T

Los linfocitos T reconocen a través de su TCR los antígenos en forma de péptidos, presentados por las moléculas HLA. El TCR es un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas transmembrana, α/β o γ/δ unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Los linfocitos T expresan solo una de las dos formas: α/β o γ/δ, aunque el receptor α/β lo hace casi en el 95% de los linfocitos T periféricos y las cadenas γ/δ solo el 5% (González- Molina y Alonso, 2005). En el complejo TCR, las proteínas CD3 (formadas por tres monómeros γ, δ y ε) y la proteína ζ (homodímero unido por puentes disulfuro) se asocian de forma no covalente al heterodímero αβ o γ/δ y cuando el TCR reconoce antígenos, estas proteínas asociadas transducen señales que provocan la activación del linfocito T (Abbas y Lichman 2004) (Fernández-Miguel y cols., 1999) (figura 13). Cada una de las cadenas del complejo contiene motivos de activación ITAM que son dianas de tirosín-quinasas y cuya fosforilación es el primer

evento detectado en la señalización tras el reconocimiento de antígenos (Kolanus y cols., 1993).

Además del complejo TCR, en la superficie de los linfocitos T se expresan otros receptores de membrana que no reconocen antígenos, aunque sí participan en las respuestas frente a ellos. Se denominan moléculas correceptoras, CD4 y CD8, cuya expresión está íntimamente relacionada con la función efectora de las células T. Ambas moléculas, aumentan la capacidad de respuesta de las células T a los antígenos, enviando señales que potencian la adhesión entre las células T y las CPAs. La mayoría de los linfocitos T γδ no expresan CD4 o CD8. De esta forma, los linfocitos T αβ maduros se pueden dividir en función de la expresión de estas moléculas en su superficie, $CD4^+CD8^-$ y $CD4^-CD8^+$. Se puede establecer otra clasificación de los linfocitos T αβ según la función que desempeñan, por un lado se encuentran los linfocitos T con funciones efectoras, que incluyen a los linfocitos T $CD4^+$ colaboradores o Th (del inglés, *T helper*) y a los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos. Por otro lado, los linfocitos T con función reguladora, entre otros, los linfocitos T $CD4^+$ reguladores naturales (Treg) y a los linfocitos T $CD8^+$ supresores (Ts) (Jensen, 2007).

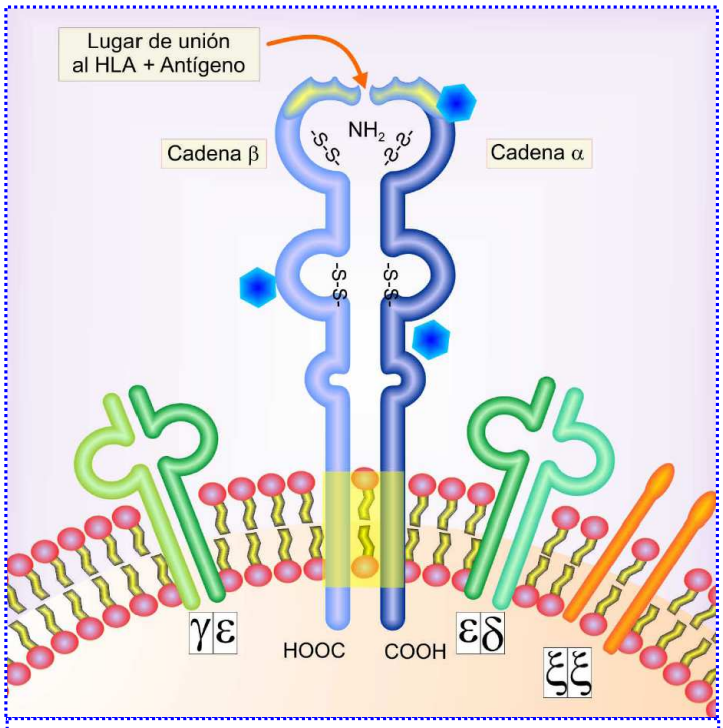

Figura 13. Estructura molecular del complejo TCR del linfocito T. Las moléculas γ, δ, ε y ζ forman el complejo CD3 (tomada de González- Molina y Alonso, 2005).

- ✓ **Linfocitos T CD4$^+$**

Las células Th reconocen a los antígenos que son presentados en el contexto del HLA clase II (Trivedi, 2007). La principal función efectora de estas células es la secreción de citoquinas, que actúan sobre linfocitos B, otras células T, leucocitos inflamatorios y endotelio vascular, promoviendo y regulando las respuestas inmunitarias humorales, celulares e inflamatorias. Los linfocitos Th cuando son activados, se pueden dividir en dos grupos, Th1 y Th2 (Mosmann y cols., 1986), en función del patrón de citoquinas que secretan. De manera que, las células Th1 secretan fundamentalmente INF-γ, IL-2 y TNF-α y las Th2 IL-4, IL-5 e IL-13, pero también TNF-α e IL-9, y en pequeñas cantidades IL-2 (Zhu y cols., 2010). Inicialmente se pensó que las células Th1 provocaban el rechazo en los aloinjertos, mientras que las células Th2 estaban relacionadas con fenómenos de tolerancia, sin embargo, estudios posteriores revelaron la implicación de ambos tipos celulares en fenómenos de rechazo. De manera que, las células Th1 median la inmunidad celular y las células Th2 la inmunidad humoral, ambas, de forma independiente, son capaces de provocar la destrucción del aloinjerto (Le Moine y cols., 2002; Barbara y cols., 2000; Issa y cols., 2010).

Se identificó una tercera población de células T CD4$^+$ efectoras que podrían derivar de células T CD4$^+$ naive (Murphy y cols., 2003; Aggarwal y cols., 2003; Cua y cols., 2003). Estas células llamadas Th17 (Park H y cols., 2005; Harrington y cols., 2005; Veldhoen y cols., 2006), fueron caracterizadas por la producción de IL-17A, IL-17F e IL-22 como principales citoquinas, también producían IL-21 (Zhou y cols., 2007; Nurieva y cols., 2007; Korn y cols., 2007). Se ha demostrado que la población Th17 también está implicada en el rechazo de aloinjertos (Atalar y cols., 2009; Benghiat y cols., 2009; Afzali y col., 2007 (b)), alterando así, el clásico paradigma de Th1/Th2 (Mosmann y cols., 1986), y en el desarrollo de numerosas enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Crome y cols., 2010).

- ✓ **Linfocitos T CD8$^+$**

Los linfocitos T CD8$^+$ son necesarios para el reconocimiento y eliminación de células infectadas por patógenos intracelulares (Nagata y Koide, 2010.), así como en la respuesta inmunitaria antitumoral (Tsukishiro y cols., 2003). Reciben la señal de

activación al reconocer a través del TCR los péptidos antigénicos en las moléculas HLA clase I (Arosa, 2002). Al recibir esta señal, proliferan y se diferencian por un lado en linfocitos T citotóxicos, que mueren por apoptosis después de realizar sus funciones efectoras y, por otro, dan lugar a linfocitos T $CD8^+$ memoria, que se generan en cantidades muy pequeñas y se mantienen para luchar contra los mismos antígenos en exposiciones posteriores, dando lugar así a una respuesta más rápida y agresiva (Kaech y cols., 2002; Brenchley y cols., 2003).

Como se ha comentado anteriormente, los linfocitos T requieren de una segunda señal para activarse, en este proceso tiene gran importancia la molécula coestimuladora CD28 que se encuentra presente en la mayoría de los linfocitos T $CD4^+$, mientras que el porcentaje de células T $CD8^+$ que la expresan es muy variable. Por lo tanto, los linfocitos T $CD8^+$ se pueden clasificar en dos subpoblaciones atendiendo a la expresión de dicha molécula: linfocitos T $CD8^+CD28^+$ y linfocitos T $CD8^+CD28^-$. En los linfocitos T $CD8^+$ la presencia de CD28 es esencial para su activación y para la generación de células T citotóxicas específicas de antígeno (Acuto y Michel, 2003; Fuse y cols., 2008). Como consecuencia de la estimulación antigénica crónica, los linfocitos T $CD8^+$ se diferencian a linfocitos T $CD8^+CD28^-$ (Arosa, 2002), que en función del fenotipo que presenten, pueden desempeñar funciones citotóxicas o supresoras.

En los linfocitos T citotóxicos, asociado a la pérdida de la molécula CD28, se produce un aumento en la expresión de la molécula CD57 (Merino y cols., 1998; Bandrés y cols., 2000). Los linfocitos $CD8^+CD28^-CD57^+$ se han considerado altamente citotóxicos, ya que su expresión se correlaciona con la producción de granzimas y perforinas, que actúan sobre la célula diana destruyéndola por lisis osmótica (Chattopadhyay y cols., 2009). Esto llevaría a pensar que las células $CD8^+CD28^-$ negativas para CD57, tienden a comportarse como inmunosupresoras mientras que las que son positivas para CD57 muestran actividad citotóxica. De este modo, CD57 podría ser un marcador para diferenciar entre linfocitos T $CD8^+CD28^-$ citotóxicos y supresores (Strioga y cols., 2011). Además, estos linfocitos $CD8^+CD28^-CD57^+$, expresan altas cantidades de un gen que codifica para una proteína denominada granulisina, que actúa como efector crítico en la respuesta de los linfocitos T citotóxicos a patógenos intracelulares y células tumorales, además de actuar como un quimioatrayente y activador proinflamatorio (Le Priol y cols., 2006). Los linfocitos T $CD8^+CD28^-CD57^+$

también producen altas cantidades de citoquinas inmunomoduladores como IFN-γ (interferón- γ) y pro-inflamatorias como TNF-α (Eylar y cols., 2001).

6.3.2.4. Moléculas coestimuladoras

En la actualidad se conocen diversos pares de moléculas receptor/ligando con actividad accesoria o coestimuladora de la inmunidad específica. Dependiendo del tipo de moléculas involucradas, esta segunda señal puede llevar al desarrollo de una reacción inflamatoria o favorecer la regulación inmunitaria. A parte de la familia CD28:B7 se han descrito numerosas moléculas coestimuladoras, como la superfamilia de receptores de TNF (TNFR), que juegan un papel importante en la transmisión de señales coestimuladoras tanto en etapas tempranas como tardías de la respuesta inmunitaria. Una de las interacciones mejor conocidas y que han sido parcialmente objeto de estudio en esta tesis es la de CD28 y CTLA-4 en el linfocito T y las moléculas de la familia B7 en las CPAs.

CD28 es un homodímero de 44kDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. En humanos, CD28 se expresa constitutivamente en más del 90% de los linfocitos T $CD4^+$ y en el 50% de los T $CD8^+$. Cuando CD28 interacciona con sus ligandos, B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), expresados en la CPA, potencia la expresión de IL-2 y la proliferación celular (Favero y Lafont, 1998), aumenta la supervivencia de las células T y previene la inducción de anergia (Lenschow y cols., 1996). CD28, además de mediar la coestimulación, también aumenta la expresión de otras moléculas coestimuladoras en las células T tales como CD40L (Grewal y cols., 1996; Yang y Wilson 1996). In vitro se ha demostrado que la ausencia de coestimulación a través de CD28 bloquea la diferenciación de las células T $CD4^+$ naive hacia un fenotipo Th2 (Schweitzer y Sharpe 1998; Rulifson y cols., 1997; Salomon y Bluestone 1998; Rogers y Croft 2000).

En receptores de injertos hepáticos, existe una relación directa entre el aumento de la expresión de la molécula CD28 en linfocitos T de sangre periférica y la aparición de rechazo agudo (García-Alonso y cols., 1997; Minguela y cols., 2006; Boleslawski y cols., 2008). Por otro lado, en estos pacientes una disminución en la frecuencia de células T $CD8^+$ que expresan $CD28^+$ predice la aparición de novo de tumores malignos a largo plazo (Boleslawski y cols., 2011).

CTLA-4 o CD152 es una molécula estructuralmente homóloga a CD28 que también se une a B7-1 y B7-2, sin embargo, solo se expresa en linfocitos T activados (Abbas y Litchman, 2004). En relación a su función, la interacción de CD28 con sus ligandos desencadena una señal positiva, que da lugar a la activación y expansión clonal de linfocitos T, y a la producción de citoquinas (Linsley y Ledbetter, 1993; Thompson, 1995; June y cols., 1994; Bluestone, 1995), en contraste CTLA-4 transduce señales negativas que atenúa la respuesta de la célula T (Linsley y cols., 1991; Walunas y cols., 1994; Walunas y cols., 1996).

Las moléculas CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) presentan dos dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. CD80 y CD86 se expresan principalmente en células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Ambas moléculas comparten el 25% de homología e interaccionan con los receptores CD28 y CTLA-4, aunque B7-1 tiene más afinidad por CTLA-4 y B7-2 por CD28 (Pentcheva-Hoang y cols., 2004). La expresión de B7-1 es lentamente inducida y estable durante un largo periodo de tiempo (4-5 días), en comparación con B7-2 que es inducida rápidamente y alcanza su máximo a las 48 horas (Lenschow y cols., 1996; Hathcock y cols., 1994; Inaba y cols., 1994; Lenschow y cols., 1993). Estas moléculas, además, modulan la diferenciación de las células Th1 y Th2, B7-1 favorece la diferenciación Th1 y B7-2 incrementa la producción de IL-4 y en general las respuestas Th2 (Kuchroo y cols., 1995). Así mismo, B7-2 tiene un papel en la proliferación de las células B, la producción de IgG1, IgG2a e IgE y la expresión de moléculas anti-apoptóticas (Jeannin y cols., 1997; Suvas y cols., 2002). Por el contrario B7-1 reduce la proliferación de las células B y favorece la expresión de moléculas pro-apoptóticas (Hirokawa y cols., 1996; Suvas y cols 2002). Así, en trasplante cardiaco se ha relacionado la señalización a través de B7-2 con una mayor incidencia de rechazo agudo del injerto, mientras que la señalización continua a través de B7-1 contribuye más al desarrollo del rechazo crónico (Kim y cols., 2001).

ICOS (coestimulador inducible, del inglés, *inducible costimulator*) es otra molécula coestimuladora que se expresa en linfocitos T activados. En humanos presenta un 24% de homología con CD28 y un 17% con CTLA-4. Su ligando es la molécula B7RP-1 que se expresa en CPAs y en células parenquimatosas como la de los túbulos renales y glándula prostática. Su expresión aumenta con la inflamación

(Ozkaynak y cols., 2001). La coestimulación a través de ICOS provoca un aumento de la proliferación celular y parece estar implicada en el desarrollo de una respuesta Th2 (Clay y cols., 2009; Shilling y cols., 2009).

Las moléculas coestimuladoras de la superfamilia de receptores de TNF son proteínas transmembrana tipo I que se caracterizan por presentar dominios extracelulares ricos en residuos de cisteína (Schönbeck y Libby, 2001). Entre ellas CD40 se expresa en CPAs incluyendo a linfocitos B y su ligando, CD40L, se expresa en las células T activadas. Las interacciones entre CD40-CD40L determinan la diferenciación de las células T naive a células T efectoras y favorecen el cambio de isotipo en las células B. La proteína Fas, también denominada CD95 o APO-1, es una proteína de 48kDa que se expresa en el timo, hígado, corazón, riñón, ovarios y pulmones (Oehm y cols., 1992; Itoh y cols., 1991), células NK (Robertson y cols., 1995), monocitos, macrófagos, células T y B activadas y en líneas celulares tumorales (Suda y cols., 1993). La unión a su ligando FasL, induce la apoptosis de las células que expresan Fas (Itoh y cols., 1991). FasL o CD95L, es una proteína de membrana de 40kDa que se expresa en linfocitos T activados y células NK y de forma constitutiva en células endoteliales, en tejidos como los testículos y los ojos y en neutrófilos (Suda y cols., 1995; Griffith y cols., 1995; French y cols., 1996; Sata y Walsh, 1998; Liles y cols., 1996).

En trasplante hepático, la expresión de CD95 en linfocitos T aumenta significativamente en pacientes que presentan rechazo agudo (Marín y cols., 2002). Además, este aumento de la expresión de CD95 en células de sangre periférica asociado a la presencia de episodios de rechazo agudo, está condicionado por la presencia de infecciones VHB/VHC (Minguela y cols., 2006).

En aloinjertos cardiacos, las células T $CD4^+$ que median el rechazo agudo requieren de la expresión de perforina, y de CD95 por parte del injerto (Grazia y cols., 2010). De hecho, biopsias de pacientes con rechazo agudo presentaron mayores niveles de Fas y FasL (Pérez y cols., 2006). Por otro lado, se ha descrito que INF-γ actúa en cooperación con la vía Fas-FasL para mediar la apoptosis de células del músculo liso de las arterias y con ello acelerar la progresión del CAV (Hart-Matyas y cols., 2010). En contraste, otros estudios indican que la expresión de FasL en el endotelio de los vasos trasplantados, puede ejercer un efecto protector en la hiperplasia de la íntima de las

arterias ya que puede inducir apoptosis en las células T, monocitos y macrófagos infiltrantes (Sata y cols., 2001).

6.3.3. Células reguladoras

En la actualidad se han descrito diversos subtipos celulares con capacidad de regular o suprimir la respuesta inmunológica a nivel periférico, que contribuyen de forma decisiva al mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia inmunológica. Células con capacidad reguladora existen tanto entre las células presentadoras de antígeno como entre los linfocitos T, B y NK, pero por su importancia en esta memoria se revisarán tan solo algunas de las células T reguladoras.

6.3.3.1. Linfocitos T reguladores $CD4^+$

A su vez con dos subtipos fundamentales, las células T reguladoras $CD4^+$ naturales (nTreg) y las células T reguladoras $CD4^+$ inducidas (iTreg).

- ✓ El término de nTreg se utiliza para denominar las células T $CD4^+CD25^{++}$ (Sakaguchi y cols., 2001; Shevach y cols., 2001), que son generadas en el timo y comprenden aproximadamente el 5-10% de las células $CD4^+CD8^-$ de sangre periférica. La expresión de CD25 (cadena α del receptor IL-2) es constitutiva y muy elevada en nTreg, por ello también se las define como células $CD4^+CD25^{higt}$ (Baecher-Allan y cols., 2001), en contraposición a las células T $CD4^+$ efectoras recién activadas, en las que la expresión de CD25 es más baja y transitoria (Fehérvari y Sakaguchi, 2004; Sakaguchi, 2005). Además, las nTregs expresan de forma definitoria el factor de transcripción FOXP3 (Fontenot y Rudensky, 2005), el cual está directamente implicado en la diferenciación de las células nTreg en el timo y juega un papel importante en su función efectora (Fontenot y cols., 2003). De entre otros marcadores las nTreg pueden expresar, CTLA-4, GITR (del inglés, *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), CD62L, CD44, CD69, CD45RB, TNFR2 (del inglés, *tumour necrosis factor receptor type 2*), CD122, CD103 (integrina αEβ7), CD134 (OX40), TGF-β (factor de crecimiento transformante beta, del inglés, *transforming growth factor beta*), CD39 y CD73 (Chen y Oppenheim, 2011; Josefowicz y cols., 2012).

Las células nTreg son capaces de suprimir tanto las respuestas inmunitarias innatas (Serra y cols., 2003), como las repuestas inmunitarias adaptativas (Janssens y

cols., 2003). Su mecanismo de actuación es a través de contacto celular y lo hacen previa activación vía TCR. Además de prevenir enfermedades autoinmunes, pueden inducir tolerancia en trasplantes ya que son capaces de suprimir la respuesta frente a aloantígenos (Dieckmann y cols., 2001).

✓ Las iTreg son otra subpoblación de células T reguladoras $CD4^+$ que engloban a las células Th tipo 3 (Th3) (Weiner, 2001) y a las tipo 1 (Tr1) (Roncarolo y cols., 2001). Estas células suprimen la respuesta alogénica mediante la secreción de citoquinas. Las células Tr1 se localizan en tejidos inflamados y realizan su función supresora de una forma no dependiente del antígeno, a través de citoquinas supresoras como IL-10 y TGF-β (Roncarolo y cols., 2006). Las células Th3 son células productoras de TGF-β con un funcionamiento similar a Tr1 (Verbsky, 2007).

En receptores de injertos cardiacos, se ha demostrado que ratios altos de las subpoblaciones Th1/Treg, se asocian con mayor rechazo agudo así como a una mayor incidencia de CAV (Mirabet y cols., 2011).

6.3.3.2. Linfocitos T supresores $CD8^+$ (Ts)

Igualmente se han reconocido diversas subpoblaciones de células T $CD8^+$ con capacidad reguladora/supresora, generalmente relacionadas con el fenotipo $CD8^+CD28^-$. Estas células se desarrollan tras estimulación repetida de células T y se asocian generalmente con fenotipos efectores, en muchos casos en estadios finales de diferenciación, que expresan frecuentemente moléculas asociadas a la actividad de las células NK, moléculas KIR.

✓ Linfocitos Ts $CD8^+CD28^-FOXP3^+$: Estas células actúan por contacto directo sobre las CPAs, tanto profesionales (células dendríticas) como no profesionales (células endoteliales), transformandolas en CPAs tolerogénicas al inducir la expresión de los receptores inhibidores ILT-3 e ILT-4 (Chang y cols., 2002; Manavalan y cols., 2004; Vlad y cols., 2005). Tanto ILT-3 como ILT-4, miembros de la familia de los receptores inhibidores de las células NK, presentan largas colas citoplásmicas con motivos ITIM e inhiben la producción de NF-kB. La sobreexpresión de ILT-3 e ILT-4 en las CPAs inhibe la activación mediada por CD40 (Chang y cols., 2002), reduciendo la capacidad de las

CPAs para transcribir moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 (Liu y cols., 1999; Li y cols., 1999).

Estudios realizados en receptores de trasplante de órganos sólidos, mostraron que cifras elevadas de estas células Ts en la circulación se asociaban negativamente con la aparición de rechazo agudo y crónico, por lo que era posible reducir la dosis de inmunosupresores, llevándolos a niveles mínimos sin, aparentemente, alterar la función del injerto (Ciubotariu y cols., 2001; Colovai y cols., 2003; Sindhi y cols., 2005).

- ✓ Linfocitos Ts $CD8^{+}CD28^{-}FOXP3^{-}$: Al igual que la población Tr1 no son específicos de antígeno, e inhiben la actividad de las CPAs, la proliferación de células T y la citotoxicidad de linfocitos T citotóxicos a través de la secreción de IL-10 (Filaci y cols., 2004; Filaci y cols., 2007; Fenoglio y cols., 2008).

6.4. Factores solubles que regulan la respuesta alogénica

6.4.1. Citoquinas

Las citoquinas son glicoproteínas de bajo peso molecular producidas por células de la respuesta inmunitaria innata y adquirida, y actúan como medio de comunicación entre células. Tienen una estructura diversa pero comparten importantes propiedades: 1) se producen de forma breve y autolimitada; 2) tienen un efecto pleiotrópico, es decir, cada una de ellas puede actuar sobre diferentes tipos celulares; 3) influyen a menudo en las acciones de otras citoquinas; 4) pueden actuar en la misma célula que la secreta (acción autocrina) o bien en una célula vecina (acción paracrina) o en células distantes (acción endocrina); 5) ejercen sus acciones al unirse a receptores específicos de membrana en las células diana; y 6) la síntesis de unas citoquinas puede influenciar la producción de otras (Abbas y Litchman, 2004).

El tipo de respuesta inmunitaria, ya sea citotóxica, humoral, celular o alérgica, está determinada por el tipo y balance de citoquinas que intervienen (Commins y cols., 2010).

- ✓ **Citoquinas producidas por CPAs: respuestas innatas y adaptativas.**

Las CPAs producen citoquinas que actuan tanto en la respuesta innata tras estimulación a través de PRRs (del inglés, *pattern recognition receptors*) (TNF, IL-1, IL-6, IL-8 o CXCL8 y otras quimioquinas), como adaptativas al interaccionar con las células Th (IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27 e IL-32).

Entre las citoquinas pro-inflamatorias producidas por CPAs, **TNF-α** media en el proceso inflamatorio favoreciendo la extravasación de leucocitos y en la activación de linfocitos T y B. **TNF-β**, producida por linfocitos (Beutler y Cerami, 1989), induce efectos citotóxicos directamente sobre las células cancerígenas y estimulan respuestas inmunitarias antitumorales. **IL-1**, familia formada por 5 péptidos IL-1a, IL-1b, IL-1ra, IL-18, e IL-33 (Dinarello y Wolff, 1993), favorece la activación de linfocitos Th al aumentar la producción de IL-2 y la expresión de su receptor IL-2R. **IL-6** induce la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, media en la activación, crecimiento y diferenciación de las células T, además tiene un papel fundamental en la diferenciación de células Th17 (Akira y cols., 1993).

Otras citoquinas secretadas por CPAs se relacionan más directamente con la inmunidad específica, **IL-12 e IL-23**, están implicadas en la activación de células T y en su diferenciación a células Th1 y Th17, respectivamente (Brunda, 1994; Oppmann y cols., 2000). IL-12 además de estimular la producción de IFN-γ y otras citoquinas, activa e induce la proliferación y citotoxicidad de las células NK y linfocitos T citotóxicos. **IL-18** también induce la producción de IFN-γ (Dinarello, 2000) y tiene un papel muy importante en la adhesión celular. La expresión de su receptor aumenta por la acción de IL-12, por lo que tiene un efecto sinérgico en la estimulación de la liberación de IFN-γ. **IL-15** comparte con IL-2 la cadena beta del IL-2R y al igual que ella es un factor de crecimiento de células T y una molécula quimiotáctica para estas células. IL-2 e IL-15 difieren en su papel dentro del sistema inmunitario adaptativo ya que IL-2, pero no IL-15, está implicada en la generación y mantenimiento de las células Treg, mientras que IL-15 es necesaria para el mantenimiento y la supervivencia de las células T $CD8^+$ memoria y las células NK. **IL-27** favorece la inmunidad mediada por células Th1 y tiene una acción sinérgica con IL-12 en inducir la secreción de IFN-γ por células NK y Th. **IL-32** induce la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF-α y quimioquinas en macrófagos.

- ✓ **Citoquinas e inmunidad humoral**

IL-7 e **IL-11** son factores de crecimiento de las células madre linfoides y contribuyen a la maduración de los linfocitos B en la médula ósea, además IL-7 es importante en el desarrollo de linfocitos B y T. Los linfocitos B maduros tras reconocer al antígeno e interaccionar con los linfocitos Th, que proporcionan señales coestimuladoras a través de CD40-CD40L, inducen el cambio de isotipo de su Ig. En función del tipo de antígeno, el lugar de reconocimiento y las células inmunitarias que intervienen, las citoquinas predominantes en el microambiente condicionan el isotipo a adquirir por el linfocito B. Así, **IL-4 e IL-13** favorecen los isotipos IgE e IgG4, **IFN-γ** los isotipos IgG1 e IgG3, mientras que **TGF-β** secretado por células (Th3) favorece los isotipos IgA e IgG2 (Sonoda y cols., 1989). **IL-21** es fundamental en la proliferación y supervivencia de células B y en su diferenciación a células plasmáticas productoras de Igs (Konforte y cols., 2009).

- ✓ **Citoquinas e inmunidad celular**

IL-2 junto a **IL-6** forma parte fundamental de la "tercera señal" que requieren los linfocitos T para su estimulación efectiva tras su encuentro con el antígeno, e inducen la secreción simultánea de IL-2 y de su receptor de alta afinidad IL-2R. La unión de la IL-2 al IL-2R induce la proliferación clonal de estas células, lo que asegura que solo se activen las células T efectoras específicas del antígeno. Además de su papel como efector y factor de crecimiento de T efectoras y Tregs, esta citoquina está implicada en la activación de las células NK, células B y macrófagos.

Las respuestas inmunitarias frente a infecciones víricas y las células neoplásicas, están mediadas por células T citotóxicas y NK que producen citoquinas como los IFNs. Los IFNs tipo I inhiben la replicación viral y estimulan la inmunidad antiviral de células T citotóxicas y NK. Los de tipo II (IFN-γ) tienen una modesta actividad antiviral pero son de gran importancia en la inmunidad celular. Los de tipo III (IL-29, IL-28A e IL-28B) comparten características funcionales con los de tipo I (Sheppard y cols., 2003). **IFN-γ**, producido por células Th1, linfocitos T citotóxicos y NK, es la citoquina más importante en la inmunidad mediada por células (Farrar y Schreiber, 1993). Induce el aumento de expresión de HLA clase I y II, estimula la presentación de antígenos y la producción de citoquinas por CPAs. Así mismo, estimula las funciones fagocíticas de las fagocitos

mononucleados. También estimula las funciones asesinas de las células NK y los neutrófilos.

Las diferentes subpoblaciones de linfocitos Th se pueden identificar en base al repertorio de citoquinas que secretan (Mosmann y Coffman, 1989).

✓ Diferenciación hacia Th1

La diferenciación de Th1 está inducida y mantenida por **IL-12, IL-18 e IL-27**, aunque comparten las vías de señalización con IL-12 (Manetti y cols., 1993). Las células dendríticas y los fagocitos mononucleados producen IL-12 y son los mediadores más importantes en la diferenciación Th1. IL-12 interacciona con los linfocitos Th naive para activar STAT4, que lleva a la expresión del factor de transcripción T-bet (*T-box expressed in T cells*), responsable último de la diferenciación Th1. T-bet induce la producción de IFN-γ e IL-12R y bloquea la diferenciación Th2 y Th17 (Villarino y cols., 2004).

✓ Diferenciación hacia Th2

IL-4 es un factor determinante de la diferenciación Th2 al activar STAT6 (Seder y cols., 1992), que a su vez promueve la expresión de GATA-3, regulador maestro de las células Th2, y suprime la expresión de T-bet y la diferenciación Th1 y Th17. La fuente principal de IL-4 responsable de la diferenciación Th2 son los linfocitos T $CD4^+$ vírgenes, si bien basófilos, células NK y mastocitos también son capaces de secretar importantes cantidades de IL-4 (Bilenki y cols., 2004; Akbari y cols., 2006). **IL-19** e **IL-25** también favorecen la desviación Th2 (Gallagher y cols., 2004, Tamachi y cols., 2006). Aunque, en la actualidad se considera que las dos citoquinas más importantes responsables de la desviación Th2 son IL-33 y TSLP (del inglés, *Thymic stromal lymphopoietin*). **IL-33,** citoquina similar a IL-1, media su señalización a través de un receptor relacionado con el IL-1R (Coyle y cols., 1999) que se expresan en células Th2, macrófagos, células madre hematopoyéticas y fibroblastos. **TSLP** se expresa en células epiteliales de piel, intestino y pulmones, y activa a las células dendríticas de manera que promueve la producción de citoquinas Th2 (Wang y cols., 2006).

✓ Diferenciación hacia Th17

La producción selectiva de IL-17 por una clona de linfocitos Th llevó a definir a los linfocitos Th17 (Dong, 2006). TGF-β por si sola, o en presencia de IL-6 ó IL-4, está implicada en la diferenciación de Tregs, Th17 o Th9, respectivamente (Bettelli y cols., 2006). IL-6 a través de la activación de STAT3 media la diferenciación de Th17 como resultado de la activación de RORγt (del inglés, *related orphan receptor*), el regulador maestro de Th17 (Holland y cols., 2007; Constantin y cols., 2000; Milner y cols., 2008; Minegishi y cols., 2009). **IL-17** tiene un papel fundamental en las respuestas celulares frente a patógenos extracelulares (Kawaguchi y cols., 2004), pero también contribuye de forma importante al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Molet y cols., 2001).

✓ **Citoquinas antiinflamatorias**

Algunas citoquinas tienen efectos principalmente antiinflamatorios, como L-1ra, TGF-β y los miembros de la familia de IL-10. **TGF-β,** producida por eosinófilos, monocitos y células T, es sin duda la más pleiotrópica, con efectos estimuladores e inhibidores sobre diversos tipos celulares (Sporn y Roberts, 1992). En general, inhibe la proliferación de células B, Th, linfocitos T citotóxicos y NK e induce apoptosis. **IL-10** es una citoquina inmunoreguladora producida principalmente por Treg, monocitos y células B (Del Prete y cols., 1993) que inhibe la producción de IFN-γ en los linfocitos Th1; de IL-4 e IL-5 en los Th2; de IL-1b, IL-6, CXCL8, IL-12, de TNF-α en fagocitos mononucleados; de IFN-γ y TNF-α en células NK y la expresión de MHC clase II y moléculas coestimuladoras en CPAs. También, es capaz de inducir la expresión de HLA-G en cultivos de trofoblastos y monocitos (Moreau y cols., 1999). **IL-35**, secretada principalmente por las células Treg, suprime respuestas inflamatorias induciendo la proliferación de Treg y reduciendo la actividad de las células Th17 (Niedbala y cols., 2007).

6.4.2. Quimioquinas

Son una superfamilia de pequeños polipéptidos que regulan el tráfico leucocitario tanto en condiciones de inflamación, mediando la migración a los lugares de daño tisular, como en condiciones fisiológicas, mantenimiento la supervivencia y la

organización espacial de los órganos linfoides secundarios. Las quimioquinas coordinan de forma precisa el tráfico leucocitario hacia el microambiente linfoide, regulando la adhesión, la quimiotaxis y la activación de muchas subpoblaciones de linfocitos, además de regular el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación (Rot y von Andrian, 2004). Se han definido cuatro grupos de quimioquinas según los residuos conservados de cisteína de su extremo amino-terminal, pero la mayoría pertenecen a la clase CC, en la que las cisteínas conservadas son continuas, y a la clase CXC, en las que hay algún aminoácido entre ellas (Zlotnik y Yoshie, 2000). Además de estas, también se han descrito, una clase C, con una única cisteína en el extremo amino-terminal, y una clase CX3C, en la que las dos cisteínas están separadas por tres residuos (Bazan y cols., 1997).

Todos los receptores de quimioquinas tienen una estructura característica con 7 dominios alfa transmembrana y están asociados a proteínas G (Barrett, 1997; Ben-Baruch y cols., 1995). La porción intracelular carboxiterminal contiene residuos serina y treonina, los cuales son fosforilados y participan en la transducción de señales. Los linfocitos Th1 y Th2 se pueden diferenciar por la expresión de receptores para quimioquinas, los Th1 expresan CXCR3, CCR1 y CCR5, mientras que los linfocitos Th2 expresan CCR3 y CCR4 (Nickel y cols., 1999).

Las quimioquinas de las familias CC y CXC se producen por leucocitos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos, inducidas por microorganismos y por citoquinas inflamatorias (Abbas y Litchman, 2004). IL-1 y TNF-α son potentes inductores de la expresión de quimioquinas CC y CXC en gran variedad de tipos celulares (Barrett, 1997). En contraste, la IL-10 y TGF-β disminuyen de forma general la producción de quimioquinas (NickeL y cols., 1999).

6.4.3. Citoquinas y quimioquinas en trasplante cardiaco

Algunas citoquinas se han identificado como biomarcadores pronóstico asociados con el riesgo de rechazo agudo. Tradicionalmente se han asociado las respuestas Th1 al desarrollo del rechazo agudo del aloinjerto (Benichou y cols., 1999; Dallman y cols., 1991), sin embargo, estudios recientes han señalado que IFN-γ puede no ser esencial para estas respuestas, lo que sugiere que otras citoquinas pueden contribuir en la cascada de la inflamación y facilitar el rechazo (Halloran y cols., 2001;

Miura y cols., 2003). En este sentido, se han implicado a las células Th17, ya que varios estudios demostraron que los niveles de IL-17 séricos aumentaron en pacientes con rechazo agudo de diversos tipos de injertos (Loong y cols., 2002; Vanaudenaerde y colls., 2006; Fábrega y cols., 2009).

En el desarrollo de CAV intervienen fundamentalmente los macrófagos, junto a los linfocitos Th1 productores de IFN-γ (Tellides y Pober, 2007). IFN-γ estimula fuertemente a los macrófagos y estos mediante la producción de IL-12 e IL-18 estimulan a los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ infiltrantes, formando así un círculo de retroalimentación positiva para la producción de IFN-γ (Mitchell, 2009). Los macrófagos una vez activados pueden deteriorar de forma local las paredes vasculares de las arterias mediante la producción de proteasas, metabolitos del ácido araquidónico y especies reactivas del oxígeno. Además, mediante la producción de PDGF (del inglés, *platelet derived growth factor*) y TGF-β, inducen la proliferación de fibroblastos y de células del músculo liso de la pared de las arterias, con la síntesis de matriz extracelular, dando lugar a una proliferación e hiperplasia de la íntima vascular y fibrosis. Junto a esto, las células del músculo liso de la lámina media de las arterias también sintetizan IFN-γ cuando son estimuladas por IL-12 y IL-18 (Gerdes y cols., 2002). Se ha sugerido que la capacidad de los macrófagos y de las células musculares lisas para sintetizar IFN-γ, puede representar un mecanismo por el cual se puede desarrollar CAV en ausencia de respuestas aloespecíficas (Mitchell, 2009).

Otros estudios han demostrado la existencia de un mediador denominado, CTGF (del inglés, *connective tissue growth factor*), inducido por TGF-β en múltiples tipos celulares, miocitos cardiacos y fibroblastos (Chen y cols., 2000; Leask y Abraham, 2003), que desempeña un papel importante en el desarrollo de fibrosis y rechazo crónico en injertos renales y cardiacos (De Winter y cols., 2008; Csencsits y cols., 2006; Cheng y cols., 2006; Yuan y cols., 2009).

IL-6 también se ha relacionado con el desarrollo de fibrosis en injertos cardiacos con rechazo crónico (Diaz y cols., 2009). IL-6 junto a TGF-β favorece una respuesta Th17, citoquina implicada igualmente en el desarrollo de CAV por sus efectos fibróticos (Yuan y cols., 2008; Faust y cols., 2009). En este sentido, también CsA se ha relacionado con el desarrollo de CAV, aparentemente al inducir la síntesis de

TGF-β y de otros factores fibrogénicos (Wasowska y cols., 2001; Khanna y cols., 2002; Waiser y cols., 2002).

En relación de las quimioquinas con el trasplante cardiaco, las de tipo CC se descubrieron originalmente como quimioatrayentes involucrados en el reclutamiento y la activación de células inflamatorias mononucleares (Luster, 1998). **MCP-1** (del inglés, *monocyte chemoat tractant proteína-1*) o CCL2, es el prototipo de quimioquina CC y puede reclutar monocitos, células T o NK a través de la unión a su receptor CCR2 (Luster, 1998; Rollins, 1997; Izutani y cols., 1995). CCR2 se ha relacionado con una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas, entre ellas la aterosclerosis (Yla-Herttuala y cols., 1991). **CCL5** se ha relacionado tanto en la aterosclerosis como en la patogénesis de CAV (von Hundelshausen y cols., 2001). Entre las quimioquinas de la familia CXC, destacan las inducidas por INF-γ, CXCL-10, CXCL9 y CXCL11, por su fuerte asociación con el desarrollo de CAV (Zhao y cols., 2002; van Loosdregt y cols., 2006).

7. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA E INMUNOREGULACIÓN

La tolerancia inmunológica se define como la incapacidad de producir una respuesta específica frente a un antígeno, ya sea propio o extraño, inducida por el contacto previo con dicho antígeno. Una propiedad fundamental del sistema inmunitario es la tolerancia a lo propio o autotolerancia. Los antígenos que inducen tolerancia se conocen como tolerógenos, para distinguirlos de los inmunógenos, o capaces de generar inmunidad. Cuando la tolerancia inmunológica fracasa se desencadenan reacciones inmunitarias contra antígenos propios, o autoinmunidad (Abbas y Litchman, 2004).

En trasplante, la tolerancia indica un estado de ausencia de respuesta agresiva contra el injerto, manteniendo una función normal frente a otros antígenos (Sykes, 2007). Uno de los principales objetivos en el campo del trasplante de órganos sólidos, es la disminución o retirada completa de los fármacos inmunosupresores sin que se produzca la pérdida del injerto. A este proceso se le denomina tolerancia operacional y se observa hasta en un 20% de los receptores de trasplante hepático (Lerut y Sanchez-Fueyo, 2006; Pons y cols., 2008, Orlando y cols., 2009).

Existen diversas vías de inducción de tolerancia inmunológica, que actúan a diferentes niveles:

7.1. Tolerancia central

Los fenómenos de tolerancia central ocurren fundamentalmente en el timo, en un proceso de selección negativa, por el que los linfocitos T que unen complejos péptido-propio/moléculas HLA clase I o II con alta afinidad son eliminados por apoptosis, y otro de selección positiva de los que se unen con baja afinidad (González-Molina y Alonso, 2005). De esta forma, la selección tímica asegura que los linfocitos T que abandonan el timo sean capaces de reconocer antígenos presentados por moléculas del MHC propias, eliminando las células T potencialmente autorreactivas. En el contexto del trasplante, esto requeriría del establecimiento de un sistema inmunológico quimérico, en el que las células T fueran reeducadas en el timo para reconocer los antígenos del donante como propios (Salama y cols., 2007).

7.2. Tolerancia periférica

Algunos linfocitos con reactividad frente a lo propio escapan al proceso de selección tímica, por lo que se hace necesario disponer de mecanismos alternativos de tolerancia o tolerancia periférica. La tolerancia periférica de los linfocitos T tiene por objeto garantizar la falta de respuesta a antígenos propios ausentes en el timo o presentes a muy baja concentración, motivos por los que los linfocitos T no adquirieron tolerancia central (González- Molina y Alonso, 2005). Aunque estos mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria funcionan en condiciones fisiológicas, juegan igualmente un papel relevante en la inducción de tolerancia inmunológica a aloinjertos.

La eliminación y/o regulación negativa de células T reactivas frente a aloantígenos del donante se puede alcanzar tanto a nivel central, en timo y médula ósea, como en la periferia mediante diversos mecanismos:

- ✓ **Inducción de anergia de linfocitos T**

Se produce cuando la segunda señal o coestimulación es deficiente, entrando los linfocitos en un estado de falta de respuesta o anergia. Esta deficiencia en la coestimulación se puede producir por ausencia total o parcial de moléculas coestimuladoras de la familia B7 (Sykes, 2007) o por inhibición competitiva de la

coestimulación CD28/B7 por señales inhibidoras conducidas por CTLA-4 u otras moléculas inhibidoras como PD-1 (Parry y cols., 2005; Monk y cols., 2006).

- ✓ **Deleción por agotamiento clonal**

Ocurre como resultado de una estimulación crónica del antígeno o por el reconocimiento del mismo en condiciones subóptimas. La consecuencia es la eliminación o la inactivación funcional de las células que lo reconocen, en buena medida por la participación de la vía inductora de apoptosis CD95/CD95L (González-Molina y Alonso, 2005).

- ✓ **Ignorancia inmunológica**

Es el proceso por el cual el sistema inmunitario es incapaz de reconocer a ciertos antígenos, propios o extraños (Kamradt y Mitchinson, 2001), debido a que: 1) los linfocitos T no tienen acceso al tejido donde se encuentra el antígeno; 2) la concentración del antígeno es muy baja; y 3) las CPAs no presenten el antígeno o expresen niveles muy bajos (Lanzavecchia y Sallusto, 2000).

- ✓ **Supresión por células T reguladoras**

Se ha descrito en apartados anteriores como las células T reguladoras están implicadas de forma activa en la inducción y mantenimiento de la tolerancia periférica a lo propio y como se relacionan también con la tolerancia a aloinjertos (Wood y Sakaguchi, 2003; Jiang y cols., 2006). Estas células actúan sobre linfocitos T y B, directamente o a través de la producción de factores solubles, suprimiendo sus respuestas mediante la inhibición de la proliferación celular y de la producción de citoquinas y anticuerpos (Sykes, 2007; Beaudreuil y cols., 2007).

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La optimización de las terapias inmunosupresoras y del manejo clínico de los pacientes ha impulsado al trasplante ortotópico de corazón como la principal opción terapéutica en insuficiencia cardiaca terminal. Sin embargo, continúa habiendo un desequilibrio importante entre las complicaciones que la inmunosupresión evita (el rechazo) y las que favorece (las infecciones y neoplasias). Por tanto, es necesario disponer de biomarcadores que nos permitan valorar el estatus inmunitario del paciente e individualizar la terapia inmunosupresora, ajustándola a las características y situación clínica de cada paciente. Los métodos actuales de monitorización, farmacológicos y anatomopatológicos, analizan la concentración de los fármacos y los efectos directos sobre el injerto, respectivamente, pero no permiten predecir el grado de inmunosupresión efectiva, ni su influencia a corto y largo plazo en la evolución del injerto y del paciente. Actualmente existen algunos marcadores que pueden facilitar la monitorización inmunológica del paciente. Así, en trasplante hepático el análisis de la expresión de CD28 y la de receptores KIR en linfocitos T de sangre periférica ayudan a predecir la buena o mala aceptación de los injertos. HLA-G soluble igualmente se ha relacionado en diversos tipos de trasplante con una aceptación más favorable del injerto.

Con estas premisas, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: si las principales complicaciones del trasplante cardiaco tienen base inmunológica, ha de ser posible establecer biomarcadores en sangre periférica que permitan valorar el estatus inmunológico del paciente, predecir la aparición de complicaciones y, a la luz de ellos, guiar las decisiones clínicas para ajustar la terapia inmunosupresora en cada paciente de forma individualizada.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta esta hipótesis, el objetivo general que se propone es monitorizar en sangre periférica algunos biomarcadores que permitan evaluar el estatus inmunológico del paciente antes y después del trasplante cardiaco, y su relación con la patología de base (cardiopatía isquémica y no-isquémica), la frecuencia del rechazo celular agudo, la severidad del rechazo crónico (evaluado mediante IVUS), y la frecuencia y el tipo de infecciones.

Objetivos específicos:

1. Analizar y cuantificar las principales subpoblaciones leucocitarias (leucocitos, monocitos y neutrófilos) y linfocitarias (linfocitos T, B y NK), así como algunas moléculas relacionadas con su activación y función (CD80, CD86 y CD95).

2. Evaluar la expresión de CD28 y la de receptores KIR (KIR2DL1/S1 y KIR2DL2/L3/S2) en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, y compararla con la observada en los receptores de trasplante hepático de nuestro centro.

3. Evaluar la concentración de HLA-G soluble en suero y su relación con las infecciones y la evolución de los injertos cardiacos a largo plazo.

Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. METODOLOGÍA DEL TRASPLANTE DE CORAZÓN

1.1. Técnica quirúrgica

El trasplante ortotópico cardiaco puede realizarse según tres tipos de técnicas: *clásica, bicava y total*. La técnica más utilizada en la actualidad fue descrita por Lower y Shumway en 1960 (Lower y Shumway, 1960) que recibió el nombre de *técnica convencional ó clásica*, y es la técnica que se ha utilizado en los pacientes de nuestra serie. Técnica que consiste en la extracción del corazón del donante y receptor a través de una estereotomía media a nivel medio auricular, sin alterar la desembocadura de las venas cavas en la aurícula derecha y la de las venas pulmonares en la aurícula izquierda del receptor.

1.2. Seguimiento clínico post-trasplante

Tras la cirugía, los pacientes ingresaron en la unidad de cuidados intensivos (UCI) durante los primeros 7-10 días post-trasplante, pasando posteriormente a la planta de cardiología, pero manteniendo siempre las medidas de aislamiento adecuadas (guantes y mascarilla). En este periodo, se monitorizaron diariamente los niveles de CsA y se realizaron analíticas básicas (hemograma, iones, urea, creatinina, glucemia) durante la primera semana post-trasplante y cada 2-4 días el resto del primer mes y los parámetros bioquímicos se controlaron 2 veces por semana. Las biopsias endomiocárdicas se realizaron a los 7-10 días post-trasplante y posteriormente según protocolo tardío que se detalla más adelante (figura 13). Con cada biopsia además se realizó una analítica completa, electrocardiograma, radiografía de tórax y ecocardiograma.

Tras el periodo postrasplante temprano, los pacientes fueron dados de alta e ingresaron en un programa de seguimiento ambulatorio donde se efectuó un seguimiento del paciente de por vida, que incluyó el control clínico y la monitorización analítica (ciclosporinemia, hemograma, bioquímica, serología) y del rechazo (ecocardiografía y biopsias endomiocárdicas). El seguimiento de las biopsias endomiocárdicas se realizó según el calendario de biopsias, cada 10 días los 2 primeros

meses, cada 20 días el 3º y 4º mes, cada mes el 5º y 6º y con posterioridad al 6º mes se siguió un curso individualizado según las características del paciente. Tras la realización de la biopsia, el paciente permaneció hospitalizado durante 24 horas en espera del informe anatomopatológico y a la mañana siguiente se le realizó ecocardiografía, siendo dado de alta inmediatamente en caso de no ser preciso tratamiento anti-rechazo. Cuando se hizo necesaria la administración de corticoide intravenoso por la presencia de rechazo, este se inició de forma inmediata y se realizó una nueva biopsia a los 10 días.

1.3. Terapia inmunosupresora y anti-rechazo

El tratamiento inmunosupresor aplicado a estos pacientes consistió en una etapa inicial a altas dosis (ó tratamiento de inducción) para reducir la posibilidad del rechazo precoz y facilitar la aceptación del injerto, seguido de dosis de mantenimiento para favorecer la aceptación a largo plazo del injerto.

1.3.1. Tratamiento de inducción

- ✓ *Daclizumab (zenapax, Roche Farma)*: Es el tratamiento de inducción autorizado en nuestro centro (anticuerpo monoclonal anti-receptor de la interleuquina-2): la primera dosis (1 mg/kg) se administra en UCI al llegar del quirófano. Se puede repetir cada 14 días durante los primeros meses (máximo 5 dosis).
- ✓ *Basiliximab (simulect, Novartis Farma)*: Se administra por vía intravenosa en una dosis de 20 mg (10 mg para pacientes de menos de 35 Kg de peso) el día del trasplante (antes de la 6ª hora del post-operatorio) y el día 4 post-trasplante, dos dosis en total.

1.3.2. Tratamiento de mantenimiento

Consistió en una triple terapia farmacológica que incluyó un inhibidor de la calcineurina, CsA (Samdimun Neoral, Sandoz, Basilea, Suiza) ó Tacrolimus (Prograf, Astellas Pharma, Londres, Reino Unido), esteroides (metilprednisolona, Solumoderin, Pfizer, Nueva York, EE.UU.) y un inhibidor de la síntesis de nucleótidos, MMF (CellCept, Roche Farma, Basilea, Suiza).

El tratamiento con CsA se inició en el primer día post-trasplante con dosis de 3 mg/Kg/día repartido en dos tomas. Para alcanzar niveles terapéuticos circulantes se incrementó la dosis en saltos de 50mg repartidos en las dos administraciones diarias. Si la función renal estaba alterada, se utilizó una dosis menor (1-2mg/Kg/día) y se retrasó su administración hasta el cuarto día.

La dosis de inicio de tacrolimus fue de 0,05-0,15 mg/Kg/día repartida en dos tomas; en general no precisa ajuste de dosis en pacientes con disfunción renal, sin embargo los ajustes de dosis fueron necesarios en pacientes con evidencia de deterioro de la función renal inducida por el fármaco.

La prednisona se inició con dosis de 0,8 mg/Kg/día (en dos dosis) en la primera semana post-trasplante, con una reducción gradual hasta alcanzar dosis de 0,2 mg/Kg/día durante el primer mes e incluso podría ser retirada a partir del año en pacientes con buena evolución.

El MMF se inició en las primeras 24 horas post-trasplante por vía intravenosa, en dosis de 1g cada 12 horas, durante su estancia en UCI y se pasó a vía oral cuando el paciente inició su alimentación por vía oral. Los niveles en sangre que se recomiendan mantener son de 2-4 ng/dl, independientemente del tiempo post-trasplante.

1.3.3. Tratamiento del rechazo

La decisión para instaurar el tratamiento del rechazo cardiaco se basó en el resultado ofrecido por el grado histológico de rechazo (clasificación ISHLT, ver tabla 1) y en la repercusión sobre la función del injerto (reducción de la fracción de eyección, dilatación del ventrículo izquierdo, insuficiencia cardiaca y arritmias). Cuando el rechazo presentó un grado histológico igual ó mayor a 1R (ISHLT) o se detectaron cualquiera de las alteraciones clínicas mencionadas anteriormente, se administraron bolos de metilprednisolona (por vía intravenosa 250mg a 1g /día) durante 3 días.

Cuando se detectó una disminución de la FEVI se suministró tratamiento anti-rechazo con independencia de que la biopsia endomiocárdica no presentase evidencias histológicas de rechazo. Además de los bolos de corticoides, se realizó plasmaféresis y/o se reinstauró el tratamiento de inducción.

En caso de aparición de rechazo, y aunque se mantuvieran niveles correctos de CsA, se realizó cambio de inmunosupresión basal con sustitución de CsA por tacrolimus.

1.4. Diagnóstico de rechazo agudo

El diagnóstico de rechazo agudo en trasplante cardiaco se basa en la presencia de infiltrados inflamatorios en la biopsia endomiocárdica y/ó sospecha clínica.

Los pacientes se clasificaron siguiendo los criterios de la ISHLT para la clasificación del rechazo celular agudo cardiaco (ver tabla 1).

En cualquier caso, el paciente fue clasificado y tratado de rechazo agudo cuando el resultado de una biopsia ofreció un grado de rechazo histológico ≥ 1R ó cuando el paciente presentaba claras evidencias clínicas de rechazo agudo.

1.5. Control y prevención de infecciones

Para evitar las infecciones más frecuentes durante el primer mes post-trasplante, se estableció la siguiente pauta de tratamiento:

- *Profilaxis quirúrgica*: Si el receptor ingresa procedente de su domicilio y el exudado nasal era negativo para *Staphylococcus* resistente a meticilina, se empleó cefuroxima 1500 mg/vía intravenosa/8horas 3 dosis. Cuando el paciente estaba ingresado o el exudado nasal era positivo para *Staphylococcus* resistente a meticilina, se usó teicoplanina 200mg vía intravenosa en el preoperatorio y cada 12 horas durante las 48 horas posteriores.
- *Profilaxis Candida:* Nistatina suspensión 5cc/8horas vía oral.
- *Profilaxis Pneumocystis carinii*: trimetoprin-sulfametoxazol 160/800 mg/vía oral/24horas (post-extubación), durante los 6 primeros meses. En el caso de alergias a sulfamidas: pentamidina en aerosol 300 mg (disuelto en 6 ml de agua) una vez al mes.
- *Profilaxis Aspergillus*: Itraconazol 200mg/24 horas/ vía oral, durante 3 meses.
- *Profilaxis Toxoplasma:* Pirimetamina 25 mg/24 horas/vía oral + ácido fólico 1 comprimido al día. Si el donante tiene serología positiva para *Toxoplasma* y el receptor es seronegativo, tratamiento durante 6 meses.

- Si el test de Mantoux fue positivo o existía sospecha de antecedentes de tuberculosis (lesiones radiológicas, contactos familiares, etc.), se administró isoniazida 300mg por vía intravenosa durante 24 horas, y por vía oral durante un año.

La infección más frecuente y problemática entre 1 y 6 meses post-trasplante fue la infección por CMV, y su profilaxis incluyó un tratamiento de inducción durante 2 semanas con ganciclovir intravenoso (Cymevene, Roche Farma) a dosis de 5mg/Kg/12horas o vanganciclovir (Valcyte, Roche Farma) vía oral, en dosis de 900mg/12horas, seguido de un tratamiento de mantenimiento durante 3 meses con vanganciclovir vía oral a 900mg/24horas. Dichas dosis fueron dependientes en todo momento de la función renal. Si el receptor fue seronegativo para CMV y el donante seropositivo o desconocido, se mantuvo el tratamiento de inducción 4 semanas y el tratamiento de mantenimiento 6 meses.

A partir de los 6 meses postrasplante, las infecciones fueron fundamentalmente respiratorias nosocomiales. Entre las infecciones persistentes más frecuentes estuvieron CMV y VEB.

2. GRUPOS DE ESTUDIO: PACIENTES Y CONTROLES

Este estudio comprende el análisis de un total de 77 pacientes trasplantados de corazón entre los años 1999-2007 en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. Se excluyeron 27 pacientes por diversas causas, que se recogen en la Tabla 4. Esta tabla muestra además las patologías que indicaron la realización del trasplante, y la presencia de infecciones sufridas por estos pacientes a lo largo de su evolución.

Nuestro grupo final de pacientes quedó constituido por 50 trasplantes cardiacos, que fueron monitorizados durante el primer año de evolución. El grupo lo constituyeron 7 mujeres (14%) y 43 hombres (86%), con una edad media de 52±13 años. Como control, se utilizó una serie de 48 individuos sanos.

En todos los casos, se obtuvo consentimiento informado de los pacientes y controles, y el protocolo de estudio fue aprobado por el comité ético de la institución.

Tabla 4. Pacientes incluidos en el estudio.

Nº Total de pacientes	77
Pacientes excluidos:	27
- Fracaso 1^{ario} del injerto	8(29.6%)
- Seguimiento incompleto	11(40.7%)
- Problemas quirúrgicos	2(7.4%)
- Otros	6(22%)
Pacientes estudiados	50
Edad (años)	52±13
Sexo (Hombres/Mujeres)	43(86%) / 7(14%)
Patologías	
Cardiopatía isquémica	21(42%)
Miocardiopatía dilatada	25(50%)
Otras (valvular, hipertrófica)	4(6%)
Infecciones	
CMV	18(47,4%)
Otras (bacterianas, fúngicas y virales diferentes a CMV)	20(52,6%)

Los pacientes se clasificaron en diferentes grupos de estudio atendiendo a cuatro variables:

A)- Patología de base: Cuando la cardiopatía responsable del trasplante tuvo ó no un origen isquémico, los pacientes se clasificaron en:

- ✓ *Receptores con cardiopatía isquémica* (**CI**). En este grupo se incluyeron a aquellos pacientes cuya patología causante del trasplante tuvo un componente isquémico: como cardiopatía isquémica o MCDi isquémica.
- ✓ *Receptores con cardiopatía no isquémica* (**CNI**). En este grupo se incluyeron a aquellos pacientes que presentaron una patología de base sin causa isquémica: miocardiopatía hipertrófica, cardiopatía valvular, MCDi de diversas etiologías (idiopática, viral, familiar, alcohólica/tóxica ó asociada a otras cardiopatías) ó miocarditis.

B)- Rechazo celular agudo: de acuerdo al mismo, los receptores se clasificaron en 2 grupos de estudio:

- ✓ *Receptores sin rechazo agudo* (**NRA**): Donde se incluyeron los pacientes cuyas biopsias endomiocárdicas mostraron un grado de rechazo histológico < 1R y, que, no presentaron síntomas clínicos de rechazo celular agudo.
- ✓ *Receptores con rechazo agudo* (**RA**): Dentro de este grupo se incluyeron a aquellos pacientes que presentaron al menos una biopsia endomiocárdica de grado ≥ 1R y/o síntomas clínicos de rechazo agudo.

C)- Infecciones en el periodo postrasplante: Se distribuyeron en tres grupos:

- ✓ *Pacientes sin infecciones* (**NoInf**)
- ✓ *Pacientes con infecciones de tipo bacteriano o virales diferentes a CMV* (**InfNo-CMV**).
- ✓ *Pacientes con infección/reactivación de CMV* (**CMV**).

D)- Rechazo crónico o CAV o también conocido como EVI. Su diagnóstico se estableció mediante IVUS. Este método estima CAV mediante la medición del máximo grosor intimal (MIT, del inglés, *maximal intimal thickness*) y del índice intimal (medido a partir de las áreas luminal e intimal). Debido fundamentalmente a su elevado coste, solo se realizó IVUS a 21 pacientes. Dado que todos los pacientes con evolución post-trasplante mayor a un año presentaron rechazo crónico, los pacientes se agruparon en función de la severidad siguiendo la clasificación de Standford (Valantine y cols., 1992) (tabla 3 del apartado de introducción de esta memoria) en:

- ✓ R*eceptores con CAV no severo* (**CAV-NS**): Aquellos receptores que mediante IVUS presentaron un grosor intimal de la arteria coronaria < 0.5mm.
- ✓ *Receptores con CAV severo* (**CAV-S**): Aquellos que mostraron un grosor intimal ≥ 0.5mm.

En la tabla 5, se describe el número de pacientes que pertenecen a cada uno de los 4 grupos descritos:

Tabla 5. Pacientes agrupados según la patología de base, rechazo agudo, infecciones y severidad de EVI.

Variable de estudio	**n**
- **Patología de base:**	
o CI	21
o CNI	29
- **Rechazo agudo:**	
o RA	19
o NRA	31
- **Infecciones:**	
o NoInf	12
o InfNo-CMV	20
o CMV	18
- **CAV:**	
o CAV-NS	12
o CAV-S	9

3. PROTOCOLO DE MONITORIZACIÓN INMUNOLÓGICA

Diversos parámetros inmunológicos fueron monitorizados en sangre periférica tanto en el periodo pre-trasplante como a diversos tiempos durante el primer año post-trasplante.

El protocolo de recogida de muestras se resume en la figura 13, las muestras de sangre periférica se recogieron en tubos con EDTA y las de suero en tubo seco, antes del trasplante (Pre-trasplante, o día 0), durante las semanas 1ª, 2ª, 3ª y 4ª, así como en los meses 2º, 3º, 4º, 6º, 9º y 12º post-trasplante, habitualmente coincidiendo con la toma de biopsias endomiocárdicas.

Las muestras anticoaguladas en EDTA se utilizaron para el estudio de poblaciones celulares por citometría de flujo y los sueros se congelaron a -80ºC, para estudiar posteriormente los niveles de HLA-G soluble.

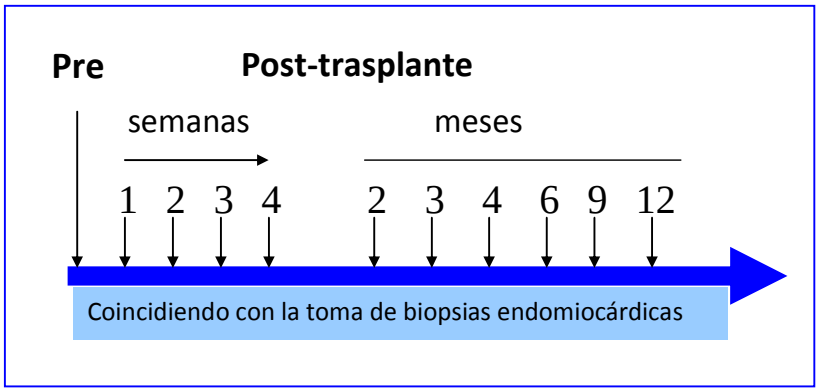

Figura 13. Protocolo de recogida de muestras.

4. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica de estudio celular multiparamétrica, basada en el análisis de una suspensión de células, marcadas previamente con anticuerpos monoclonales (AcMos) conjugados con diversos flurocromos. Las células una vez marcadas, se hacen pasar alineadas de una en una por delante de un haz de luz focalizado procedente de uno o más rayos láser. La interacción del haz de luz sobre la célula produce señales fluorescentes que son recogidas por los detectores y que permiten diferenciar distintos parámetros de la célula. Estos parámetros están relacionados con características intrínsecas de la célula, como el tamaño (FSC, del inglés, *Forward Scatter*) y la granularidad/complejidad celular (SSC, del inglés, *Side Scatter*), o pueden estar relacionados con las características antigénicas de cada célula (Inmunofenotipo).

4.1. Anticuerpos monoclonales

Para el estudio de citometría de flujo se utilizaron combinaciones apropiadas de los siguientes AcMos marcados con distintos fluorocromos: anti-CD45, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD28, anti-CTLA-4, anti-CD86, anti- CD25, anti-CD94, anti-CD80, anti-CD95, anti-CD158a/h, anti-CD158b/j y anti-CD56. En la tabla 6 se describen con mayor detalle las características y procedencia de estos reactivos.

Además se utilizaron los correspondientes controles de isotipos IgG1 e IgG2a (BD) combinados con los distintos fluorocromos para establecer la fluorescencia de fondo. Los 4 fluorocromos utilizados fueron isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridrina (PerCP) y aloficocianina (APC). FITC, PE y

PerCP son excitables a una longitud de onda de 488 nm (laser azul) pero al emitir luz a distintas longitudes de onda permite su discriminación a 519 nm para FITC (FL-1), 578nm para PE (FL-2) y 678 nm para PerCP (FL-3). El fluorocromo APC se excita a una longitud de onda de 633 nm (laser rojo) y emite a 678 nm (FL-4).

4.2. Poblaciones celulares y moléculas monitorizadas

La tabla 7 recoge las diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales en triple ó cuádruple marcaje empleados en el estudio. En ella se indica, además, las subpoblaciones celulares de sangre periférica estudiadas y las moléculas que fueron monitorizadas para evaluar su intensidad de expresión, determinada como intensidad media de fluorescencia (IMF).

4.3. Protocolo de tinción por inmunofluorescencia directa

Se utilizaron tubos de polipropileno de 12×75mm donde se dispensaron 100µl de sangre total anticoagulada con EDTA y 10µl de los AcMos fluorescentes correspondientes, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- → Mezclar bien la sangre con los anticuerpos (según las combinaciones descritas en la tabla 7).
- → Incubar en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- → Añadir 3ml de solución de lisis/fijación (BD Fas™ Lysing Solution, BD) y agitar bien.
- → Incubar de nuevo en oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- → Centrifugar 5 minutos a 400xg (1.500 rpm) a 4ºC.
- → Eliminar el sobrenadante por decantación, agitar y añadir 3 ml de solución de lavado (PBS, buffer fosfato salino, pH: 7.4, BD FacsFlow™ Sheat Fluid, BD).
- → Centrifugar 5 minutos a 400xg (1.500 rpm) a 4ºC.
- → Eliminar el sobrenadante por decantación, agitar y resuspender cada tubo en 500µl de solución de lavado.
- → Adquirir inmediatamente.

Tabla 6. Anticuerpos monoclonales fluorescentes utilizados.

Molécula reconocida	Células portadoras	Clon	Fluorocromo	Proveedor
CD14	Monocitos	IQP143A	APC	BD
CD19	Linf-B	SJ25C1/Leu-12	APC	BD
CD25	Linf-T y NKs	2 A3	PE	BD
CD28	Linf-T	28.2	FITC	Inmunotech
CD3	Linf-T	SK7	PerCP	BD
CD4	Subtipo de linf-T	SK3	APC	BD
CD8	Subtipo de linf-T	SK1	PerCP	BD
CD45	Panleucocitario	2D1	PerCP	BD
CD56	Células NK, linf-T	NCAM 16.2	FITC	BD
CD80	Linf-B	BB1	FITC	BD
CD86	Linf-B, monocitos	IT2.2	PE	BD
CD94	Células NK, linf-TCD8	HP-3B1	PE	BC
CD95	Linf-T, linf-B, Monocitos	DX2	FITC	BD
CD158a/h	Células NK, Linf-T	EB6	FITC	BC
CD158b/j	Células NK, Linf-T	GL183	PE	BC
CTLA-4	Linf-T	BNI3.1	PE	BD
IgG1/IgG2a	No reconocen antígenos de superficie	X40/X39	PE/FITC	BD
IgG1	No reconocen antígenos de superficie	X40	PerCP	BD
IgG1	No reconocen antígenos de superficie	X40	APC	BD

CD: Cluster de diferenciación; Linf-B: linfocitos B; Linf-T: linfocitos T; NK: células *Natural Killer;* BD: Benton Dickinson; BC: Beckman Coulter.

Tabla 7. Combinaciones de AcMos para el estudio de poblaciones celulares.

Combinaciones de anticuerpos					*Poblaciones celulares y moléculas analizadas
Tubo	**FITC**	**PE**	**PerCP**	**APC**	
1	-	CD19	CD45	CD14	- **Porcentaje (%)**: de Linfocitos totales, Monocitos, Neutrófilos, Linfocitos $CD19^+$
2	CD28	CTLA-4	CD8	CD4	- **Porcentaje (%)**: de linfocitos $CD4^+$, $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CD28^-$ **- Intensidad media de fluorescencia (IMF)**: de la molécula CD28 en linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$
3	CD80	CD86	CD19	CD14	- **Porcentaje (%)**: $CD19^+80^+$, $CD19^+CD86^+$ **- Intensidad media de fluorescencia (IMF)**: CD80 y CD86 en Monocitos, y en Linfocitos $CD19^+$.
4	CD95	CD80	CD3	CD19	- **Porcentaje (%)**: de linfocitos $CD3^+$, $CD3^+CD95^+$, $CD3^+CD80^+$ **- Intensidad media de fluorescencia (IMF)**: de CD95 en Monocitos y en linfocitos $CD3^+$ y de CD80 en linfocitos $CD3^+$
5	CD28	CD86	CD3	CD8	- **Porcentaje (%)**: de linfocitos $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD8^+CD28^+$, $CD3^+CD8^+CD28^-$, $CD3^+CD86^+$ **- Intensidad media de fluorescencia (IMF)**: de CD86 en linfocitos $CD3^+$
6	CD158a	CD158b	CD3	CD8	**- Porcentaje (%)**: de linfocitos $CD3^-CD158a/h^+$, $CD3^-158b/j^+$, $CD3^+CD8^+CD158a/h^+$,$CD3^-CD8+158a/h^+$, $CD3^+CD8^+158b/j^+$, $CD3^-CD8^+CD158b/j^+$.
7	CD56	CD94	CD3	CD8	-**Porcentaje (%)**: de linfocitos $CD3^-CD56^+$
8	IgG1/ IgG2a		IgG1	IgG1	Control de Isotipo

* Solamente se indican las poblaciones y subpoblaciones celulares que se han incluido en este trabajo.

4.4. Estandarización del citómetro de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (BD) equipado con un láser de argón de 488 nm y un láser diodo rojo de 633 nm, capaz de analizar 6 parámetros simultáneamente para cada una de las células adquiridas. Los componentes fotoeléctricos del citómetro se ajustaron utilizando el software Cell Quest Pro ™ (BD) y los calibradores adecuados (CALIBRITES, microesferas marcadas con FITC, PE, PerCP, APC y sin marcar, BD). La IMF de las microesferas marcadas con los distintos fluorocromos se calculó diariamente y con cada muestra de estudio se adquirió una suspensión de calibradores en PBS, con el fin de controlar la estabilidad fotoeléctrica del instrumento.

4.5. Sistemática de adquisición y análisis

Una vez concluido el proceso de marcaje, las muestras fueron diluidas en PBS hasta conseguir una velocidad de adquisición de 200-800 células por segundo. Los parámetros FSC y SSC, que determinan el tamaño y la granularidad/complejidad celular, respectivamente, se representan en escala lineal y las distintas fluorescencias FL1 (FITC), FL2 (PE), FL3 (PerCp) y FL4 (APC) en escala logarítmica. Para la adquisición de las muestras se utilizó el software Cell Quest Pro ^{TM} y para su análisis el software PAINT-A-GATE Pro^{TM}, ambos de Becton Dickinson. En primer lugar, se adquirió un tubo hasta un total de 25.000 células mononucleares de sangre periférica (figura 14A, R1), que fueron utilizadas para crear una ventana o "gate" de adquisición sobre células con morfología linfomonocitario a partir de los parámetros FSC/SSC (ver figura 14B, R2). Una vez seleccionada la ventana para estas células, el resto de los tubos se adquirieron hasta conseguir 15.000 células linfomonocitarias dentro del "gate" de adquisición.

4.6. Cálculo de los porcentajes de las subpoblaciones celulares y de la IMF.

4.6.1. Identificación de las poblaciones celulares de sangre periférica

La identificación de las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos de las muestras de sangre periférica, se realizó en función de la expresión del marcador CD45 (antígeno leucocitario común) y la distribución en tamaño/complejidad celular (FSC/SSC) (figura 14).

4.6.2. Cálculo del porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica

Para calcular los porcentajes de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, se realizó una primera ventana de análisis, a partir del "gate" de adquisición sobre células con aspecto linfomonocitario, que englobaba a las células que por su distribución para los parámetros FSC/SSC tenían aspecto de linfocitos (figura 15A, R1). El porcentaje de células que expresaban las moléculas de interés se obtuvo tras fijar los límites de fluorescencia con los controles de isotipo correspondientes, a partir de los cuales se consideraba positiva la expresión de cada uno de los AcMos empleados. A modo de ejemplo, se representa el tubo 6 (Figura 15) para explicar el método seguido para el cálculo de los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias $CD3^+CD8^+CD158b/j^+$ y

$CD3^+CD8^+CD158a/h^+$. Entre los linfocitos (R1), en un dot plot de CD3 vs CD8, se realizó otra ventana (R2) de células positivas para CD3 y CD8 ($CD3^+CD8^+$) (Figura 15B). Entre las células $CD3^+CD8^+$, se diferenciaron otras dos subpoblaciones: células positivas para la molécula CD158b/j (R3) y células positivas para la molécula CD158a/h (R4).

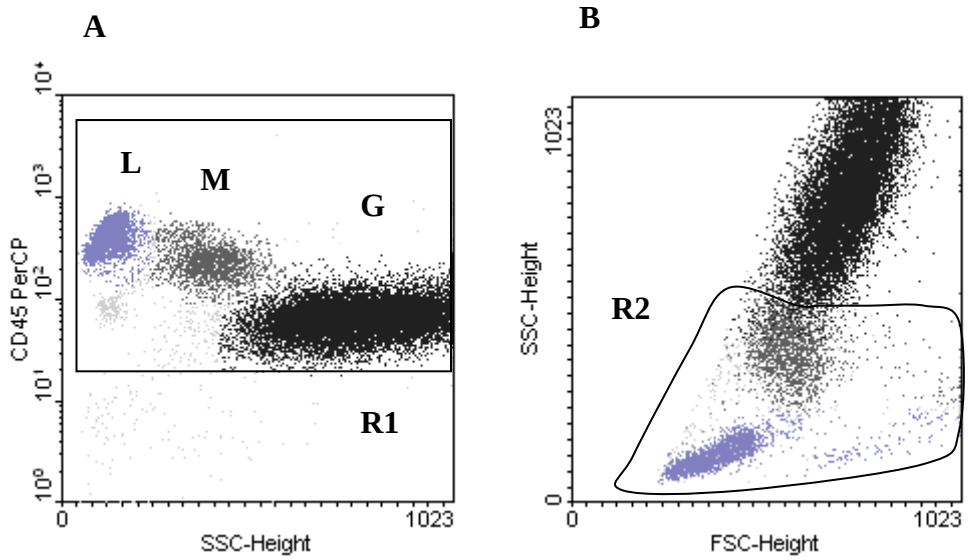

Figura 14. *Poblaciones celulares en sangre periférica*. Representación en gráficos de puntos (dot plot) de la distribución de linfocitos (L), monocitos (M) y granulocitos (G) de una muestra de sangre periférica, en función de: **A**, la expresión del marcador CD45 (Percp) y el parámetro SSC (granularidad), R1 región leucocitaria y **B**, los parámetros FSC (tamaño) y SSC (granularidad), R2 región linfomonocitaria.

4.6.3. Estimación de la IMF

Para calcular la IMF de una molécula determinada sobre una subpoblación celular particular se utilizó el parámetro IMF proporcionado por el programa de análisis PAINT-A-GATE Pro™. La IMF ofrece una estimación proporcional al número de moléculas (densidad de una molécula) sobre la superficie celular de una subpoblación particular.

Para calcular la IMF de una molécula dentro de una subpoblación de linfocitos determinada, se realizó una primera ventana de análisis (R1) que englobaba las células que por su distribución para los parámetros FSC/SSC tenían aspecto linfocitario. Se realizó una segunda ventana (R2) que incluía la subpoblación que expresaba la molécula de interés en cada caso. En las células que cumplían la condición de estar incluidas en R1 y R2 simultáneamente, se valoró la IMF del marcador a estimar. Este

proceso se esquematiza en la figura 16, aplicada al cálculo de la IMF de la molécula CD28 sobre linfocitos $CD4^+$ (figura 16B-C) y $CD8^+$ (figura 16D-E).

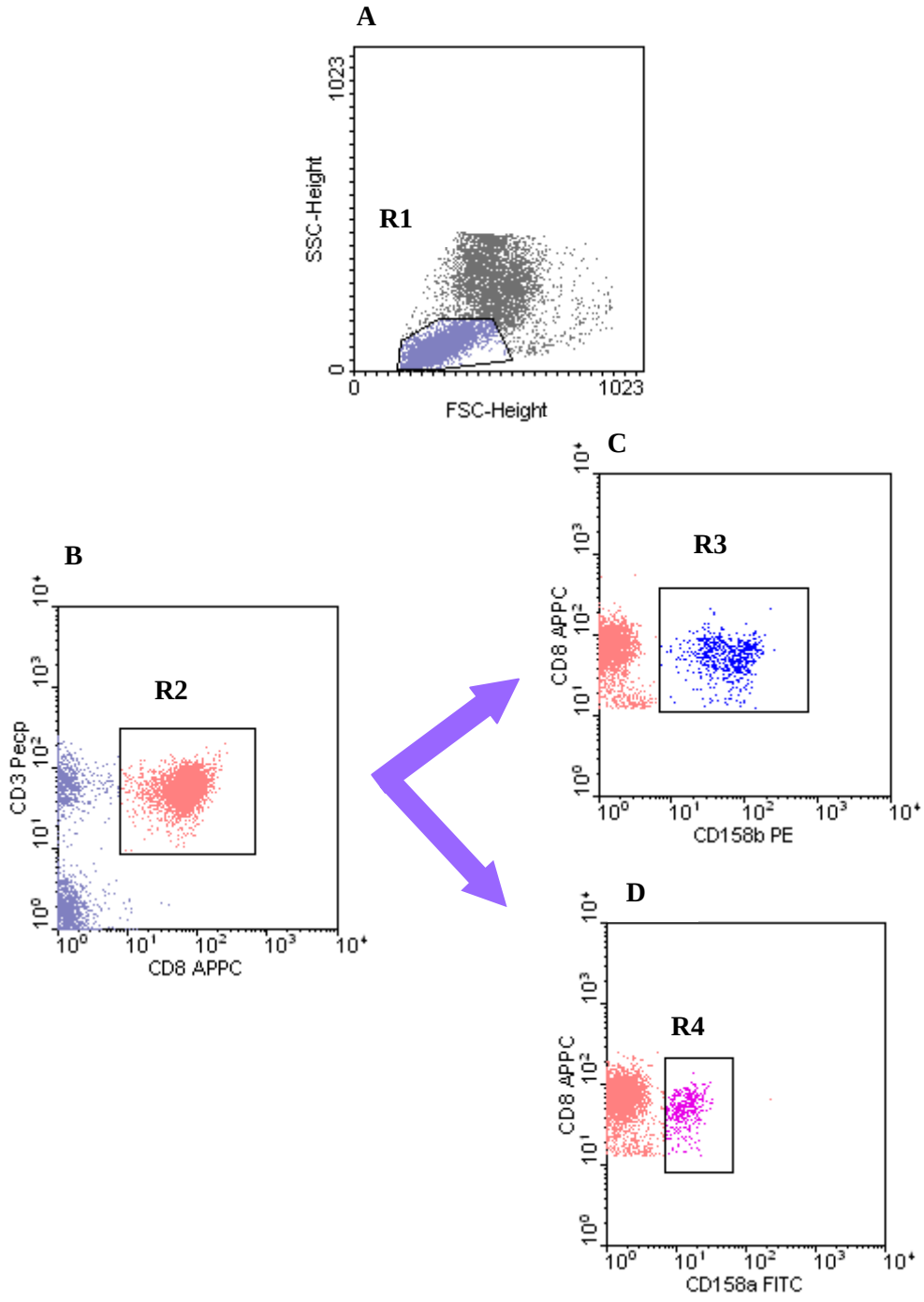

Figura 15. *Representación de las ventanas utilizadas para el análisis del porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo.* **A**, distribución de las células por los parámetros FSC (tamaño) y SSC (granularidad), **R1** región linfocitaria. **B**, poblaciones de células positivas para la molécula CD8 dentro de la población de los linfocitos T (**R2**); **C** y **D**, subpoblaciones linfocitarias T $CD8^+$ CD158b/j^+ (**R3**) y T $CD8^+$ CD158a/h^+ (**R4**), respectivamente.

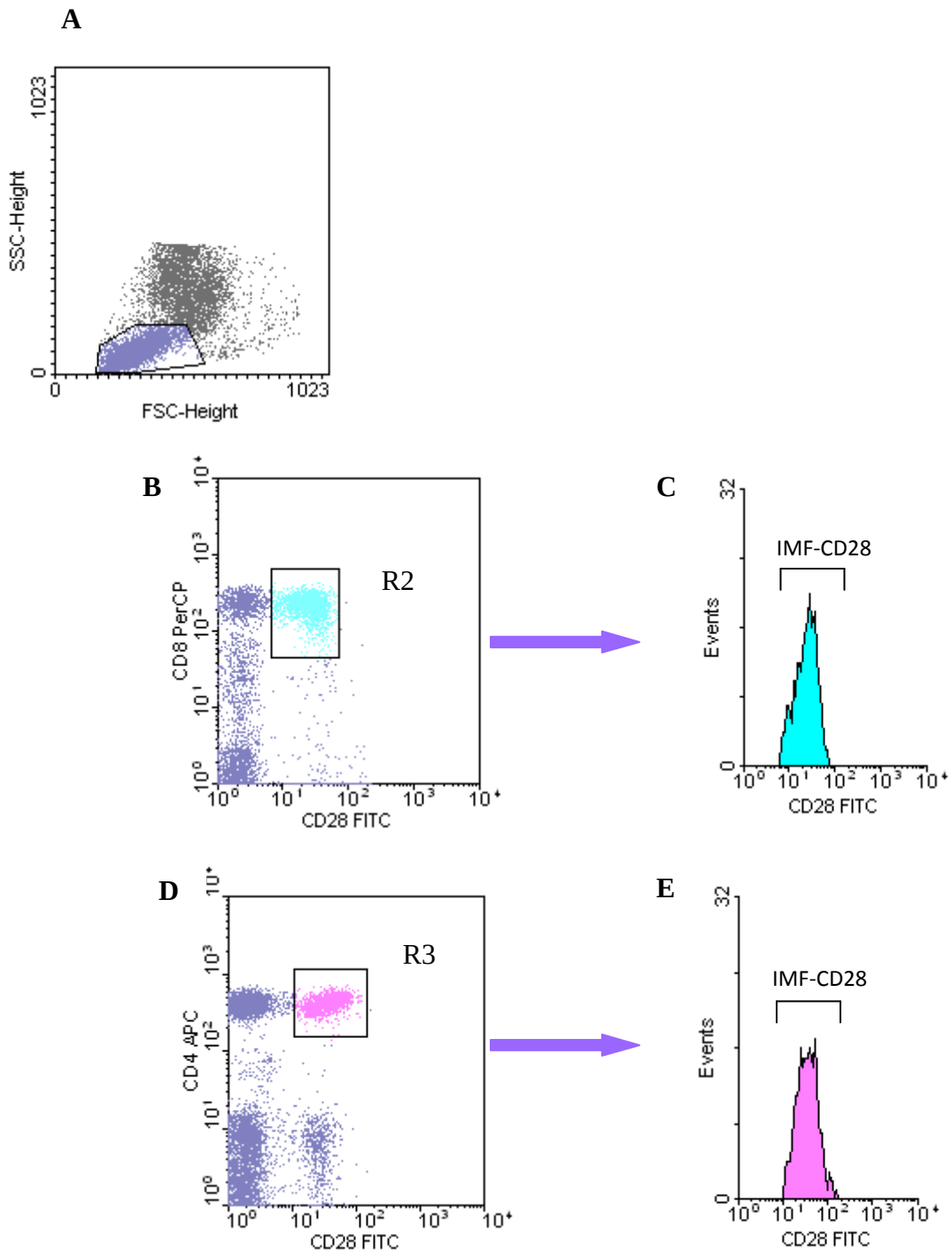

Figura 16. *Representación de las ventanas de análisis utilizadas para la estimación de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF).* **A**, distribución de las células por los parámetros FSC (tamaño) y SSC (granularidad), R1 región linfocitaria. **B**, Células positivas para CD8 y CD28 (R2, $CD8^+CD28^+$). **C**, Histograma que representa el nivel de expresión de la molécula CD28 (IMF-CD28) en linfocitos $CD8^+$. **D**, subpoblación de linfocitos positiva para las moléculas CD4 y CD28 (R3, $CD4^+CD28^+$). **E**, Histograma que representa el nivel de expresión de la molécula CD28 en linfocitos $CD4^+$.

4.7. Cálculo del número absoluto de las subpoblaciones celulares

Para cada una de las subpoblaciones celulares estudiadas se estimó el número absoluto de células x 10^{-3}/ml en sangre periférica. Para ello, se cuantificó el número de leucocitos totales (células x 10^{-3}/ml) mediante un contador automático Coulter A^{C}•T diff^{TM} (Coulter Corporation, Miami, Florida). Con los datos porcentuales de cada población estimada por citometría de flujo y teniendo en cuenta el total de leucocitos, se calculó el número de células x 10^{-3}/ml para cada subtipo celular usando las siguientes fórmulas:

a) Nº absoluto de la población de interés $= \dfrac{\text{Nº abs. Leucocitos x \% de población de interés}}{100}$

b) Nº absoluto de la subpoblación linfocitaria $= \dfrac{\text{Nº abs. Linfocitos x \% subpoblación linfocitaria}}{100}$

La fórmula **a)** se utilizó para calcular el número absoluto de las poblaciones de monocitos, granulocitos y linfocitos totales, y la **b)** para los números absolutos de las subpoblaciones linfocitarias.

5. CUANTIFICACIÓN DE HLA-G EN SUERO

Los niveles de HLA-G soluble en sueros durante el primer año pos-trasplante cardiaco se cuantificaron mediante ELISA (del inglés, *enzime linked inmunoabsorbent assay*). Concretamente se cuantificaron las isoformas solubles sHLA-$G1^{+}$ y sHLA-G5 mediante el Kit de sHLA-G de Exbio (Cat. RD194070100R, Exbio, Praha a.s.). Todos los componentes necesarios para la realización del ELISA vienen suministrados en este Kit.

Para ello, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, que se describe a continuación.

Curva de calibración

Se reconstituyó la proteína estándar de sHLA-G en 0.45 ml de agua destilada, obteniéndose una concentración de 625 Unid/ml (solución stock); para la preparación

de la curva de calibración se realizaron las siguientes diluciones seriadas de la solución stock:

Volumen del calibrador	Tampón de dilución	Concentración
Stock	-	**625.00 Unid/ml**
100 µl de stock	400 µl	125.00 Unid/ml
250 µl de 125.00 Unid/ml	250 µl	62.50 Unid/ml
250 µl de 62.50 Unid/ml	250 µl	31.25 Unid/ml
250 µl de 31.25 Unid/ml	250 µl	15.63 Unid/ml
250 µl de 15.63 Unid/ml	250 µl	7.81 Unid/ml
250 µl de 7.81 Unid/ml	250 µl	3.91 Unid/ml

Técnica de ELISA

Se preparó la solución de lavado diluyendo 10 veces la solución de lavado concentrada (10x) proporcionada por el kit de Exbio (100 ml de la solución de lavado del kit + 900ml de agua destilada).

La técnica de ELISA se realizó siguiendo los pasos descritos a continuación:

- Pipetear 100 µl de calibradores, muestras de suero (sin diluir) y tampón de dilución (blanco), por duplicado en los pocillos correspondientes.
- Incubar la placa a 2-8ºC durante 16-20 horas, sin agitación.
- Lavar los pocillos 5 veces con solución de lavado (0.35 ml por pocillo); después del lavado final invertir y golpear fuertemente la placa sobre un papel.
- Añadir 100 µl de solución de conjugado a cada pocillo.
- Incubar la placa a temperatura ambiente (25ºC) durante 60 minutos, en un agitador orbital de microplacas a 300rpm.
- Lavar los pocillos 5 veces con solución de lavado (0.35 ml por pocillo); después del lavado final invertir y golpear fuertemente la placa sobre un papel.
- Añadir 100 µl de solución sustrato en cada pocillo, no colocar la placa en exposición directa a la luz solar (cubrir la placa con papel de aluminio).
- Incubar la placa durante 25 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 100 µl de la solución de parada.

- Determinar la absorbancia a 450nm. La absorbancia se debe medir en menos de 5 minutos después de añadir la solución de parada.

Cálculo de la concentración de HLA-G

Se construyó una curva patrón utilizando los valores conocidos de concentración de las diluciones seriadas de los estándares y las absorbancia obtenidas. A esta curva se refirieron los valores de absorbancia de las muestras problema para estimar la concentración de sHLA-G.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron recogidos en una base de datos diseñada en Microsoft Access^{R} y procesados con el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows^{R}. Para cada grupo de estudio se obtuvo una distribución de frecuencias resumiendo y expresando los valores de las distintas variables como media ± error estándar de la media (SEM).

Para estudiar la relación de las variables categóricas (Ej. Entre sexo y aparición de rechazo agudo), se realizó un análisis de tablas de contingencia mediante el test de Chi-cuadrado de Pearson y el subsiguiente análisis de residuos. Cuando las frecuencias esperadas fueron bajas, se utilizó el test exacto de Fischer.

Para comparar el valor medio de las variables cuantitativas entre los diferentes grupos de estudio (Ej. Porcentaje de células $CD8^{+}CD28^{-}$ en los grupos de RA y NRA) en cada uno de los periodos de monitorización pre y postrasplante, y el valor medio de estas variables en ambos grupos respecto al grupo control, se utilizaron los test paramétricos *t de Student para muestras independientes* ó el test no paramétrico de *Mann-Whitney*, si los grados de libertad eran menores de 35, lo que indica que no se cumplen las condiciones necesarias para la aplicación de un test paramétrico. También se utilizó el análisis de ANOVA de dos factores cuando se compararon los valores medios de dichas variables en los diferentes grupos de estudio a lo largo del tiempo (% cambio de sHLA-G).

En cualquier caso, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $P < 0.05$, y se representa en el manuscrito de la siguiente manera:

1. Para el pretrasplante, la significación obtenida al comparar los distintos grupos de pacientes (Ej. CI/CNI, NoInf/Inflo-CMV/CMV, RA/NRA, EVI-S/EVI-NS) así como la comparación con el grupo control, se recoge en las figuras correspondientes de cada sección de resultados indicando el valor de la *p* en cada caso.

2. La significación obtenida al comparar los distintos grupos de pacientes (Ej. CI/CNI, NoInf/Inflo-CMV/CMV, RA/NRA, EVI-S/EVI-NS) en el periodo postrasplante se recoge en las figuras correspondientes. En el caso de las infecciones, además, se añade un superíndice numérico al valor de la *p*, para indicar entre que grupos (NoInf/Inflo-CMV/CMV) se calculan las diferencias significativas.

3.- Para mayor claridad, la significación obtenida al comparar las muestras del periodo postrasplante con las del grupo control y/ó con las correspondientes muestras pretrasplante, se describe en el texto y en los pies de figura, pero no se representan en las figuras.

Por otro lado, para minimizar el impacto de la variabilidad pretrasplante en algunos de los parámetros estudiados (IMF de CD28 en CD4 ó CD8, células $CD3^{+}CD8^{+}CD28^{-}$ y concentración sérica de HLA-G) y comparar la evolución de estos en el conjunto de receptores, fue necesario normalizar los datos. Estos se expresaron en porcentaje medio de cambio postrasplante. Para ello, en cada paciente, el valor pretrasplante se consideró como el 0% de variación, los valores mayores que el pretrasplante como incrementos porcentuales positivos y los menores que el pretrasplante, incrementos porcentuales negativos. En estos casos, los datos fueron comparados mediante el test paramétrico de la *t de Student para muestras apareadas* o el test de *Wilcoxon* no paramétrico.

Por último, para evaluar la precisión diagnóstica de determinadas variables cuantitativas (ejemplo: porcentaje de cambio post-trasplante de la IMF de CD28 en la predicción de RA), se emplearon curvas ROC (del inglés, *receiver operating curve*) con el fin de establecer en estas el punto de corte óptimo con la mayor sensibilidad y especificidad.

Resultados

RESULTADOS

1. DATOS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS EN RECEPTORES CARDIACOS

1.1. Características demográficas y clínicas de la población trasplantada y su relación con el desarrollo de RA y CAV

En la tabla 8, se ofrece un resumen de las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en esta serie según los grupos NRA/RA y CAV-S/CAV-NS. En nuestra serie de estudio, el sexo del receptor de un trasplante cardiaco no parecía influir de forma significativa en la posterior aparición de RA o CAV-S, aunque existía una tendencia hacia que los hombres rechazaran menos (37%) que las mujeres (43%). Por el contrario, la tasa de CAV-S en las mujeres es menor (33%) que en hombres (44%). Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias en la edad media de los receptores en los 4 grupos de estudio.

En cuanto a la patología que indicó el trasplante, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, no obstante existe una tendencia de los receptores con cardiopatía isquémica a sufrir menos episodios de RA y menor incidencia de CAV-S.

Tabla 8. Características demográficas de los receptores de corazón y su relación con el RA y CAV.

	RA n (%)	**NRA** n (%)	**CAV-S** n (%)	**CAV-NS** n (%)
Pacientes	19 (38%)	31 (62%)	9 (43%)	12 (57%)
Sexo				
Hombre	16 (37 %)	27 (63%)	8 (44%)	10 (56%)
Mujer	3 (43%)	4 (57%)	1 (33%)	2 (67%)
Edad media (años)	52±3,2	52±2,3	54±2,0	54±3,2
Patología de base				
Cardiopatía isquémica	5 (24%)	16 (76%)	4 (40%)	6 (60%)
Cardiopatía no isquémica	14 (48%)	15 (52%)	5 (46%)	6 (54%)

RA = grupo de rechazo agudo; NRA = grupo de no rechazo agudo; CAV-S: grupo de vasculopatía dell alo-injerto cardiaco severo; CAV-NS= grupo de vasculopatía del alo-injerto cardiaco no severo.

1.2. Infecciones

En la figura 18, se detalla la frecuencia y el momento de aparición de las distintas infecciones a lo largo de la evolución post-trasplante en nuestro grupo de estudio.

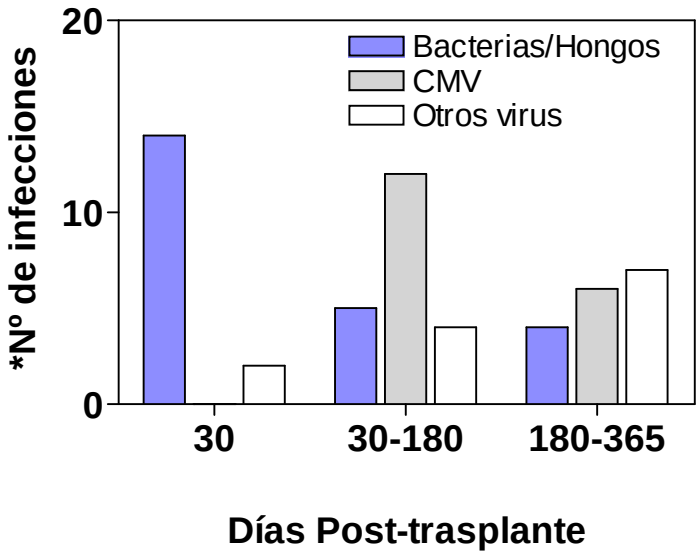

Figura 18. *Frecuencia y distribución temporal del tipo de infección en el periodo post-trasplante*. En azul se representa las infecciones bacterianas/fúngicas, en gris, las infecciones causadas por CMV y en blanco las infecciones causadas por otros virus diferentes a CMV, entre ellos: VHZ (Herpes Zoster), VEB (virus de Epstein-Barr), VHS (Herpes simple) y VHB (virus de la hepatitis B). *Cada paciente puede sufrir más de un tipo de infección.

Durante los primeros 30 días post-trasplante, los pacientes que sufrieron infecciones fueron mayoritariamente de tipo bacteriano/fúngico, derivadas fundamentalmente del proceso quirúrgico. Entre el primer y sexto mes post-trasplante las infecciones más frecuentes fueron las infecciones por CMV. Al final del periodo de evolución, predominaron las infecciones virales, tanto por CMV como por VHZ, VEB, VHS.

En lo referente a las infecciones post-trasplante, nuestros datos parecen demostrar una relación inversa entre la presencia de infecciones y la aparición de rechazo agudo. Entre los pacientes que sufrieron reactivación de CMV el 39% presentaron RA frente al 61% que aceptaron el injerto (diferencias estadísticamente no significativas). Los receptores con InfNo-CMV presentaron una tasa de rechazo agudo significativamente más baja (20%) que los pacientes libres de infección no-CMV (80%, p=0,041). Por el contrario,

entre los pacientes que no sufrieron infecciones durante su evolución post-trasplante, el 67% presentaron RA frente al 33% que aceptaron el injerto (p<0,038).

Del mismo modo, de los pacientes con reactivación de CMV el 14% presentaron CAV-S frente al 86% que no lo presentaron, diferencias no significativas debido al reducido tamaño de la muestra. La ausencia de infecciones o las infecciones no-CMV no parecían afectar la incidencia de CAV-S.

Tabla 9. Relación entre infecciones, RA y CAV.

	RA n (%)	**NRA** n (%)	**CAV-S** n (%)	**CAV-NS** N (%)
Infecciones post-trasplante				
CMV	7 (39%)	11 (61%)	1 (14%)	6 (86%)
Infección no-CMV	4 (20%)*	16 (80%)	5 (62 %)	3 (37%)
No Infección	8 (67%)**	4 (33%)	3 (50%)	3 (50%)

RA = grupo de rechazo agudo; NRA = grupo de no rechazo agudo; CAV-S: grupo de vasculopatía del alo-injerto cardiaco severo; CAV-NS= grupo de vasculopatía del alo-injerto cardiaco no severo; n (%) = número y porcentaje de pacientes; CMV= citomegalovirus humano.
P, comparaciones entre grupos mediante el test exacto de Fisher, con estudio de residuos tipificados corregidos para ver la dirección de la asociación entre el RA y las infecciones.
* P=0.021, RA vs NRA; ** P=0.038, RA vs NRA

1.3. Rechazo agudo y niveles de CsA en sangre periférica

Como se observa en la figura 19, la frecuencia de episodios de RA en la evolución post-trasplante de receptores cardiacos, fue más elevada entre el tercer y noveno mes post-trasplante. Como se verá más adelante, es en este periodo donde se podrán observar las mayores diferencias de las poblaciones celulares monitorizadas entre los diferentes grupos de estudio (RA/NRA; CI/CNI; CAV-S/CAV-NS; NoInf/InfNo-CMV/CMV).

En la misma figura, se representan los niveles de CsA en sangre periférica a lo largo de la evolución post-trasplante, observándose una relación inversa entre dichos niveles y la aparición de episodios de rechazo agudo. Los niveles de CsA en sangre periférica aumentaron durante el primer mes post-trasplante hasta llegar a niveles de 300-350ng/ml, que después disminuyeron gradualmente hasta 150-250 ng/ml en todos los receptores. Es precisamente cuando se produce esta disminución, cuando la frecuencia de rechazo agudo fue más elevada (tanto rechazo clínico, como histológico 1R o superior), especialmente entre el 3º y 9º mes post-trasplante. Como se puede

observar en la figura, los niveles de CsA no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con y sin RA.

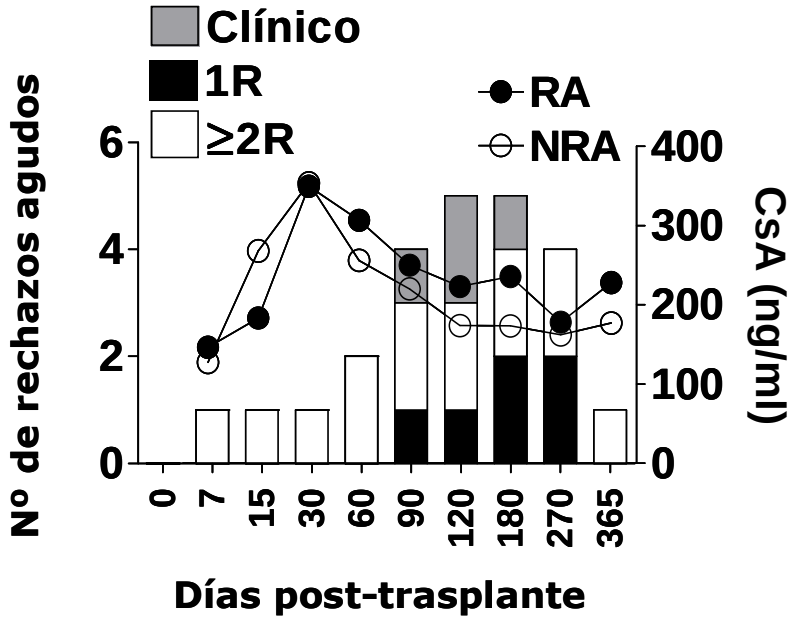

Figura 19. *Distribución temporal y severidad de los episodios de rechazo agudo* (RA) (barras). En gris se representa el RA-clínico, en negro el grado histológico 1R y en blanco el grado ≥2R. Niveles de CsA en sangre periférica (líneas), en pacientes del grupo de rechazo agudo (RA, negro) y de no rechazo agudo (NRA, blanco).

2. POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA EN EL PRE-TRASPLANTE CARDIACO

Las poblaciones leucocitarias y linfocitarias de interés, leucocitos totales, monocitos totales, granulocitos, linfocitos totales, linfocitos B, linfocitos T totales y sus subpoblaciones y células NK, se estudiaron en muestras de sangre periférica de pacientes sometidos a trasplante cardiaco recogidas en el momento previo al trasplante (día 0 ó pretrasplante), y se compararon con las de un grupo control de individuos sanos. Con esta comparación se intentó valorar si los pacientes que acudían a recibir un trasplante cardiaco presentaban de forma basal diferencias respecto a los individuos sanos que pudieran influir en su comportamiento tras el trasplante.

Además, los datos pretrasplante se compararon entre los diferentes grupos de pacientes, en función de la patología de base, la aparición de rechazo agudo o crónico (CAV) y la aparición de infecciones tras el trasplante.

Los resultados observados para cada población celular en el pretrasplante, se representan en gráficos de barras con información del porcentaje medio (%) de células

que componen la población objeto de estudio, bien referido al total de leucocitos (en el caso de linfocitos totales, monocitos y granulocitos) o al total de linfocitos (en el caso de las distintas subpoblaciones linfocitarias). Además, se representa la media de los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de cada uno de los tipos celulares para cada grupo de estudio. Las diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes, o de estos con los individuos sanos se representan en cada gráfico.

2.1. Poblaciones leucocitarias generales

2.1.1. Leucocitos

Las cifras absolutas de leucocitos en los pacientes en espera de trasplante cardiaco fueron significativamente mayores que las de los individuos del grupo control (8.527±444 vs 6.153±210, P=0,0001).

Como se puede observar en la Figura 20, los valores absolutos de leucocitos detectados en las muestras pretrasplante de pacientes de todos y cada uno de los grupos de pacientes: CNI y CI (figura 20A); NRA y RA (figura 20B); NoInf, InfNo-CMV y CMV (figura 20C); CAV-NS y CAV-S (figura 20D), diferían significativamente de los valores que presentaba el grupo control (la significación se indica en el gráfico correspondiente). Las cifras más elevadas de leucocitos en pacientes que controles, tuvo como consecuencia que estas diferencias se observen igualmente en las cifras absolutas de muchas de las subpoblaciones celulares que se describirán a continuación

Hay que destacar, además, que no se detectaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos de trasplante estudiados.

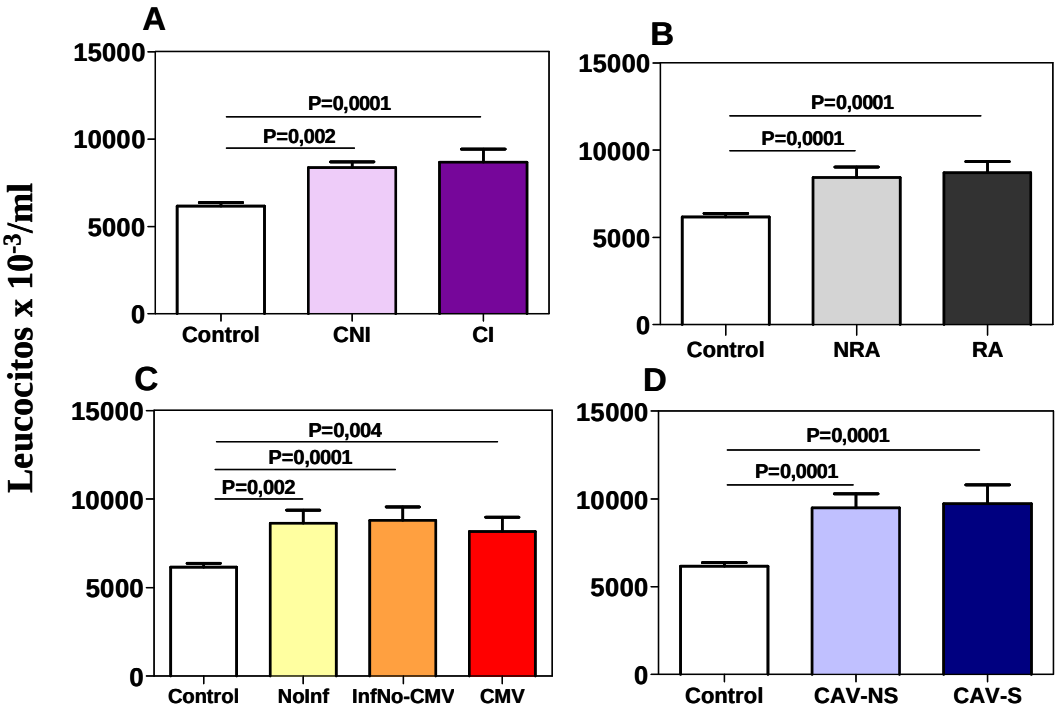

Figura 20. *Cifras absolutas de leucocitos en sangre periférica de controles sanos y de receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante.* **A**, representa la media de leucocitos (células x 10^{-3}/ml) en el grupo de individuos sanos (control), y de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI). **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico.

2.1.2. Monocitos

El porcentaje de monocitos en sangre periférica fue prácticamente similar en el global de pacientes en espera de trasplante que en los individuos del grupo control (6,4%±0,35 vs 6,5%±0,22, p>0,05). En la figura 21, se compara el valor medio del porcentaje de monocitos entre cada uno de los grupos de pacientes, así como con el grupo control. Como se puede observar no se detectaron diferencias significativas en ningún caso.

Sin embargo, la media de los valores absolutos de monocitos detectada en la población total de pacientes fue mayor y estadísticamente significativa que la observada en el grupo control (541,28±42,25 células x 10^{-3}/ml vs 399,24±18,90 células x 10^{-3}/ml; p=0,003). Además, como se puede observar en la figura 21, los valores medios observados en cada uno de los grupos considerados por separado, también fueron superiores a los del grupo control, con diferencias que llegaron a ser

estadísticamente significativas en los grupos CNI y CI; RA y CAV-S (el grado de significación en cada caso se detalla en el gráfico correspondiente). Reseñar que no se detectaron diferencias significativas en las cifras absolutas de monocitos entre los diferentes grupos de pacientes trasplantados.

2.1.3. Granulocitos neutrófilos

Los granulocitos neutrófilos presentaron cifras porcentuales (67,8±2,22% vs 57,7±2,22%, p=0,001) y absolutas (5.814±377 vs 3.601 ±186 células x 10^{-3}/ml; p=0,0001) significativamente más elevadas en los pacientes en lista de espera de trasplante cardiaco que en los individuos del grupo control, tanto si estos se analizaban globalmente, como si se hacía individualmente para cada uno de los grupos de estudio (los valores y el grado de significación se detalla en la figura 22 para cada caso). Reseñar que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes.

2.1.4. Linfocitos totales

El porcentaje de linfocitos del grupo de pacientes considerados tanto de forma global (27,12±1,78% *vs* 30,35±1,35%; p>0,05) como en los diferentes grupos por separado fue muy similar al del grupo control (Figura 23). No se observaron diferencias significativas entre los valores medios de linfocitos totales de cada grupo de pacientes.

Por el contrario, cuando se analizaron los valores absolutos de linfocitos totales, se observaron valores significativamente superiores en el global de pacientes que en el grupo control (2.177±125 vs 1.790±68 células x 10^{-3}/ml; p=0,009). El número absoluto de linfocitos en pacientes con CNI, CI, NRA y CAV-S fue significativamente superior que el observado en los individuos control (en la figura 23, se describe el grado de significación para cada caso). No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de pacientes.

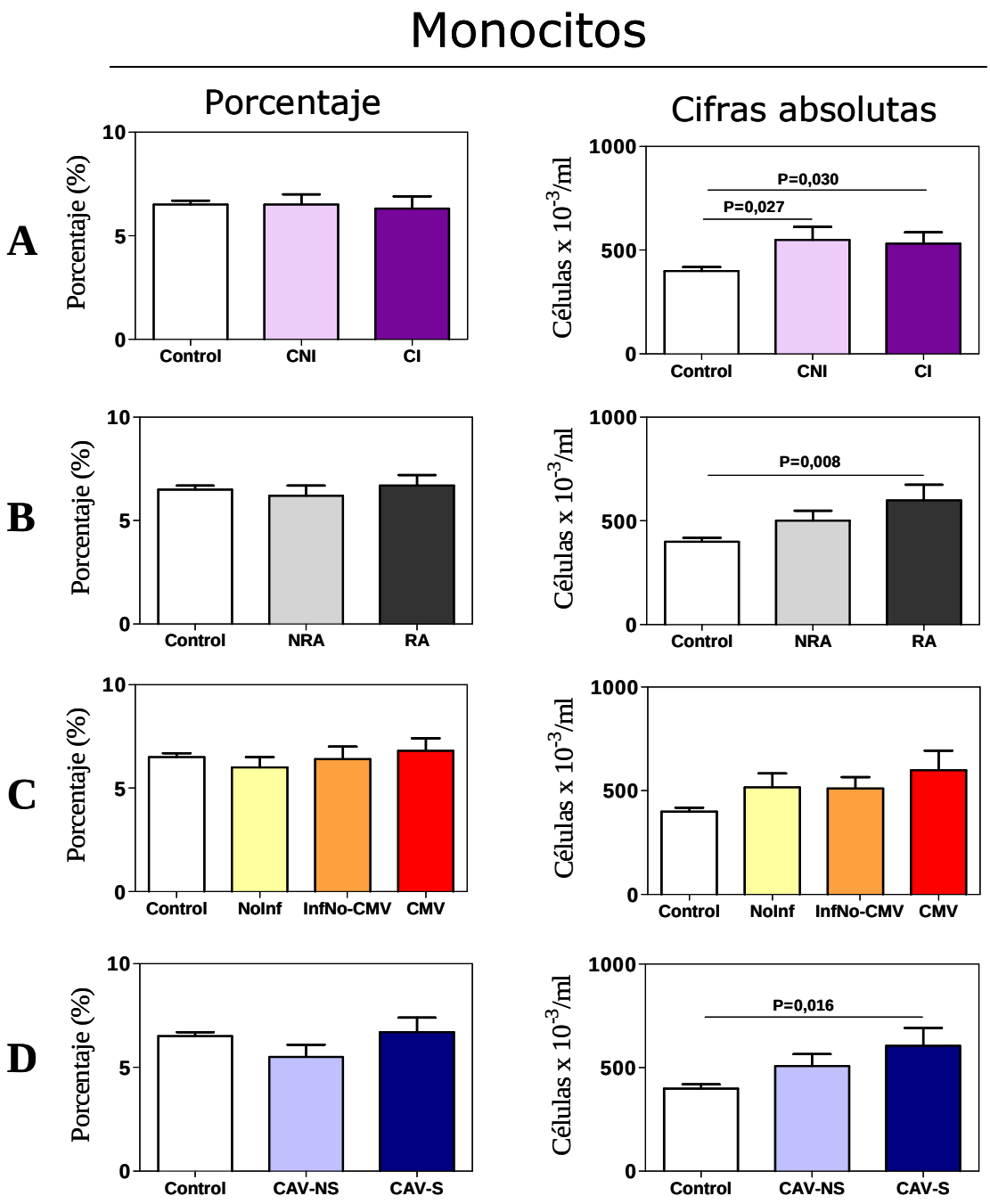

Figura 21. *Porcentaje y valor absoluto de Monocitos en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico.

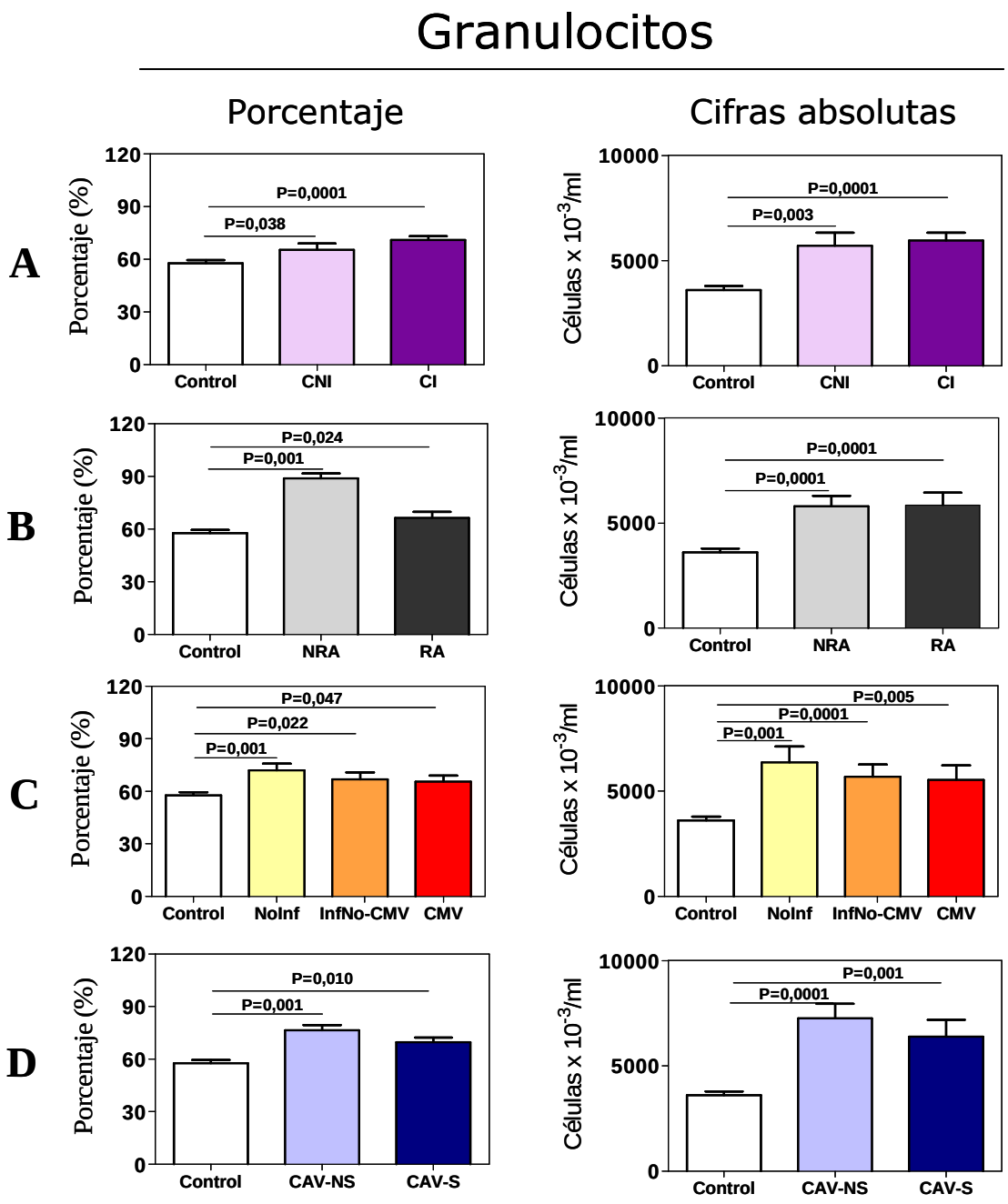

Figura 22. *Porcentaje y valor absoluto de granulocitos neutrófilos en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico.

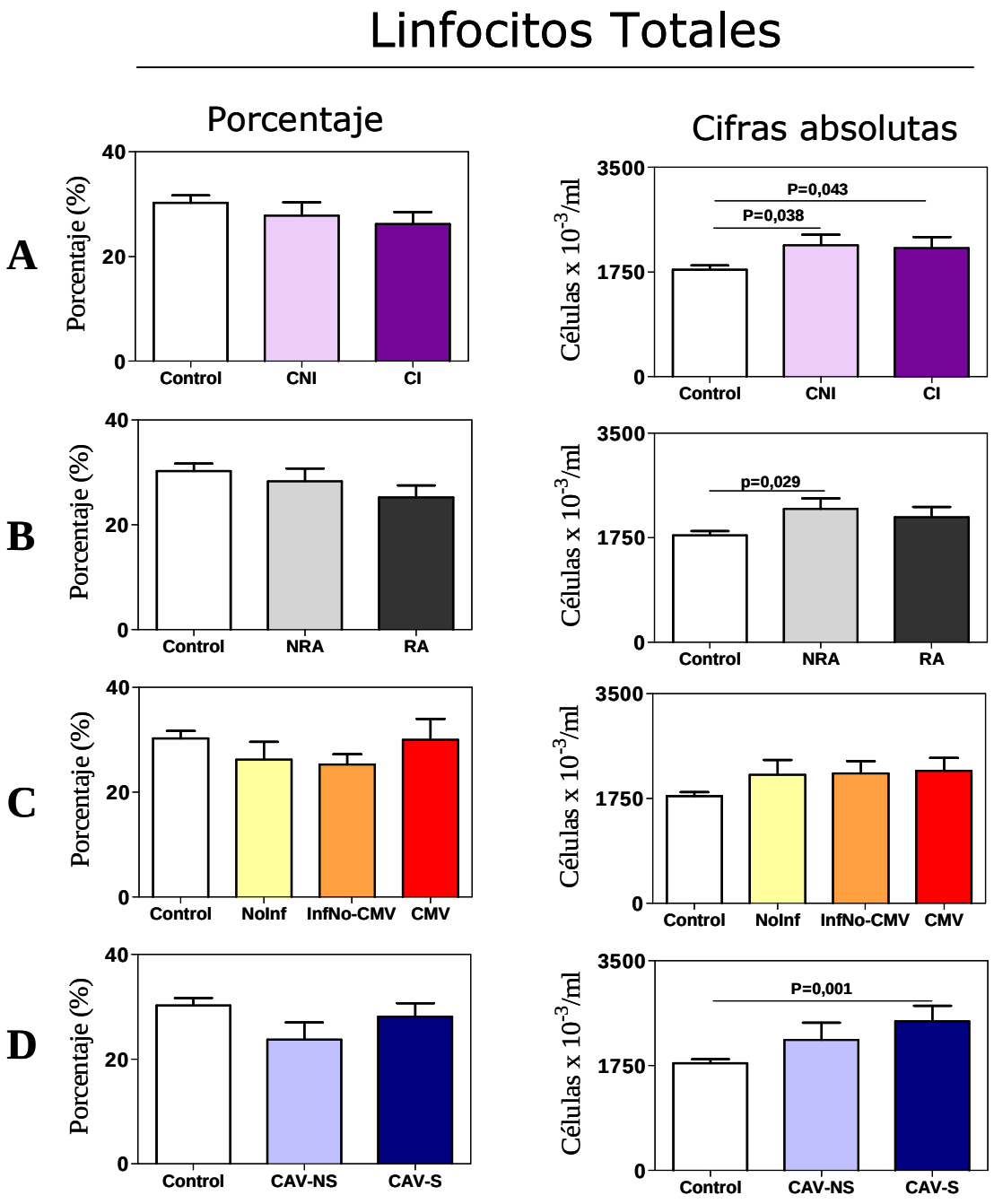

Figura 23. *Porcentaje y valor absoluto de linfocitos totales en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico.

2.2. Linfocitos B ($CD19^+$)

El porcentaje de linfocitos B en el grupo total de pacientes fue ligeramente superior que en el grupo de individuos control (10,5±1,1% vs 9,43±0,5%) aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias al comparar el valor medio del porcentaje de linfocitos B entre cada uno de los grupos de pacientes, ni al comparar cada uno de los grupos de pacientes con el grupo control (figura 24).

El número absoluto de linfocitos B fue significativamente superior en el grupo total de pacientes que en el grupo control (227±27 vs 166±10 células x 10^{-3}/ml; p=0,041). Aunque, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de pacientes ni entre estos y el grupo de individuos control (figura 24).

2.3. Linfocitos T ($CD3^+$)

El porcentaje medio de linfocitos T totales en el grupo total de pacientes fue similar al del grupo de individuos control (71,2±1,5% vs 71,4%±0,96%; p>0,05). Como se puede observar en la figura 25, no se observaron diferencias al comparar el valor porcentual medio de linfocitos T entre cada uno de los grupos de pacientes, ni entre estos y el grupo control.

Sin embargo, el número absoluto de linfocitos T fue significativamente superior en los pacientes en lista de espera de trasplante cardiaco que en los controles sanos (1.535±96 vs 1.283±54 células x 10^{-3}/ml; p=0,026). Las cifras absolutas fueron superiores en todos los grupos de pacientes respecto al grupo control, aunque solo fueron estadísticamente significativas en el grupo de pacientes con CAV-S respecto al grupo de controles sanos (p=0,019). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes.

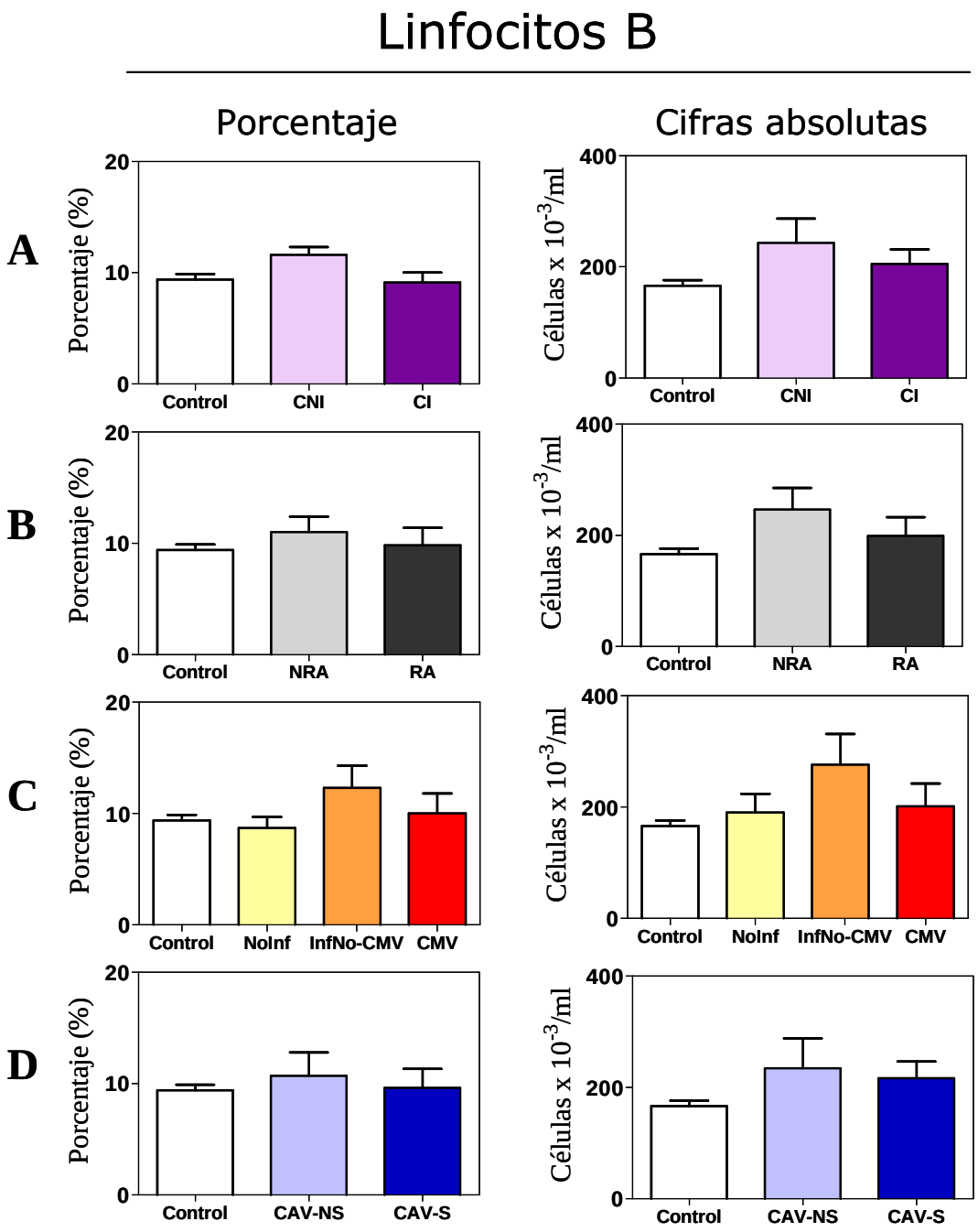

Figura 24. *Porcentaje y valor absoluto de linfocitos B CD19+ en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante.* En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S).

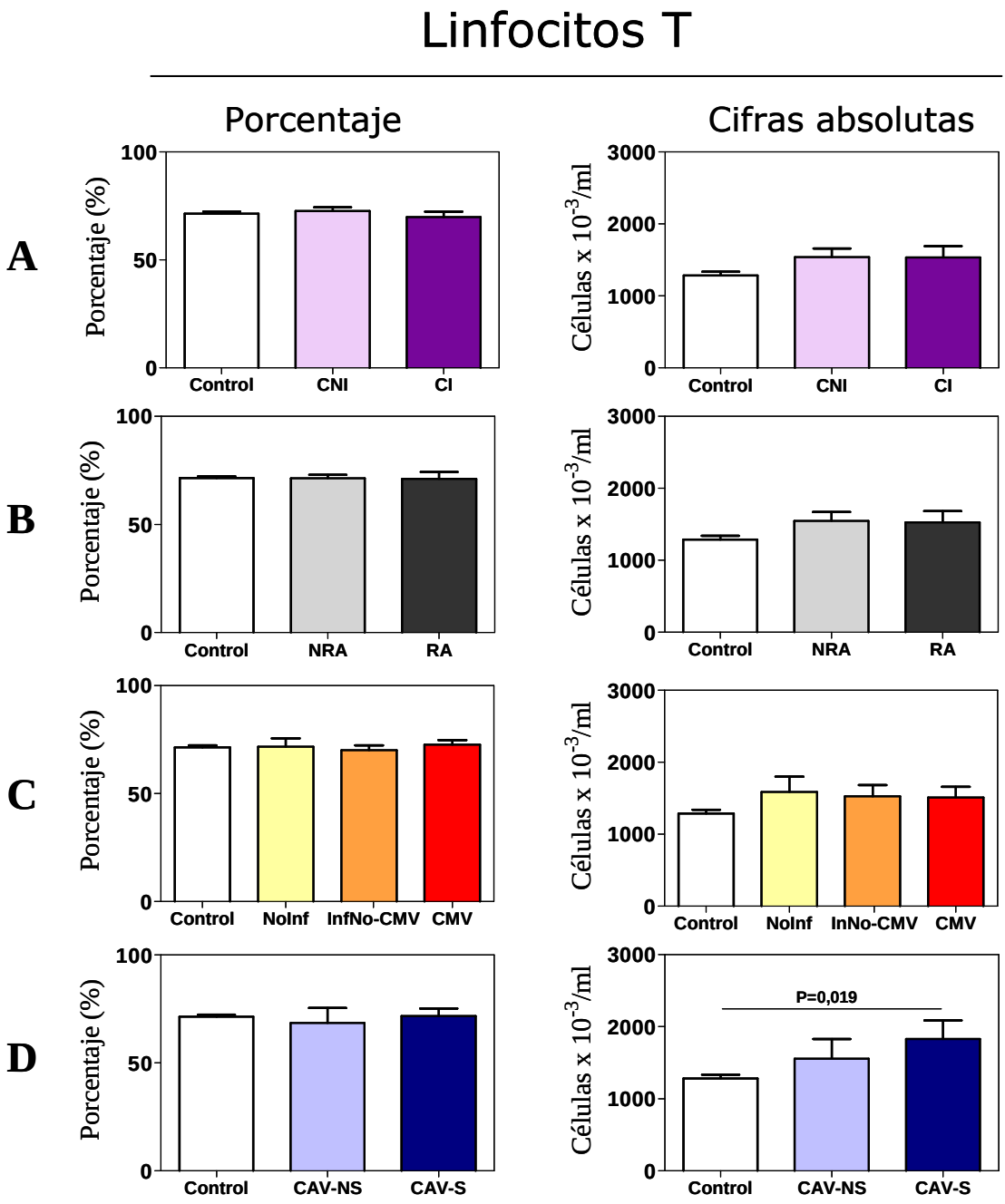

Figura 25. *Porcentaje y valor absoluto de linfocitos T en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico.

2.3.1. Linfocitos T $CD4^+$

Los linfocitos T $CD4^+$ presentaron cifras porcentuales similares en los receptores de injerto cardiaco y en los individuos del grupo control, tanto considerando a los pacientes de forma global (45,5±1,2 % vs 43,8±1,2%, p>0,05) como de forma individual para cada uno de los grupos (figura 26). Tampoco se detectaron diferencias significativas de esta población entre cada uno de los grupos de pacientes.

Por el contrario, el número absoluto de linfocitos T $CD4^+$ fue significativamente superior en el total de pacientes que en el grupo control (966±65 vs 786±38 células x 10^{-3}/ml; p=0,016). Como se puede observar en la figura 26, no se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los grupos de pacientes ni entre estos con el grupo de individuos control.

2.3.1.1. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD4^+CD28^+$

Por su parte, los linfocitos T $CD4^+CD28^+$, que representaron un 42% del total de linfocitos, mostraron valores porcentuales y absolutos muy similares a los obtenidos para los linfocitos T $CD4^+$ (figura 26), ya que la molécula coestimuladora CD28 se expresó en el 92% del total de linfocitos T $CD4^+$ tanto en pacientes como en individuos control (figura 27).

2.3.1.2. Niveles de expresión de CD28 en la membrana de linfocitos T $CD4^+$ (IMF)

La IMF de la molécula CD28 sobre linfocitos T $CD4^+$ fue significativamente superior en el grupo total de pacientes que en el grupo control (53,8 ± 3,4 vs 41,5 ± 11,9; p=0,001). La expresión de CD28 sobre linfocitos T $CD4^+$ en pacientes de NRA, InfNo-CMV y CAV-NS fue significativamente superior a la observada en los individuos del grupo control (en la figura 28, se describe el grado de significación para cada caso). Además, en dicha figura se puede observar que la expresión de CD28 sobre linfocitos T $CD4^+$ fue significativamente más elevada en los pacientes del grupo NRA que en los pacientes del grupo RA (p=0,046). De forma similar, los pacientes del grupo CAV-NS presentaron niveles superiores de CD28 que los del grupo CAV-S, aunque estas diferencias no llegaron a la significación estadística.

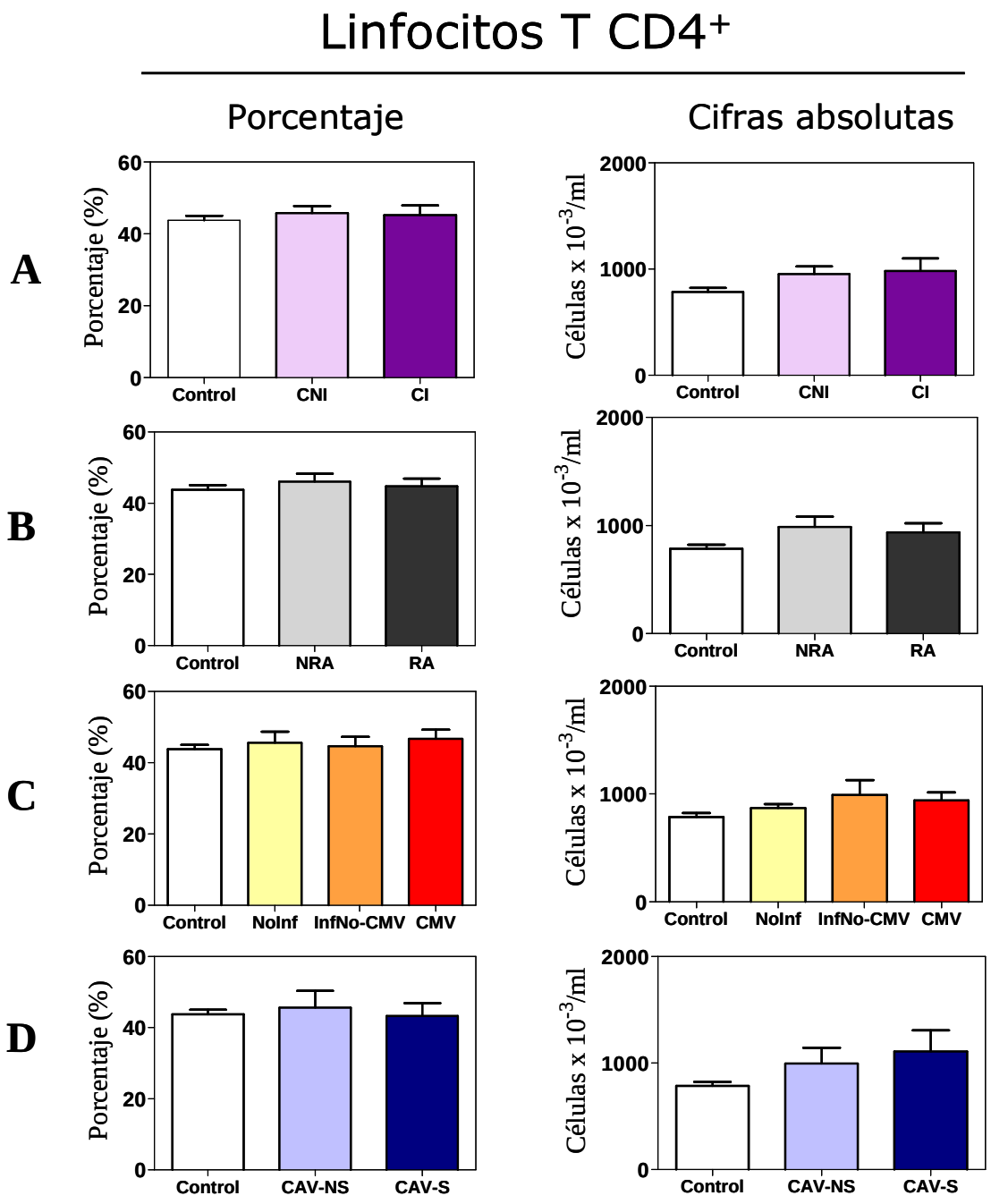

Figura 26. *Porcentaje y valor absoluto de linfocitos T CD4$^+$ en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S).

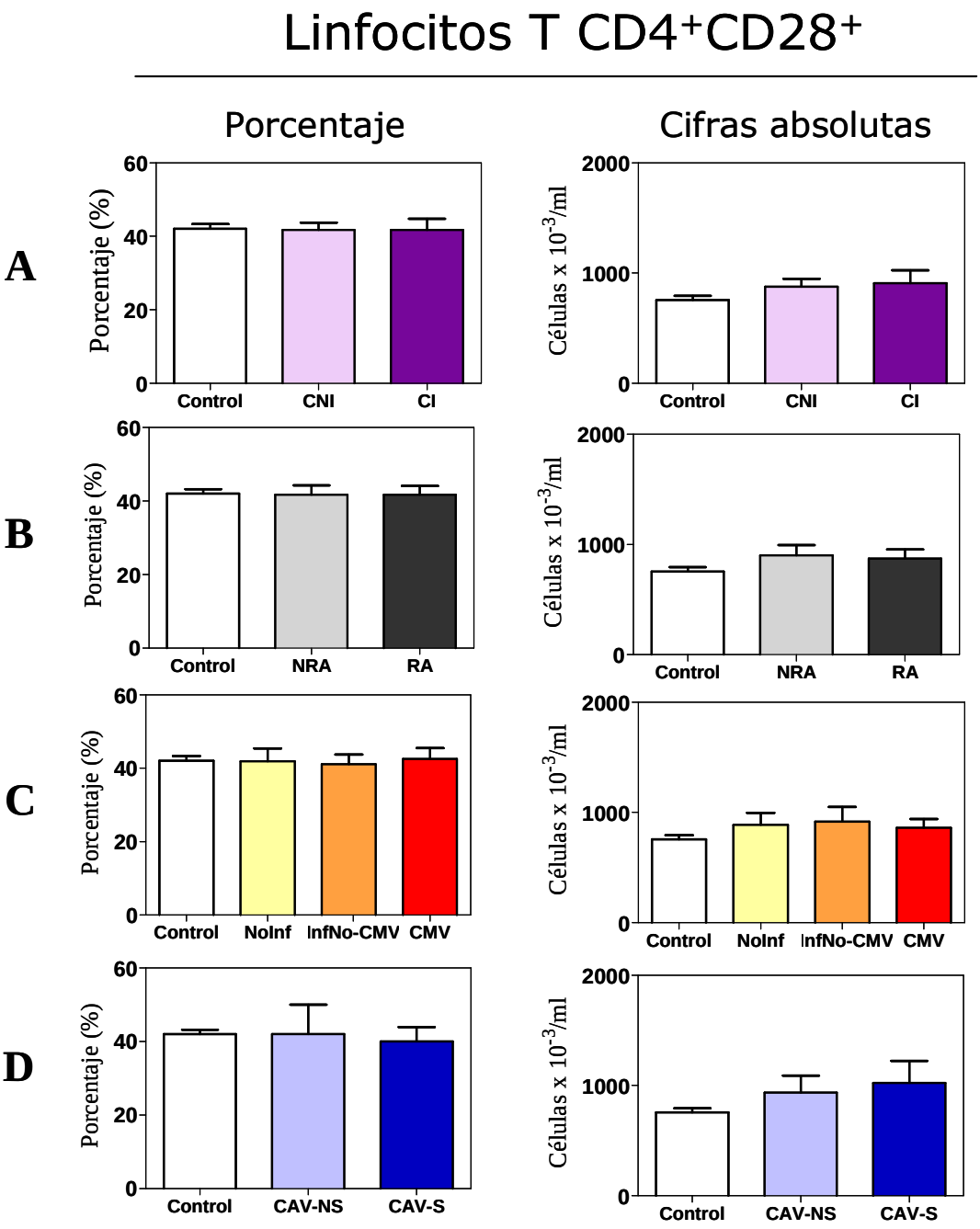

Figura 27. *Porcentaje y valor absoluto de linfocitos T CD4$^+$CD28$^+$ en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S).

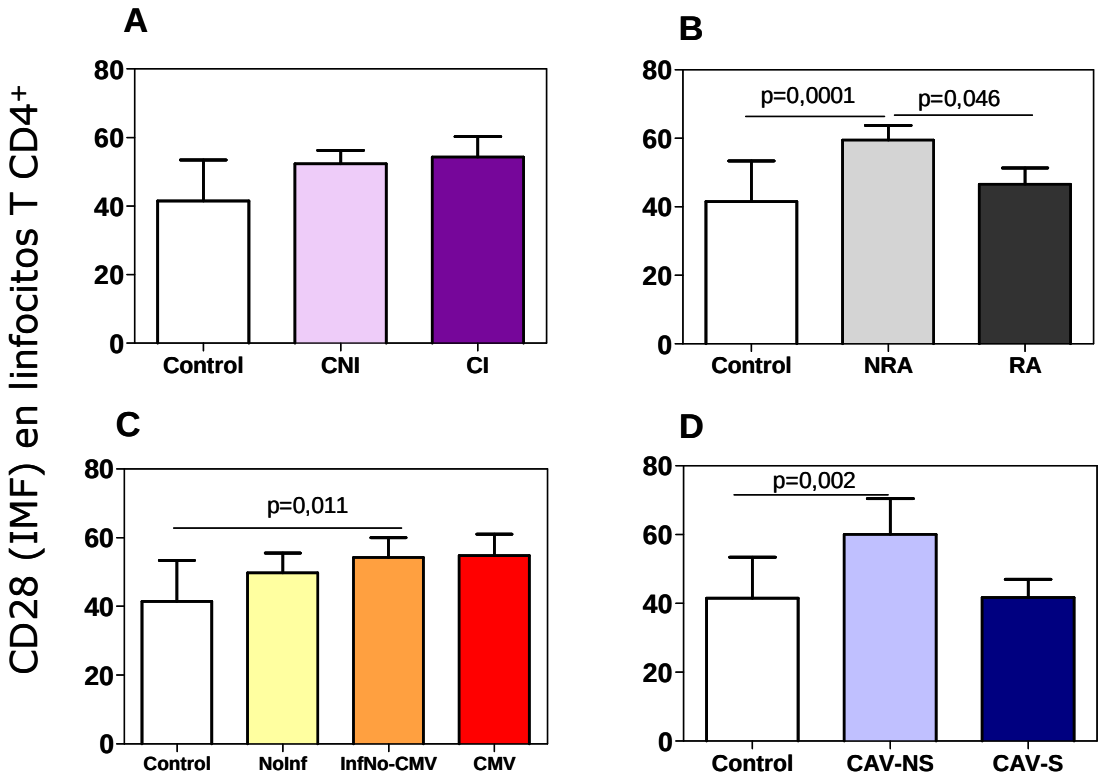

Figura 28. *Expresión de CD28 sobre Linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante.* Se representa la media de la IMF de CD28 en Linfocitos T $CD4^+$ de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico.

2.3.1.3. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD4^+CD28^-$

La subpoblación de linfocitos T $CD4^+CD28^-$ presentó cifras porcentuales y absolutas significativamente más elevadas en el grupo total de pacientes que en el grupo de individuos control (3,3±0,6% vs 1,7±0,4%, p=0,036; 72±15 vs 31±7,6 células x 10^{-3}, p=0,016).

Al analizar el porcentaje y cifras absolutas de linfocitos T $CD4^+CD28^-$ por grupos de pacientes, se observaron valores significativamente superiores en los grupos de pacientes de CI, RA y NRA que en el grupo control (en la figura 29, se describe el grado de significación para cada caso) y de CAV-S en cifras absolutas. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de pacientes.

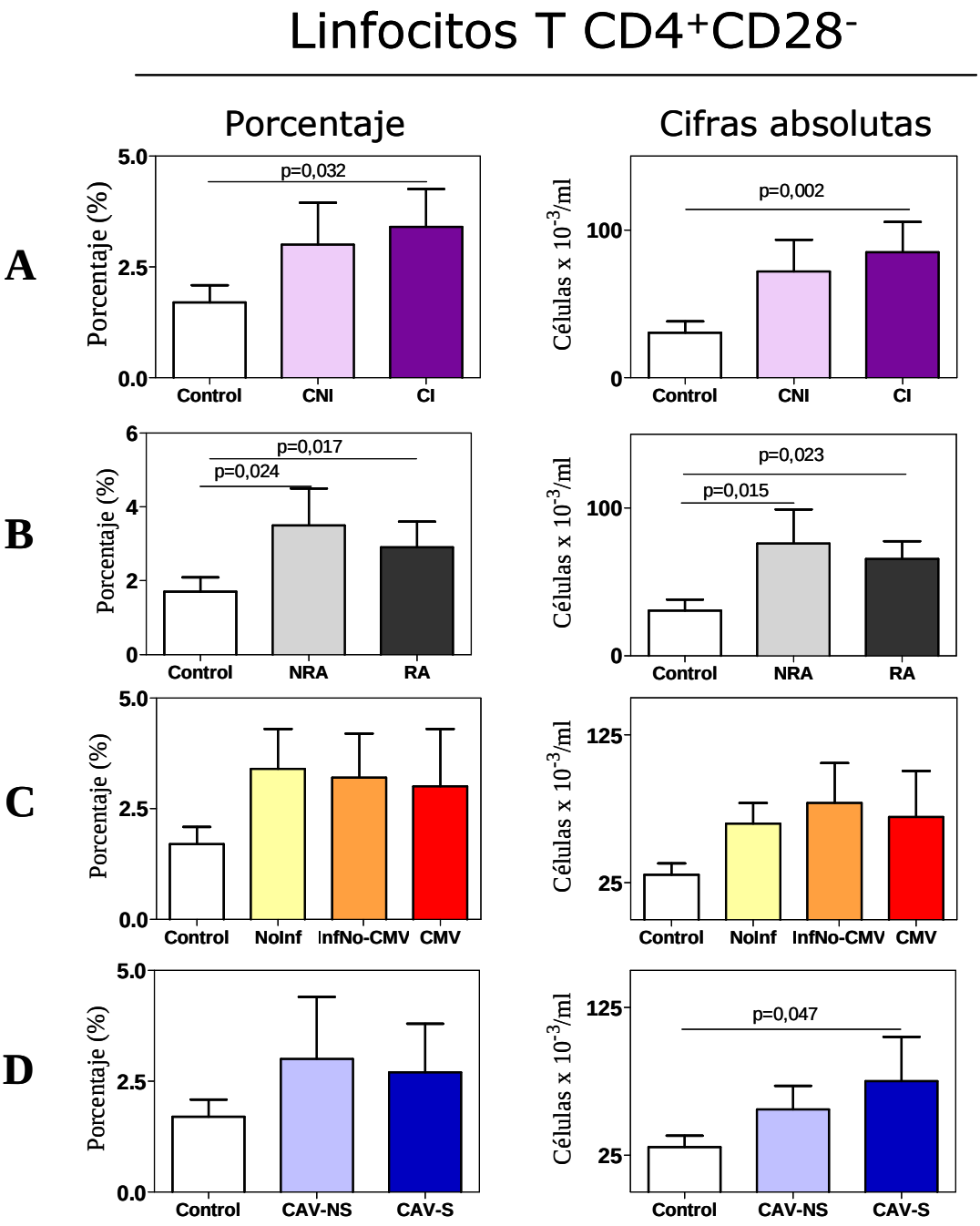

Figura 29. *Porcentaje y valor absoluto de linfocitos T CD4$^+$CD28$^-$ en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico.

2.3.2. Linfocitos T $CD8^+$

El porcentaje y los valores absolutos de linfocitos T $CD3^+CD8^+$ fueron similares en los pacientes en lista de espera de trasplante cardiaco que en los individuos del grupo control, tanto si los pacientes se consideraron de forma global (22,2±1,8% vs 21,3±1,2%; y 474±60 vs 386±29 células x 10^{-3}; respectivamente) como en sus diferentes grupos de estudio (figura 30). Sin embargo, hay que destacar que el porcentaje y el valor absoluto de células T $CD8^+$ en los pacientes del grupo con CAV-S mostraron valores más elevados que en los individuos del grupo control, aunque dichas diferencias fueron estadísticamente significativas solo para las cifras absolutas (p=0,003).

2.3.2.1. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD8^+CD28^+$

La población de linfocitos T $CD8^+CD28^+$, que representó el 12,3% del total de linfocitos (55,4% de los linfocitos T $CD8^+$), mostró porcentajes y cifras absolutas igualmente similares en los pacientes en lista de espera de trasplante cardiaco que en los individuos del grupo control, tanto si los pacientes se consideraron de forma global (12,3±0,9% vs 13,4 ±0,8%; 257±32 vs 239±17 células x 10^{-3}; respectivamente) como en sus diferentes grupos de estudio (figura 31).

2.3.2.2. Expresión de CD28 en linfocitos T $CD8^+$

La expresión de CD28 sobre linfocitos T $CD8^+$ fue significativamente superior en el grupo total de pacientes que en el grupo control (38,7 ± 2,4 vs 27,1 ± 6,5; p=0,0001). Al comparar cada uno de los grupos de pacientes con el grupo control, se observaron valores significativamente superiores en los pacientes de los grupos de NRA, InfNo-CMV, CMV y de CAV-NS (detalle de la significación enconrada se indican en el gráfico 32). De manera similar a lo observado en la expresión de CD28 sobre linfocitos T $CD4^+$, la expresión de CD28 sobre linfocitos T $CD8^+$ fue más alta en los pacientes del grupo NRA y CAV-NS que en los pacientes de los grupos RA y CAV-S, respectivamente, aunque dichas diferencias no llegaron a la significación estadística en ningún caso.

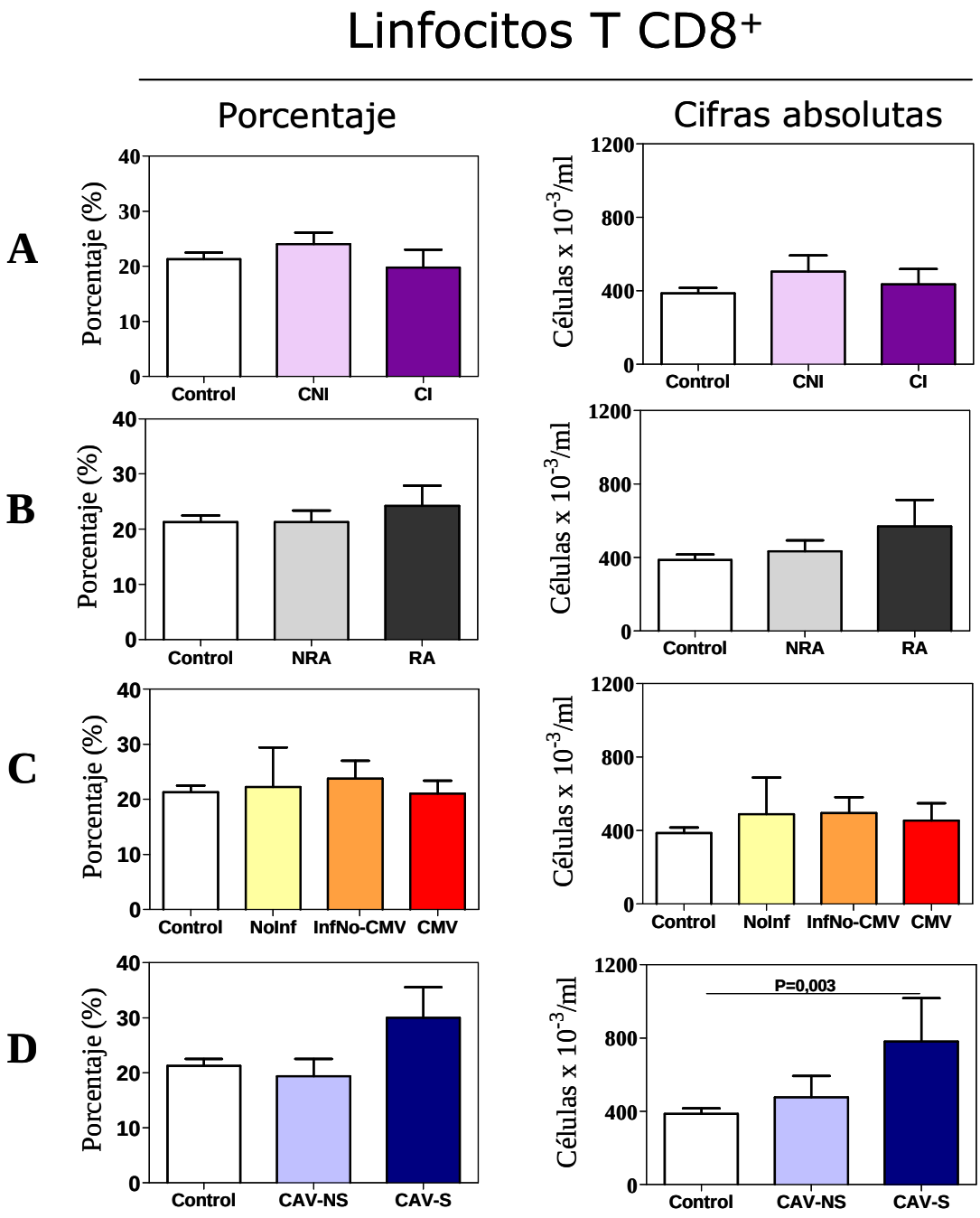

Figura 30. *Porcentaje y valor absoluto de Linfocitos T CD8⁺ en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico.

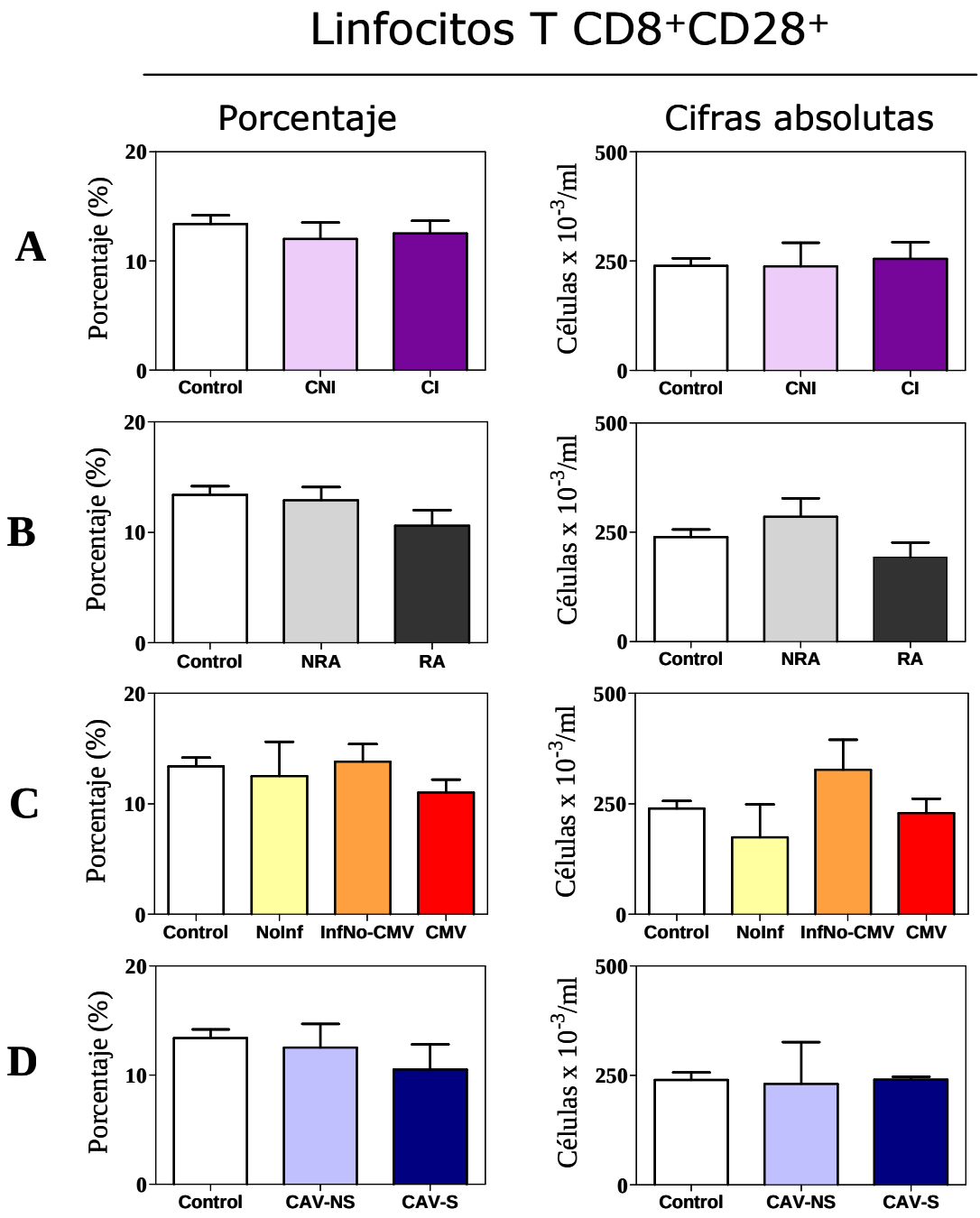

Figura 31. *Porcentaje y valor absoluto de Linfocitos T CD8⁺CD28⁺ en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S).

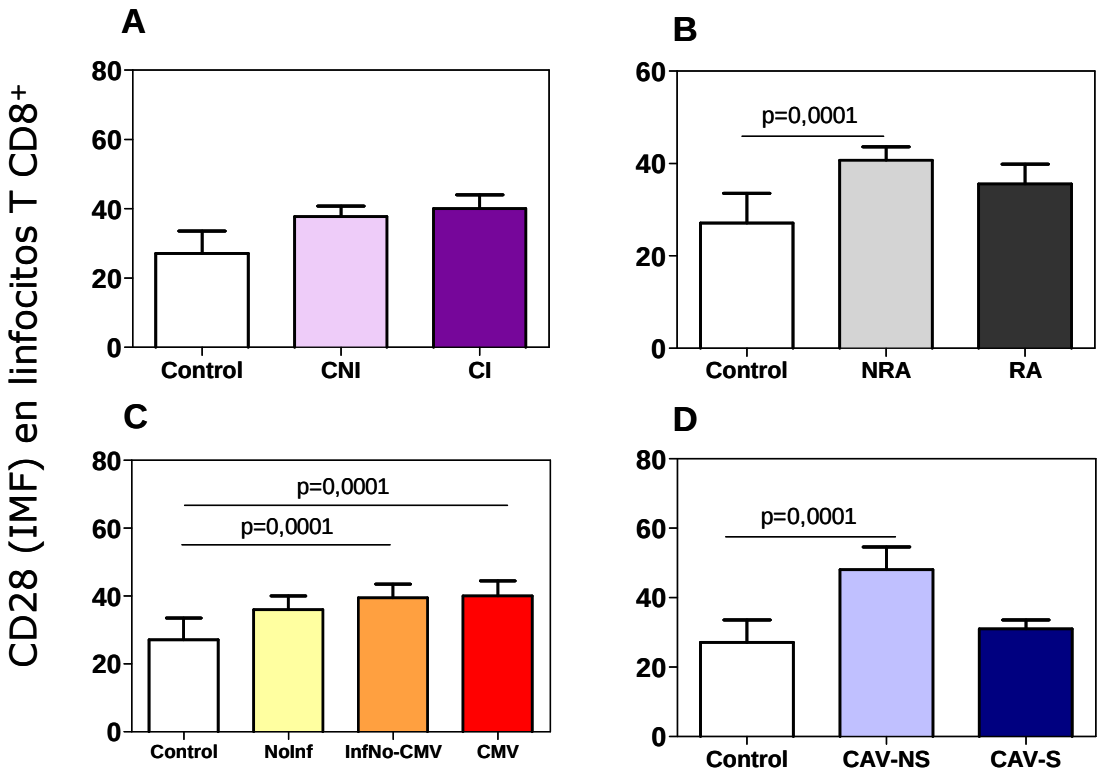

Figura 32. *Expresión de CD28 sobre Linfocitos T CD8$^+$ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* Se representa la media de la IMF de CD28 en Linfocitos T CD8$^+$ de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico.

2.3.2.3. Linfocitos T CD8$^+$CD28$^-$

Los valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD8$^+$CD28$^-$ fueron ligeramente superiores en el grupo total de pacientes que en el grupo de individuos control (10,7±1,9% vs 8,1±1,1%; 238±52 vs 149±24 células x 10^{-3}), aunque estas diferencias no fueron significativas.

En la figura 33, se compara el porcentaje medio y las cifras absolutas de linfocitos T CD8$^+$CD28$^-$ entre cada uno de los grupos de pacientes, así como entre estos y el grupo control. Al igual que en linfocitos T CD8$^+$ (figura 30), los pacientes con CAV-S presentaron valores porcentuales y absolutos superiores que el grupo control, en este caso dichas diferencias fueron estadísticamente significativas tanto en valores porcentuales como en cifras absolutas (el grado de significación se detalla en la figura 33D). Además, tanto los porcentajes como las cifras absolutas de linfocitos T

$CD8^+CD28^-$ fueron considerablemente más altos en los pacientes con CAV-S que en pacientes con CAV-NS, aunque dichas diferencias solo alcanzaron la significación estadística en cifras absolutas (p=0,046).

Es importante destacar que las diferencias descritas en los valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD3^+$ totales en el periodo pre-trasplante, más elevados en el grupo de pacientes con CAV-severo que en el resto de grupos de pacientes y controles, fue fundamentalmente a costa de linfocitos T $CD8^+CD28^-$, ya que los linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+CD28^+$ presentaban valores muy similares en todos las situaciones.

Por otro lado, y aunque las cifras de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ no mostraron diferencias significativas entre los pacientes de los grupos de RA y NRA, los pacientes del grupo RA partían de valores pre-trasplante más elevados que los del grupo NRA, situación que como veremos, se invierte de forma significativa durante el periodo post-trasplante, en el que dichas células predominaron en los pacientes sin rechazo agudo. De forma similar, los pacientes del grupo CAV-S también partían de valores pre-trasplante más elevados que los del grupo CAV-NS, situación que también se invierte en el post-trasplante, aunque en este caso sin diferencias estadísticamente significativas.

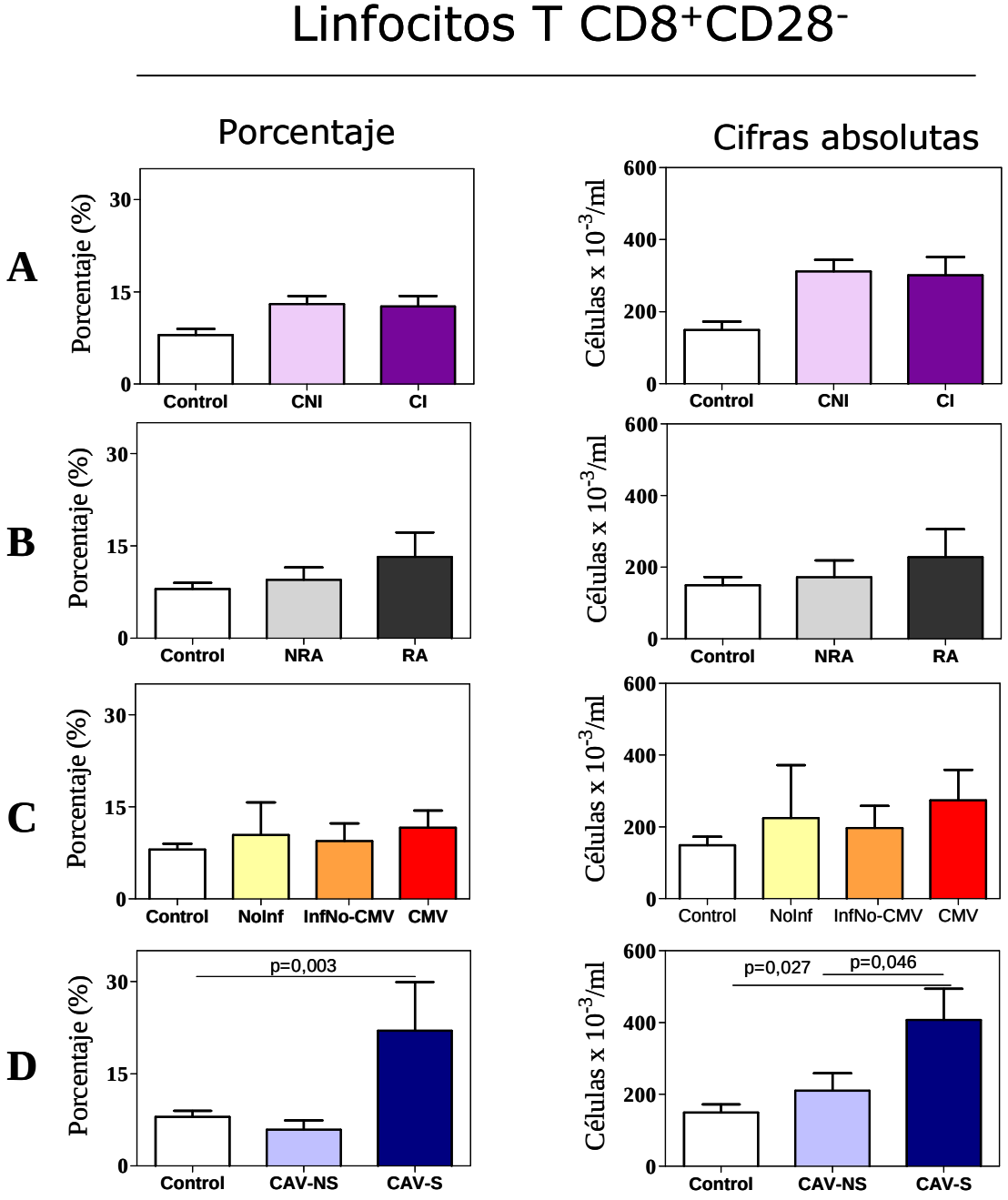

Figura 33. *Porcentaje y valor absoluto de Linfocitos T CD8⁺CD28⁻ en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico.

2.4. <u>Células NK</u>

Al contrario de lo que ocurre para leucocitos totales y para el resto de las subpoblaciones celulares analizadas, el porcentaje y valor absoluto de las células NK, identificadas como células $CD3^{-}CD56^{+}$, fue significativamente inferior en el grupo total de pacientes que en el grupo de individuos control (7,3±0,8% vs 12,0±0,8%, p=0,001; 151±19 vs 216±17 células x 10^{-3}, p=0,021).

En la figura 34 se puede observar que los valores porcentuales para cada uno de los grupos de pacientes considerados por separado, también fueron inferiores a los del grupo de individuos sanos, con diferencias que llegaron a ser estadísticamente significativas en todos lo grupos de pacientes, a excepción de los pacientes con CAV-S que no presentaron diferencias respecto a los controles (las significaciones así como su grado, se especifican en el gráfico correspondiente).

Las cifras absolutas de las células NK, fueron también inferiores en todos los grupos de pacientes que en el grupo control, aunque solo fueron estadísticamente significativas en los grupos de pacientes RA y CAV-NS respecto al grupo control (figura 34B y 34D, columna derecha).

Al igual a lo observado en la subpoblación T $CD8^{+}CD28^{-}$, el grupo de pacientes con CAV-S presentó valores medios superiores a los del grupo CAV-NS, tanto en porcentajes como en cifras absolutas, aunque dichas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas (figura 34 D).

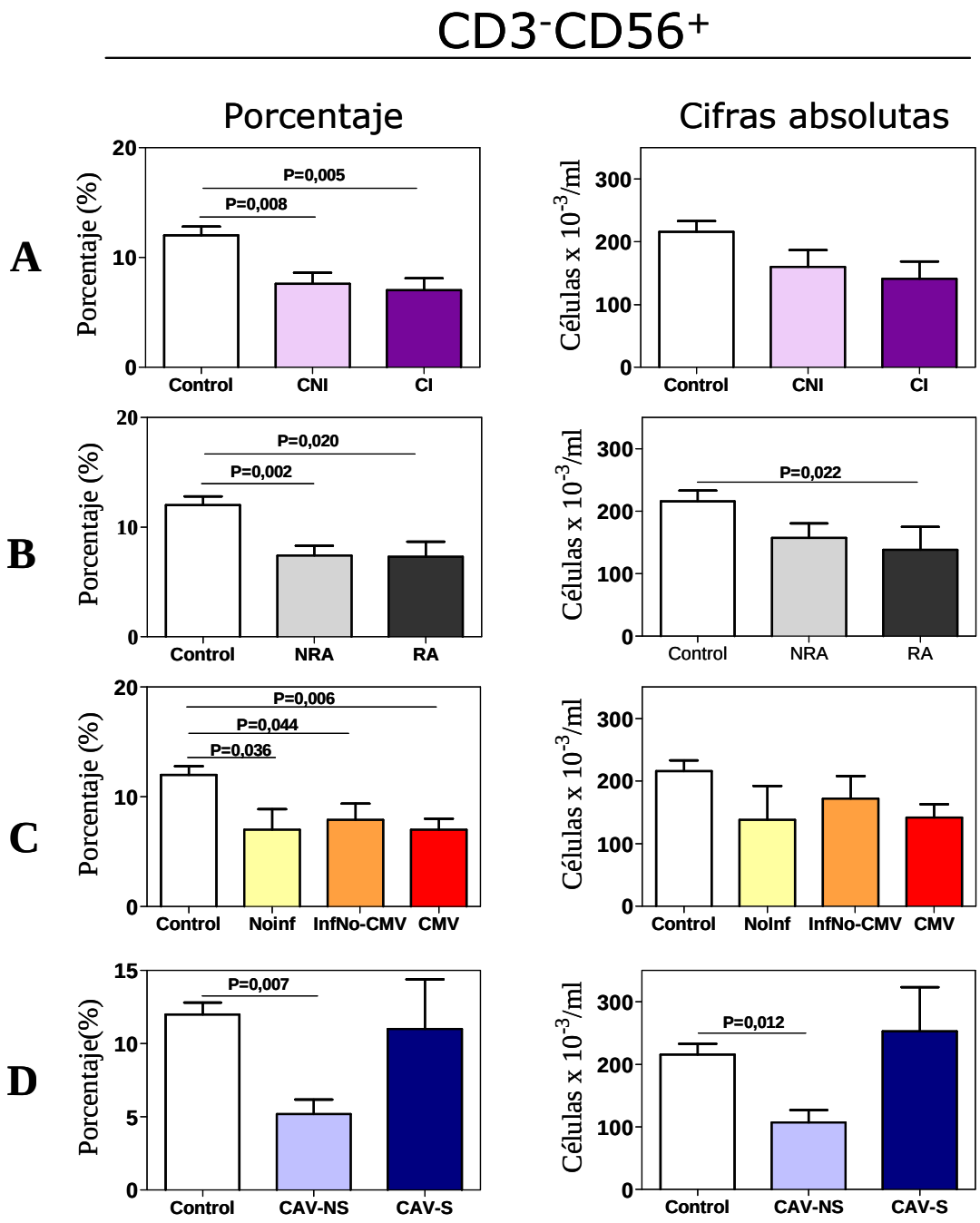

Figura 34. *Porcentaje y valor absoluto de células NK (CD3$^-$CD56$^+$) en controles sanos y en receptores de trasplante cardiaco en el pre-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (en células x 10^{-3}) de: **A**, controles y pacientes con cardiopatía no isquémica (CNI) e isquémica (CI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico.

3. POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA EN EL POST-TRASPLANTE

3.1. Poblaciones leucocitarias generales

3.1.1. Leucocitos

Después del trasplante los pacientes mostraron leucocitosis, con cifras absolutas de leucocitos en sangre periférica significativamente aumentadas en los primeros 15 días postrasplante (p=0,0001) en todos los grupos de estudio (CI y CNI; RA y NRA; NoInf, InfNo-CMV y CMV; CAV-S y CAV-NS). Las cifras de leucocitos recuperaron sus niveles basales a partir de la tercera semana post-trasplante, para mantenerse durante todo el periodo de monitorización posterior (de 21 a 365 días). Las cifras absolutas de leucocitos durante los primeros 15 días post-trasplante, también fueron significativamente más elevadas en todos los grupos de pacientes que en el grupo control (p=0,0001). No se detectaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes trasplantados durante su evolución (figura 35). Únicamente destacar que los pacientes que durante el periodo post-trasplante sufrieron infecciones de CMV, mostraron cifras de leucocitos ligeramente superiores a las de los pacientes sin infecciones o con infecciones diferentes a CMV a día 15 post-trasplante, en cualquier caso estas diferencias no fueron significativas.

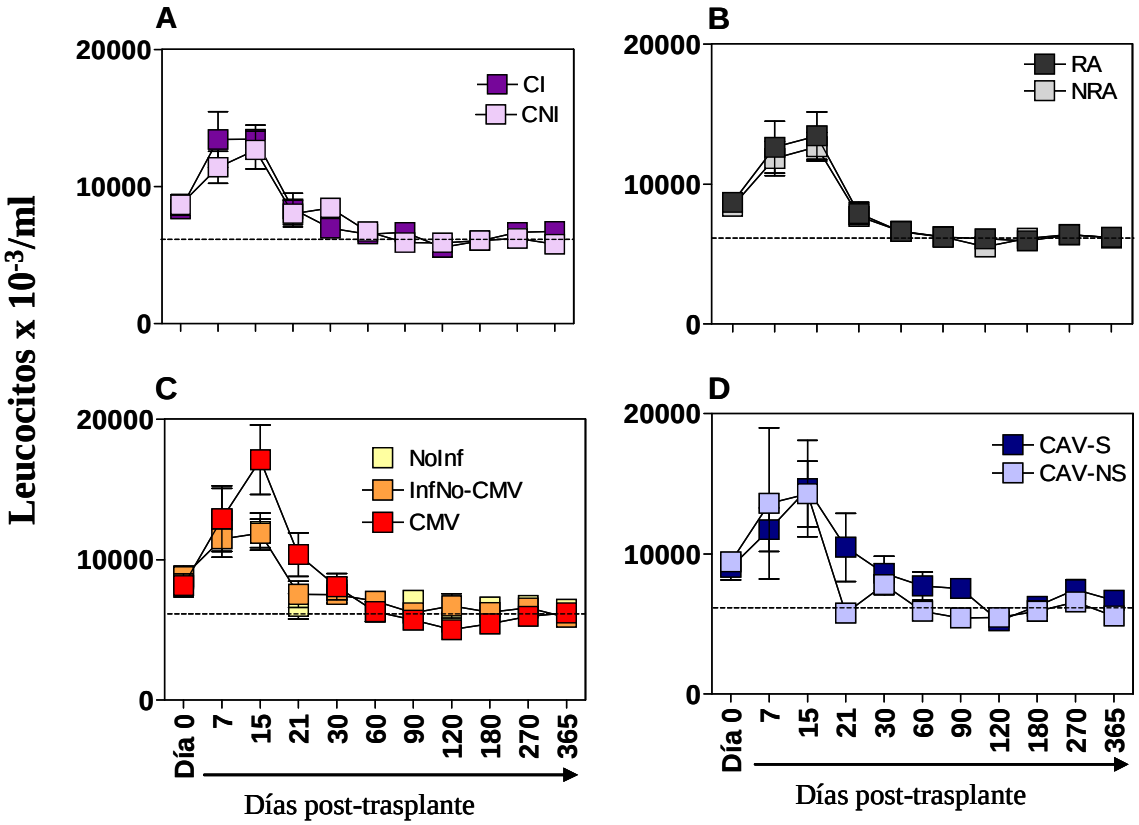

Figura 35. *Cifras absolutas de leucocitos en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. **A**, representa la media de leucocitos (células x 10^{-3}/ml) en el grupo de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores absolutos detectados en el grupo control.

3.1.2. Monocitos

3.1.2.1. Valores porcentuales y absolutos de monocitos

En el periodo post-trasplante temprano, el grupo total de pacientes mostró una disminución significativa en las cifras porcentuales de monocitos durante los días 7 (p=0,0001), 15 (p=0,022) y 21 (p=0,022) post-trasplante, recuperando e incluso sobrepasando sus niveles basales durante el resto del periodo de evolución.

En cifras absolutas, esta caída en las cifras de monocitos fue solo significativa a los 21 días post-trasplante (p=0,006).

Las cifras porcentuales y absolutas de los monocitos fueron similares en todos los grupos de receptores durante el periodo post-trasplante (figura 36).

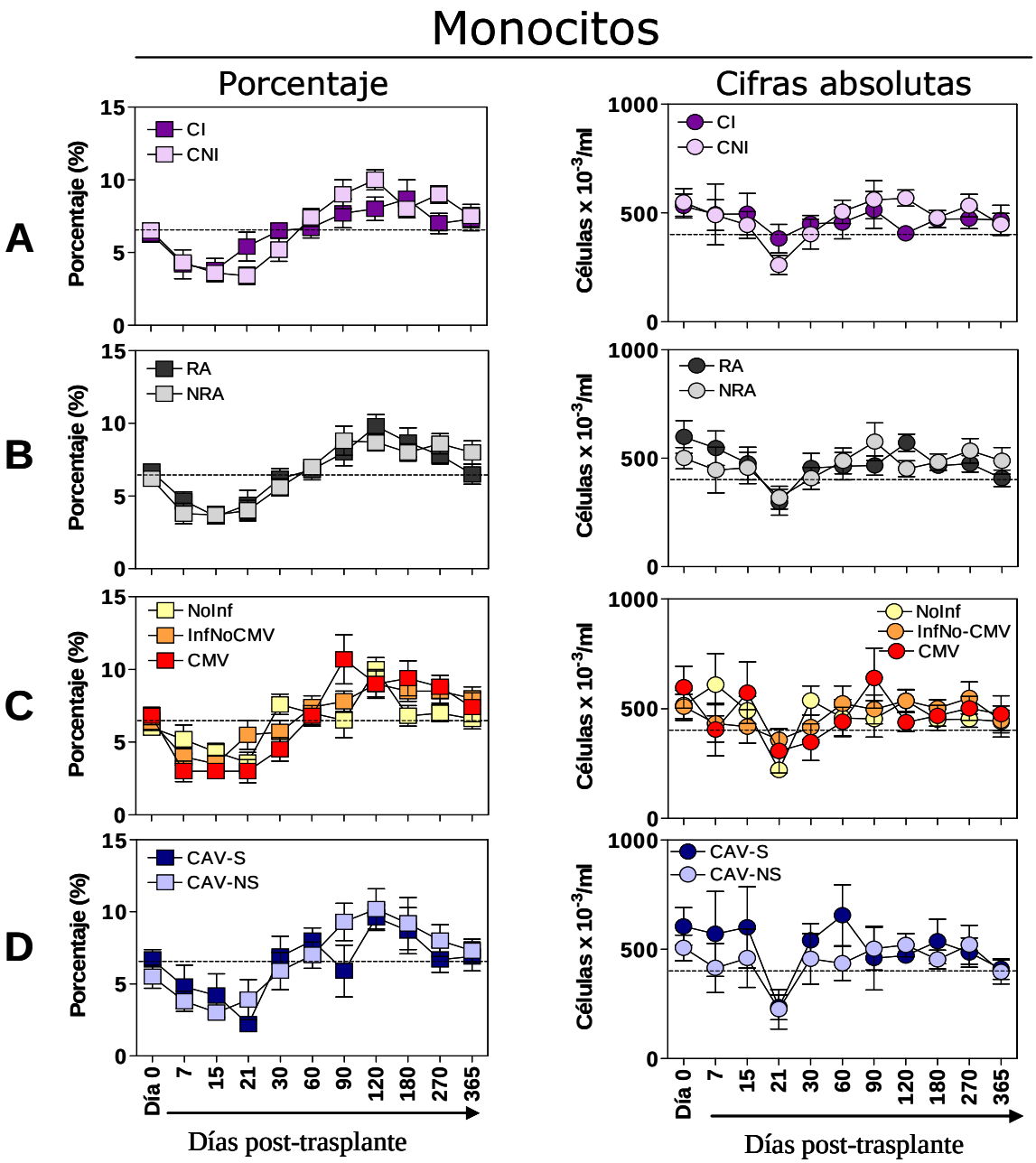

Figura 36. *Porcentaje y cifras absolutas de monocitos en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

3.1.2.2. Expresión de CD80, CD86 y CD95 sobre Monocitos

En monocitos, la expresión de CD80 durante la monitorización post-trasplante no mostró diferencias con los valores basales. Tampoco se observaron diferencias entre cada uno de los grupos de pacientes del estudio (figura 37).

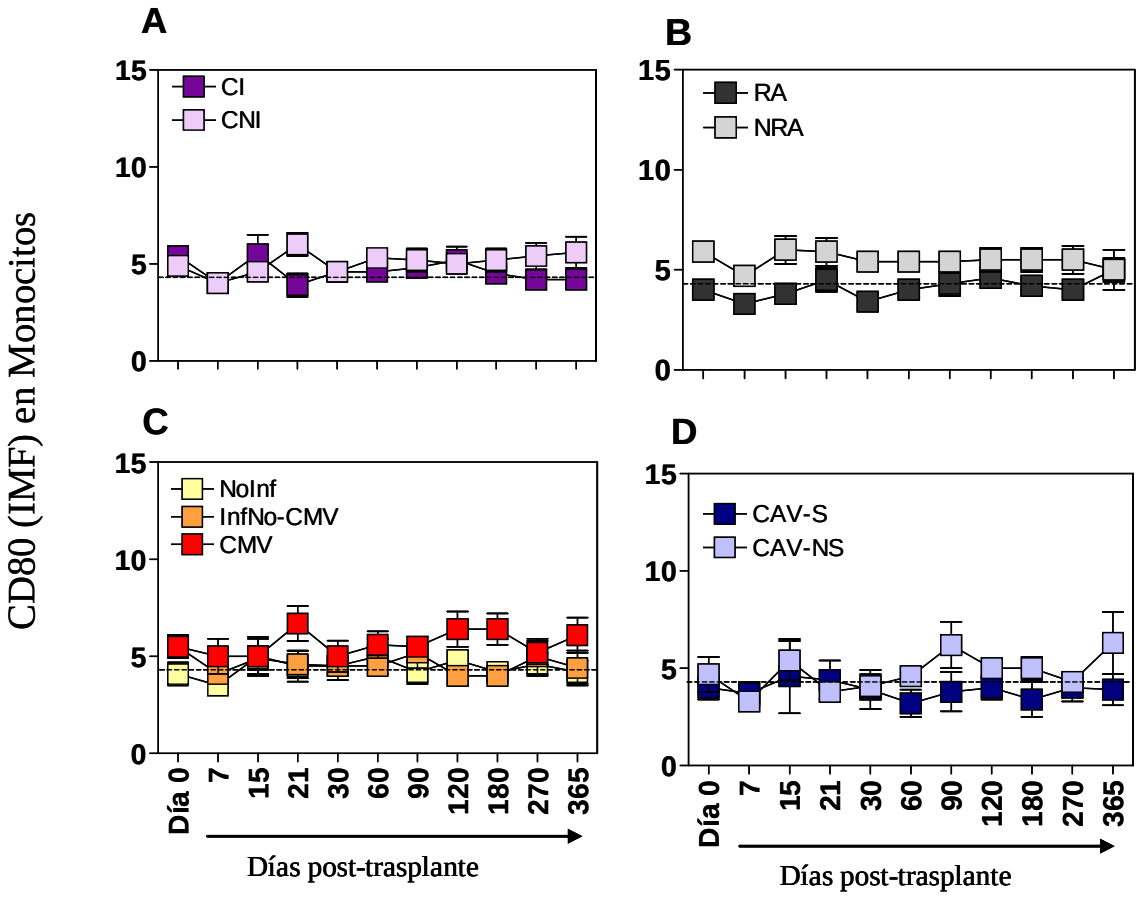

Figura 37. *Expresión de CD80 sobre monocitos en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD80 en monocitos de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

La expresión de la molécula CD86 sobre monocitos disminuyó de forma significativa los días 7 (p=0,0001), 15 (p=0,012) y 30 (p=0,001) post-trasplante en todos los grupos de estudio, con tendencia a recuperar sus niveles basales a lo largo del resto de la evolución post-trasplante (figura 38). Durante la evolución post-trasplante, los niveles de expresión de CD86 en monocitos fueron significativamente más elevados (p=0,012) en los pacientes del grupo NRA que en los del grupo RA entre los días 15 y 90 post-trasplante. Los pacientes con infección de CMV también mostraron niveles

significativamente más elevados de CD86 que los pacientes sin infecciones (NoInf) (p=0,022) y que los que tenían infecciones distintas a CMV (InfNo-CMV) (p=0,035), entre los días 90 y 270 post-trasplante, llegando además a superar sus niveles pre-trasplante. De forma similar, los pacientes con CAV-NS mostraron valores significativamente superiores a los pacientes con CAV-S entre los días 60 y 365 post-trasplante (p=0,032).

Como se observa en la figura 39, la expresión de la molécula CD95 sobre monocitos no mostró diferencias con sus niveles basales, ni tampoco entre los valores de los pacientes de los diferentes grupos a lo largo de toda su evolución post-trasplante.

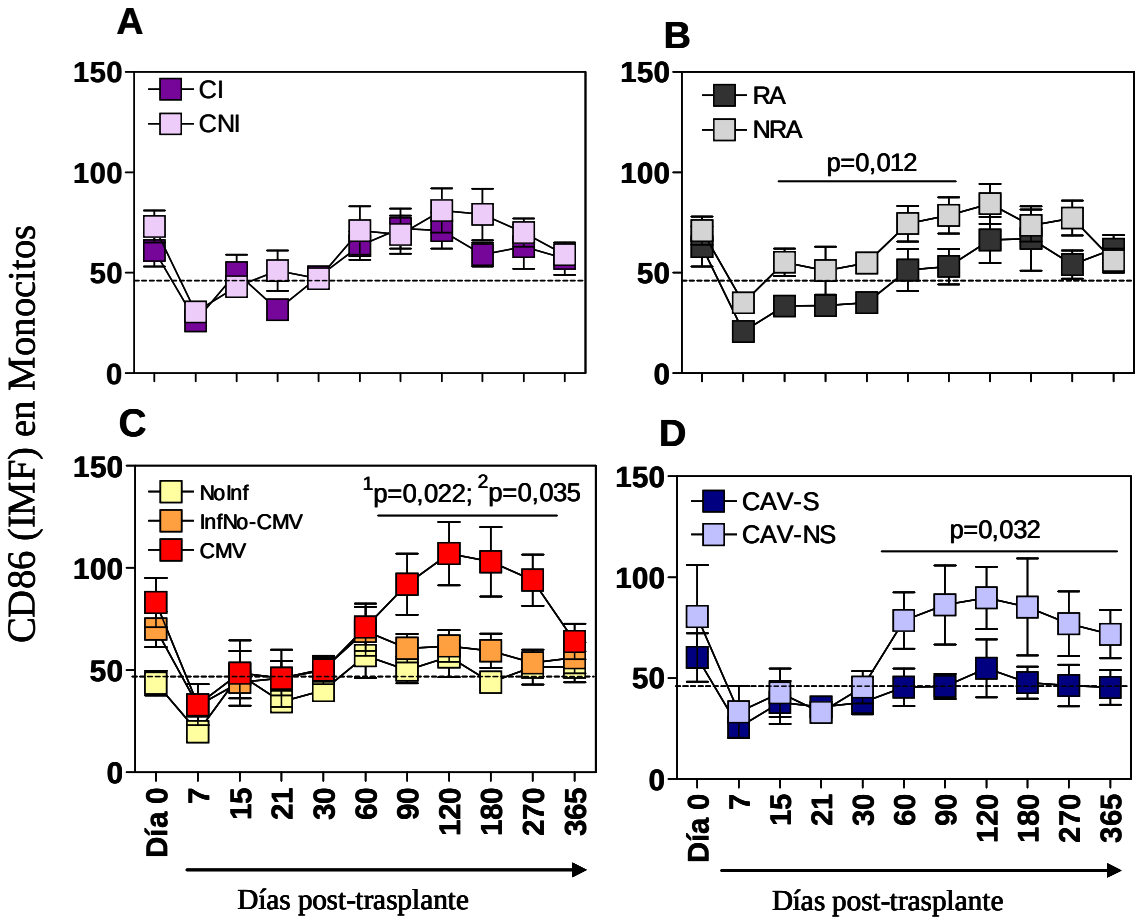

Figura 38. *Expresión de CD86 en monocitos de sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD86 en monocitos de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1), grupo CMV vs NoInf; (2), grupo CMV vs InfNo-CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

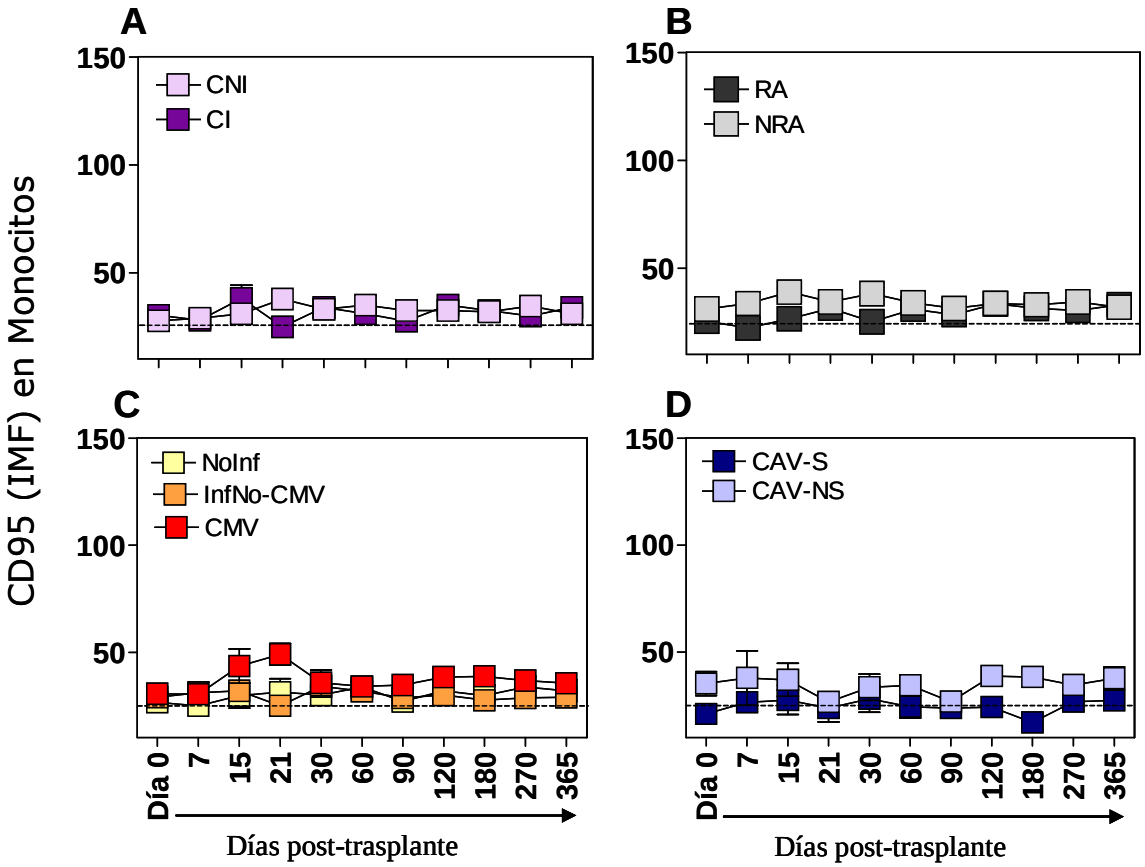

Figura 39. Expresión de CD95 en monocitos *de sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD95 en monocitos de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica. **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

3.1.3. Granulocitos neutrófilos

En el caso de los granulocitos neutrófilos las cifras porcentuales aparecían aumentadas durante los primeros 21 días post-trasplante en todos los grupos de receptores, alcanzando valores significativos los días 7 y 15 post-trasplante (p=0,0001); posteriormente retornaron a sus niveles pretrasplante. Durante toda la monitorización post-trasplante, el porcentaje medio de neutrófilos en todos los grupos de pacientes se mantuvo por encima del grupo control.

Las cifras absolutas de los granulocitos neutrófilos también se incrementaron en todos los grupos de receptores durante los 7 (p=0,0001) y 15 (p=0,001) días post-

trasplante, posteriormente retornaron a niveles pre-trasplante y se igualaron a las cifras absolutas de los controles.

Además en la figura 40, se puede observar que la evolución post-trasplante de los valores porcentuales y absolutos de granulocitos, fue semejante en todos los grupos de receptores.

3.1.4. Linfocitos totales

En el periodo post-trasplante el porcentaje de linfocitos totales decayó significativamente en todos los grupos de receptores en la muestra de los días 7, 15 y 21 post-trasplante ($p=0,0001$, $p=0,0001$ y $p=0,004$, respectivamente); a partir del día 30 se produjo un aumento gradual de linfocitos en todos los grupos de pacientes alcanzando los niveles basales a partir de los 90 días post-trasplante hasta el final de del periodo de monitorización.

En cifras absolutas, todos los grupos de estudio mostraron valores disminuidos respecto a sus valores basales durante el primer mes post-trasplante ($p<0,05$). Las cifras absolutas de linfocitos totales tendieron a recuperarse a partir del segundo mes post-trasplante, aunque en ningún caso recuperaron completamente sus niveles pre-trasplante. No obstante, dado que los pacientes de todos los grupos de estudio partieron de valores pretrasplante de linfocitos mayores que los de controles, si consiguieron tener cifras absolutas de linfocitos totales similares a los de los controles sanos, a excepción de los pacientes con RA y los que tenían infección por CMV que mantuvieron cifras absolutas de linfocitos disminuidas a lo largo de todo el periodo de monitorización, para recuperar valores similares al grupo control al año post-trasplante.

Como se puede observar en la figura 41, el grupo RA presentó cifras medias porcentuales (entre los 90 y 365 días) y absolutas (entre los 120 y 270 días) de linfocitos totales significativamente inferiores a las del grupo NRA (el grado de significación se detalla en la figura correspondiente).

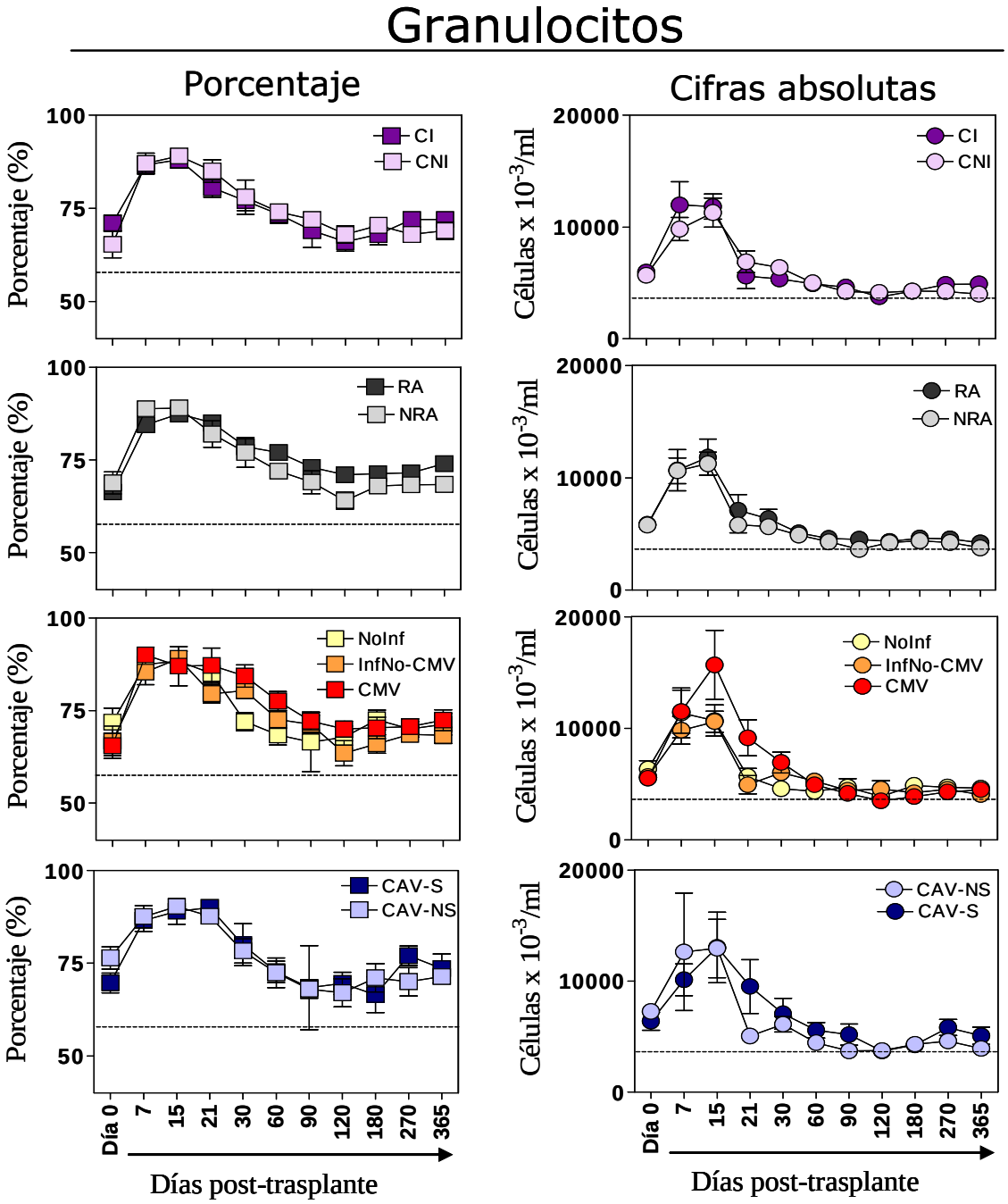

Figura 40. *Porcentaje y cifras absolutas de granulocitos neutrófilos en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) ó con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

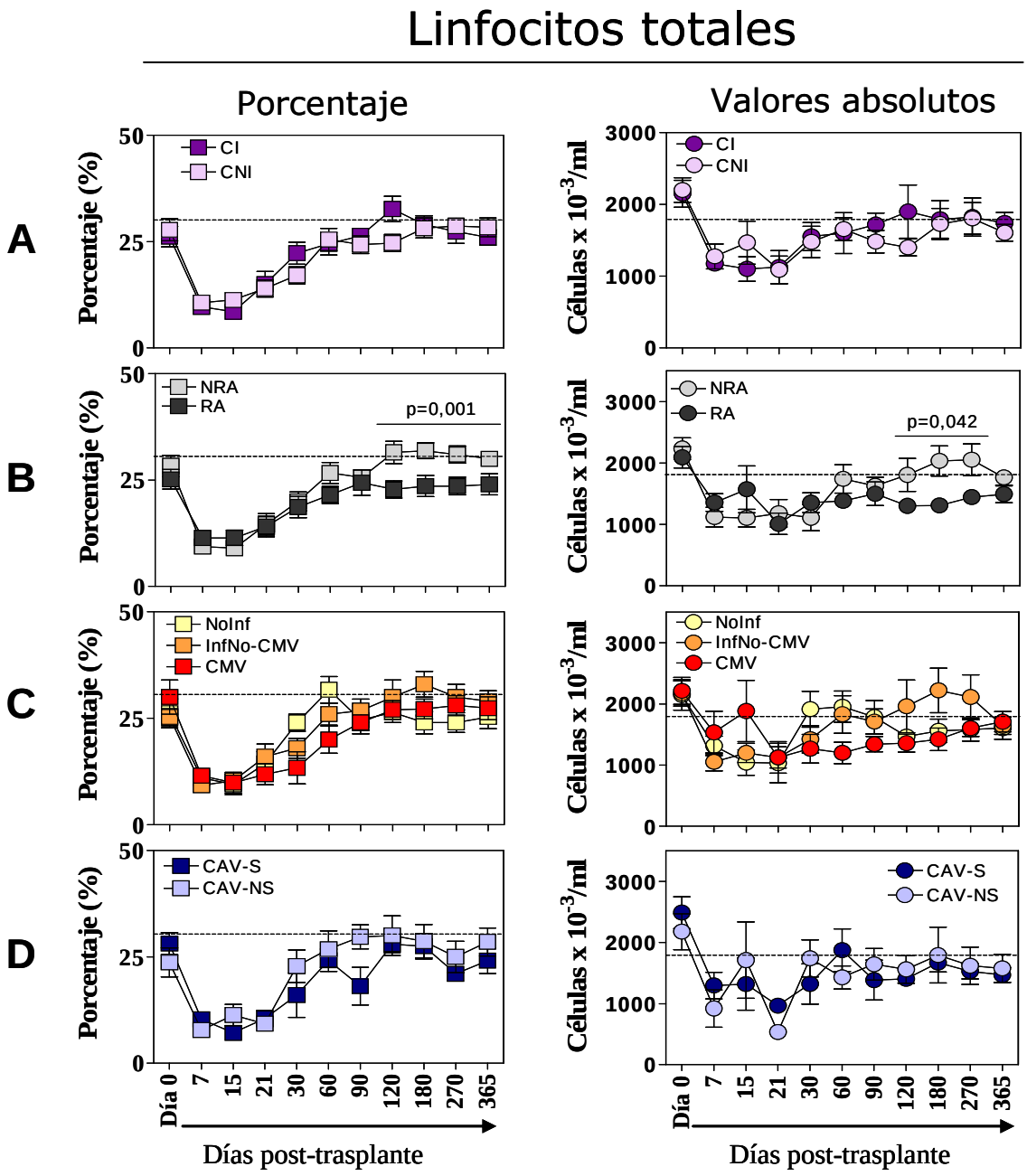

Figura 41. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos totales en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) ó con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

3.2. Linfocitos B ($CD19^+$)

3.2.1. Valores porcentuales y absolutos de Linfocitos B

Como ocurría con los leucocitos en el periodo post-trasplante temprano, todos los receptores mostraron cifras porcentuales de linfocitos B significativamente aumentadas durante los días 7 (p=0,0001), 15 (p=0,001), 21 (p=0,004) y 30 (p=0,0001) post-trasplante, recuperando e incluso alcanzando valores inferiores a sus niveles basales durante el resto de la evolución. En cifras absolutas, este aumento en las cifras de linfocitos B se observó durante los primeros 15 días post-trasplante sin llegar a ser estadísticamente significativo.

Las cifras porcentuales y absolutas de los linfocitos B fueron muy similares en todos los grupos de receptores (figura 42).

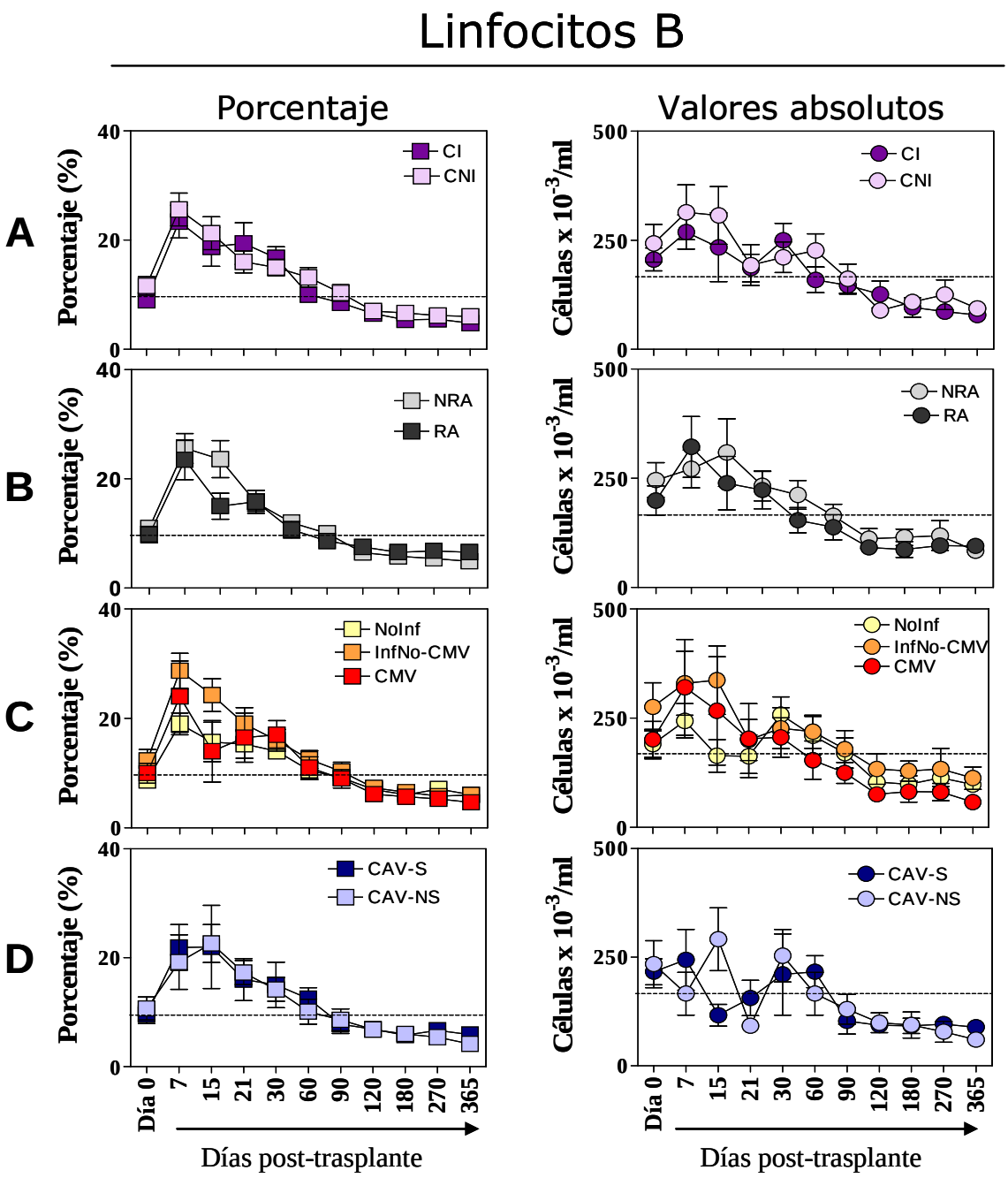

Figura 42. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos B en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

3.2.2. Expresión de CD80 y CD86 sobre Linfocitos B

La expresión de CD80 en linfocitos B durante la monitorización post-trasplante, no mostró diferencias con los valores basales. Tampoco se observaron diferencias entre cada uno de los grupos de pacientes de estudio (figura 43).

En el periodo post-trasplante, la expresión de la molécula CD86 sobre linfocitos B disminuyó durante el primer mes post-trasplante en todos los grupos de estudio, con diferencias significativas a los 7 días (p=0,0001) post-trasplante, recuperando sus niveles basales durante el resto de la monitorización. Los pacientes con CMV mostraron niveles significativamente superiores de CD86 que los pacientes sin infecciones (NoInf) a los 270 días post-trasplante (p=0,026) (figura 44).

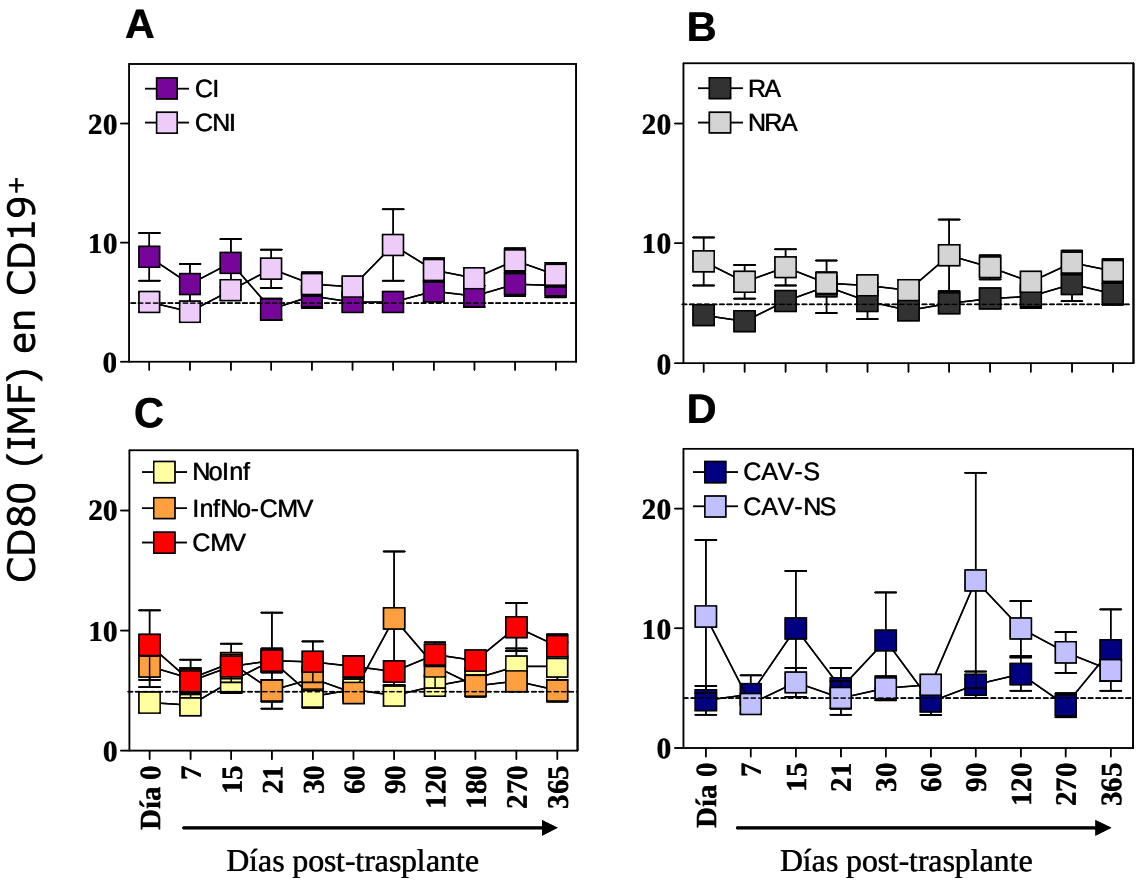

Figura 43. *Expresión de CD80 sobre linfocitos B en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD80 en Linfocitos B de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

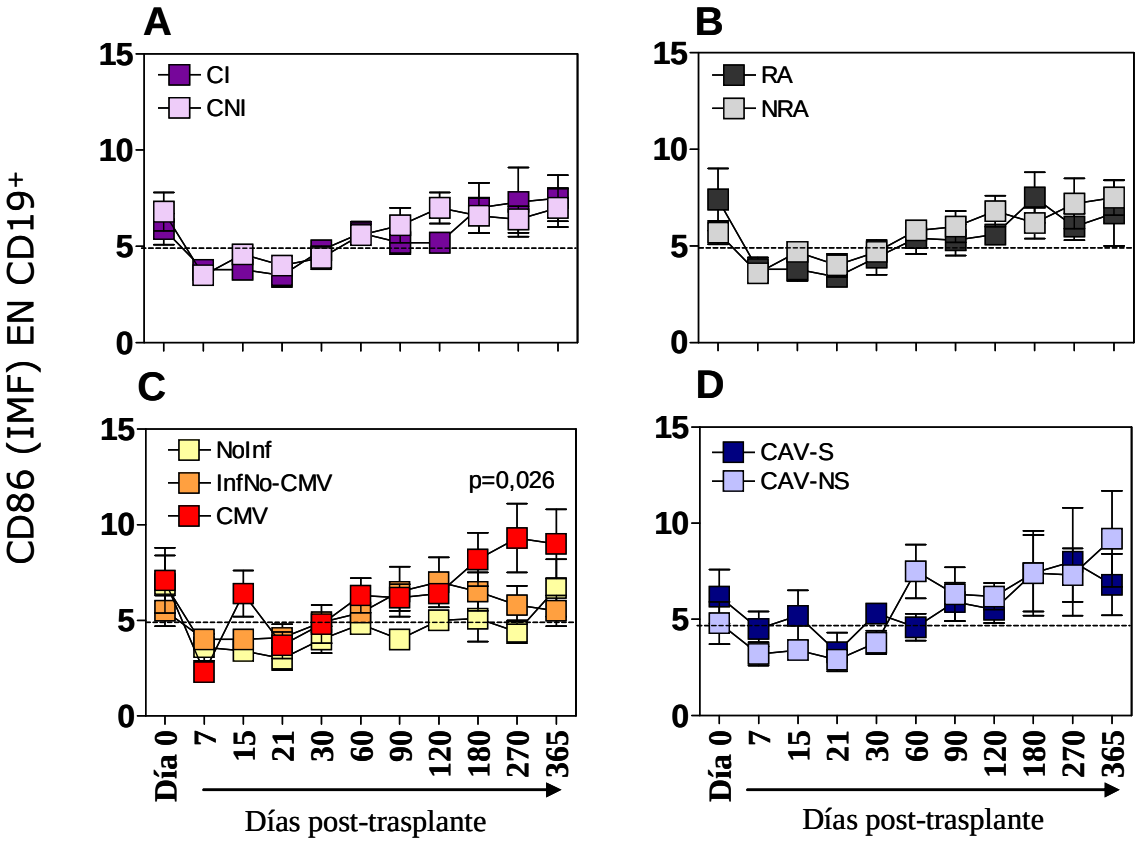

Figura 44. *Expresión de CD86 sobre linfocitos B en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD86 en Linfocitos B de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico. Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

3.2.3. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos B CD80$^+$ y CD86$^+$

Como ocurría con los linfocitos B totales, los linfocitos B con expresión positiva de CD80 (CD80$^+$) presentaron cifras porcentuales superiores a los valores pre-trasplante durante los días 7 y 15 (p=0,007) post-trasplante en todos los grupos de receptores; posteriormente retornaron a sus niveles basales, que se mantuvieron hasta el final del periodo de monitorización.

Las cifras absolutas de linfocitos B CD80$^+$ también se incrementaron durante los primeros días post-trasplante, aunque dichas diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Además en la figura 45, se puede observar que la evolución post-trasplante de los valores porcentuales y absolutos de linfocitos B $CD80^+$ fue muy semejante en todos los grupos de pacientes.

En el caso de los linfocitos B con expresión positiva de CD86 ($CD86^+$), las cifras porcentuales mostraron un aumento significativo a los 30 días post-trasplante (p=0,0001), y retornaron a sus niveles basales durante el resto del periodo de monitorización.

En el periodo post-trasplante, las cifras absolutas de los linfocitos B $CD86^+$ no mostraron diferencias significativas respecto a los niveles pretrasplante.

Como se observa en la figura 46, las cifras porcentuales y absolutas de linfocitos B $CD86^+$ fueron superiores en los pacientes con infecciones diferentes a CMV durante los días 60 y 90 post-trasplante, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. De igual manera, las cifras absolutas de linfocitos B $CD86^+$ en pacientes con CAV-S mostraron valores más altos que en pacientes con CAV-NS durante los 30 y 60 días post-trasplante, diferencias que no llegaron a ser estadísticamente significativas.

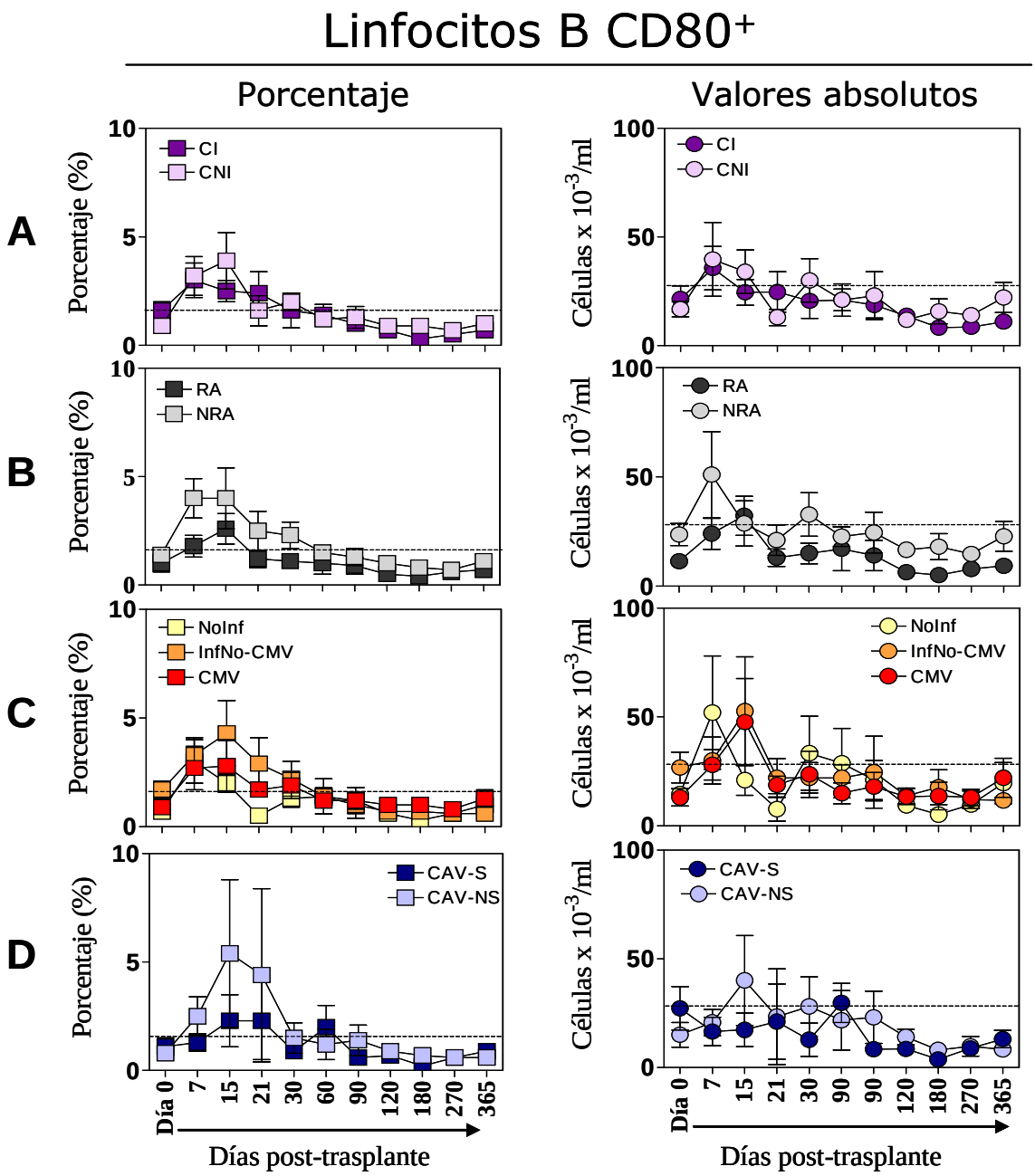

Figura 45. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos B CD80⁺ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

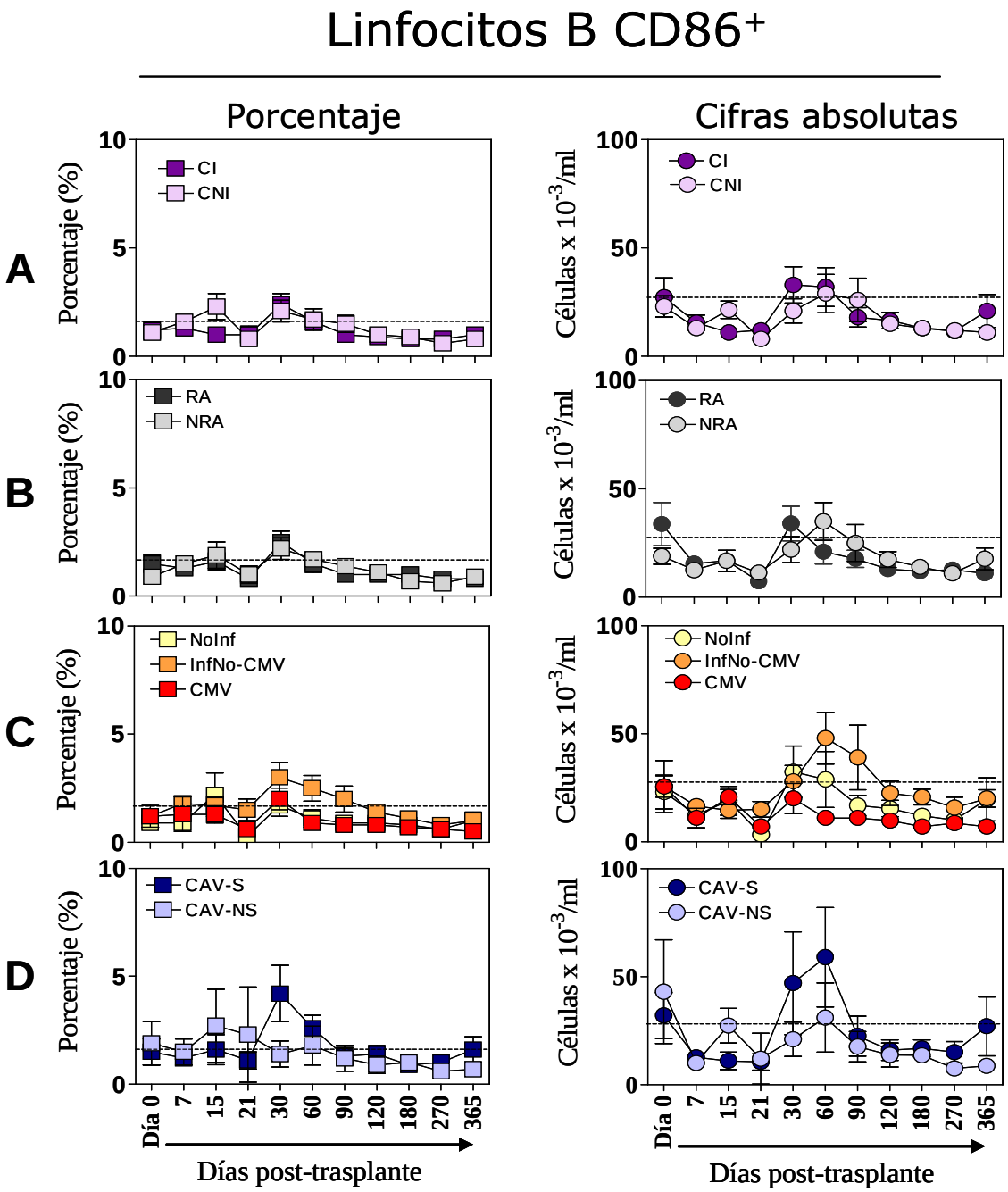

Figura 46. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos B CD86⁺ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

3.3. Linfocitos T ($CD3^+$)

3.3.1. Linfocitos T totales

Al contrario de lo que ocurría con los leucocitos, en el periodo post-trasplante los pacientes mostraron cifras porcentuales de linfocitos totales en sangre periférica disminuidas durante los días 7 (p=0,0001) y 15 (p=0,003) post-trasplante. En cifras absolutas también se observó una caída significativa de los linfocitos T totales durante los días 7 (p=0,0001), 15 (p=0,003) y 30 (p=0,007) post-trasplante. Destacar, que durante los días 120 y 270 post-trasplante los pacientes del grupo NRA presentaron cifras absolutas de linfocitos totales significativamente superiores a las de los pacientes del grupo RA (figura 47). El resto de grupos de estudio no mostraron diferencias en las cifras de linfocitos T post-trasplante.

3.3.1.1. Expresión de CD95 en linfocitos T

Los linfocitos T $CD95^+$ presentaron cifras porcentuales significativamente disminuidas durante los primeros 7 días post-trasplante (p=0,0001) en todos los grupos de receptores, para recuperar sus niveles pre-trasplante durante el resto de la monitorización.

Las cifras absolutas de los linfocitos T $CD95^+$ también disminuyeron significativamente en todos los grupos de receptores durante los días 7 (p=0,0001), 15 (p=0,003), 21 (p=0,008), 30 (p=0,004) y 60 (p=0,003) post-trasplante. En cifras absolutas, los pacientes del grupo NRA mostraron cifras significativamente superiores de linfocitos T $CD95^+$ (p=0,013) que los pacientes del grupo RA entre los días 120 y 365 post-trasplante, fundamentalmente debido a que los pacientes del grupo RA no recuperaron sus niveles pre-trasplante en ningún momento del seguimiento y sí lo hacían los del grupo NRA (figura 48).

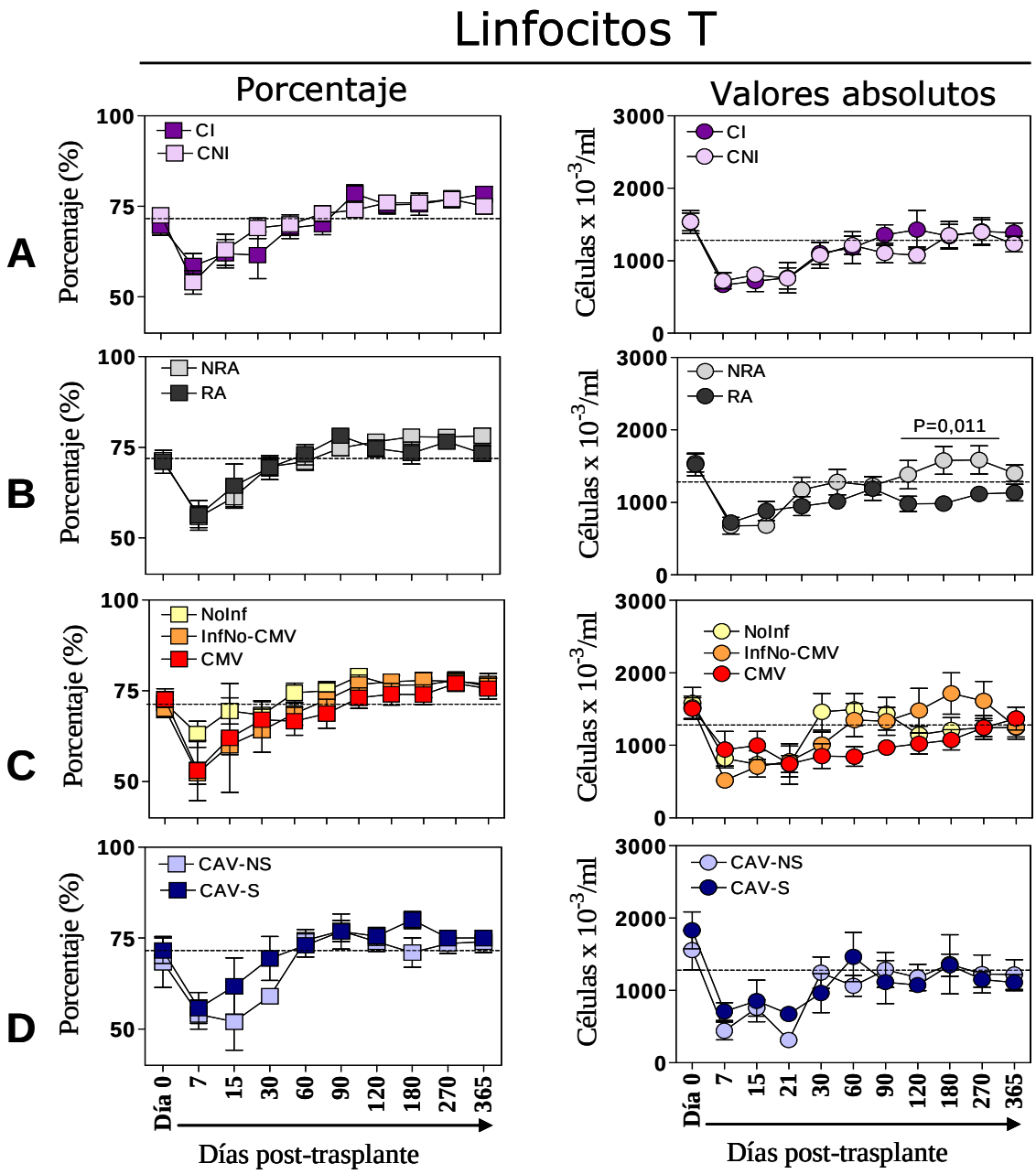

Figura 47. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

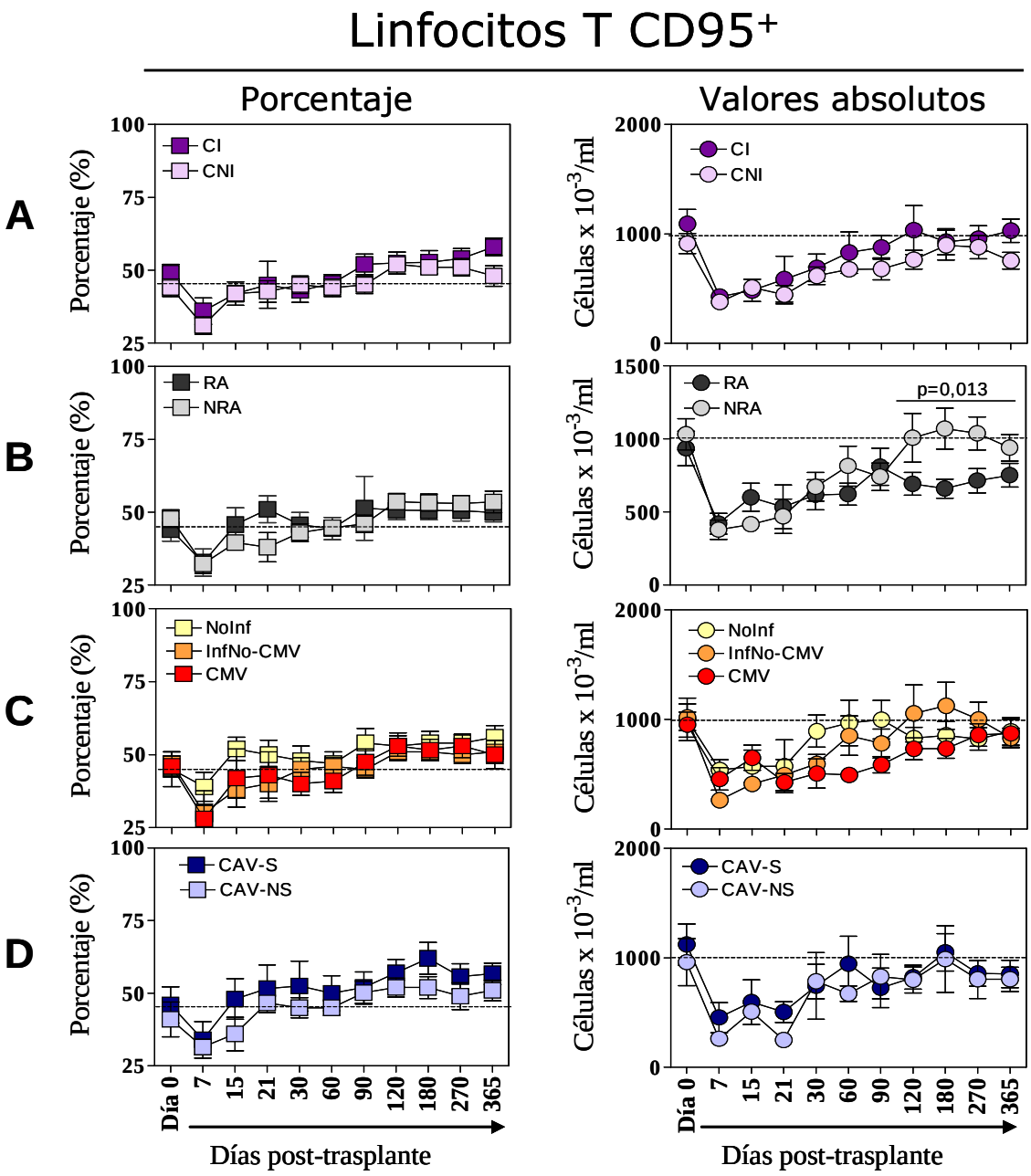

Figura 48. *Porcentaje y cifras absolutas de Linfocitos T CD95⁺en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

Como se observa en la figura 49, la expresión de la molécula CD95 sobre linfocitos T apenas mostró variaciones a lo largo de todo el periodo de monitorización post-trasplante.

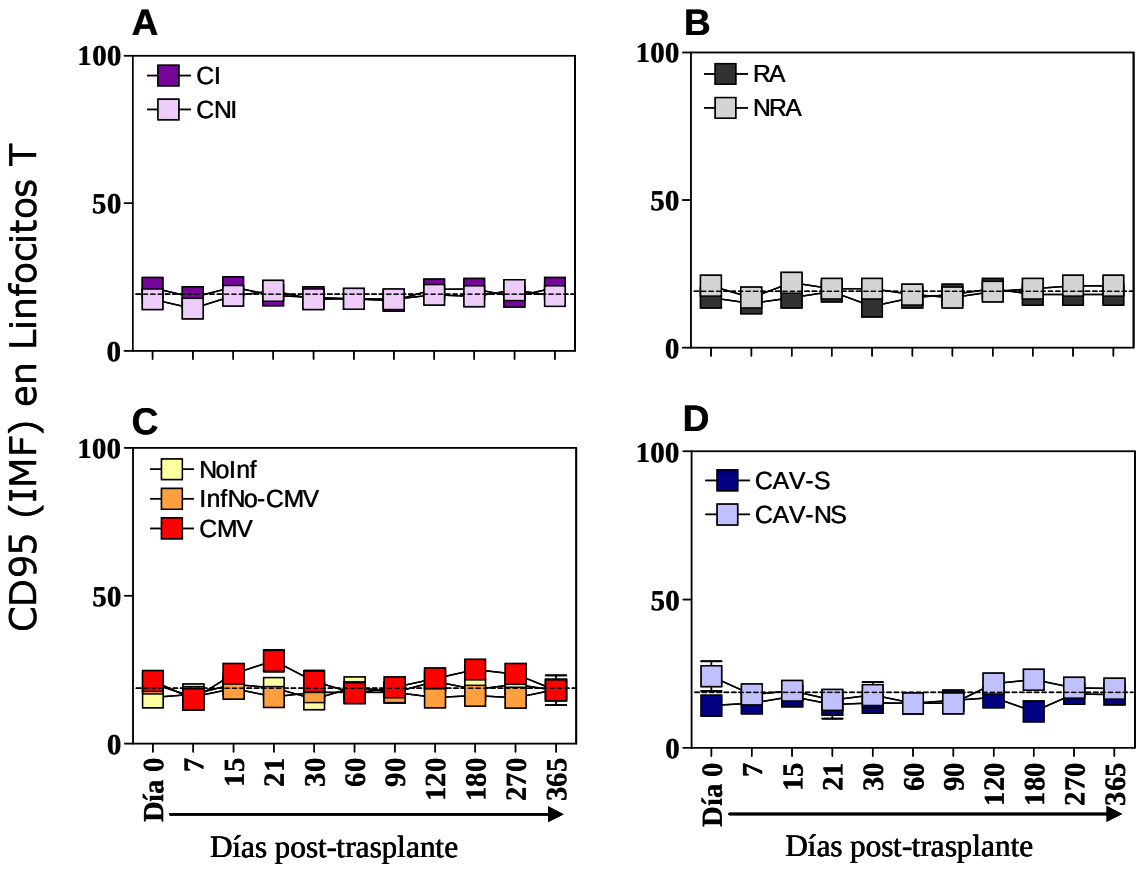

Figura 49. Expresión de CD95 sobre linfocitos T *en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD95 en Linfocitos T de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

3.3.1.2. Expresión de CD80 y CD86 en linfocitos T

Los linfocitos T $CD80^+$ mostraron cifras porcentuales significativamente disminuidas durante los 7 primeros días post-trasplante (p=0,021) en todos los grupos de receptores, para recuperar sus niveles basales a lo largo del periodo de monitorización.

Las cifras absolutas de linfocitos T $CD80^+$ se mantuvieron disminuidas hasta los 120 días post-trasplante, con diferencias significativas los días 7 (p=0,001), 21

(p=0,009), 30 (p=0,004), 60 (p=0,013), 90 (p=0,006) y 120 (p=0,008) post-trasplante en todos los grupos de receptores, recuperando los niveles basales al final de periodo de monitorización.

Como se observa en la figura 50, las cifras absolutas de linfocitos T $CD80^+$ en los pacientes del grupo NRA mostraron niveles significativamente superiores que los pacientes del grupo RA entre los días 120 y 270 post-trasplante (p=0,006).

Por otro lado, los linfocitos T $CD86^+$ mostraron cifras porcentuales disminuidas durante los primeros días post-trasplante en todos los grupos de receptores, alcanzándose diferencias significativas durante los días 7 (p=0,009), 21 (p=0,004), 30 (p=0,002) y 60 (p=0,005) post-trasplante.

Las cifras absolutas de linfocitos T $CD86^+$ se mantuvieron disminuidas durante los primeros 90 días post-trasplante en todos los grupos de receptores, disminuciones que llegaron a ser significativas durante los días 7 (p=0,0001), 15 (p=0,002), 21 (p=0,001), 30 (p=0,0001), 60 (p=0,0001) y 90 (p=0,003) post-trasplante. Las cifras absolutas de linfocitos T $CD86^+$ en pacientes del grupo NRA mostraron niveles más altos que en los pacientes del grupo RA durante los días 120 y 270 post-trasplante (p=0,007).

Las cifras absolutas de linfocitos T $CD86^+$ también mostraron valores superiores en los pacientes con InfNo-CMV y con infección CMV, que los pacientes del grupo NoInf, los días 120 y 365 post-trasplante (p=0,026 y p=0,003, respectivamente) (figura 51).

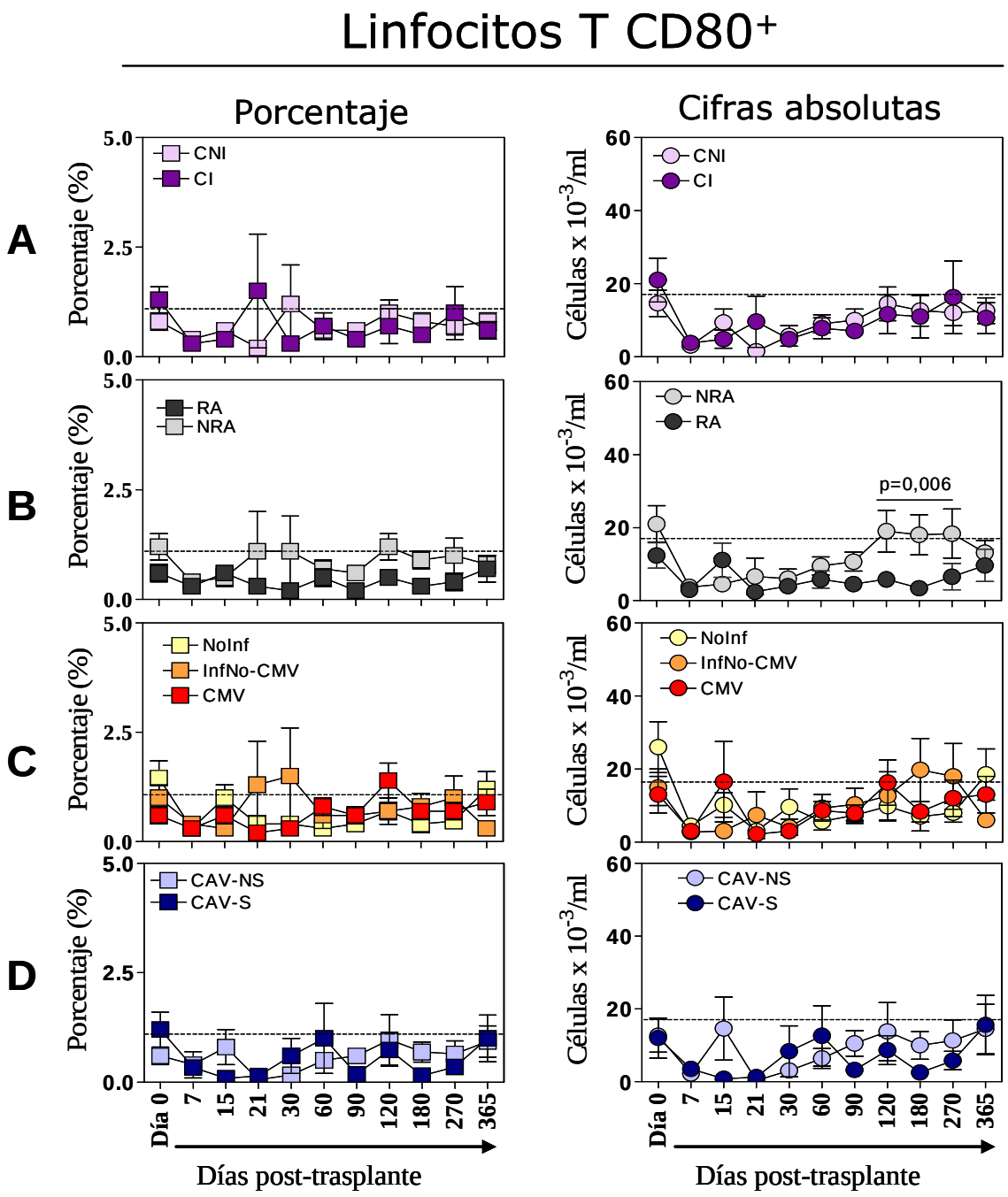

Figura 50. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T CD80⁺ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

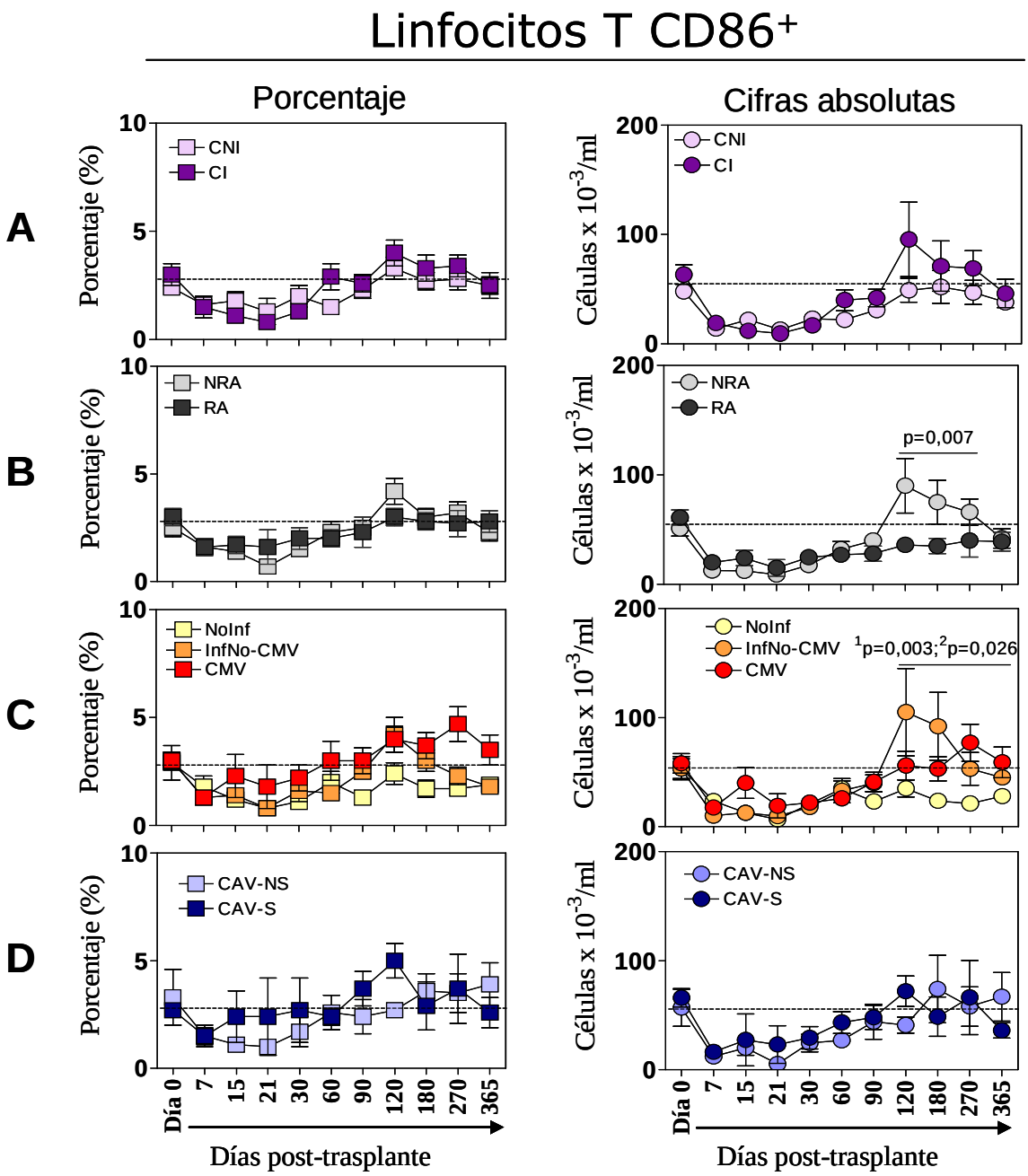

Figura 51. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T CD86⁺ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los diferentes grupos se indican en cada gráfico; [1]CMV vs NoInf; [2] InfNo-CMV vs NoInf. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

La intensidad de expresión de CD80 en linfocitos T disminuyó durante el seguimiento post-trasplante, mostrando diferencias significativas con los valores basales en los días 7 (p=0,001), 15 (p=0,0085) y 30 (p=0,0001) post-trasplante en todos los grupos de estudio. En el pre-trasplante, los pacientes del grupo NRA presentaron niveles significativamente superiores de CD80 que los pacientes con RA (p=0,003), pero estas diferencias no se mantuvieron en el periodo post-trasplante (figura 52).

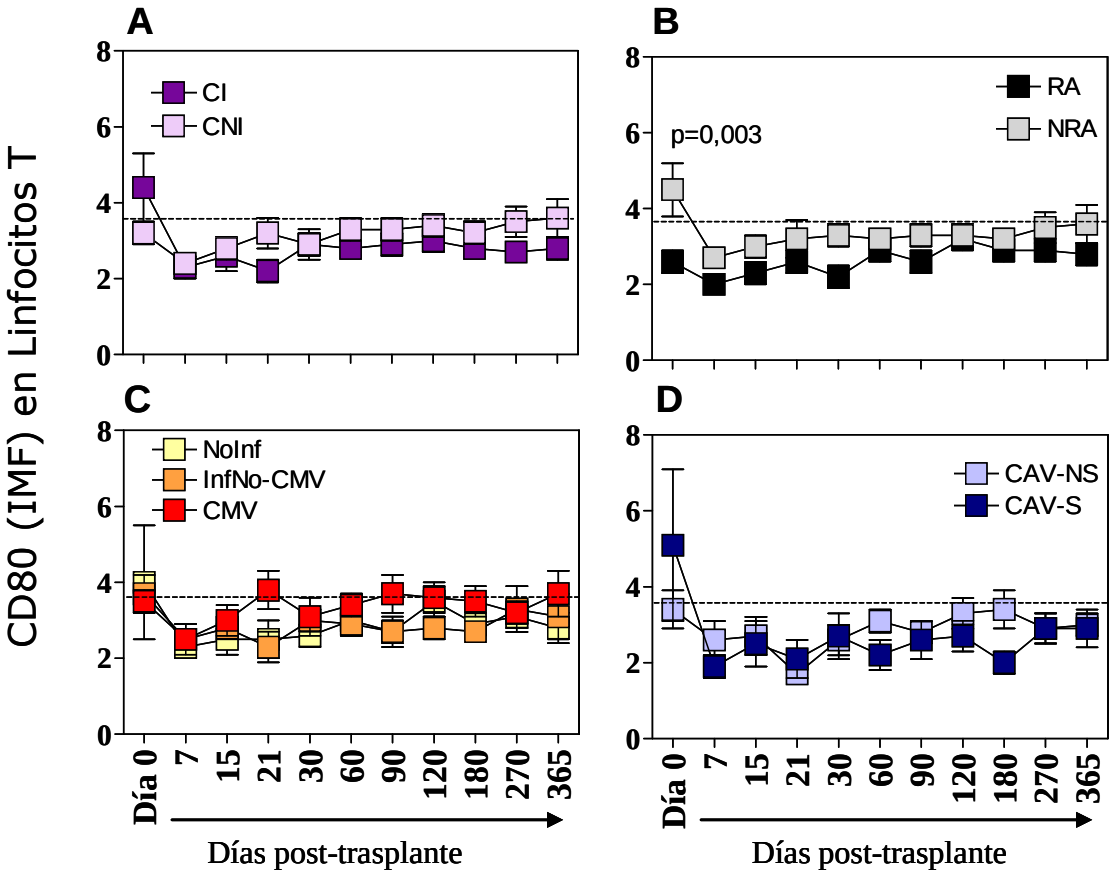

Figura 52. Expresión de CD80 sobre linfocitos T *en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD80 en Linfocitos T de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico. Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

En el periodo post-trasplante, la expresión de la molécula CD86 en linfocitos T disminuyó durante el primer mes post-trasplante observándose diferencias

significativas respecto al valor basal en los días 7 (p=0,006), 15 (p=0,001), 21 (p=0,002) y 30 (p=0,0001) post-trasplante.

Los pacientes con infección de CMV mostraron niveles significativamente superiores de CD86 que los pacientes sin infecciones (p=0,002) y que los pacientes con infecciones diferentes a CMV (p=0,007) entre los días 90 y 365 post-trasplante (figura 53).

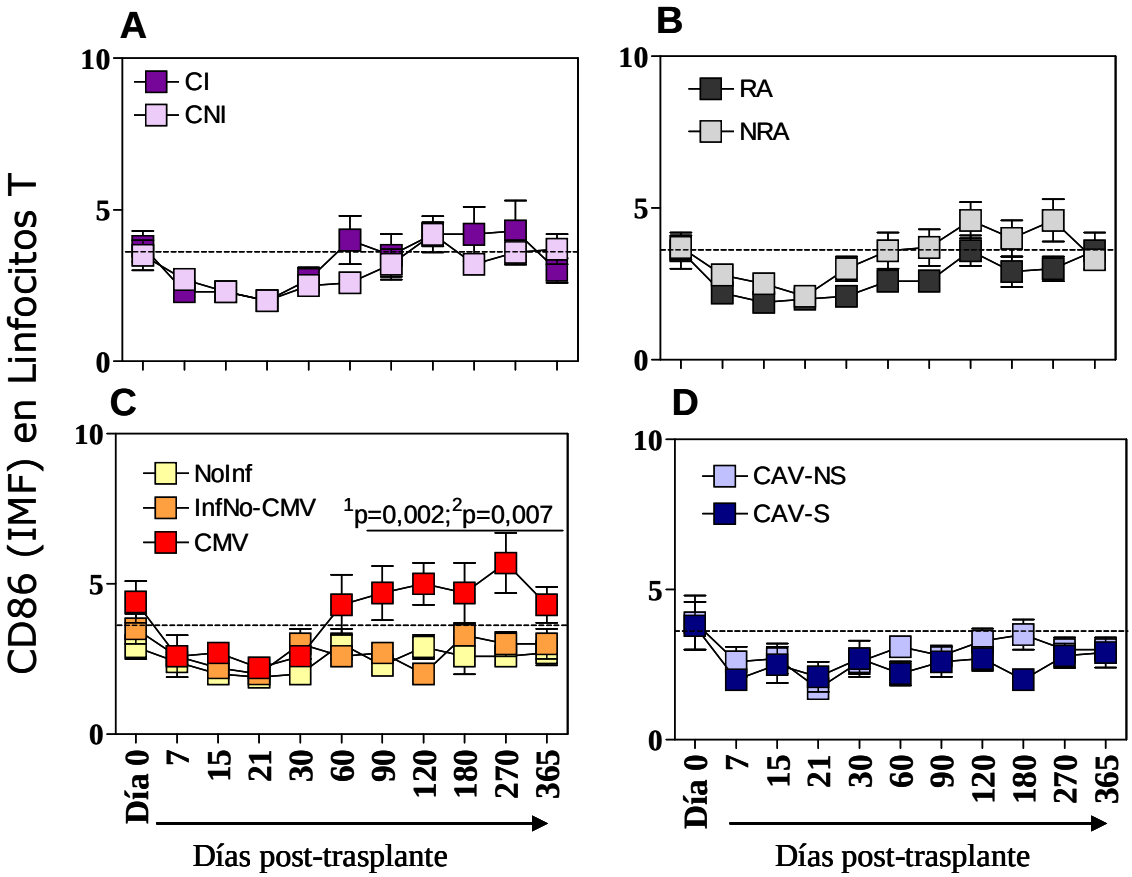

Figura 53. Expresión de CD86 sobre linfocitos T *en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD86 en Linfocitos T de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1) CMV vs NoInf; (2) CMV vs InfNo-CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

3.3.2. Linfocitos T CD4$^+$

En la línea de lo ocurrido con los linfocitos T totales, los linfocitos T CD4$^+$ mostraron cifras porcentuales significativamente disminuidas durante los 7 primeros

días post-trasplante (p=0,0001) en todos los grupos de pacientes, para recuperar sus niveles basales a lo largo del periodo de monitorización.

Las cifras absolutas de linfocitos T $CD4^+$ se mantuvieron disminuidas durante todo el seguimiento post-trasplante, y se encontraron diferencias significativas con los valores basales en los días 7 (p=0,0001), 15 (p=0,003) y 21 (p=0,007) post-trasplante en todos los grupos de receptores. Destacar que las cifras absolutas de linfocitos T $CD4^+$ en los pacientes del grupo de infección CMV fueron significativamente más bajas que en los pacientes del grupo NoInf durante los 30 y 90 días post-trasplante (p=0,018) y que las del grupo InfNo-CMV entre los 60 y 270 días post-trasplante, aunque esto último sin llegar a alcanzar la significación estadística (p=0,064).

3.3.2.1. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD4^+CD28^+$

Los linfocitos T $CD4^+CD28^+$ mostraron valores porcentuales y absolutos muy similares a los obtenidos para los linfocitos T $CD4^+$ tanto en el pre-trasplante como en el post-trasplante (figura 55), ya que la molécula coestimuladora CD28 se expresó en más del 90% del total de linfocitos T $CD4^+$. Los linfocitos T $CD4^+CD28^+$ presentaron cifras porcentuales significativamente disminuidas durante los 7 primeros días post-trasplante (p=0,004) en todos los grupos de receptores, para recuperar sus niveles basales durante el resto de su evolución. Las cifras absolutas de linfocitos T $CD4^+CD28^+$ también disminuyeron significativamente respecto a los valores pre-trasplante en los días 7 (0,0001), 15 (p=0,005) y 21 (0,010) post-trasplante. De igual forma que los linfocitos T $CD4^+$, las cifras absolutas de los linfocitos T $CD4^+CD28^+$ de los pacientes del grupo CMV, fueron significativamente inferiores a las de los pacientes del grupo NoInf entre los días 30 y 90 post-trasplante (p=0,018).

3.3.2.2. Expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$

La intensidad de expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ disminuyó de forma significativa durante los 7 primeros días post-trasplante en todos los grupos de receptores (p= 0,002). Los pacientes del grupo NRA no recuperaron sus niveles basales en toda su evolución post-trasplante, a diferencia de los del grupo RA que recuperaron e incluso sobrepasaron significativamente sus niveles basales entre los 120 y 365 días

post-trasplante, con incrementos respecto a sus valores pre-trasplante que fueron claramente significativos (p=0,001).

Los niveles de expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ de los pacientes del grupo InfNo-CMV fueron significativamente inferiores a los de los pacientes del grupo NoInf entre los días 120 y 270 post-trasplante (p=0,045), e inferiores a los de los pacientes del grupo CMV (sin alcanzar significación estadística).

Además, al igual que ocurría para el valor pretraspalnte, los pacientes del grupo CAV-NS mostraron niveles superiores de CD28 que los pacientes del grupo CAV-S entre los 120 y 365 días post-trasplante, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 56).

3.3.2.3. Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD4^+CD28^-$

Los linfocitos T $CD4^+CD28^-$, mostraron cifras porcentuales y absolutas significativamente disminuidas durante los días 7 (p=0,001 vs p=0,001), 15 (p=0,002 vs p=0,004), 21 (p=0,013 vs p=0,002) y 30 (p=0,028 vs p=0,002) post-trasplante en todos los grupos de pacientes, para recuperar sus niveles basales en el resto del periodo de monitorización.

Como se observa en la figura 57, los pacientes del grupo NRA mostraron niveles superiores de cifras porcentuales (entre los 270 y 365 días) y absolutas (entre los 120 y 365 días) de linfocitos T $CD4^+CD28^-$ que los pacientes del grupo RA, diferencias que no llegaron a alcanzar la significación estadística.

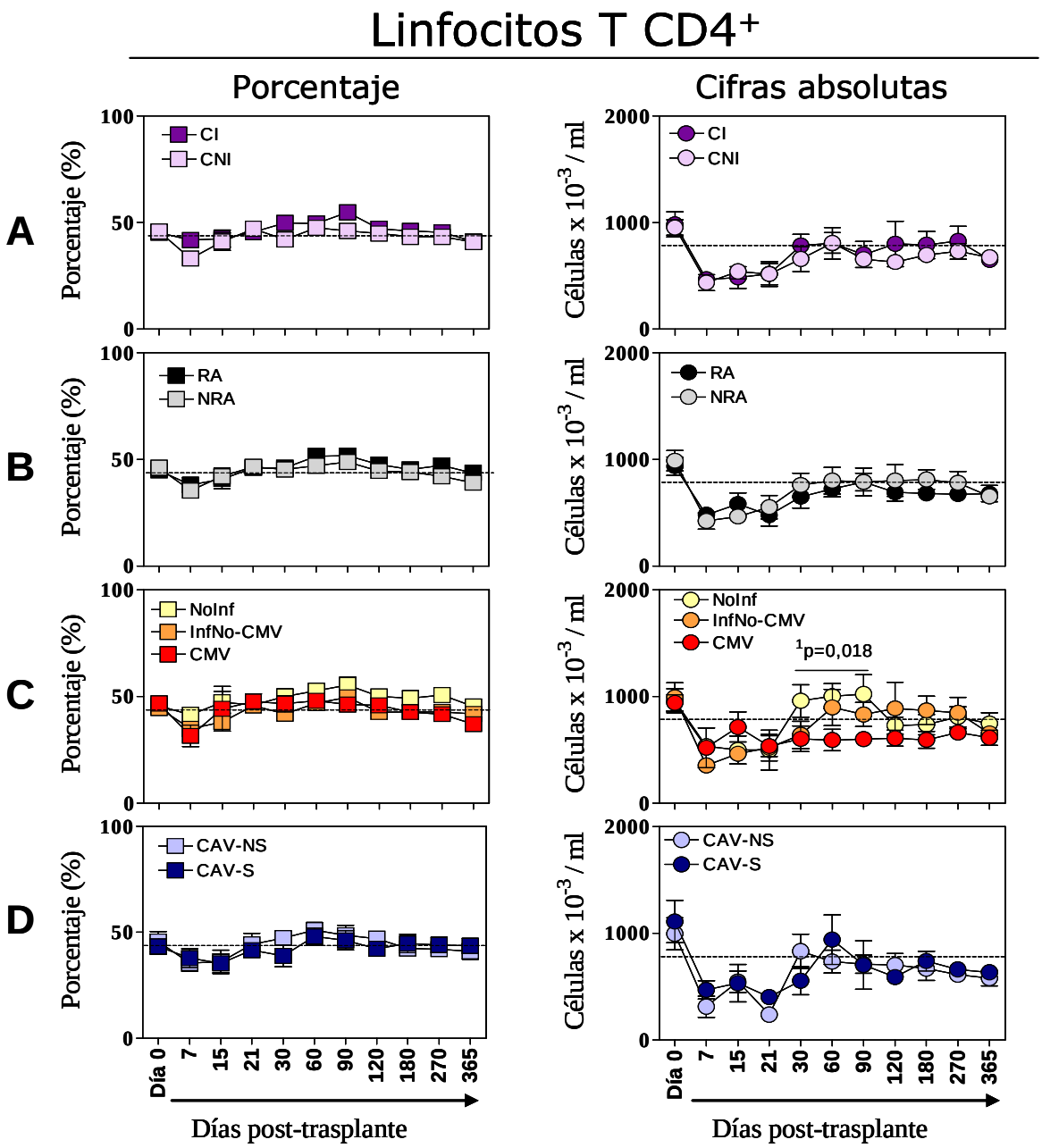

Figura 54. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento postrasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1) NoInf vs CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

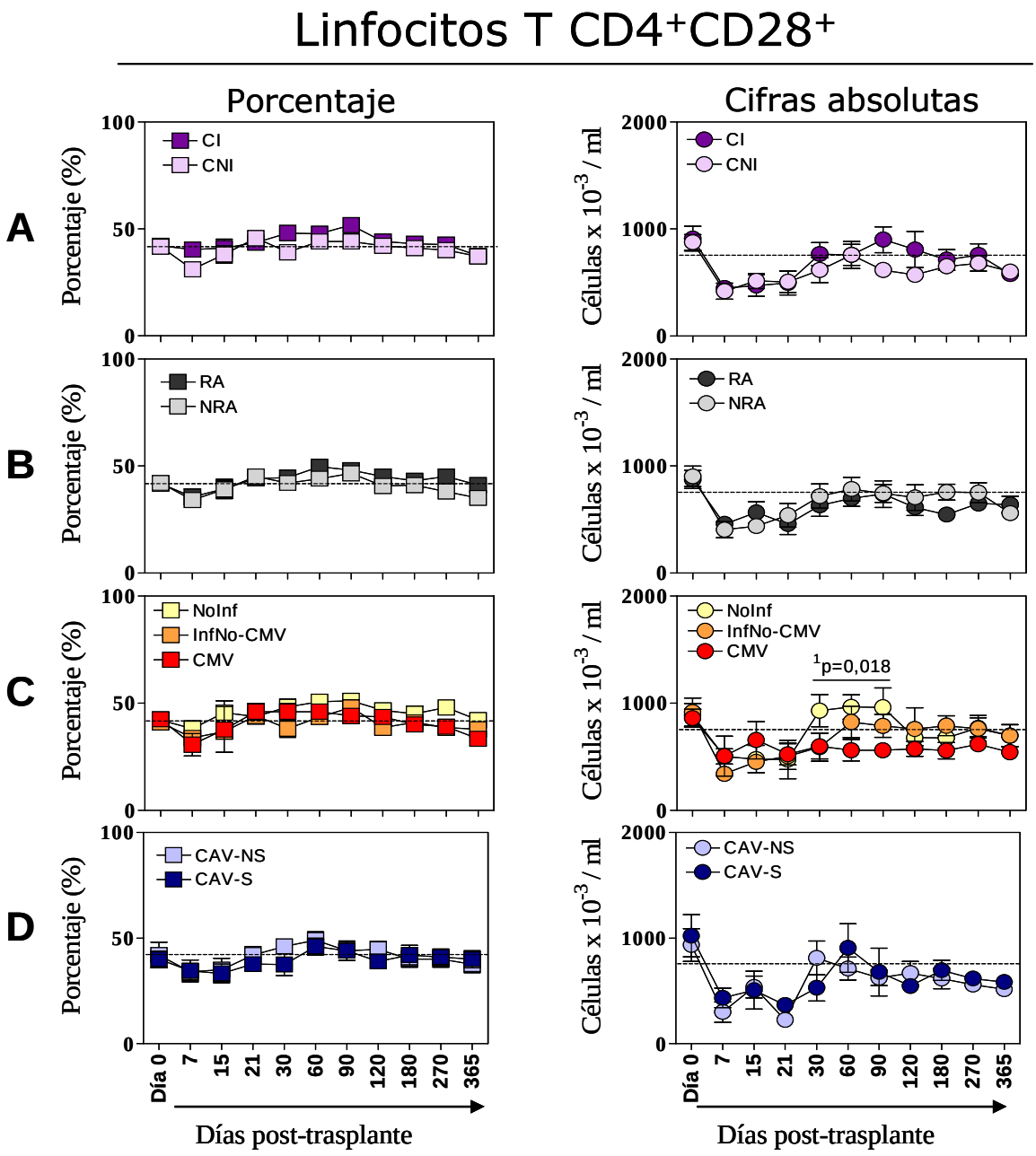

Figura 55. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T CD4$^+$CD28$^+$ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1), NoInf vs CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

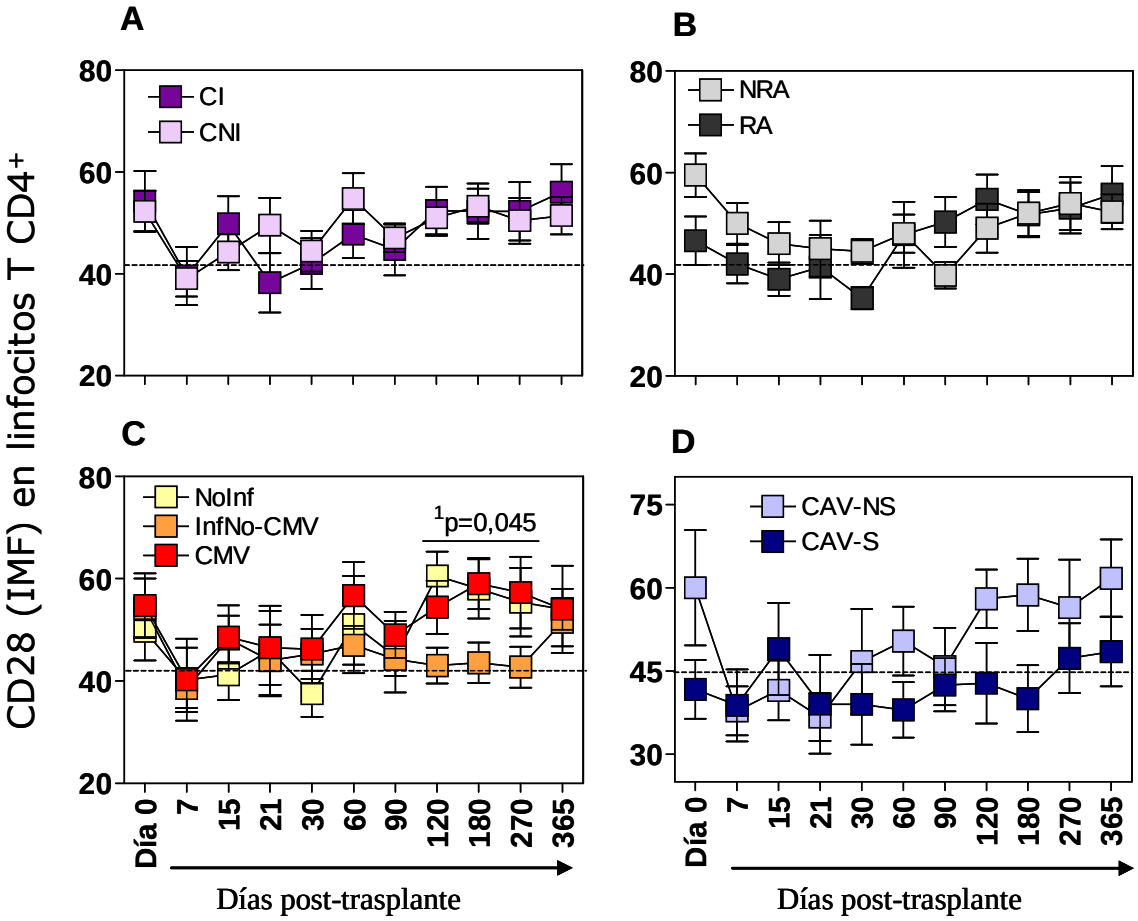

Figura 56. Expresión de CD28 sobre linfocitos T CD4$^+$ *en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD28 en Linfocitos T CD4$^+$ de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1), InfNo-CMV vs NoInf. Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

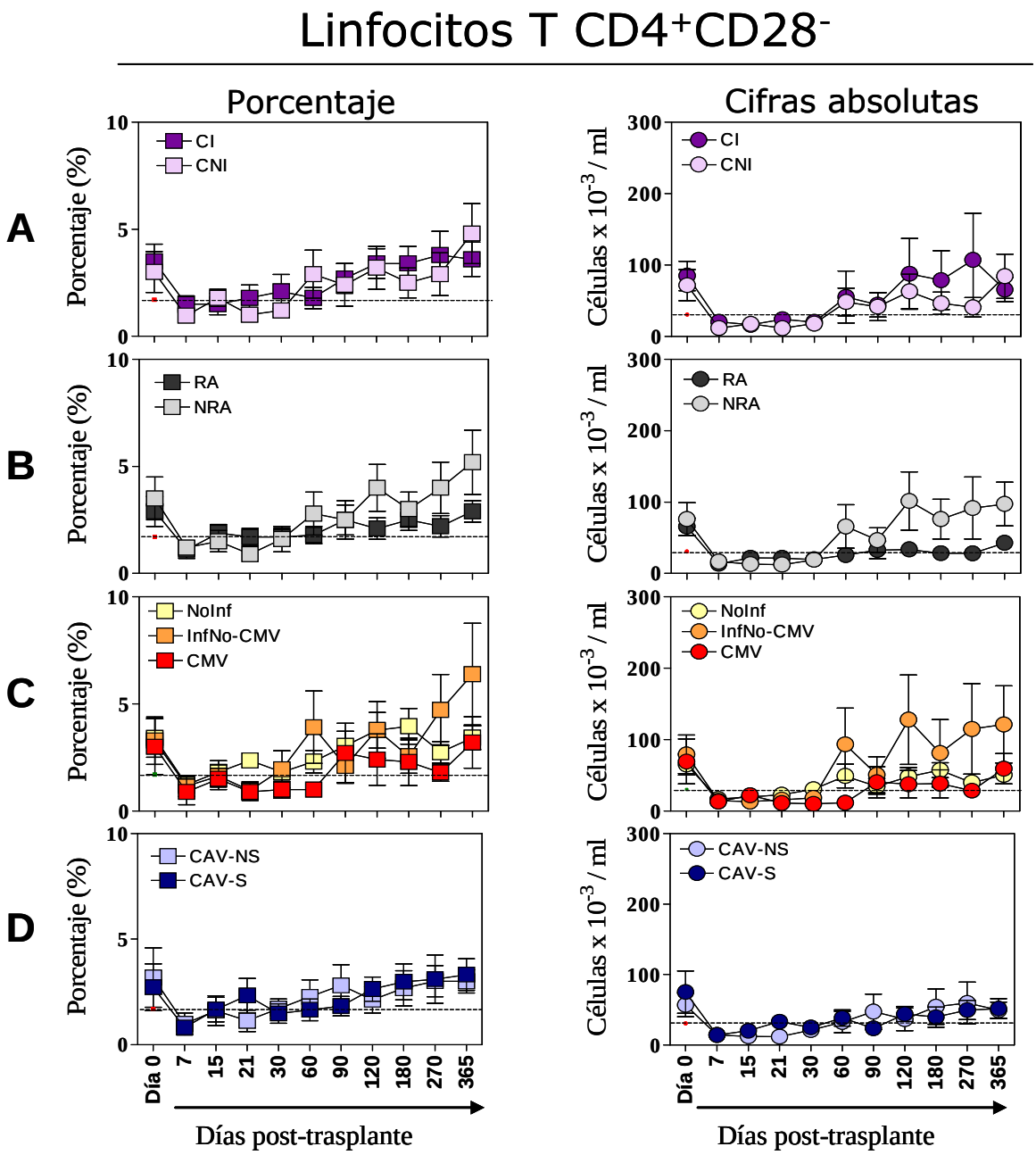

Figura 57. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T CD4$^+$CD28$^-$ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

3.3.3. Linfocitos T $CD8^+$

El porcentaje de linfocitos T $CD8^+$ disminuyó de forma significativa en los días 7 (p=0,043) y 15 (p=0,017) post-trasplante en todos los grupos de estudio, con tendencia a recuperar sus niveles basales a lo largo del resto de la evolución post-trasplante.

Las cifras absolutas de linfocitos T $CD8^+$ se mantuvieron disminuidas durante los primeros días post-trasplante en todos los grupos de receptores, con diferencias significativas respecto al valor pre-trasplante en los días 7 (p=0,010), 15 (p=0,012) y 21 (p=0,018) post-trasplante, recuperando los niveles basales durante el resto de su evolución.

Como se observa en la figura 58, los pacientes del grupo NRA mostraron cifras absolutas de linfocitos T $CD8^+$ significativamente superiores que los pacientes del grupo RA entre los días 120 y 365 post-trasplante (p=0,032). Esta diferencia también se observó en cifras porcentuales, aunque sin alcanzar la significación estadística. Por otro lado, los pacientes del grupo InfNo-CMV mostraron niveles significativamente superiores de linfocitos T $CD8^+$ que los pacientes del grupo NoInf entre los días 30 y 180 post-trasplante, esto se observó tanto en cifras porcentuales (p=0,049) como absolutas (p=0,033). Además en cifras absolutas, los pacientes del grupo InfNo-CMV mostraron valores significativamente superiores que los pacientes del grupo CMV (p=0,011) en el mismo periodo post-trasplante.

3.3.3.1 Valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD8^+CD28^+$

Durante la monitorización post-trasplante no se observaron diferencias con los valores basales del porcentaje y cifras absolutas de linfocitos T $CD8^+CD28^+$.

Al igual que lo observado en linfocitos T $CD8^+$, los pacientes del grupo InfNo-CMV mostraron valores significativamente superiores de células T $CD8^+CD28^+$ que los del grupo CMV (p=0,004), a partir del 21 día post-trasplante (figura 59).

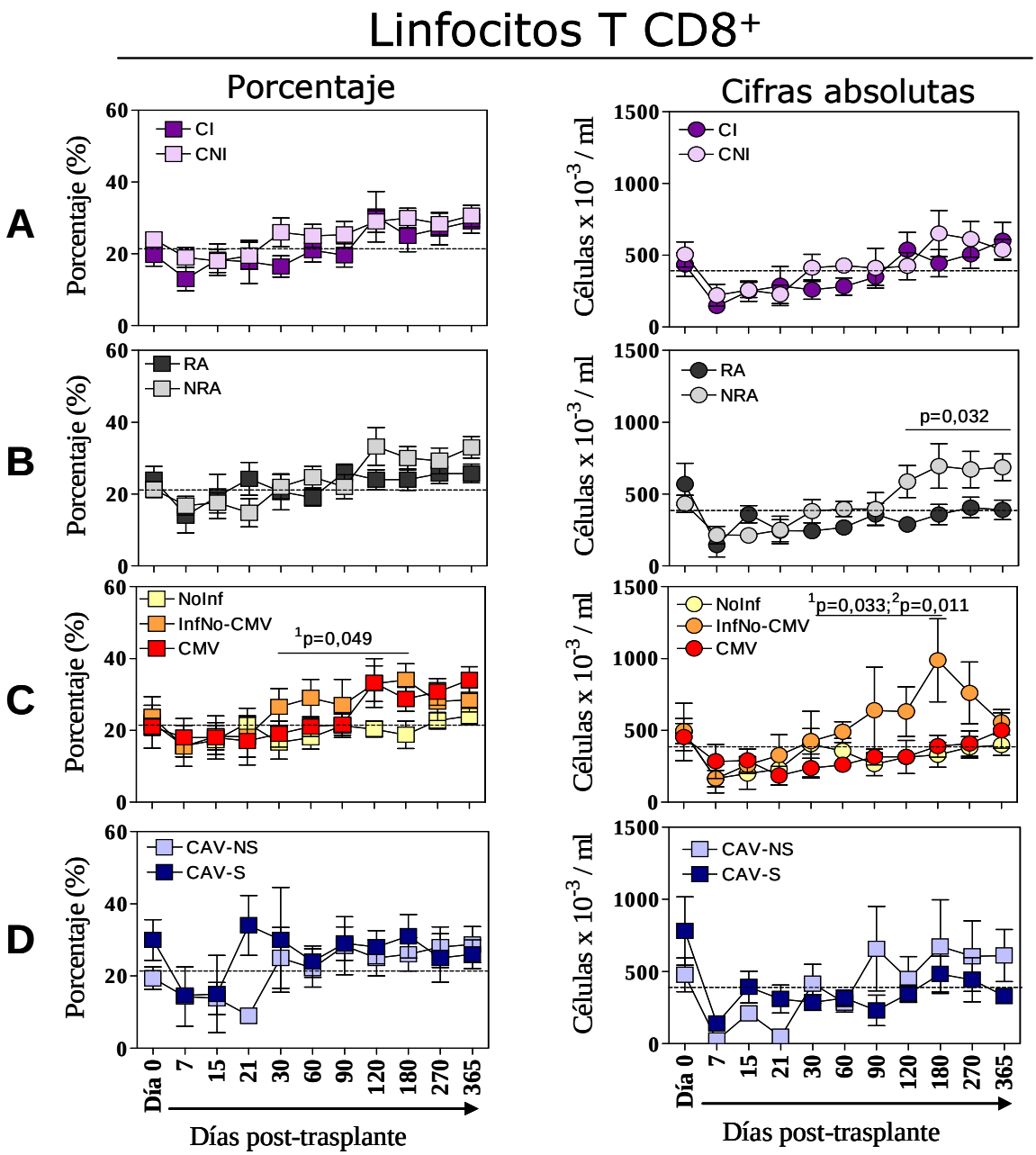

Figura 58. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T CD8$^+$ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1), NoInf vs InfNo-CMV y (2), CMV vs InfNo-CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

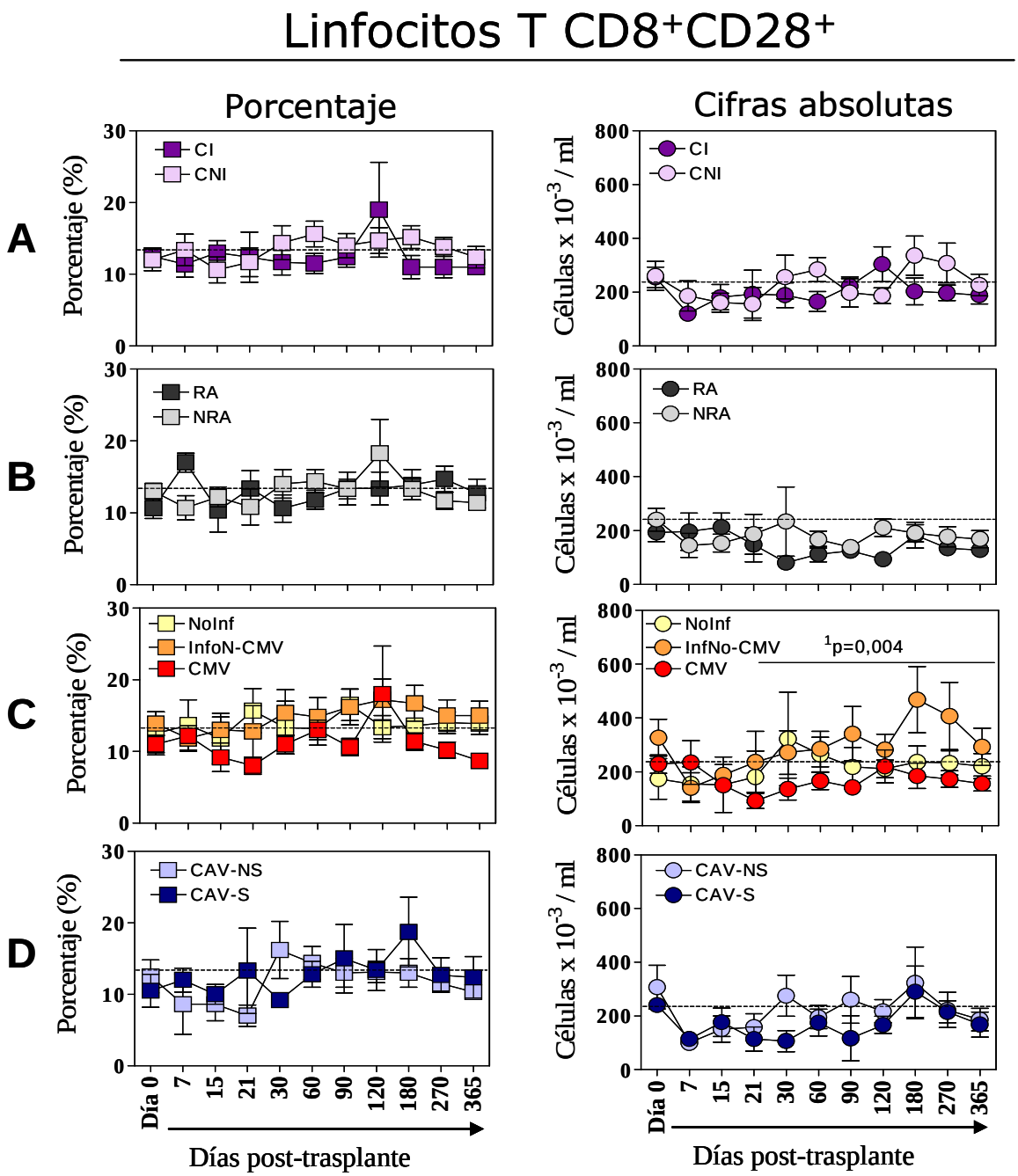

Figura 59. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T CD8⁺CD28⁺ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1), CMV vs InfNo-CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

3.3.3.2. Intensidad de expresión de CD28 en linfocitos T $CD8^+$

La intensidad de expresión de la molécula CD28 (medida como IMF) en linfocitos T $CD8^+$ disminuyó de forma significativa los días 7 (p=0,001) y 15 (p=0,005) post-trasplante en todos los grupos de estudio. De forma similar a lo observado para linfocitos T $CD4^+$, la expresión de CD28 en linfocitos T $CD8^+$ en pacientes del grupo NRA se mantuvo por debajo de sus niveles basales en el periodo post-trasplante, mientras que en los del grupo de RA la IMF de CD28 recuperó e incluso sobrepasó significativamente sus niveles basales entre los 120 y 365 días post-trasplante (p=0,001, al comparar los valores pre- y post-trasplante).

Además, los niveles de expresión de CD28 en linfocitos T $CD8^+$ de los pacientes del grupo InfNo-CMV, fueron significativamente inferiores a los de los pacientes de los grupos NoInf y CMV, entre los días 120 y 270 post-trasplante (p=0,012 y p=0,046, respectivamente) (figura 60).

Por otro lado, los pacientes del grupo CAV-NS también mostraron niveles superiores de CD28 que los pacientes de CAV-S entre los 120 y 365 días post-trasplante, diferencias que no fueron estadísticamente significativas.

3.3.3.3. Linfocitos T $CD8^+CD28^-$

En el periodo post-trasplante temprano, el grupo total de pacientes mostró una disminución significativa en las cifras porcentuales de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ durante los días 7 (p=0,046) y 15 (p=0,007) post-trasplante.

Las cifras absolutas de los linfocitos T $CD8^+CD28^-$ se mantuvieron disminuidas durante los primeros 60 días post-trasplante en todos los grupos de trasplantados, diferencias que llegaron a ser significativas respecto a los valores basales, durante los días 7 (p=0,028), 15 (p=0,009) y 21 (p=0,017) post-trasplante.

Como se puede observar en la figura 61, el grupo NRA presentó cifras medias porcentuales y absolutas de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ significativamente superiores a las del grupo RA, los días 120 y 365 post-trasplante (p=0,037 y p=0,01, respectivamente).

Destacar que el grupo de pacientes sin infecciones (NoInf) mostró cifras medias porcentuales (entre los 30 y 365 días) y absolutas (entre los 90 y 365 días) de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ significativamente inferiores a las del grupo con infección de CMV

(p=0,035), e inferiores a las cifras absolutas del grupo InfNo-CMV entre los 90 y 365 días post-trasplante (p=0,038).

Al comparar los resultados presentados en las figuras 58 (*cifras de linfocitos T CD8$^+$*), 59 (*cifras de linfocitos T CD8$^+$CD28$^+$*) y 61 (*cifras de linfocitos T CD8$^+$CD28$^-$*), se puede observar que las diferencias descritas en los valores porcentuales y absolutos de linfocitos T CD8$^+$ totales al final del periodo post-trasplante, más elevados en el grupo de pacientes NRA que en el grupo RA, fue debido fundamentalmente al aumento de linfocitos T CD8$^+$CD28$^-$, ya que los linfocitos T CD8$^+$CD28$^+$ presentaron valores muy similares en ambos grupos de receptores.

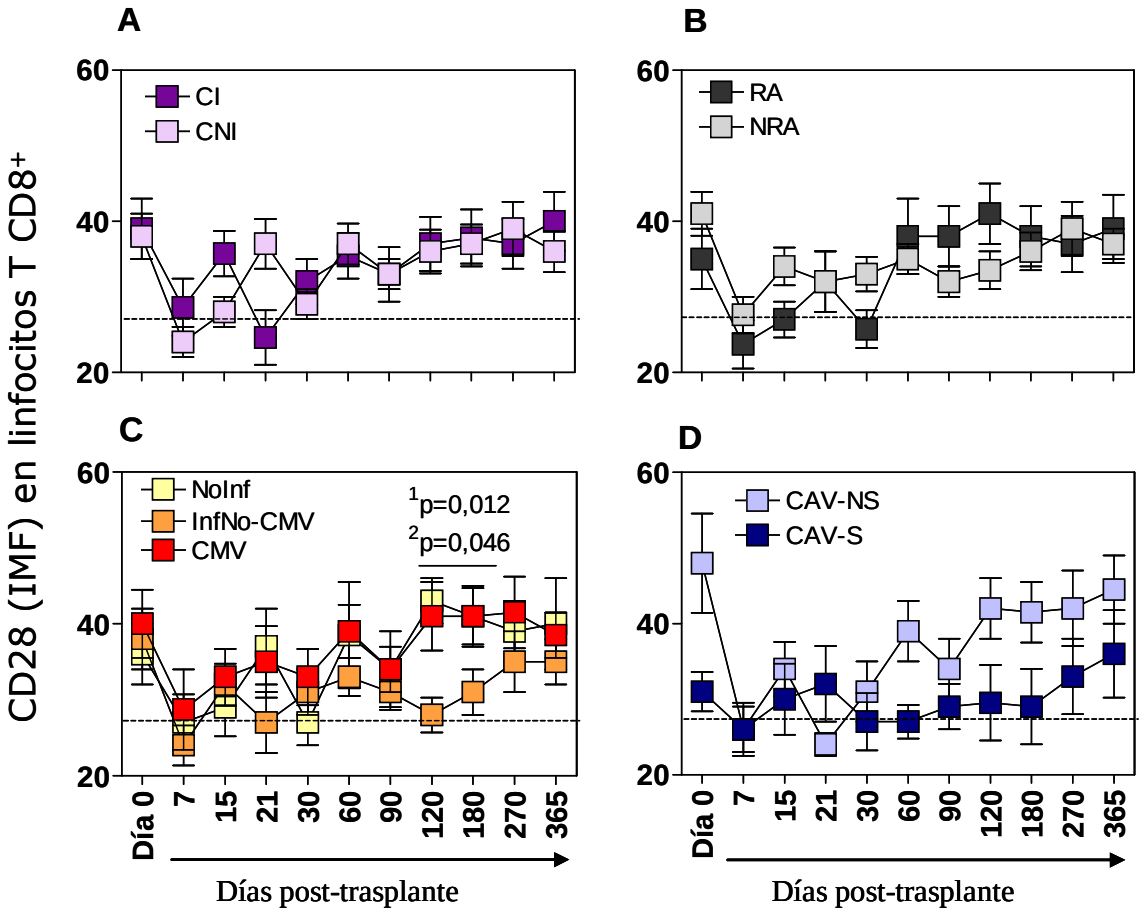

Figura 60. Expresión de CD28 sobre linfocitos T CD8$^+$ *en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante.* **A**, representa la media de la IMF de CD28 en Linfocitos T CD8$^+$ de pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV); y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1),NoInf vs InfNo-CMV; (2), infNo-CMV vs CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores detectados en el grupo control.

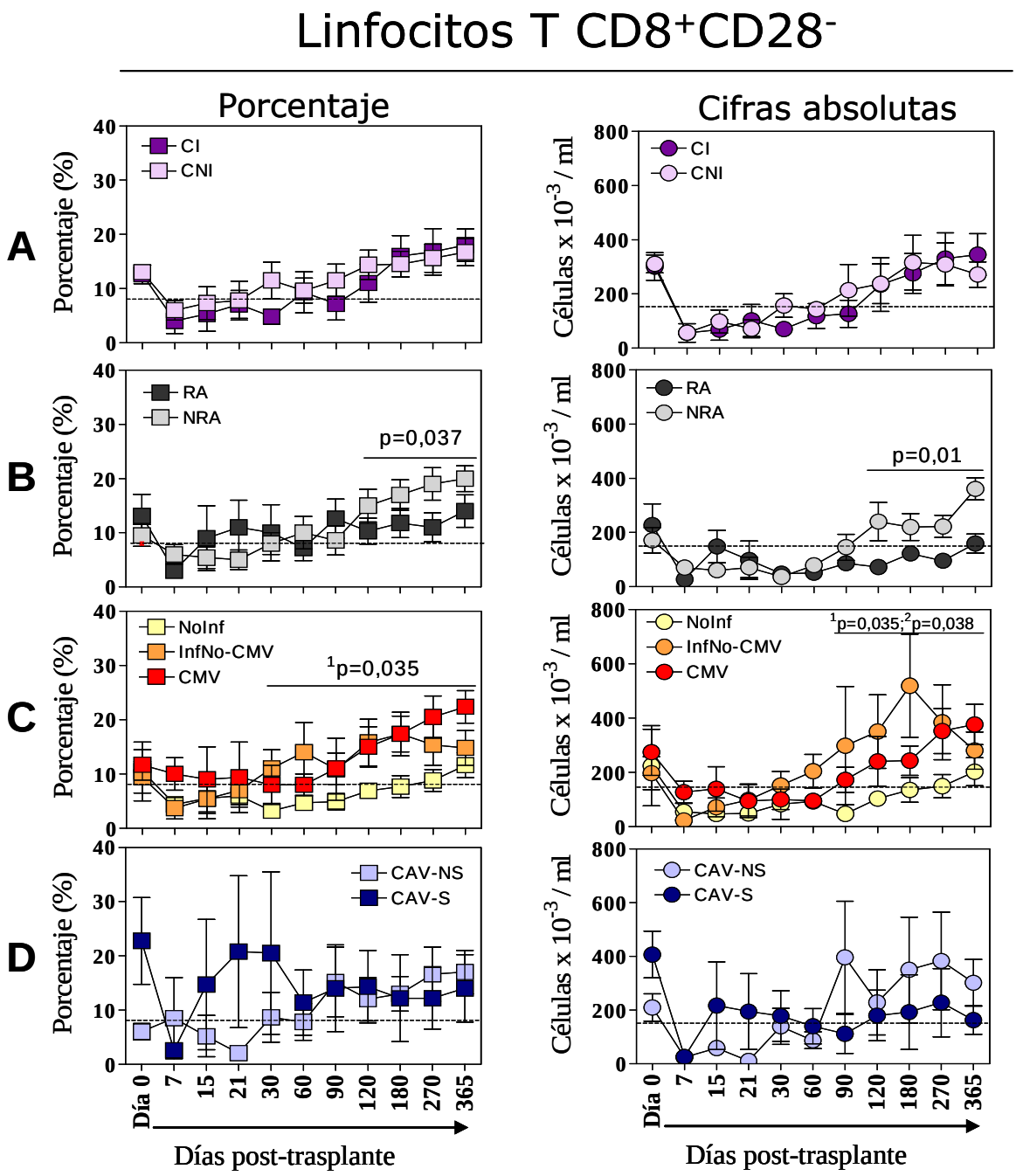

Figura 61. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos T CD8⁺CD28⁻ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control. [1], NoInf vs CMV; [2], NoInf vs infNo-CMV.

3.3.4. Linfocitos T CD8$^+$ que expresan receptores KIR2D

3.3.4.1. Linfocitos T CD8$^+$CD158a/h$^+$

Durante la monitorización post-trasplante, el porcentaje de linfocitos T CD8$^+$CD158a/h$^+$ no mostró diferencias significativas con los valores pretrasplante. Las cifras porcentuales de linfocitos T CD8$^+$CD158a/h$^+$ en pacientes del grupo NRA fueron superiores a las del grupo RA a partir de los 15 días post-trasplante, diferencias que solo fueron estadísticamente significativas entre los 180 y 270 días post-trasplante (p=0,048). También en cifras porcentuales, los pacientes con InfNo-CMV mostraron valores más elevados de linfocitos T CD8$^+$CD158a/h$^+$ (entre los 15 y 60 días) que los pacientes de los grupos CMV y NoInf, diferencias que no llegaron a alcanzar la significación estadística.

En cifras absolutas, los linfocitos T CD8$^+$CD158a/h$^+$ presentaron valores significativamente superiores a los del pre-trasplante en pacientes de los grupos NRA (entre los 90 y 365 días) e InfNo-CMV (entre los 90 y 120 días), p=0,010 y p=0,021, respectivamente. En la evolución post-trasplante, las cifras absolutas de dichas células fueron superiores en pacientes del grupo NRA que en los pacientes del grupo RA durante los días 90 y 365 post-trasplante (p=0,01). Igualmente, los pacientes del grupo InfNo-CMV mostraron valores superiores de linfocitos T CD8$^+$CD158a/h$^+$ que los pacientes de los grupos NoInf y CMV entre los 90 y 180 días post-trasplante (p=0,048 y p=0,012, respectivamente) (figura 62).

3.3.4.2. Linfocitos T CD8$^+$ CD158b/j$^+$

En el periodo post-trasplante el porcentaje de linfocitos T CD8$^+$CD158b/j$^+$ decayó significativamente en todos los grupos de receptores en la muestra de los 7 días (p=0,006), recuperando e incluso sobrepasando sus niveles basales durante el resto del periodo de evolución. A partir del día 7, estas células mostraron una evolución post-trasplante similar a las células T CD8$^+$CC158a/h$^+$. En los pacientes del grupo NRA se produjo un aumento significativo de linfocitos T CD8$^+$CD158b/j$^+$ entre los días 120 y 365 (p=0,05) respecto a los niveles pre-trasplante. De forma similar, en los pacientes del grupo InfNo-CMV las cifras porcentuales de linfocitos T CD8$^+$CD158b/j$^+$ también sobrepasaron los niveles pre-trasplante entre los días 15 y 270, estos aumentos no fueron significativos.

En cifras absolutas, todos los grupos de estudio también mostraron valores disminuidos respecto a sus valores basales a los 7 días del trasplante (p=0,008). Las cifras absolutas de linfocitos T $CD8^{+}CD158b/j^{+}$ sobrepasaron sus niveles basales en receptores de los grupos NRA (entre los 90 y 365 días) e InfNo-CMV (entre los 90 y 180 días) p=0,001 y p=0,0001, respectivamente.

Como se puede observar en la figura 63, el grupo NRA presentó cifras medias porcentuales de linfocitos T $CD8^{+}CD158b/j^{+}$ (entre los días 60 y 365) y absolutas (entre los días 90 y 365) significativamente superiores a las del grupo RA (p=0,008 y p=0,001, respectivamente). Además, los pacientes del grupo InfNo-CMV mostraron cifras porcentuales significativamente superiores de linfocitos T $CD8^{+}CD158b/j^{+}$ que los pacientes del grupo NoInf entre los días 21 y 180 (p=0,05), y cifras absolutas superiores de dichas células que los pacientes de los grupos NoInf y CMV entre los días 90 y 180 (p=0,001). El grupo de pacientes CAV-NS también mostró cifras absolutas superiores de linfocitos T $CD8^{+}CD158b/j^{+}$ que los pacientes del grupo CAV-S a partir de los 180 días, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

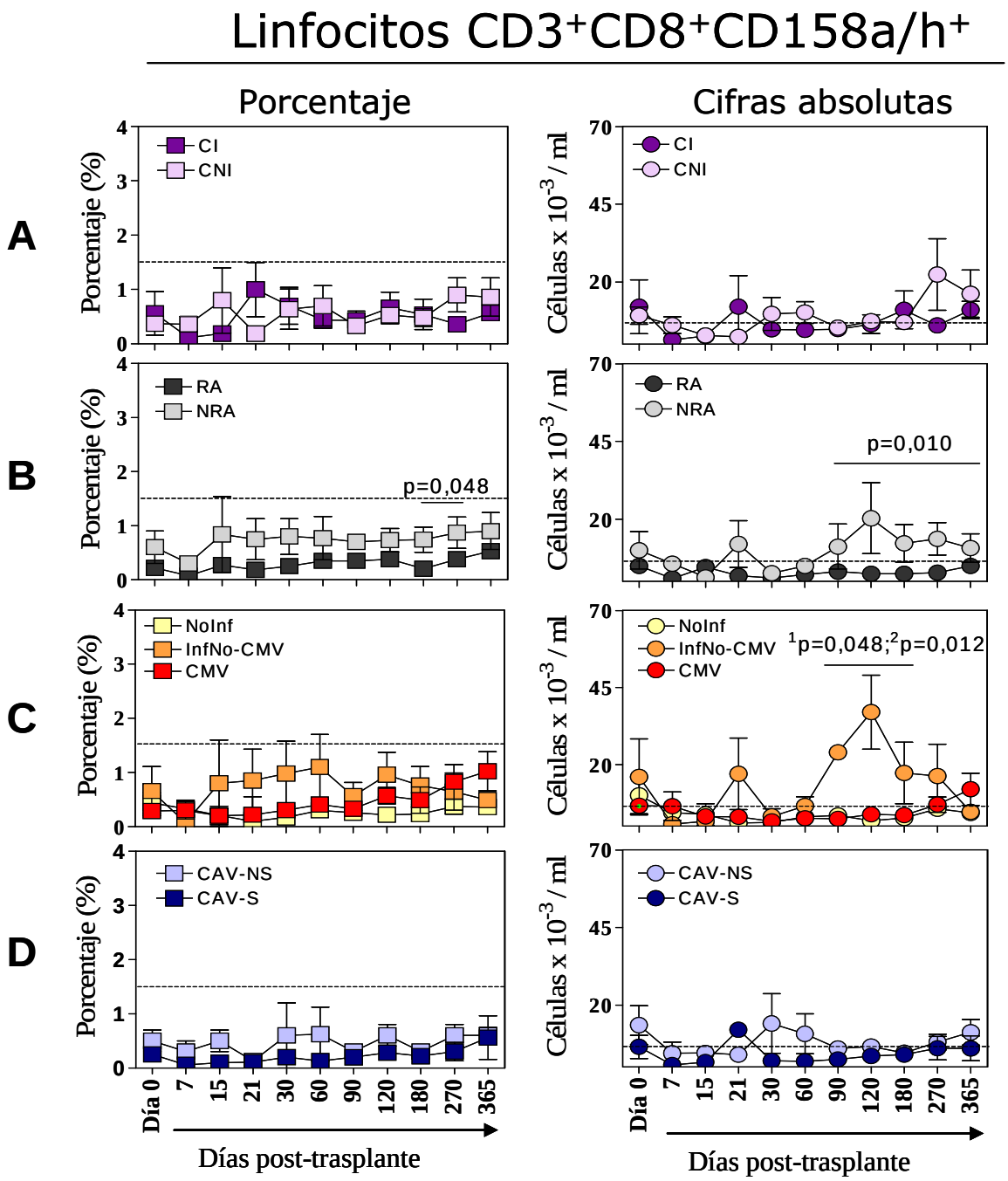

Figura 62. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos CD3$^+$CD8$^+$CD158a/h$^+$ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1), NoInf vs InfNo-CMV y (2), InfNo-CMV vs CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

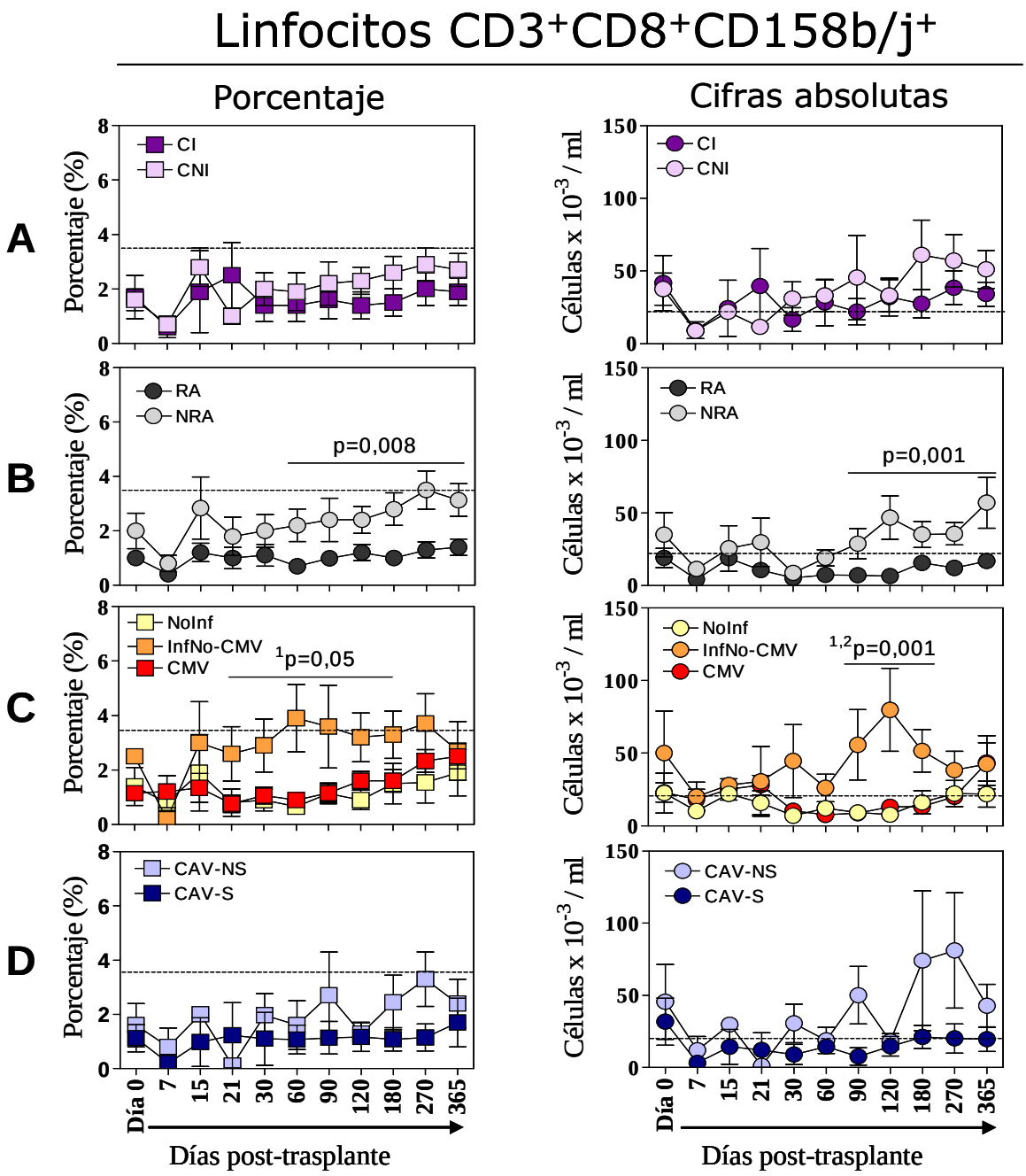

Figura 63. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos CD3⁺CD8⁺CD158b/j⁺ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las diferencias significativas entre los distintos grupos se indican en cada gráfico; (1), InfNo-CMV vs NoInf y (2), InfNo-CMV vs CMV. Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

3.4. Células NK ($CD3^-CD56^+$)

En el pre-trasplante, las cifras porcentuales y absolutas de células $CD3^-CD56^+$ fueron superiores al comparar los pacientes del grupo CAV-S con los del grupo CAV-NS, aunque dichas diferencias no fueron significativas (figura 64).

En la evolución post-trasplante, las células $CD3^-CD56^+$ presentaron cifras porcentuales significativamente disminuidas durante los días 7 (p=0,001) y 15 (p=0,003) en todos los grupos de receptores, para recuperar sus niveles pretrasplante durante el resto del periodo de monitorización. En cifras absolutas, estas células se mantuvieron disminuidas durante los primeros 90 días post-trasplante en todos los grupos de estudio, diferencias que llegaron a ser estadísticamente significativas durante los días 7 (p=0,001), 15 (p=0,032), 21 (p=0,05) y 30 (p=0,017) post-trasplante.

3.4.1. Células NK $CD3^-$ $CD158a/h^+$

Las células NK $CD3^-CD158a/h^+$ no mostraron diferencias en sus valores porcentuales o absolutos en ninguno de los grupos de pacientes analizados tanto en el pre-trasplante como en el post-trasplante (figura 65).

3.4.2. Células NK $CD3^-CD158b/j^+$

En el pre-trasplante, el grupo CAV-S presentó cifras porcentuales (no significativas) y absolutas (p=0.02) de células NK $CD3^-CD158b/j^+$ superiores a las del grupo CAV-NS (figura 66). Por el contrario, en su evolución post-trasplante todos los grupos de estudio mostraron valores porcentuales y absolutos de dichas células similares.

Además, también se estudiaron las subpoblaciones de células NK $CD3^-CD8^+$ que expresaban $CD158a/h^+$ y ó $CD158b/j^+$, no detectándose diferencias significativas en ninguna de las situaciones clínicas analizadas (datos no mostrados).

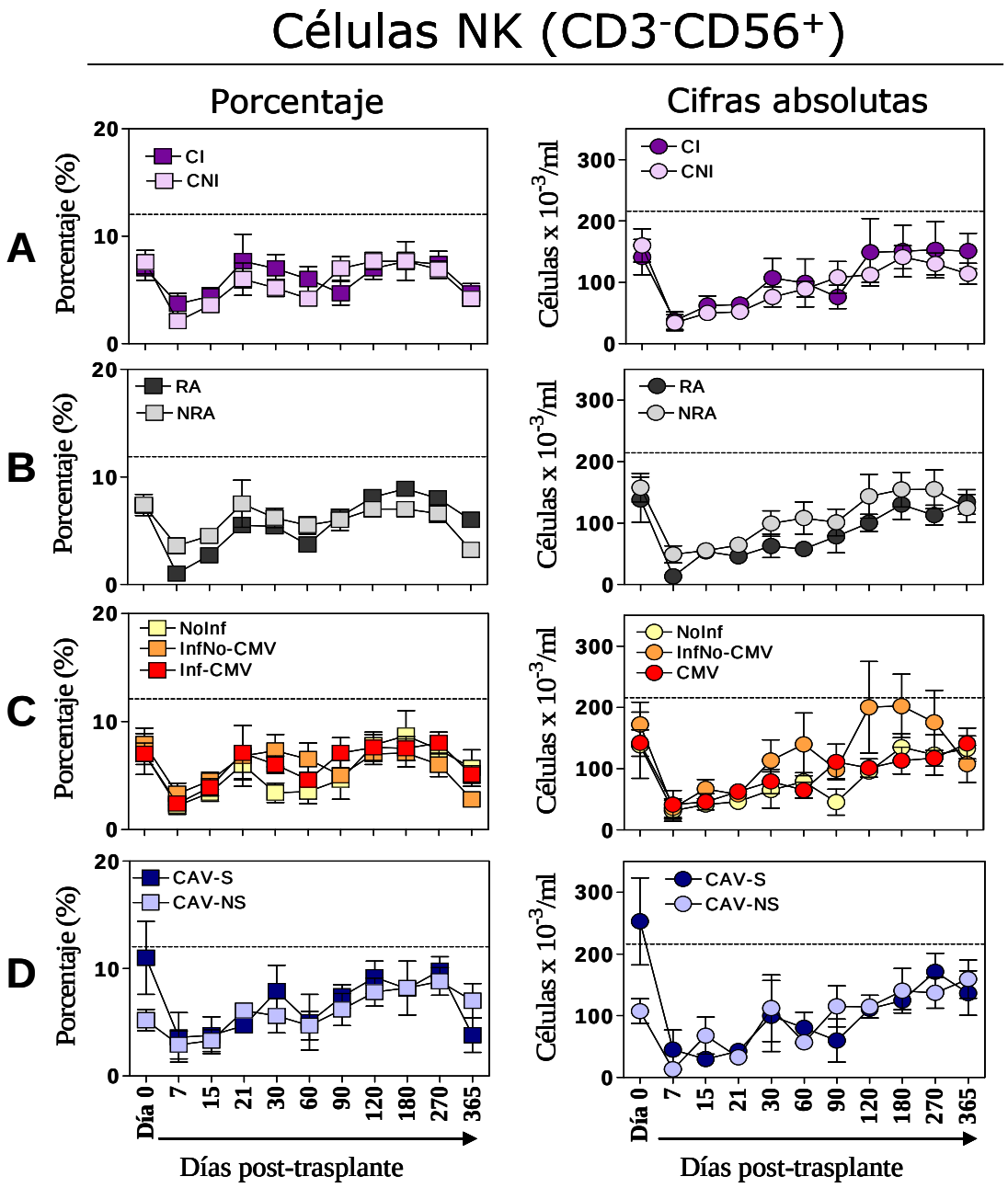

Figura 64. Porcentaje y *cifras absolutas de células NK (CD3$^-$CD56$^+$) en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica; **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

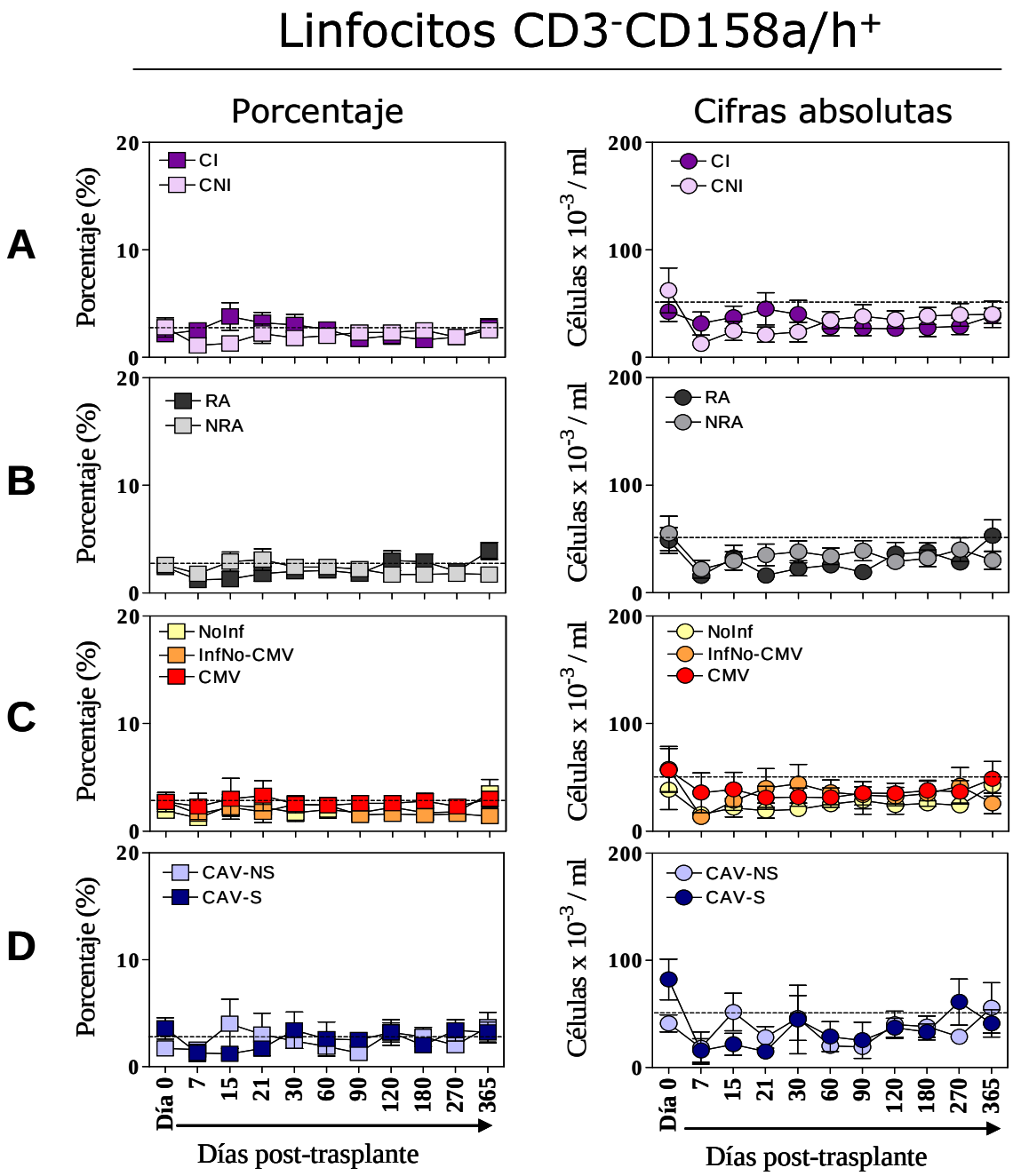

Figura 65. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos CD3$^-$CD158a/h$^+$ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

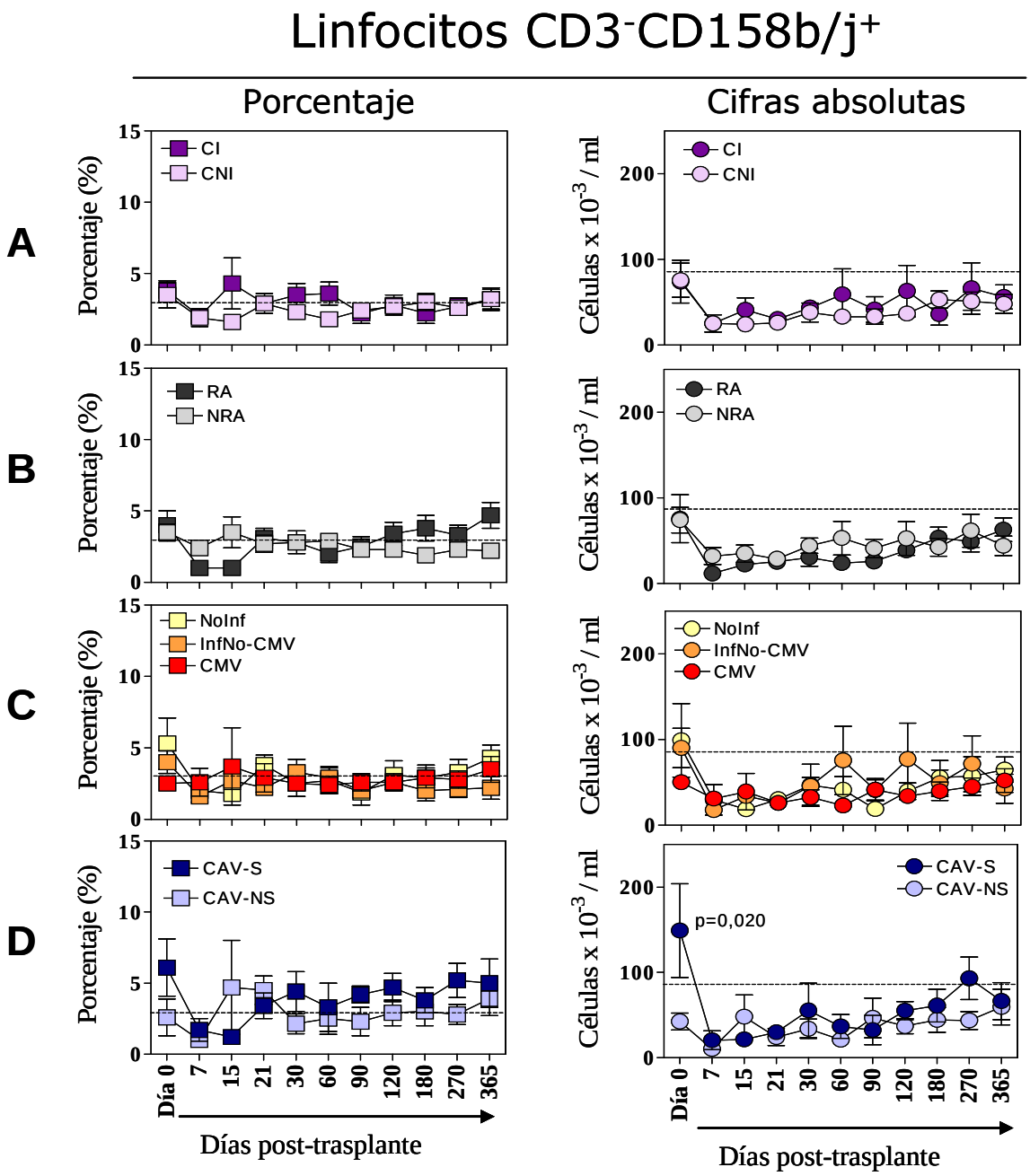

Figura 66. Porcentaje y *cifras absolutas de linfocitos CD3$^-$CD158b/j$^+$ en sangre periférica de pacientes en el día previo al trasplante y durante el periodo de seguimiento post-trasplante*. En la columna de la izquierda se representan los valores porcentuales y en la de la derecha los valores absolutos (células x 10^{-3}/ml) de: **A**, pacientes con cardiopatía isquémica (CI) ó no isquémica (CNI); **B**, sin rechazo agudo (NRA) y con rechazo agudo (RA); **C**, en pacientes sin infecciones (NoInf), con infecciones diferentes a CMV (InfNo-CMV) y con infección de CMV (CMV) y **D**, con CAV no severo (CAV-NS) ó con CAV severo (CAV-S). Las líneas de puntos representan la media de los valores porcentuales y absolutos detectados en el grupo control.

4. CD28 Y RECEPTORES KIR2D COMO SENSORES DEL ESTADO INMUNE EN TRASPLANTE CARDIACO Y HEPÁTICO

La utilidad de la monitorización de la expresión de la molécula CD28 en linfocitos T de sangre periférica para predecir la evolución de injertos hepáticos, ha sido bien establecida por trabajos de nuestro grupo realizados en diferentes series (García-Alonso y cols., 1997; Minguela y cols., 1997; Minguela y cols., 2000; Minguela y cols., 2000). Para confirmar si dicho parámetro puede ser igualmente de utilidad en la monitorización del trasplante cardiaco, se realizó un estudio comparativo de la expresión de CD28 en nuestra serie de trasplante cardiaco y en la serie de trasplante hepático utilizada en la tesis doctoral de la Dra. M. Rocío López Álvarez en 2011.

4.1. Expresión diferencial de CD28 en linfocitos T de sangre periférica en receptores que sufren o no rechazo agudo celular

La distribución de episodios de RA en la evolución post-trasplante difiere apreciablemente en las series de receptores de trasplante de corazón e hígado. Mientras que en trasplante hepático los episodios de RA se concentraron en el primer mes post-trasplante, en trasplante cardiaco fueron más frecuentes entre el tercer y noveno mes post-trasplante (figura 68). Es importante destacar que, durante estos periodos, la expresión de CD28 en linfocitos T, medida como cambio post-trasplante de la IMF de CD28, aumentó en receptores de corazón y de hígado del grupo RA y disminuyó en aquellos que no presentaron RA. Las diferencias significativas entre los receptores de los grupos RA y NRA se observaron cuando la expresión de CD28 se evaluó tanto en linfocito T $CD4^+$ ($p<0,001$ y $p<0,01$, en trasplante cardiaco y hepático, respectivamente) como en linfocitos T $CD8^+$ ($p<0,001$ y $p<0,05$, en trasplante cardiaco y hepático, respectivamente) (figura 68).

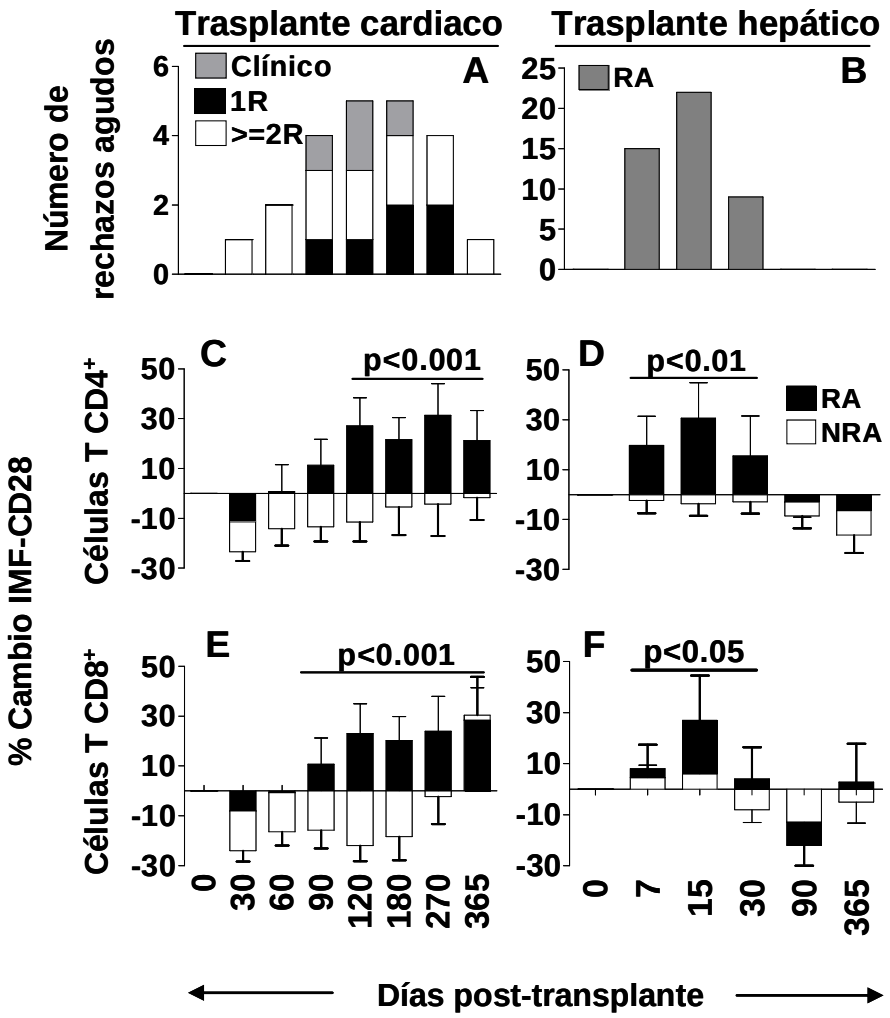

Figura 68. *Distribución de episodios de rechazo agudo celular durante el post-trasplante y expresión de CD28 en linfocitos T CD4$^+$ y CD8$^+$ de sangre periférica, en receptores de trasplante de corazón y de hígado*. Distribución post-trasplante de los episodios de rechazo agudo celular (RA) en (**A**) trasplante cardiaco y (**B**) trasplante hepático. En trasplante cardiaco, se representa el RA-clínico (barras grises), el grado histológico 1R (barras negras) y el grado ≥2R (barras blancas). La media ± SEM (error estándar de la media) de los porcentajes de cambio de la IMF de CD28 en linfocitos T CD4$^+$ y T CD8$^+$ fueron calculados teniendo en cuenta los valores pre-trasplante de la IMF de CD28 como el 0% de variación en cada receptor de los grupos RA y NRA. Las líneas horizontales indican los periodos post-trasplante en los que se detectaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes RA y NRA; los valores de p se indican en cada gráfico.

4.2. La infección por CMV y no otras infecciones bloqueó el aumento de CD28 asociado a los episodios de rechazo agudo

Se analizó la influencia de la infección de CMV y de otras infecciones en el aumento de la expresión de CD28 asociado al RA en linfocitos T CD4$^+$ (figura 69). Los resultados obtenidos demostraron que los receptores de corazón y de hígado que no presentaron infecciones ($p<0,01$ y $p<0,02$, respectivamente en cada tipo de injerto, al

comparar CD28-IMF en pacientes con RA y sin NRA) y aquellos que presentaron infecciones diferentes a CMV, incluyendo las infecciones bacterianas, fúngicas y virales ($p<0,003$ y $p<0,02$, respectivamente, al comparar CD28-IMF en pacientes con RA y sin NRA), mantuvieron los patrones divergentes de expresión de CD28 típicos de pacientes que sufrieron o no RA (figura 69A, 69B, 69D y 69E). Sin embargo, en aquellos pacientes que presentaron infección por CMV, no se pudo detectar el aumento de la expresión de CD28 asociado a la presencia de RA (figura 69C y 69F).

Al igual que otras infecciones y en contraste con CMV, la infección por VHC no modificó el patrón de expresión de CD28 en receptores de hígado con o sin RA. Sin embargo, debido al número reducido de pacientes infectados por VHC que sufrieron RA en nuestra serie (n=6), las diferencias en la expresión de CD28 entre los receptores de los grupos RA y NRA no fueron significativas. No obstante, se pudo comprobar que 4 de los 6 receptores infectados por VHC mostraron un moderado aumento de CD28 asociado al RA; los dos pacientes restantes que no incrementaron la expresión de CD28 asociado al RA, tenían infecciones concomitantes por VIH y CMV (figura 69G y 69H, respectivamente).

Para confirmar estos resultados, la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ fue analizada en periodos anteriores y posteriores al diagnóstico de la infección/reactivación de CMV (figura 70). Interesantemente, la expresión de CD28 permanecía significativamente disminuida durante los días del diagnóstico de la infección por CMV, tanto en trasplante cardiaco ($p<0,01$) como en hepático ($p<0,02$). Cabe destacar que la infección por CMV fue más frecuente en trasplante cardiaco (18 de 50, 36%) que en hepático (11 de 116, 9.5%).

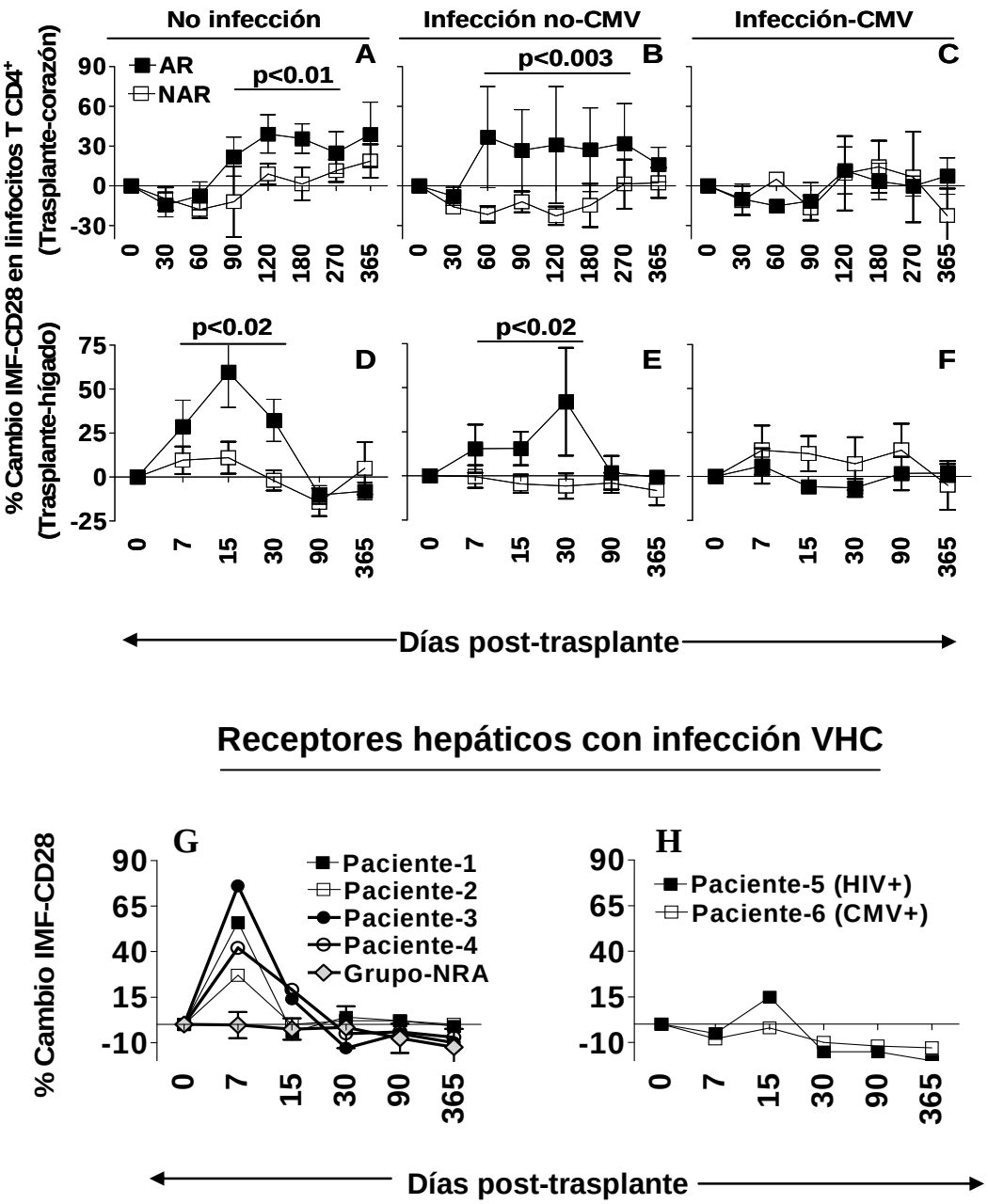

Figura 69. *Impacto de las infecciones en la expresión de CD28 en linfocitos T CD4$^+$ de sangre periférica en trasplante de corazón y de hígado.* La media ± SEM (error Standard de la media) de los porcentajes de cambio post-trasplante de la IMF de CD28 (% cambio IMF-CD28), se calcularon considerando el valor pre-trasplante de la IMF de CD28 en células T CD4$^+$ como 0% de variación en cada receptor del grupo de rechazo agudo celular (RA) (cuadrados negros) y no rechazo agudo (NRA) (cuadrados blancos). **A** y **D**, receptores sin ningún tipo de infección; **B** y **E**, los que sufren infecciones bacterianas, fúngicas o virales distintas a CMV y **C** y **F** los que presentaron infección por CMV. Las líneas horizontales indican los periodos post-trasplante con diferencias significativas entre los grupos de RA y NRA; los valores de p se indican en los gráficos correspondientes a dichos periodos. **G**, porcentaje de cambio post-trasplante de la IMF de CD28 en receptores de hígado infectados por VHC del grupo de NRA (media ± SEM, rombos gris claro, n=21) y de 4 receptores que mostraron aumentos moderados de la IMF de CD28 asociados a la presencia de episodios de RA. **H**, 2 receptores de trasplante hepático con infección de VHC que no presentaron aumentos de la IMF de CD28 asociados a sus episodios de RA y que sufrieron infecciones concomitantes VIH ó CMV.

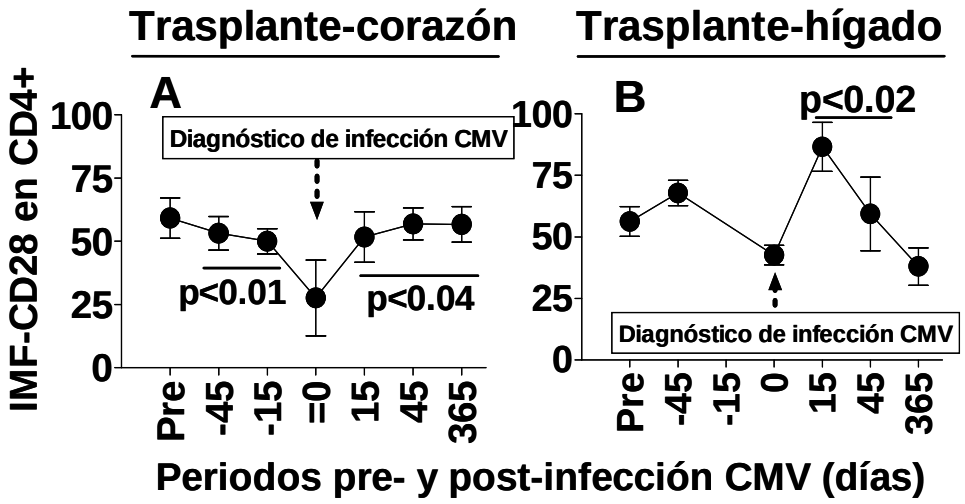

Figura 70. *Expresión de CD28 en linfocitos T CD4$^+$ en los periodos antes y después de la infección por CMV en los receptores de corazón y de hígado*. La media ± SEM de la IMF de CD28 en linfocitos T CD4$^+$ se indica en los periodos previos al diagnóstico de la infección por CMV (días con valores negativos), los días del diagnóstico (=0, flecha) y en los periodos de días tras el diagnóstico de CMV (días con valores positivos). En trasplante cardiaco (**A**), se detectaron diferencias significativas en la expresión de CD28 cuando se compararon los valores de los días del diagnóstico de la infección por CMV con los valores de los días anteriores (días entre -45 y -15) o posteriores (días entre 15 y 365) a la infección. En trasplante hepático (**B**), las diferencias significativas de la IMF de CD28 se detectaron cuando los valores de los días del diagnóstico de la infección por CMV se compararon con los valores de los días posteriores a la infección (días entre 15 y 45). Las líneas horizontales indican los periodos con diferencias significativas respecto a los valores del día del diagnóstico de CMV; los valores de p se indican en los gráficos.

4.3. El aumento de la expresión de CD28 post-trasplante se relaciona directamente con la aparición de episodios de rechazo agudo

Considerando la serie total de receptores, el aumento de CD28 en linfocitos T CD4$^+$ se asoció significativamente con la aparición de RA, tanto en trasplante cardiaco (p=0,008) como en hepático (p=0,0001) (tabla 10). Además, la evaluación post-trasplante de la IMF de CD28 fue un parámetro sensible (78.9% y 87.5%, respectivamente) y específico (61.3% y 60.9%, respectivamente) para predecir el RA tanto en trasplante cardiaco como hepático (tabla 10). En un análisis más detallado, encontramos que la asociación entre el aumento de la expresión de CD28 y el RA se perdió en los receptores infectados por CMV (p=1,0 y p=0,18 en trasplante cardiaco y hepático, respectivamente), pero se mantuvo e incluso mejoró en pacientes que sufrieron infecciones diferentes a CMV, en los que la IMF de CD28 se incrementó en el 100% en receptores cardiacos y hepáticos con RA, y en comparación con el 37.5%

(p=0,087) y 42,8% (p=0,009) en los receptores de corazón y de hígado libres de RA, respectivamente.

En un análisis más detallado teniendo en cuenta el grupo total de receptores, se evaluó la precisión de la medida de la IMF de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ de sangre periférica para predecir el RA, mediante el cálculo del área bajo la curva ROC en trasplante cardiaco (AUC=0.795) y hepático (AUC=0.718) (figura 71A y 71B, respectivamente). A partir de dicha curva, se determinó el valor del porcentaje de cambio de la IMF de CD28 que maximiza la sensibilidad y especificidad en la predicción del RA. El punto de corte óptimo del porcentaje de cambio de la IMF de CD28 en $CD4^+$ se estableció en incrementos superiores al 5% en ambos tipos de trasplante.

A pesar de la buena capacidad predictiva de la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ de sangre periférica, el incremento de CD28 se pudo detectar también en cerca del 40% de los receptores incluidos en el grupo NRA en ambos tipos de trasplante. No es posible encontrar una explicación fácil, pero podría ser indicativo de alo-respuestas subclínicas efectivas o a que el rechazo podría estar teniendo lugar en las regiones distantes del punto de biopsia. En la figura 71C se muestra la IMF de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ de un receptor de trasplante cardiaco que mostró aumentos evidentes de CD28 sin signos claros de RA en las biopsias. El rechazo clínico se diagnosticó en el día 421 y se aplicó tratamiento anti-rechazo, el paciente falleció el día 554 post-trasplante con signos de rechazo crónico en el estudio necrópsico.

Tabla 10. Relación entre RA, infecciones y la modulación post-trasplante de CD28.

	Trasplante de corazón			**Trasplante de hígado**		
Selección de pacientes	**Incremento de CD28[1]**			**Incremento de CD28[1]**		
Grupo total	No	Si	p	No	Si	p
RA (No)	19	12 (38.7%)		56	36 (39.1%)	
RA (Si)	4	15 (78.9%)	0.008	3	21 (87.5%)	0.0001
Infección-CMV[2]						
RA (No)	7	4 (36.4%)		3	6 (66.7%)	
RA (Si)	4	3 (42.8%)	1.0	2	0 (0.0%)	0.18
Infección no-CMV[3]						
RA (No)	10	6 (37.5%)		12	9 (42.8%)	
RA (Si)	0	4 (100%)	0.087	0	8 (100%)	0.009

RA = rechazo agudo; CMV = citomegalovirus humano.
P, comparaciones mediante el test exacto de Fisher.
[1]Se consideró como incremento post-trasplante de la expresión de CD28 cuando los valores de la IMF de CD28 en $CD4^+$ fueron superiores al 5% del valor pre-trasplante, en cualquier momento durante el primer mes del trasplante hepático o durante el año completo de seguimiento en el trasplante cardiaco, periodos en los que la frecuencia de RA fue más alta en cada tipo de trasplante.
[2]Pacientes que sufren infección por CMV tras el trasplante.
[3]Pacientes que sufren infecciones bacterianas, fúngicas y virales diferentes a CMV.

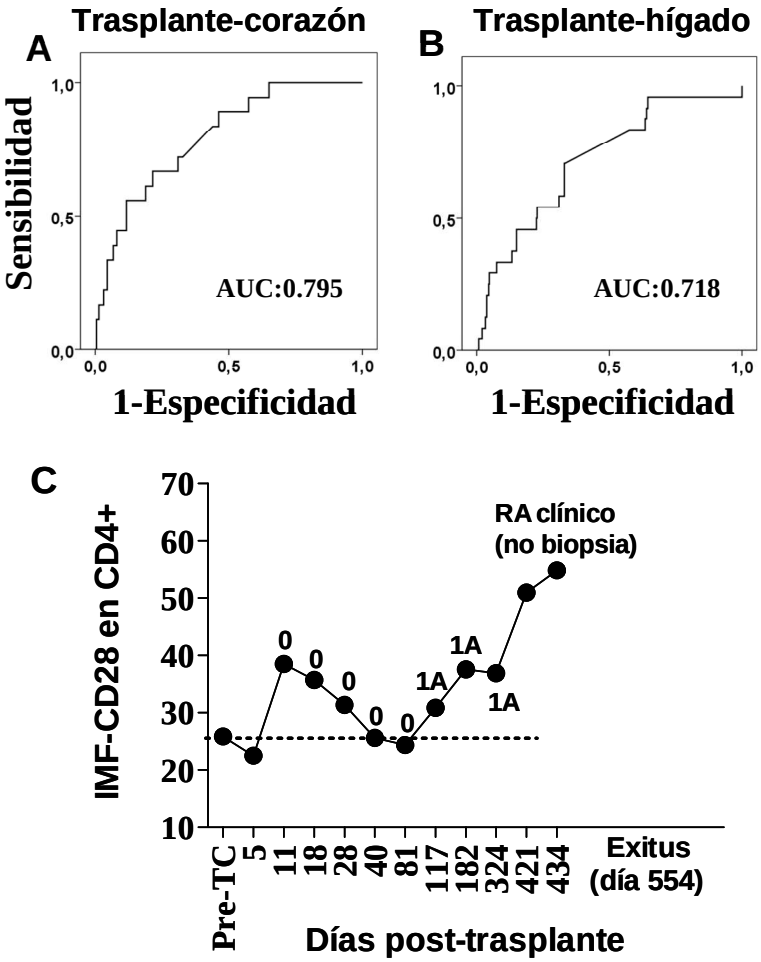

Figura 71. *(A y B), Sensibilidad y especificidad de la medida de la IMF de CD28 en linfocitos T CD4$^+$ de sangre periférica en el diagnóstico de rechazo agudo*. El área bajo la curva ROC (AUC) en (**A**) trasplante cardiaco y (**B**) hepático, se estimó con los valores del porcentaje de cambio post-trasplante de la IMF de CD28 en los días previos al diagnóstico de RA en el grupo de receptores de RA y de todos los valores post-trasplante en el grupo de receptores de NRA. Los resultados o valores de AUC se indican en los gráficos. Los puntos de corte óptimos se establecieron en incrementos superiores al 5% de la IMF de CD28, a partir de las curvas ROC, en ambos tipos de trasplante. (**C**), paciente trasplantado de corazón que muestra aumentos reiterados de la IMF de CD28 en linfocitos T CD4$^+$ sin signos de RA en la biopsia. El rechazo clínico finalmente fue diagnosticado en el día 421 post-trasplante y se aplicó tratamiento anti-rechazo. El paciente falleció a los 554 días post-trasplante con signos de rechazo crónico en la biopsia.

4.4. La expansión de linfocitos T CD8$^+$CD28$^-$ y CD8$^+$CD28$^-$KIR2D$^+$ asociada a una mejor aceptación del trasplante, no se observó en receptores infectados por CMV

En ambos tipos de trasplante, el número de células T CD4$^+$ disminuyó después del trasplante y cualquier recuperación de estas células fue completamente anulada en receptores infectados por CMV, dando lugar a una disminución significativa de dichos valores post-trasplante en receptores cardiacos (p=0.001) y hepáticos (p=0.05)

infectados por CMV (figura 72, A1-A6). Por lo que respecta a las células T $CD8^+CD28^+$, no se detectaron variaciones significativas post-trasplante en ningún caso. No se observaron diferencias en el número de células $CD4^+$ o $CD8^+CD28^+$ cuando se compararon los receptores de los grupos RA y NRA, ya sea en trasplante cardiaco y hepático (figura 72, B1-B6).

En contraste, el número de células T $CD8^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-KIR2D^+$ ($CD158a/h^+$ o $CD158b/j^+$) mostraron una diferente evolución post-trasplante en los grupos RA y NRA en ambos tipos de receptores (Figura 72, C1-E1, C2-E2, C4-E4 y –C5-E5). Estos tipos de células T $CD8^+$ mantuvieron los niveles pre-trasplante en receptores con RA, pero se expandieron de manera significativa después del trasplante en receptores del grupo NRA, tanto en trasplante cardiaco como hepático. Se observaron diferencias significativas tanto al comparar los datos del pre-trasplante con la evolución post-trasplante a partir de los 3 meses en adelante ($p<0,01$), como al comparar los valores post-trasplante entre receptores de RA y NRA ($p<0,01$). Aparentemente la infección por CMV pero no por VHC u otras infecciones, bloqueó la expansión post-trasplante de las células T $CD8^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-KIR2D^+$ en receptores de corazón y de hígado libres de RA (Figura 72, C3-E3 y C6-E6).

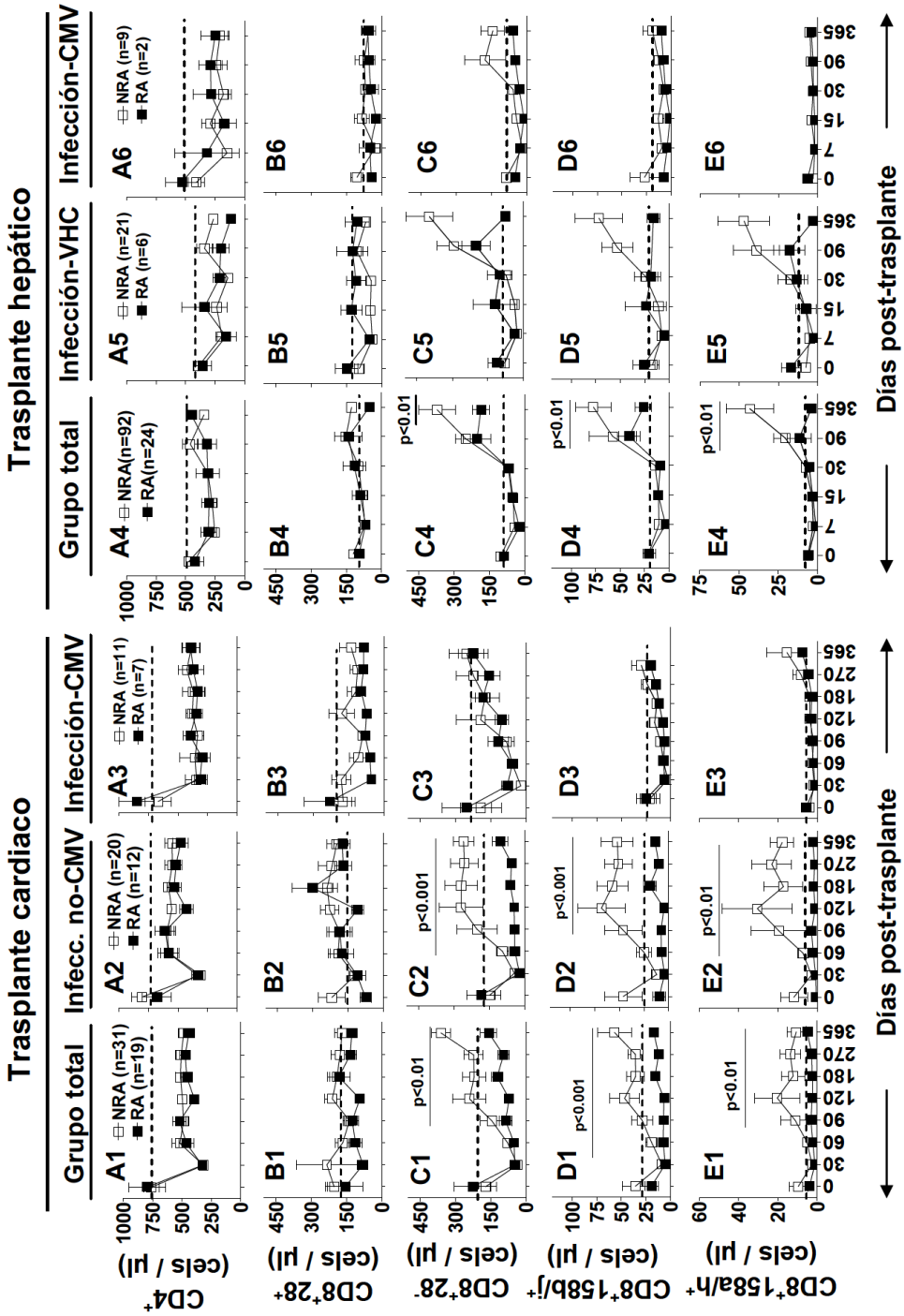

Figura 72. *Número absoluto de subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica en receptores de injertos cardiacos y hepáticos.* (**A1-A6**), media ± SEM del número de células (cels/µl) T $CD4^+$; (**B1-B6**), $CD8^+CD28^+$; (**C1-C6**), $CD8^+CD28^-$; (**D1-D6)**, $CD8^+CD28^-CD158b/j^+$ y (**E1-E6**), $CD8^+CD28^-CD158a/h^+$**,** de sangre periférica de los receptores del grupo RA (cuadrados negros) y NRA (cuadrados blancos). (**A1-E1**), grupo total de receptores de corazón; (**A2-E2**), receptores de corazón que sufren infecciones distintas de CMV y (**A3-E3**), receptores cardiacos que sufren infección por CMV. (**A4-E4**), grupo total de receptores de hígado; (**A5-E5**), receptores hepáticos que sufren infección por VHC; (**A6-E6**), receptores hepáticos que presentan infección por CMV. Las líneas discontinuas representan el valor promedio de los valores pretrasplante de cada subpoblación de células T de los receptores del grupo RA y NRA. Las líneas horizontales continuas indican los periodos post-trasplante que muestran diferencias significativas entre los grupos de RA y NRA; los valores de p se indican en cada gráfico. También se indica el número de receptores incluidos en cada grupo.

5. NIVELES SÉRICOS DE HLA-G EN TRASPLANTE CARDIACO Y SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN POR CMV Y EL DESARROLLO DE CAV

5.1. Incremento post-trasplante de HLA-G soluble detectado específicamente en receptores con CAV no severo

La concentración de HLA-G soluble (sHLA-G) en el pre-trasplante no mostró diferencias entre los receptores de corazón que sufrieron o no CAV severo o reactivación por CMV (figura 73A). Como se puede observar en la figura, los niveles pre-trasplante de sHLA-G presentaban variaciones muy marcadas entre los diferentes pacientes, lo que hizo necesario transformar los datos de cada paciente en porcentajes de cambio respecto a sus valores pre-trasplante a fin de comparar los cambios de sHLA-G post-trasplante entre los diferentes grupos de estudio.

Los pacientes del grupo CAV-NS mostraron un incremento significativo de sHLA-G entre los 6 y 12 meses post-trasplante ($p=0.014$) respecto a sus niveles pre-trasplante, mientras que se observó una disminución de sHLA-G en los pacientes que sufrieron CAV-S (figura 73B). Se detectaron diferencias significativas de los porcentajes de cambio de sHLA-G en el post-trasplante entre los receptores que sufrieron CAV-S y CAV-NS entre los 6 y 12 meses post-trasplante ($p=0.003$). De la misma manera, la concentración de sHLA-G aumentó significativamente entre los 6 y 12 meses después del trasplante en los pacientes que sufrieron reactivación por CMV respecto a sus niveles pretrasplante, mientras que no se observaron aumentos en los receptores libres de reactivación por CMV (figura 73 B).

Con el objetivo de evaluar la precisión para predecir el desarrollo de CAV-severo que tenía el incremento o no de los niveles post-trasplante de sHLA-G, se realizó un análisis ROC utilizando los valores medios del porcentaje de cambio de sHLA-G observado a los 6 y 12 meses post-trasplante, en el que se encontró un área bajo la curva de 0.821 (95% CI 0.552-1.05, $p =0.033$) (figura 73C). A partir de dicha curva, se determinó el valor del incremento porcentual de sHLA-G que maximiza la sensibilidad y la especificidad en la predicción de CAV-S. Encontrándose un valor óptimo en un incremento mayor o igual a 0.062% de sHLA-G, con una sensibilidad asociada del 80% y una especificidad del 100%. Además, es importante destacar que el incremento post-trasplante de sHLA-G se asoció por un lado, inversamente con CAV-S (OR, 0.33; 95%CI,

0.1-0.7; p<0.01), de manera que sHLA-G aumentó en el 0% y el 67% de los receptores que sufrieron o no de CAV severo, respectivamente, y por otro, directamente a la reactivación de CMV (OR, 10; 95%CI, 1.0-97; p<0.03), ya que sHLA-G aumentó en un 67% y 17% de los receptores que mostraron o no reactivación de CMV, respectivamente. Sin embargo, no se encontró una relación significativa entre CAV-S e infección por CMV, infecciones diferentes a CMV o el rechazo agudo celular (tabla 11). Igualmente destacar que no se observaron diferencias de las concentraciones de sHLA-G en el pre- o el post-trasplante entre los receptores que sufrieron o no rechazo celular agudo (datos no mostrados).

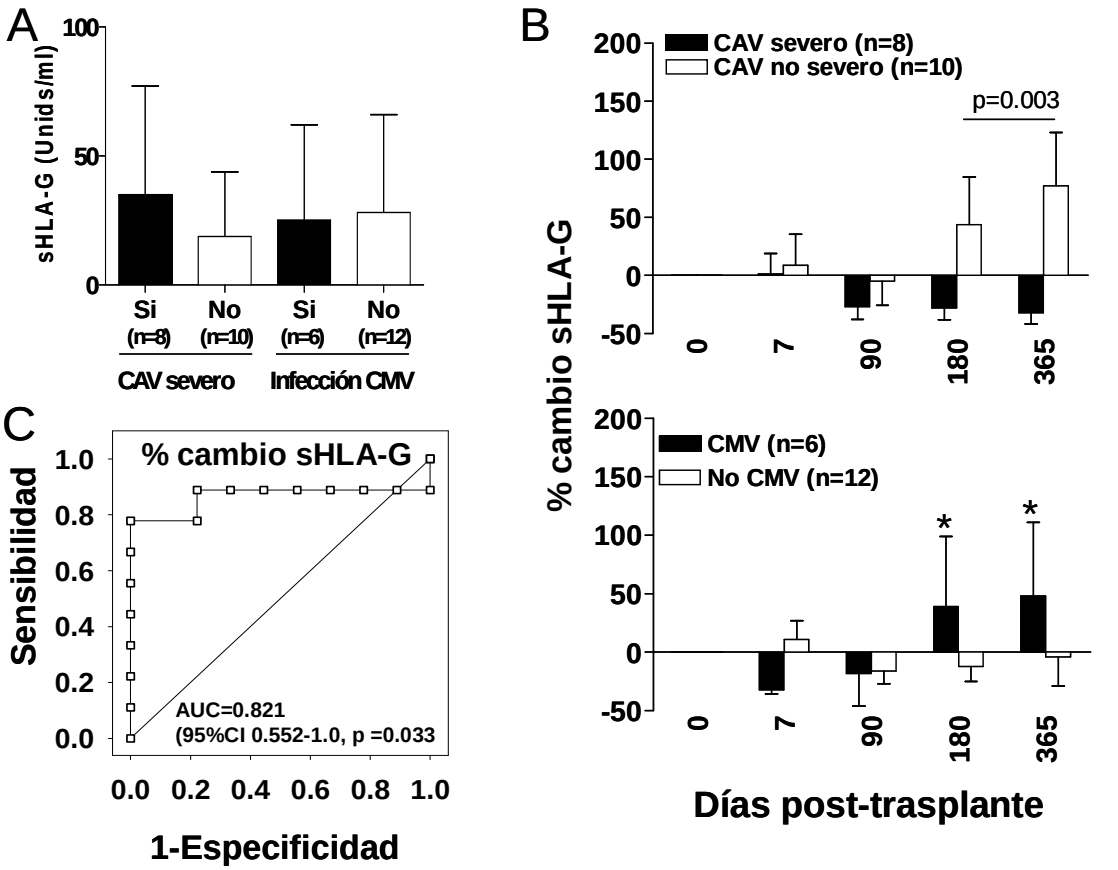

Figura 73. *Niveles séricos de HLA-G en los periodos pre- y post-trasplante en receptores de trasplante de corazón*. Se indica el número de pacientes incluidos en cada serie. Solo se incluyeron los pacientes con seguimiento completo. **A**, media ± SD (desviación estándar) de la concentración sérica de HLA-G (unidades/ml) en el pre-trasplante de receptores de corazón que sufrieron ó no CAV severo ó reactivación de CMV. **B**, media±SEM del porcentaje de cambio post-trasplante de sHLA-G, calculado teniendo en cuenta los valores pre-trasplante como 0% de variación de cada receptor (% cambio de sHLA-G). El gráfico superior compara los receptores que presentaron (barras negras) ó no (barras blancas) CAV severo; el gráfico inferior compara los receptores que presentaron (barras negras) o no (barras blancas) reactivación de CMV. Las diferencias significativas entre los receptores que presentaron o no CAV severo se observaron entre los 6 y 12 meses post-trasplante (p=0.003, ANOVA de dos

factores); los receptores que sufrieron reactivación por CMV presentaron aumentos significativos de sHLA-G (*, t de Student p<0.05; ANOVA de dos factores, no significativo) entre los 6 y 12 meses post-trasplante respecto a los niveles pre-trasplante. **C**, Análisis ROC para evaluar la precisión de la medida del porcentaje medio de cambio de sHLA-G entre los 6 y 12 meses post-trasplante en el diagnóstico de CAV. Los cuadrados blancos representan los valores de los 18 pacientes incluidos en el análisis.

En conjunto, nuestros datos demuestran que un aumento en la concentración de HLA-G en suero entre los 6 y 12 meses post-trasplante, se relaciona con una incidencia de CAV menos severo post-trasplante. Al parecer, la reactivación de CMV podría estar involucrada en el aumento post-trasplante de sHLA-G.

Tabla 11. Relación de CAV con los diferentes parámetros clínicos e inmunológicos.

	% CAV severo			
Parámetro (Si/No)	**Si**	**No**	**P**	**OR (95% CI)**
Rechazo agudo celular	4 (40%)	5 (45%)	0.8	0.8 (0.1-4.5)
Reactivación CMV	1 (14%)	8 (57%)	0.06	0.1 (0.0-1.3)
Otras infecciones no CMV	5 (62%)	3 (50%)	0.64	1.7 (0.2-14.3)
% Cambio sHLA-G ≥ 0.062%*	0 (0%)	8 (67%)	**0.01**	0.33 (0.1-0.7)
	% Reactivación CMV			
% Cambio sHLA-G ≥0.062%*	4 (67%)	2 (17%)	**0.03**	10 (1.0-97)
	% Incremento sHLA-G			
% Cambio $CD3^+CD8^+CD28^-$ ≥ 15%**	3 (100%)	3 (20%)	**0.01**	0.2 (0.1-0.5)

* Media del % cambio de sHLA-G calculado con los datos acumulados de 6 y 12 meses post-trasplante. El punto de corte establecido (≥0.062%) deriva del análisis ROC.
** % de cambio de $CD3^+CD8^+CD28^-$, calculado con los cambios observados a los 12 meses post-trasplante. El punto de corte (≥15%) deriva del análisis ROC con un área bajo la curva de 0.886, 95% CI 0.699-1.074, p=0.026, con la mayor sensibilidad (75%) y especificidad (85%).
CAV, vasculopatía del injerto cardiaco; CMV, citomegalovirus humano; sHLA-G, antígeno leucocitario humano-G soluble.

5.2. Perfiles de células T tolerogénicas asociados a CAV no severo y a un aumento de sHLA-G

Como se observa en la figura 74A (también revisado en apartados anteriores), los linfocitos T $CD8^+CD28^-$ se expandieron significativamente en los receptores del grupo NRA ($p<0.001$). Además, de manera significativa en el pre-trasplante se observó un mayor número de células T $CD8^+CD28^-$ en los receptores con CAV-S que en los que presentaron CAV-NS ($p<0.05$) (figura 74B izquierda). Después del trasplante, las células T reguladoras $CD8^+CD28^-$ se expandieron en los receptores del grupo CAV-NS pero permanecieron disminuidas en aquellos receptores que presentaron CAV-S hasta el final del periodo de seguimiento ($p<0.001$); las diferencias significativas entre estos grupos de pacientes se encontraron entre los 6 y 12 meses post-trasplante ($p=0.002$) (figura 74B derecha).

Por otro lado, también es importante destacar que en nuestra serie de receptores cardiacos, la disminución en la expresión de la molécula CD28 en la membrana de los linfocitos T $CD4^+$, se observó particularmente en aquellos pacientes que mostraron un aumento de sHLA-G durante el post-trasplante, mientras que la expresión de CD28 aumentó en aquellos pacientes que no mostraron incrementos en los niveles de sHLA-G tras el trasplante ($p=0.015$). Las diferencias significativas en la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ entre ambos grupos de pacientes se encontraron entre los 6 y 12 meses post-trasplante ($p=0.01$) (figura 74C-derecha).

Es importante destacar que, aunque no se encontraron asociaciones entre la reactivación de CMV y el número de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ o la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ (datos no mostrados); sí se encontró una asociación directa y significativa entre los cambios post-trasplante de sHLA-G y los de células T $CD8^+CD28^-$ (tabla 11, OR, 0.2; 95% CI, 0.1-0.5; $p=0.01$), mostrándose además una correlación positiva para estos dos parámetros (correlación de Pearson, $p=0.004$, datos no mostrados).

En conjunto, los datos parecen indicar que perfiles más tolerogénicos de células T $CD8^+$ y $CD4^+$ se observaban después del trasplante en receptores del grupo CAV-NS y en aquellos que mostraron un aumento en la concentración de sHLA-G.

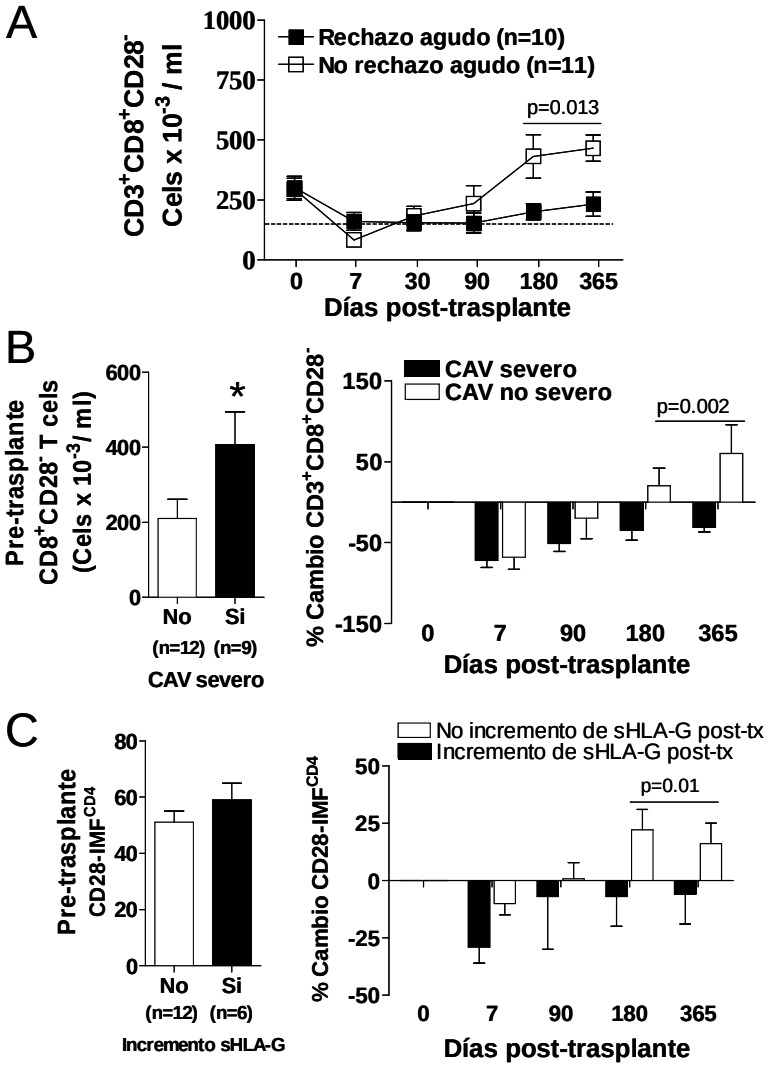

Figura 74. *Perfiles de linfocitos T tolerogénicos asociados a CAV no severo y a incrementos en los niveles de sHLA-G post-trasplante*. Se indica el número de pacientes incluidos en cada serie. Solo se incluyeron a los pacientes con seguimiento completo. **A**, Media ± SEM de linfocitos T $CD3^+CD8^+CD28^-$ (células x 10^{-3}/ml) en los periodos pre- y post-trasplante de receptores cardiacos que presentaron (cuadros negros) o no (cuadros blancos) rechazo celular agudo. Las diferencias significativas entre los receptores que presentaron o no rechazo agudo, entre los 6 y 12 meses post-trasplante, se indican en el gráfico (p=0.013, ANOVA de dos factores). **B**-izquierda, número de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ en el pre-trasplante de receptores de corazón que presentaron (barras negras) ó no (barras blancas) CAV severo. Se encontraron diferencias significativas entre los receptores que presentaron CAV severo y CAV no severo (*, p<0.05, t de Student). **B**-derecha, media ± SEM de los porcentajes de cambio post-trasplante de las cifras absolutas de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ calculados considerando los valores pre-trasplante como 0% de variación en cada receptor (% cambio de $CD3^+CD8^+CD28^-$). Las diferencias significativas entre los receptores que presentaron ó no CAV severo se encontraron entre los 6 y 12 meses post-trasplante (p=0.002, ANOVA de dos factores). **C**-izquierda, media ± SEM de la IMF de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ ($CD28\text{-}IMF^{CD4}$) en receptores que mostraron (barras negras) ó no (barras blancas) cambios post-trasplante de sHLA-G ≥ 0.062%. **C**-derecha, media ± SEM de los porcentajes de cambio de $CD28\text{-}IMF^{CD4}$ calculados considerando los valores pre-trasplante como 0% de cambio en cada receptor (% cambio $CD28\text{-}IMF^{CD4}$). Las diferencias significativas entre los receptores que mostraron (barras negras) ó no (barras blancas) incrementos post-trasplante de sHLA-G ≥ 0.062%, se detectaron entre los 6 y 12 meses post-trasplante (p=0.01, ANOVA de dos factores).

5.3. La reactivación de CMV se asocia con una mayor expresión de CD86 en monocitos de sangre periférica

En la línea con lo observado en estudios previos que revelaron que los monocitos infectados por CMV expresaban mayores niveles de la molécula coestimuladora CD86 (Gredmark y Söderberg-Nauclér, 2003), en nuestra serie de receptores cardiacos que presentaron reactivación por CMV durante el primer año post-trasplante, la expresión de CD86 en monocitos fue significativamente mayor entre los 6 y 12 meses post-trasplante (p=0.002) que en los receptores que no presentaron reactivación de CMV (figura 75). Además, una expresión significativamente mayor de CD86 en monocitos también se observó en receptores del grupo CAV-NS entre los 2 y 12 meses post-trasplante (p=0.001), en comparación con los receptores que presentaron CAV-S. Como control, la expresión de la molécula CD95 en monocitos no mostró variaciones en ningún caso, lo que sugiere que la reactivación de CMV podría haber inducido diferencial y específicamente el aumento de la expresión de CD86 en monocitos.

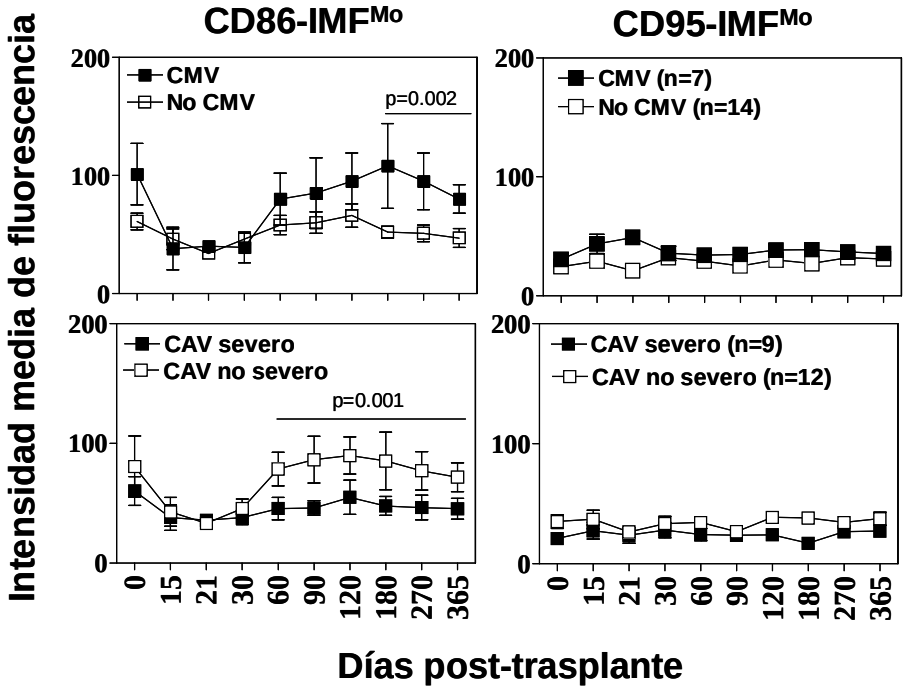

Figura 75. *Expresión de CD86 y CD95 en monocitos de sangre periférica en el pre- y post-trasplante.* Se indica el número de pacientes incluidos en cada serie. Solo se incluyeron a los pacientes con seguimiento completo. Media ± SEM de CD86-IMF^{Mo} (gráfico de la izquierda) y CD95-IMF^{Mo} (gráfico de la derecha), en receptores de corazón que presentaron (cuadrados negros) ó no (cuadrados blancos) infección por CMV (gráficos superiores) ó CAV severo (gráficos inferiores). Se observaron diferencias significativas entre los receptores que sufrieron ó no infección por CMV (p=0.002, ANOVA de dos factores) ó CAV severo (p=0.001, ANOVA de dos factores) para CD86-IMF^{Mo} pero no para CD95-IMF^{Mo}.

Discusión

DISCUSIÓN

1. RECHAZO E INFECCIONES EN TRASPLANTE CARDIACO

Según el último informe del registro español de trasplante cardiaco, el rechazo agudo ocurre fundamentalmente durante el primer año post-trasplante (Almenar y cols., 2011) y aunque puede ocurrir en cualquier momento, es más común entre los primeros 3 a 6 meses post-trasplante (Ubilla y cols., 2006; Labarrere y Jaeger, 2012). De forma similar, en nuestra serie de estudio, los episodios de rechazo agudo aparecieron mayoritariamente entre el tercer y noveno mes post-trasplante, concentrándose entre los meses cuarto y sexto (ver figura 19), con una tasa de rechazo del 38%. Es importante señalar, que en ese periodo de máxima frecuencia de rechazo, es donde se encontraron las mayores diferencias en los parámetros monitorizados entre los diferentes grupos de estudio, diferencias que aparentemente no se vieron influenciadas por el tratamiento inmunosupresor, ya que los niveles de CsA en sangre fueron similares en receptores con y sin rechazo agudo. La distribución temporal de los rechazos agudos en trasplante cardiaco, discrepa de la observada en otros tipos de injertos, como en el trasplante hepático donde la mayor frecuencia de rechazo agudo se observó en las primeras semanas post-trasplante (Minguela A, 1998; López Álvarez MR., 2011) (figura 68 B). Esto podría ser consecuencia de que, a diferencia de lo establecido en trasplante hepático, en receptores cardiacos la administración de una agresiva terapia inmunosupresora de inducción, podría retrasar la aparición de episodios de rechazo agudo.

Por otro lado, nuestros resultados no revelaron diferencias significativas respecto a la influencia de la patología que indicó el trasplante, edad o sexo del receptor, sobre la incidencia de rechazo agudo. Aunque se encontró una tendencia hacia que las mujeres rechazaran más que los hombres, resultados que coinciden con los observados en otras series de trasplante cardiaco (Banchs y cols., 2005; Takami y cols, 1995).

La necesidad de mantener niveles elevados de inmunosupresores para evitar el rechazo aumenta el riesgo de sufrir infecciones. Hecho que se vio reflejado al analizar la influencia de las infecciones sobre la tasa de rechazo agudo en nuestra serie, donde encontramos una relación inversa entre la presencia de infecciones post-trasplante y la

aparición de RA (tabla 9). Por tanto, la administración de un tratamiento inmunosupresor más severo llevaría a una mejor aceptación del injerto pero favorecería el desarrollo de infecciones. En los últimos años, se han introducido nuevos regímenes para la prevención y tratamiento de infecciones oportunistas, que han disminuido considerablemente el número de infecciones y han retrasado su presentación. Sin embargo, las infecciones continúan siendo la mayor causa de reingreso en el hospital durante el primer año post-trasplante (Taylor y cols., 2004). En nuestro trabajo, las infecciones también fueron la complicación más frecuente, con 38 pacientes (76%) que presentaron algún episodio de infección (bacteriana, viral ó fúngica) que requirieron ingreso hospitalario en el primer año post-trasplante.

El rechazo crónico se considera la principal causa de fallo del injerto cardiaco y muerte del paciente tras el primer año del trasplante (Almenar y cols., 2010). También conocido como CAV o EVI, consiste en el estrechamiento concéntrico y difuso de las arterias y venas del corazón trasplantado (Oni y cols., 1992; Liu y Butany, 1992). Su detección, tiene una clara influencia en el pronóstico del paciente, y su incidencia y prevalencia vienen determinadas por el método de diagnóstico empleado. En la actualidad, la coronariografía se considera el método diagnóstico estándar aunque presenta varias desventajas de cara al diagnóstico de CAV. Fundamentalmente, ha demostrado ser poco sensible al infraestimar la severidad de la enfermedad en comparación con otra técnica de imagen más reciente, el IVUS. Asimismo, no permite detectar la afectación de arterias penetrantes intramurales ni, frecuentemente, el estrechamiento de ramas secundarias o terciarias de las arterias coronarias epicárdicas principales, por lo que dichas limitaciones, hacen que la enfermedad no pueda ser diagnosticada hasta que se encuentra en fases avanzadas. El IVUS se considera actualmente la mejor herramienta diagnóstica de CAV, sin embargo su coste elevado hace que no esté disponible en todos los centros, y ha sido la causa fundamentalmente de que tan solo a 21 de los 50 pacientes incluidos en esta memoria se les haya valorado CAV mediante IVUS. Esta limitación económica, justifica profundizar en la búsqueda de métodos alternativos que sean más baratos y accesibles para su diagnóstico en un mayor número de pacientes.

Al analizar la influencia de la edad, sexo y cardiopatía del receptor sobre la tasa de CAV-S, no se encontraron diferencias significativas (tabla 8). Por el contrario,

cuando se evaluó el impacto de las infecciones post-trasplante, se encontró que la mayoría de los pacientes con infección por CMV presentaron CAV menos severo (86%) frente a un número reducido que presentó CAV severo (14%), diferencias que no llegaron a ser estadísticamente significativas por el reducido tamaño de la muestra (tabla 9). Estos datos sugieren que la reactivación de la infección de CMV protege del desarrollo de CAV severo, hipótesis en la que la secreción inducida por CMV de la citoquina cmvIL-10, homóloga a IL-10 humana, podría estar jugando un papel importante al inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias como INF-γ (Spencer y cols., 2002), que reduciría la proliferación neointimal y la infiltración del injerto por macrófagos y linfocitos (Chen y cols., 2005). No obstante, esta observación se opone claramente a lo descrito en otros trabajos de trasplante cardiaco, donde la presencia de la infección de CMV se considera un factor de riesgo para el desarrollo y la severidad de CAV (Weill, 2001; Valantine, 2004; Petrakopoulou y cols., 2004). La principal vía por la que CMV favorecería CAV sería a través de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, creando así un ambiente pro-aterogénico favorable para el desarrollo de CAV (Weis y Cooke, 2003; Weis y cols., 2004). Tal y como se discutirá más adelante, nuestros datos indican que si somos capaces de atenuar los efectos negativos de la infección de CMV, podríamos potenciar los positivos, como es la protección del injerto frente a CAV severo a través de la secreción de sHLA-G (Yan y cols., 2009).

2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DEL ESTADO INMUNITARIO EN RECEPTORES DE TRASPLANTE CARDIACO.

La combinación de potentes fármacos inmunosupresores ha contribuido de forma decisiva a la mejora de la supervivencia de los injertos cardiacos. Sin embargo, la principal causa de muerte durante el primer año post-trasplante, continua siendo el rechazo agudo y, como efecto colateral, las infecciones. En este sentido, es importante destacar que la sensibilidad a la terapia inmunosupresora de los pacientes muestra una gran variabilidad, y además, los niveles sanguíneos de inmunosupresores son predictores imprecisos de la eficacia del fármaco (Barten y cols., 2007). Por ello, la monitorización inmunológica cobra una importancia esencial, y en los últimos años ha demostrado ser un método útil para predecir la aparición del rechazo frente a la

aceptación del injerto, así como para diferenciar la activación inmune inducida por alo-reactividad de la inducida por las infecciones. La monitorización inmunológica también es útil para evaluar el estado inmunológico en receptores que reciben bajas dosis de inmunoterapia o cuando esta es retirada completamente (tolerancia operacional) (Martínez-Llordella y cols., 2008). Recientemente se ha introducido un método comercial de monitorización inmunológica para valorar el grado de inmunosupresión de los receptores de injertos. El método se basa en la medición del contenido de ATP de los linfocitos T $CD4^+$, y ha demostrado ser capaz de diferenciar entre RA e infecciones (Kowalski y cols., 2006), aunque puede conducir a resultados inconsistentes (Mendler y cols., 2008; Millán y cols., 2009). En este contexto, además hay que tener en cuenta que en la actualidad, la evaluación histopatológica de biopsias del injerto continúa siendo el patrón de oro de monitorización de la reactividad inmune frente al injerto. Sin embargo, las muestras de biopsia son fragmentos pequeños que ofrecen información de un área limitada del injerto y pueden conducir a resultados no representativos de todo el órgano, o incluso no ajustarse al estado clínico real del paciente (Stewart y cols., 2005; Rodriguez, 2003), a lo que se suma las posibles complicaciones de la técnica (Calviño-Santos y cols., 2005; Chan y cols., 2001). Por ello, es necesario profundizar en la identificación de moléculas que participen en el proceso del rechazo y que puedan tener un papel como marcador diagnóstico o predictivo.

2.1. Utilidad clínica de la monitorización inmunológica pre-trasplante

Como se describe en el apartado de resultados de esta memoria, los pacientes con enfermedad cardiaca terminal mostraron mayor recuento de leucocitos en sangre periférica que los controles sanos, independientemente de la patología de base que indicó el trasplante. No obstante, dichas cifras de leucocitos pretrasplante permanecieron dentro de los rangos de normalidad (4.500-11.000 x 10^{-3}/ml), y en general, no tuvieron valor predictivo sobre las variables clínicas analizadas en este trabajo, como el rechazo agudo y crónico o las infecciones. Como consecuencia los receptores de trasplante cardiaco de nuestra serie mostraron valores más elevados de monocitos, granulocitos y linfocitos que en la población control. Hay que resaltar, no obstante, que las cifras de monocitos observadas en los pacientes en espera de

trasplante cardiaco que, una vez trasplantados desarrollaron episodios de rechazo agudo y crónico (ver figura 21), fueron significativamente más elevadas que en los pacientes que mostraron buena aceptación de sus injertos. Aunque desconocemos los mecanismos por los que las cifras elevadas de monocitos puedan haber favorecido el desarrollo de rechazo a corto y largo plazo, nuestros resultados coinciden con los observados en trasplante hepático (López Álvarez MR., 2011). Además, en trasplante de células madre hematopoyéticas, niveles altos de monocitos antes del trasplante, se correlacionaron con un mayor riesgo de enfermedad injerto contra huésped aguda (Arpinati y cols., 2007).

El hallazgo más relevante del estudio pre-trasplante lo observamos en relación con las subpoblaciones de linfocitos T que expresan la molécula CD28. Los valores porcentuales y absolutos de células T $CD4^+CD28^+$ y $CD8^+CD28^+$ antes del trasplante, eran comparables a los observados en trabajos realizados en diferentes series de trasplante hepático (García-Alonso y cols., 1997; López Álvarez MR., 2011), y reproducían lo descrito en individuos sanos (Castro y cols., 2009). Sin embargo, las células T $CD4^+$ y, especialmente, las $CD8^+$ que pierden la expresión de CD28 ($CD4^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-$) aparecían con cifras pre-trasplante significativamente más elevadas en los pacientes que tras el trasplante desarrollaron CAV severo, que en los individuos sanos y que en los pacientes con CAV menos severo. Se ha descrito, por un lado, que la estimulación crónica juega un papel importante en la aterogénesis (Hansson y Hermansson, 2011), y por otro, que la pérdida de CD28 en linfocitos T es un proceso igualmente relacionado con la estimulación inmunitaria crónica (Pita-López y cols., 2009; Libri y cols., 2011; Wallace y cols., 2011; Tarazona y cols., 2000). En concordancia con nuestros resultados, se ha descrito que los pacientes con cardiopatía isquémica presentan un aumento de células T $CD8^+CD28^-$, fenómeno que no solo se manifestaba en pacientes seropositivos para CMV, sino también en aquellos que presentaron enfermedad arterial coronaria *per se* (Jonasson L y cols., 2003). Por todo ello, se podría pensar, que los pacientes que sobreviven a una situación de estrés debido a infarto agudo de miocardio, o los que padecen aterosclerosis grave o insuficiencia cardiaca congestiva podrían tener un sistema inmunitario sometido a estimulación crónica y por lo tanto acumulen células T $CD8^+CD28^-$ con telómeros más cortos y características de senescencia replicativa

(Spyridopoulos y cols., 2009; Van der Harst y cols 2007). Analizando el grupo total de pacientes, nuestros resultados pretrasplante no revelaron diferencias en el porcentaje o las cifras absolutas de linfocitos T $CD8^{+}CD28^{-}$ entre CI y CNI, sin embargo analizando los 21 pacientes clasificados según la severidad de CAV, tanto el porcentaje como número absoluto de células $CD8^{+}CD28^{-}$ fueron superiores en el grupo de pacientes con CI que en pacientes con CNI (datos no mostrados), lo que podría indicar que un estado isquémico previo al trasplante cardiaco, podría favorecer el desarrollo posterior de CAV-S en el post-trasplante, tal y como había sido descrito previamente (Lindelow y col., 1999; Sharples y cols., 2003; Taylor y cols., 2009; Yamani y cols.,2002).

De forma similar a lo observado en la subpoblación T $CD8^{+}CD28^{-}$, varios estudios han demostrado la presencia de linfocitos T $CD4^{+}CD28^{-}$ como células predominantes en el proceso inflamatorio que tiene lugar en la enfermedad aterosclerótica (Zal y cols., 2007; Liuzzo y cols., 2000; Aukrust y cols., 2007; Dumitriu y cols., 2009). En la misma línea, nuestros resultados mostraron un aumento significativo en el porcentaje y cifras absolutas de la subpoblación T $CD4^{+}CD28^{-}$ en receptores de cardiopatía isquémica frente a controles sanos y en aquellos que presentaron CAV severo.

Por último, señalar que antes del trasplante los valores porcentuales y absolutos de células NK de todos los grupos de pacientes fueron inferiores a los de los controles sanos, a excepción de los pacientes de CAV-S que mostraron valores similares a los controles y considerablemente superiores a los del grupo CAV-NS. Estos resultados coinciden con los observados en otros estudios de trasplante cardiaco donde destacan la posible contribución de las células NK en el desarrollo de CAV (Uehara S y cols., 2005 (a); Uehara S y cols., 2005 (b).

Por tanto, aunque se desconocen los mecanismos implicados, la acumulación de células T $CD4^{+}CD28^{-}$ y $CD8^{+}CD28^{-}$ durante las etapas previas al trasplante, probablemente inducidas por la inflamación crónica de estos pacientes, parece ser, *a priori*, un factor que predispone a la aparición de rechazo crónico más severo. Por el contrario, cifras reducidas de células NK ofrecerían protección frente al desarrollo de CAV severo. Aunque estos datos deberían confirmarse en series más amplias, en nuestra opinión, podrían constituir marcadores predictivos de fácil evaluación, que nos

permitieran establecer tratamientos preventivos inmediatamente tras el trasplante que redujesen o atrasasen la aparición del CAV-S. Sin embargo, al analizar los datos post-trasplante, tal y como describiremos más adelante, posiblemente esta hipótesis inicial deba ser reinterpretada, ya que aparentemente, no es la acumulación pre-trasplante en si, sino la reducción post-trasplante de las cifras de células T $CD28^-$ el factor que predispone el desarrollo del CAV-S.

Otro de los estudios pretrasplante que ofrecieron gran interés fue el relacionado con el nivel de expresión de la molécula coestimuladora CD28 en la membrana de linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$. Lo más importante fue que los pacientes, con niveles pre-trasplante de expresión de CD28 más elevados, por razones no bien conocidas, fueron aparentemente más sensibles al tratamiento inmunosupresor y por tanto a una mayor protección del órgano frente a RA y frente a CAV-S, aunque como contrapartida presentaron infecciones más frecuentemente. Igualmente, este marcador podría constituir un factor fácil de evaluar, que permitiera estar más vigilante ante la aparición de infecciones, o bien establecer terapias inmunosupresoras personalizadas con niveles de fármacos más reducidos.

2.2. Monitorización de las poblaciones leucocitarias durante el primer año post-trasplante: relación con la aceptación del injerto y las infecciones.

La leucocitosis observada en las primeras semanas después del trasplante concuerda con lo descrito en los estudios de trasplante hepático (Singh y cols., 1998), sugiriendo que la expansión del número de leucocitos en las primeras semanas después del trasplante podría ser debida a la manipulación quirúrgica, la inflamación asociada al proceso de trasplante o a la presencia de infecciones, así como a otras causas no determinadas.

En relación a los neutrófilos, se detectó un aumento significativo en los primeros días post-trasplante, que coincide con lo observado en otros estudios de trasplante cardiaco en los que se describe que la isquemia-reperfusión (Kubala y cols., 2002) y la administración de esteroides (Nittoh y cols., 1998; Dale y cols., 1975), así como el tratamiento inmunosupresor, podrían ser los desencadenantes del aumento pronunciado en el recuento de este tipo de células. En concordancia con otras series

(Healy y cols., 2007), este aumento en el número de neutrófilos en los primeros días post-trasplante, no contribuyó al desarrollo del rechazo agudo.

En contraposición, se observó una marcada disminución en las cifras de monocitos en los primeros días del trasplante, que pudo ser debido al tratamiento inmunosupresor de inicio. Estos resultados contrastan con los observados en trabajos de nuestro grupo realizados en diferentes series de trasplante hepático, en los que se observó monocitosis en las primeras semanas después del trasplante (Minguela A, 1998; López Álvarez MR, 2011).

Durante el primer mes post-trasplante se observó una marcada reducción en las cifras de linfocitos totales, y por el contrario, una expansión de linfocitos B, cualquiera que fuera el grupo de pacientes. Esta prevalencia de linfocitos B al inicio del post-trasplante podría ser consecuencia de la drástica reducción de linfocitos T, principal diana del tratamiento inmunosupresor de inicio.

Tras las primeras semanas post-trasplante, la recuperación de linfocitos T fue más evidente en pacientes que no sufrían rechazo agudo y, al menos en parte, parecía estar relacionada con la recuperación simultánea de linfocitos T $CD8^+$, más que con la de los linfocitos T $CD4^+$, ya que estos permanecían invariables en todos los pacientes. Algo similar se ha descrito en la evolución de linfocitos T $CD4^+$ en pacientes sometidos a retirada de inmunosupresión tras un trasplante renal (Kreijveld y cols., 2008).

Las diferencias observadas en los valores porcentuales y absolutos de linfocitos T $CD8^+$ totales en el periodo post-trasplante, más elevados en el grupo de pacientes NRA que en el grupo RA, fue fundamentalmente a expensas de linfocitos T $CD8^+CD28^-$, ya que los linfocitos T $CD8^+CD28^+$ presentaron valores muy similares en ambos grupos de receptores. Este último resultado es claramente discrepante con lo descrito en trasplante renal, donde la elevación del porcentaje de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ se asoció con la aparición de episodios de RA (Jiménez y cols., 2006). Además las cifras porcentuales y absolutas de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ se expandieron a partir del tercer mes del trasplante en aquellos pacientes con mejor aceptación del injerto. Estos resultados concuerdan con lo descrito en modelos experimentales de trasplante alogénico cardiaco, renal y hepático y xenogénicos (Liu y cols., 1998; Ciubotariu y cols., 2001), sugiriendo que las células T $CD8^+CD28^-$ pueden tener un papel relevante en la supresión de la respuesta alogénica. Estudios posteriores del mismo grupo,

demostraron que algunas células T $CD8^+CD28^-$, caracterizadas por perder también la expresión de CD27 en su superficie, son capaces de actuar sobre las células dendríticas e inducir tolerancia (Chang y cols., 2002). Un efecto que parece mediarse por el aumento en la expresión de receptores ILTs que se inducen sobre la superficie de las células dendríticas, concomitante con una disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras. Como resultado de estos cambios, las células dendríticas podrían ser incapacitadas como células presentadoras de antígeno profesionales favoreciendo la tolerancia del injerto. Por otro lado, los resultados descritos para la subpoblación de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ de nuestro estudio, ratifican lo observado en trasplante hepático de donante vivo, donde un número elevado de este subtipo de células T $CD8^+$ se relacionó con la estabilidad de la función hepática tras el trasplante (Tanaka y cols., 2006; Lin y cols., 2009) y están en línea con lo observado en trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, indicando que el número de células T $CD8^+CD28^-$ al año después del trasplante se asocia con una mejor evolución (Yakoub-Agha y cols., 2009).

En trasplante renal se ha descrito que una disminución de la respuesta celular precede a los síntomas clínicos de la enfermedad por CMV, que se manifiesta en cifras absolutas de linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$ más reducidas durante el periodo de mayor antigenemia (Castro y cols., 2003). Resultados similares se observaron en nuestra serie, y así durante los primeros meses post-trasplante el número absoluto de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ estuvo deprimido en los pacientes con reactivación de CMV.

2.2.1. Expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en linfocitos

En contraste con los resultados observados en trasplante hepático, donde los cambios en la expresión de CD80 y CD86 sobre linfocitos B parecen constituir marcadores de inmunoactivación relacionado con los episodios de rechazo agudo (Minguela A, 1998), en trasplante cardiaco no se observaron diferencias entre los pacientes con mejor y peor aceptación del injerto. No disponemos de datos que nos permitan clarificar esta diferencia, pero la terapia inmunosupresora más intensa a la que fueron sometidos los receptores cardiacos, en comparación con los hepáticos, podría haber impedido la sobre-expresión de dichas moléculas asociada a los episodios de rechazo agudo. De hecho, en trasplante hepático estos incrementos en la expresión

de moléculas CD80 y CD86 sobre linfocitos B, se minimizaron tras la introducción de terapias inmunosupresoras más eficaces (Minguela 2000).

2.2.1.1. El aumento en la expresión de CD28 en linfocitos T se asocia al rechazo agudo

La monitorización de la expresión de la molécula CD28 sobre la membrana de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ se realizó en la serie de trasplante cardiaco incluida en esta memoria, y se comparó con los resultados observados en la serie de trasplante hepático objeto de tesis de la Dra. M. Rocío López Álvarez (2011). El resultado más significativo observado en ambos tipos de trasplantes, reveló que en el periodo de máxima frecuencia de episodios de rechazo agudo (en trasplante cardiaco, entre el 3º y 9º mes y en trasplante hepático, en el primer mes post-trasplante), la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en pacientes con RA sobrepasó significativamente sus niveles basales, a diferencia del grupo de pacientes NRA en los que no llegó a recuperar sus niveles basales a lo largo de toda su evolución post-trasplante. Además en dicho periodo, la expresión de CD28 en linfocitos T, medida como cambio post-trasplante de la IMF de CD28, aumentó en receptores de corazón y de hígado del grupo RA y disminuyó en aquellos que no presentaron RA. Sin embargo, un incremento en la expresión de CD28 se detectó también en cerca del 40% de receptores del grupo NRA en ambos tipos de trasplante (ver tabla 10). Esta última observación podría estar indicando una alo-reactivación sin consecuencias clínicas (Tippner y cols., 2001) o, alternativamente un rechazo que podría localizarse en zonas alejadas del lugar de la biopsia (como el caso del paciente descrito en la figura 71-C).

Es importante destacar que, en ambos tipos de trasplante, las infecciones no indujeron el aumento de la expresión de CD28 en linfocitos T, si no que este incremento parecía estar específicamente asociado a los episodios de RA (figura 69). Estos resultados coinciden con trabajos publicados por nuestro grupo en series anteriores de trasplante hepático (García-Alonso y cols., 1997). Señalar, que en ambos tipos de receptores, cardiacos y hepáticos, solamente la infección por CMV, fue capaz de bloquear el aumento de la expresión de CD28 observado en pacientes del grupo RA. Resultados que fueron confirmados cuando se analizó la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ en periodos anteriores y posteriores al diagnóstico de reactivación del CMV, ya que la expresión de CD28 permaneció significativamente disminuida durante

los días del diagnóstico de la reactivación de la infección de CMV en ambos injertos (figura 70). Esta disminución en la expresión de la molécula CD28 podría ser el resultado de la acción de proteínas derivadas de CMV, que como se ha descrito (Chalupny y cols., 2006; Gumá y cols., 2006; Zou y cols., 2005), intervienen en la evasión de la respuesta inmunitaria de este virus. Aunque este aspecto se discutirá más ampliamente en relación con el bloqueo de la expansión de células T $CD8^+KIR2D^+$ (ver sección 2.2.1.2).

Por otro lado, en los pacientes con infecciones diferentes a CMV se detectó una disminución en la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, probablemente debido al debilitamiento de la respuesta inmunitaria, consecuencia de una inmunosupresión elevada.

2.2.1.2. La expansión de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-KIR2D^+$ se asocia a una mejor aceptación del injerto cardiaco y hepático.

Creemos que es interesante apuntar que en los pacientes con buena aceptación de sus injertos, la disminución en la intensidad de expresión de CD28 en linfocitos T durante el primer mes del trasplante, fue seguida a más largo plazo de una acumulación gradual de células que perdían la expresión de CD28, con fenotipos $CD8^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-KIR2D^+$. En contraste, los pacientes que durante el primer mes post-trasplante padecieron RA, al aumento experimentado en la expresión de CD28 no se asoció a una expansión de linfocitos T $CD8^+CD28^-$, lo que sugiere una regulación diferencial en la expresión de esta molécula sobre los linfocitos en pacientes con buena y mala aceptación de sus injertos.

Teniendo en cuenta que la expresión de KIR en los linfocitos T es inducida por estimulación antigénica crónica (Van Bergen y cols., 2004; Vivier y cols., 2004), es posible que en trasplante, donde la presencia de aloantígenos es permanente, los linfocitos T $CD8^+KIR2D^+$ puedan haber sido inducidos diferencialmente en pacientes con buena aceptación de los injertos, dando lugar a células T capaces de modular células alogénicas efectoras (Parham, 2005 (b); López-Álvarez y cols., 2009; Speiser y cols., 1999; Colovai y cols., 2003; Manavalan y cols., 2004). Aunque los linfocitos T $CD8^+CD28^-$ se acumulan con la edad (Effros y cols., 2005; Tarazona y cols., 2000; Brzezińska y cols., 2004), en nuestras series, no se detectaron diferencias en función de

la edad de los pacientes (tabla 8) o de la compatibilidad HLA (datos no mostrados) que pudieran haber condicionado la acumulación diferencial de células T $CD8^+CD28^-KIR2D^+$ observada entre los receptores de los grupos RA y NRA.

De acuerdo con trabajos anteriores (Colovai y cols., 2003; Anfossi y cols., 2004), y en contraste con los datos obtenidos en trasplante de médula ósea (Van Der Veken y cols., 2009), en nuestras series de trasplante cardiaco y hepático, la infección por CMV aparentemente suprimió la expansión inducida alogénicamente de las células T $CD8^+KIR2D^+$. Poco se sabe realmente acerca de los factores que regulan la expresión de los receptores KIR en células T (Anfossi y cols., 2001), excepto que, como en células NK, el proceso es inducible por tiempo limitado (Vely y cols., 2001), de manera estocástica (Raulet y cols., 2001), y regulada tanto a nivel pre- como post-transcripcional (Li y cols., 2008). Nuestros resultados, en particular los relativos a la supresión por CMV de la expansión inducida alogénicamente de células T $CD8^+KIR2D^+$, podrían contribuir a desvelar los mecanismos moleculares implicados en la expresión de los genes KIR. Se sabe que varias proteínas derivadas de CMV bloquean la expresión de HLA (Gumá y cols., 2006), NKG2D (Welte y cols., 2003) y MICA (Zou y cols., 2005), para evadir las respuestas inmunitarias, y que los mecanismos están al menos parcialmente mediados a través de la inhibición de la vía Jak/Stat (Miller y cols., 1999). Por tanto, y en base a los resultados anteriormente expuestos (Hadaya y cols., 2008), es tentador pensar que, en nuestra series de trasplante, factores derivados de CMV podrían haber regulado negativamente la expresión de KIR2D en los linfocitos T. Esto contrasta con datos recientes que describen que la infección por CMV favorece la acumulación de células T específicas totalmente diferenciadas, $CD4^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-$ (Pita-López y cols., 2009; Libri y cols., 2011; Wallace y cols., 2011; Tarazona y cols., 2000). No obstante, no se puede descartar que el tratamiento inmunosupresor presente en receptores de trasplante pudiera estar induciendo estas diferencias.

Del mismo modo, la proteína core del VHC es capaz de atenuar la respuesta de linfocitos T $CD4^+$ mediante la inducción de anergia a través de activación de NFAT en ausencia de activación simultánea de AP-1 ó NF-κB (Domínguez-Villar y cols., 2007). El VHC, sin embargo, no alteró la expansión de células T $CD28^-$ o $KIR2D^+$ inducidas alogénicamente en los receptores hepáticos de nuestra serie, lo que sugiere que el

bloqueo de la expansión de células T $CD8^+KIR2D^+$ inducido por CMV sigue vías específicas.

En resumen, nuestros resultados indican que para hacer una monitorización inmunológica adecuada, el análisis de la intensidad de expresión de CD28 debe de ser programada desde el pre-trasplante (como un valor de referencia) y, en trasplante hepático, dos veces a la semana durante el primer mes post-trasplante; tras este periodo, el seguimiento de CD28 es menos informativo. En trasplante cardiaco, es difícil definir el tiempo concreto del post-trasplante, ya que el RA puede ocurrir en cualquier momento del seguimiento. Sin embargo, bajo de sospecha de RA y en particular en el caso de urgencia clínica, el análisis de CD28 puede ayudar a revelar o descartar la presencia de RA celular. La monitorización de receptores KIR2D en ambos tipos de trasplante a lo largo del primer año (muestras a los 3, 6 y 12 meses del trasplante) puede ayudar a ajustar las dosis de inmunosupresores a largo plazo en cada paciente.

Por tanto, aunque se van a requerir nuevos estudios con series más amplias, nuestros resultados parecen indicar que la expresión de CD28 y de receptores KIR2D en linfocitos T de sangre periférica, pueden ser considerados como sensores del estado inmunológico en trasplante de corazón y de hígado. En ambos tipos de trasplantes, el aumento en la expresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en los periodos de máxima frecuencia de RA celular es indicativo de una alorespuesta activa, mientras que la aparición en el post-trasplante de células T circulantes $CD8^+CD28^-KIR2D^+$ se correlaciona con una mejor aceptación temprana del injerto. En conjunto, estos datos ponen de manifiesto que el trasplante cardiaco y el trasplante hepático comparten los mismos mecanismos inmunológicos de aloreactivación y tolerancia. Igualmente importante, nuestros datos desvelan posibles vías por las que CMV puede evitar una respuesta inmunitaria efectiva mediante la supresión de la expresión de las moléculas CD28 y KIR2D en las células T, lo que podría tener importantes implicaciones en la evolución del injerto.

3. NIVELES POST-TRASPLANTE ELEVADOS DE sHLA-G MEJORAN LA ACEPTACIÓN DEL INJERTO CARDIACO

Los estudios publicados en trasplante cardiaco revelan que niveles elevados de sHLA-G y mHLA-G protegen al injerto del desarrollo de rechazo agudo y crónico (Lila y cols., 2002; Luque y cols., 2006; Sheshgiri y cols., 2008). Nuestro estudio es el primer trabajo en el que se ha evaluado la utilidad de la monitorización de sHLA-G en suero para predecir CAV en una serie de receptores cardiacos en los que, de forma precisa, se les ha medido el engrosamiento intimal por IVUS. Aunque IVUS es un método exacto y reproducible, hay una evidente necesidad de utilizar herramientas no invasivas para ayudar a los clínicos a identificar los pacientes con mayor riesgo de desarrollar CAV severo.

En nuestra serie, el estudio pre-trasplante de los niveles de sHLA-G no mostró diferencias significativas entre los receptores que una vez trasplantados, presentaron o no CAV severo. Sin embargo, tras el trasplante se observó que los incrementos de sHLA-G estaban presentes principalmente en receptores con CAV menos severo. Nuestros resultados muestran que la monitorización post-trasplante de los cambios en sHLA-G durante el primer año post-trasplante, podría ayudar a identificar a los receptores de corazón que a largo plazo mostrarán resultados menos favorables, CAV severo, y que por tanto podrían beneficiarse de tratamientos preventivos introducidos de forma temprana para evitar el daño progresivo y la pérdida del injerto.

Además, los receptores que mostraron menor grado de CAV, presentaron perfiles de células T anérgicas/tolerogénicas más acentuados, que junto al incremento de sHLA-G, podrían haber sido responsables de la mejor aceptación del injerto observada en nuestra serie. Es bien conocido que sHLA-G induce tolerancia al inhibir las células responsables del rechazo del injerto (Rouas-Freiss y cols., 2007); mediando efectos directos de inhibición sobre células T, células NK y células dendríticas, y efectos indirectos tolerogénicos a largo plazo por la inducción de células T reguladoras. De hecho, se ha descrito que los pacientes con aumentos en la expresión de HLA-G en sus injertos y/o elevación de sHLA-G en plasma, experimentan un menor número de episodios de RA y una menor incidencia del rechazo crónico que los pacientes que fueron negativos para sHLA-G (Lila y cols., 2000; Lila y cols., 2002; Luque y cols., 2006). En la misma línea, las células T estimuladas por células HLA-G1$^+$ o células sensibilizadas

con HLA-G5 se convierten en células anérgicas y se diferencian en células T $CD4^+$ y $CD8^+$ reguladoras/supresoras (LeMaoult y cols., 2004; Le Rond y cols., 2006). En concordancia con estos resultados, los receptores de nuestra serie que presentaron CAV menos severo, mostraron: 1) un incremento en el número de células T $CD8^+CD28^-$, una subpoblación de células T reguladoras que se ha demostrado suprimen la activación y la proliferación de células Th alo-respondedoras (Colovai y cols., 2003), y 2) una disminución en la expresión de CD28 en células T $CD4^+$, lo que sugiere una anergización funcional de las células Th respondedoras (Minguela y cols., 2000). En consecuencia, la aparición de células T reguladoras/supresoras, posiblemente inducidas por HLA-G, podría explicar, al menos en parte, la mejor aceptación del injerto por receptores con mayores niveles de sHLA-G (Gregori y cols., 2009; Le Rond y cols., 2006).

Hasta la fecha, no se sabe porqué algunos receptores de corazón experimentan incrementos en la expresión de HLA-G, mientras que otros no lo hacen. En condiciones fisiológicas, la expresión de HLA-G se limita a la interfase materno-fetal y a un reducido número de tejidos en sitios inmuno-privilegiados. La expresión restrictiva de HLA-G se altera en condiciones patológicas, observándose aumentos en los órganos injertados, enfermedades inflamatorias, autoinmunes y virales (Moreau y cols., 2009). La expresión de HLA-G está controlada principalmente a nivel transcripcional por un único gen promotor y, modulada por factores ambientales como IL-10, que ha mostrado que incrementa fuertemente la transcripción de HLA-G en cultivos de trofoblastos y monocitos (Moreau y cols., 1999). En los últimos años, se ha demostrado que tanto la expresión de mHLA-G en monocitos como de sHLA-G en plasma, aumenta drásticamente durante la reactivación de CMV (Yan y cols., 2009). Efecto aparentemente mediado por la secreción de IL-10, homóloga a IL-10 humana, codificada por CMV (Spencer y cols., 2002). Por tanto, aunque en nuestra serie de trasplante cardiaco no se observó una asociación significativa entre la reactivación de CMV y la severidad de CAV, si se pudo detectar un aumento de sHLA-G en los receptores con reactivación de la infección de CMV, y con ello, una relación directa entre la reactivación de CMV y el incremento de sHLA-G ($p<0.03$), así como entre el incremento de sHLA-G y el CAV no severo ($p<0.01$). Estos resultados sugieren que la

reactivación de CMV podría haber inducido un aumento de sHLA-G, que a largo plazo, ofrecería protección frente a CAV.

En contraste con nuestros resultados, la infección por CMV se ha asociado con el desarrollo acelerado de CAV y una disminución en la supervivencia a 5 años (Valantine, 2004); Weill, 2001; Potena y cols., 2006). Sin embargo, la profilaxis con ganciclovir podría haber cambiado la historia natural del CMV en el trasplante de corazón, y algunos estudios sugieren que el estatus de CMV de los receptores de corazón y sus correspondientes donantes no influye necesariamente en el rechazo agudo y/o crónico en términos de CAV (Luckraz y cols., 2003; Mahle y cols., 2009). Aunque en nuestra serie no se ha podido demostrar una relación significativa entre la reactivación de CMV y la severidad de CAV, el tratamiento profiláctico con ganciclovir y la terapia preventiva con estatinas (Wenke y cols., 2003), iniciada inmediatamente después del trasplante en todos los receptores, podría haber atenuado los efectos negativos de la reactivación de CMV, a la vez que potenciado sus efectos inmunomoduladores. En apoyo de esta hipótesis, observamos que la expresión de CD86 fue claramente superior en receptores que mostraron reactivación de CMV y en aquellos que mostraron CAV no severo, que puede indicar, como ya ha sido sugerido (Gredmark y Söderberg-Nauclér, 2003), que la infección por CMV podría haber bloqueado la diferenciación de los monocitos a células dendríticas, y como consecuencia, favorecido una respuesta inmunitaria más tolerogénica.

Dado que la presentación clínica de CAV es generalmente silenciosa y que no se dispone de terapias eficaces, el diagnóstico precoz y la prevención son críticos. El tratamiento preventivo incluye la optimización de la terapia inmunosupresora con regímenes basados en inhibidores de la mTOR (Eisen y cols., 2003; Topilsky y cols., 2012) y el tratamiento de la comorbilidad de CAV se debe iniciar de forma temprana, ya que el mayor engrosamiento de la íntima se produce durante el primer año post-trasplante. La cuantificación de sHLA-G en suero, entre los 180 y 365 días post-trasplante, podría ofrecer un método complementario no invasivo para identificar a los receptores con riesgo de CAV severo, candidatos para beneficiarse de terapias preventivas tempranas. A pesar de que estos resultados preliminares deben ser confirmados en series más amplias, proporcionan una base clínica para utilizar la cuantificación de sHLA-G durante el primer año post-trasplante, como un parámetro

temprano no invasivo con alta sensibilidad y especificidad, que permita a los clínicos anticiparse meses, o incluso años, a la evidencia clínica de CAV.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1.- En la serie de trasplante cardiaco estudiada en este trabajo de tesis no se apreció asociación entre la edad, el sexo o la patología que indicó el trasplante y la evolución del injerto, atendiendo a la frecuencia y la severidad del rechazo agudo y crónico. Por el contario las infecciones post-trasplante se relacionaron inversamente con el rechazo agudo, lo que estaría indicando que una inmunosupresión excesiva podría haber favorecido la aceptación del injerto pero aumentado el riesgo de sufrir infecciones.

2.- El nivel de expresión de CD28 en la membrana de linfocitos T antes del trasplante, mostró valores más elevados en los pacientes que tras el trasplante presentaron menor frecuencia de rechazo agudo, menor severidad de CAV y, por el contario, mayor número de infecciones. En contraste, cifras más elevadas de células T $CD8^+CD28^-$ y $CD4^+CD28^-$ antes del trasplante se asociaron a CAV más severo. Estos biomarcadores, podrían ser de utilidad para predecir la evolución del injerto y con ello, facilitar el ajuste temprano de la terapia inmunosupresora en cada paciente.

3.- Nuestros resultados apoyan que la expresión de CD28 y la de receptores KIR2D en linfocitos T de sangre periférica, son sensores del estado inmunológico de los receptores de injertos de corazón y de hígado. La sobreexpresión de CD28 en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en los periodos de mayor frecuencia de rechazo agudo, es indicativo de una alo-respuesta activa, mientras que la acumulación post-trasplante de células T $CD8^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-KIR2D^+$ se correlaciona con una mejor aceptación temprana del injerto. Estos sensores no se vieron afectados por las infecciones, a excepción de CMV que aparentemente alteró la modulación de CD28 y la expansión de linfocitos T $CD8^+CD28^-$ y $CD8^+CD28^-$ $KIR2D^+$.

4.- El incremento post-trasplante, pero no el nivel pre-trasplante, de sHLA-G se relacionó directamente con protección frente CAV severo. Un perfil de células T más tolerogénicas (cifras elevadas de células $CD8^+CD28^-$ y disminución de CD28 en linfocitos $CD4^+$) se asoció al incremento en la concentración de sHLA-G y al desarrollo de CAV menos severo. El incremento en la concentración de sHLA-G

también se asoció a la reactivación de CMV, lo que sugiere, que dicha infección podría haber inducido la síntesis de sHLA-G, que a largo plazo, favorecería la aceptación del injerto.

5.- Incrementos post-trasplante de la IMF de CD28 sobre linfocitos T $CD4^+$ de sangre periférica superiores al 5%, y de sHLA-G en suero superiores al 0.062%, respecto a sus valores pre-trasplante, se han establecido como biomarcadores de utilidad clínica, con capacidad predictiva de rechazo agudo y crónico (CAV menos severo), respectivamente.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A.K. y Litchman A. H. Inmunología celular y molecular, 5ª edición. Ed: Elservier España, 2004.

Abbas A.K., Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996; 383: 787-93.

Acuto O., Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. Nat Immunol 2003; 3:939-951.

Afzali B., Lechler RI., Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. Tissue Antigens 2007; 69: 545–556 (a).

Afzali B., Lombardi G., Lechler RI. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. Curr Opin Organ Transplant 2008; 13: 438–444.

Afzali B., Lombardi G., Lechler R.I., Lord G.M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin. Exp. Immunol. 2007; 148: 32–46 (b).

Aggarwal S., Ghilardi N., Xie M.H., de Sauvage F.J., Gurney A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 Tcell activation state characterized by the production of interleukin-17. J. Biol. Chem.2003; 278:1910–14.

Ahmed-Ansari A., Tadros T.S., Knopf W.D., Murphy D.A., Hertzler G., Feighan J., Leatherbury A., Sell K.W. Major histocompatibility complex class I and class II expression by myocytes in cardiac biopsies posttransplantation. Transplantation 1988; 45:972-988.

Akbari O., Faul J.L., Hoyte E.G., Berry G.J., Wahlstrom J., Kronenberg M., DeKruyff R.H., Umetsu D.T. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med.* 2006; 354:1117-1129.

Akira S., Kishimoto T. NF-IL6 and NF-kB in cytokine gene regulation. *Adv Immunol* 1997; 65:1-46.

Akira S., Taga T., Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol 1993; 54:1-78.

Almenar L., Delgado J., Crespo M., Segovia J. Trasplante cardiaco en España. Rev Esp Cardiol 2010;63 (Supl 1):132-149.

Almenar L., Maeso M.L.C., Martínez-Dolz L., Rueda J., Palomar C.G., Sáez A.O., Vives M.A., Tort M.D., Pérez M.P. Influence of HLA Matching on Survival in Heart Transplantation. Transplant Proc 2005; 37:4001-4005.

Almenar L., Segovia J., Crespo-Leiro M.G., Palomo J., Arizón J.M., Cobo M., Delgado J.; Equipos Españoles de Trasplante Cardiaco. Spanish registry on heart ransplantation. 22nd official report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure and Heart Transplantation (1984-2010). Rev Esp Cardiol 2011 Dec; 64:1138-1146.

Álvarez-Márquez A., Aguilera I., Blanco R.M., Pascual D., Encarnación-Carrizosa M., Alvarez-López M.R., Wichmann I., Núñez-Roldán A. Positive association of anticytoskeletal endothelial cell antibodies and cardiac allograft rejection. Hum Immunol 2008 Mar;69:143-148.

Anderson JL., Carlquist .JF., Hammond E.H. Deficient natural killer cell activity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Lancet 1982; 2: 1124-1127.

Anfossi N., Doisne J.M., Peyrat M.A., Ugolini S., Bonnaud O., Bossy D., Pitard V., Merville P., Moreau J.F., Delfraissy J.F., Dechanet-Merville J., Bonneville M., Venet A., Vivier E. Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8+ T cells. J Immunol 2004;173:7223-9.

Anfossi N., Pascal V., Vivier E., Ugolini S. Biology of T memory type 1 cells. Immunol Rev 2001;181:269-278.

Angermann C.E., Störk S., Costard-Jäckle A., Dengler T.J., Siebert U., Tenderich G., Rahmel A., Schwarz E.R., Nägele H., Wagner F.M., Haaff B., Pethig K. Reduction of cyclosporine after introduction of mycophenolate mofetil improves chronic renal dysfunction in heart transplant recipients, the IMPROVED multi-centre study. Eur Heart J. 2004;25:1626-34.

Aranda J.M. Jr., Scornik J.C., Normann S.J., Lottenberg R., Schofield R.S., Pauly D.F., Miles M., Hill J.A., Sleasman J.W., Skoda-Smith S. Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) therapy for acute cardiac humoral rejection: a case report. Transplantation. 2002;73:907-10.

Arnett K. L., Parham P. HLA class I nucleotide sequences. Tissue Antigens 1995; 46: 217-257.

Arnon T.I., Achdout H., Levi O., Markel G., Saleh N., Katz G., Gazit R., Gonen-Gross T., Hanna J., Nahari E., Porgador A., Honigman A., Plachter B., Mevorach D., Wolf D.G., Mandelboim O. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. Nat Immunol. 2005;.6:515-523.

Arnon TI, Lev M, Katz G, Chernobrov Y, Porgador A, Mandelboim O. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. Eur J Immunol 2001; 31: 2680-2689.

Arosa FA. CD8+ CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. Immunol Cell Biol 2002; 80:1–13.

Arpinati M., Chirumbolo G., Saunthararajah Y., Stanzani M., Bonifazi F., Bandini G., Baccarani M., Rondelli D. Higher numbers of blood CD14+ cells before starting conditioning regimen correlate with greater risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation from related donors. Biol Blood Marrow Transplant. 2007 Feb;13(2):228-234.

Atalar K, Afzali B, Lord G, Lombardi G. Relative roles of Th1 and Th17 effector cells in allograft rejection. Curr. Opin Transplant. 2009; 14: 23–29.

Aukrust P., Yndestad A., Sandberg W.J., Gullestad L., Damås J.K. T cells in coronary artery disease: different effects of different T-cell subsets. J Am Coll Cardiol. 2007 Oct 9;50(15):1459-1461.

Auphan N., DiDionato J. A., Rosette C., Helmberg A., Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kB activity through induction of IkB synthesis. *Science* 1995; 270:286-290.

Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol 2001; 167:1245–1253.

Bahram S., Bresnahan M., Geraghty D.E., Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:6259-6263.

Bahri R., Hirsch F., Josse A., Rouas-Freiss N., Bidere N., Vasquez A., Carosella E.D., Charpentier B., Durrbach A. Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. J Immunol 2006; 176:1331-1339.

Baker R.J., Hernandez-Fuentes M.P., Brookes P.A., Chaudhry A.N., Lechler R. Comparison of the direct and indirect pathways of allorecognition in chronic allograft failure. Transplant Proc 2001; 33:449.

Banchs H.L., González V., González Canmcel I., Quintana C., Calderón R., Altieri P.I. Heart transplantation in females: the experience in Puerto Rico. Bol Asoc Med P R. 2005; 97:248-56.

Bandrés E., Merino J., Vázquez B., Inogés S., Moreno C., Subirá M.L., Sánchez-Ibarrola A. The increase of IFN-gamma production through aging correlates with the expanded CD8(+high)CD28(-)CD57(+) subpopulation. Clin Immunol. 2000; 96:230-235.

Barbara J.A., Turvey S.E., Kingsley C.I., Spriewald B.M., Hara M., Witzke O., Morris P.J., Wood K.J. Islet allograft rejection can be mediated by $CD4^+$, alloantigen experienced, direct pathway T cells of Th1 and Th2 cytokine phenotype. Transplantation. 2000; 70: 1641–1649.

Barnard C.N. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. S Afr Med J. 1967; 41:1271-1274.

Barten M.J., Rahmel A., Boldt A., Dhein S., Bittner H.B., Tarnok A., Mohr F.W., Gummert J.F. Pharmacodynamic monitoring of the immunosuppressive therapy in patients after heart transplantation: whole blood flow cytometric analysis of lymphocyte function. Comput Biol Med 2007;37:1367-73.

Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science. 1999; 285(5428):727-729.

Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D.R., Zlotnik A., Schall T.J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997; Feb 13;385(6617):640-644.

Beaudreuil S., Samuel D., Rouas-Freiss N., Durrbach A. New aspect of immunosuppressive treatment in liver transplantation. How could you induce tolerance in liver transplantation? Transpl Immunol 2007; 17:98-107.

Ben-Baruch A., Michiel D.F., Oppenheim J.J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. J Biol Chem 1995; 270: 11703-11706.

Benghiat F.S., Charbonnier L.M., Vokaer B., De Wilde V., Le Moine A. Interleukin 17-producing T helper cells in alloimmunity. Transplant Rev.2009; 23: 11–18.

Benichou G., Valujskikh A., Heeger P.S. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol*. 1999;162:352–358.

Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006; 441:235-238.

Beutler B., Cerami A. The biology of cachectin/TNF - A primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:625-655.

Bharat A., Mohanakumar T. Allopeptides and the alloimmune response. Cell. Immunol. 2007; 248: 31–43.

Biassoni R., Cantoni C., Pende D., Sivori S., Parolini S., Vitale M., Bottino C., Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. Immunol Rev. 2001 Jun;181:203-214.

Biassoni R., Falco M., Cambiaggi A., Costa P., Verdiani S., Pende D., Conte R., Di Donato C., Parham P., Moretta L. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by “Group 2” or “Group 1” NK clones. J Exp Med 1995; 182:605-609.

Bilenki L., Yang J., Fan Y., Wang S., Yang X. Natural killer T cells contribute to airway eosinophilic inflammation induced by ragweed through enhanced IL-4 and eotaxin production. *Eur J Immunol.* 2004; 34:345-354.

Billingham M.E., Cary N.R., Hammond M.E., Kemnitz J., Marboe C., McCallister H.A., Snovar D.C., Winters G.L., Zerbe A. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. J Heart Transplant. 1990;9:587-593.

Bjorkman P. J., Saper M. A., Samraoui B., Bennett W. S., Strominger J. L., Wiley D. C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature. 1987; 329:506-512.

Bluestone J.A. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. Immunity 1995; 2: 555–559.

Boleslawski E., BenOthman S., Grabar S., Correia L., Podevin P., Chouzenoux S., Soubrane O., Calmus Y., Conti F. CD25, CD28 and CD38 expression in peripheral blood lymphocytes as a tool to predict acute rejection after liver transplantation. Clin Transplant. 2008 Jul-Aug;22(4):494-501.

Boleslawski E., Othman S.B., Aoudjehane L., Chouzenoux S., Scatton O., Soubrane O., Calmus Y., Delhem N., Conti F. CD28 expression by peripheral blood lymphocytes as a potential predictor of the development of de novo malignancies in long-term survivors after liver transplantation. Liver Transpl. 2011 Mar;17(3):299-305.

Borel J.F. The history of cyclosporine-A and its significance. En: White DJG, editor. Cyclosporine-A: Proceedings of an International Conference on Cyclosporine-A. New York: Elsevier North Holland; 1982.

Boyington J.C., Sun P.D. A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. Mol Immunol 2001; 38:1007-1021.

Brady W.J., Ferguson J.D., Ullman E.A., Perron A.D. Myocarditis: emergency departament recognition and management. Emerg Med Clin N Am. 2004;22:865-885.

Braud VM., Allan D.S., O'Callaghan C.A., Söderström K., D'Andrea A., Ogg G.S., Lazetic S., Young N.T., Bell J.I., Phillips J.H., Lanier L.L., McMichael A.J. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C Nature 1998;391:795-799.

Brenchley J.M., Karandikar N.J., Betts M.R., Ambrozak D.R., Hill B.J., Crotty L.E., Casazza J.P., Kuruppu J., Migueles S.A., Connors M., Roederer M., Douek D.C., Koup R.A. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. Blood 2003; 101:2711–2720.

Brunda M.J. Interleukin-12. J Leukoc Biol. 1994; 55:280-8.

Brzezińska A., Magalska A., Szybińska A., Sikora E. Proliferation and apoptosis of human CD8(+)CD28(+) and CD8(+)CD28(-) lymphocytes during aging. Exp Gerontol 2004;39:539-544.

Caligiuri M. A. Human natural killer cells. Blood 2008; 112:461–469.

Calviño-Santos R.A., Crespo-Leiro M.G., Vázquez-Rodríguez J.M., Salgado-Fernández J., Vázquez-González N., Paniagua-Martín M.J., Castro-Beiras A. Deep vein thrombosis after transfemoral endomyocardial biopsy in cardiac transplant recipients. J Heart Lung Transplant 2005;24:643-644.

Carlquist J.F., Hammond M.E., Yowell R.L., O'Connell J.B., Anderson J.L. Correlation between class II antigen (DR) expression and interleukin-2- induced lymphocyte proliferation during acute cardiac allograft rejection. Transplantation 1990; 50:582-588.

Carlquist J.F., Menlove R.L., Murray M.B., O'Connell J.B., Anderson J.L. HLA class II (DR and DQ) antigen associations in idiopathic dilated cardiomyopathy. Validation study and meta-analysis of published HLA association studies. Circulation 1991 ;83:515-522.

Carosella E.D., Howangyin K.Y., Favier B., Lemaoult J. HLA-G dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. Hum Immunol 2008; 69: 700-7.

Carosella E.D., Moreau P., Le Maoult J., Le Discorde M., Dausset J., Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal–fetal tolerance to tissue acceptance. Adv Immunol 2003; 81:199– 252.

Carrel A. The surgery of blood vessels. Johns Hopkins Hospital Bull. 1907; 18: 28.

Carrel A, Guthrie C. The transplantation of veins and organs. Am J Med. 1905; 10:1105-1905.

Castro L., Gallard T., Montes L., Cobo M., Peña J. Activación de linfocitos. En: ww.inmunologiaenlinea.es. Coordinador: José Peña. Editores: Universidad de Córdoba, Hospital Reina Sofía de Córdoba y Phadia. 2009.

Castro S.M., Sporleder H., Schröeder R., Santos A., Garcia V., Neumann J., Costa S.C. Lymphocyte subpopulations during cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. Braz J Med Biol Res 2003 Jun;36:795-805.

Caumartin J., Favier B., Daouya M., Guillard C., Moreau P., Carosella E.D., LeMaoult J. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. EMBO J 2007; 26:1423-33.

Caves P.k., Billingham M.E., Shumway N.E. Serial transvenus biopsy of transplanted human heart. Improved management of acute rejection episodes. Lancet 1974; 1:821-826.

Caves P.K., Stinson E.B., Billingham M., Shumway N.E. Percutaneous transvenous endomyocardial biopsy in human heart recipients. Experience with a new technique. Ann.Thorac Surg 1973;16:325-336.

Chang C.C., Ciubotariu R., Manavalan J.S., Yuan J., Colovai A.I., Piazza F., Lederman S., Colonna M., Cortesini R., Dalla-Favera R., Suciu-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. Nat Immunol 2002; 3:237-243.

Chan M.C., Giannetti N., Kato T., Kornbluth M., Oyer P., Valantine H.A., Robbins R.C., Hunt S.A. Severe tricuspid regurgitation after heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 2001 Jul;20:709-717.

Chalupny N.J., Rein-Weston A., Dosch S., Cosman D. Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. Biochem Biophys Res Commun 2006; 346:175-181.

Chapman T.L., Heikeman A.P., Bjorkman P.J. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. Immunity. 1999;11:603-613.

Chattopadhyay P.K., Betts M.R., Price D.A., Gostick E., Horton H., Roederer M., De Rosa S.C. The cytolytic enzymes granyzme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. J Leukoc Biol. 2009;85:88-97.

Chen M.M., Lam A., Abraham J.A., Schreiner G.F., Joly A.H. CTGF expression is induced by TGFbeta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. J Mol Cell Cardiol 2000; 32:1805–1819.

Chen S., Kapturczak M.H., Wasserfall C., Glushakova O.Y., Campbell-Thompson M., Deshane J.S., Joseph R., Cruz P.E., Hauswirth W.W., Madsen K.M., Croker B.P., Berns

K.I., Atkinson M.A., Flotte T.R., Tisher C.C., Agarwal A. Interleukin 10 attenuates neointimal proliferation and inflammation in aortic allografts by a heme oxygenase-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:7251-7256.

Chen X., Oppenheim J.J. The phenotypic and functional consequences of tumour necrosis factor receptor type 2 expression on $CD4^{+}FoxP3^{+}$ regulatory T cells. Immunology 2011;133:426-433.

Cheng O., Thuillier R., Sampson E., Schultz G., Ruiz P., Zhang X., Yuen P.S., Mannon R.B. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. Am J Transplant 2006 ;6:2292– 2306.

Chiesa S., Tomasello E., Vivier E., Vely F. Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. Mol Immunol. 2005;42:477-484.

Ciubotariu R., Vasilescu R., Ho E., Cinti P., Cancedda C., Poli L., Late M., Liu Z., Berloco P., Cortesini R., Suciu-Foca Cortesini N. Detection of T Suppressor Cells in Patients with Organ Allografts. *Human Immunology* 2001; 62:15-20.

Clay B.S., Shilling R.A., Bandukwala H.S., Moore T.V., Cannon J.L., Welcher A.A., Weinstock J.V., Sperling A.I. Inducible costimulator expression regulates the magnitude of Th2-mediated airway inflammation by regulating the number of Th2 cells. PLoS One 2009 ;4:e7525.

Coates P.T., Colvin B.L., Hackstein H., Thomson A.W. Manipulation of dendritic cells as an approach to improved outcomes in transplantation. Expert Rev Mol Med 2002;4:1-21.

Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., Lopez-Botet, M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. J Exp Med 1997; 1809–1818.

Colovai A.I., Mirza M., Vlad G., Wang Su., Ho E., Cortesini R., Suciu-Foca N. Regulatory $CD8^{+}CD28^{-}$ T cells in heart transplant recipients. Hum Immunol 2003; 64:31-37.

Commins S.P., Borish L., Steinke J.W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125:S53-72.

Constantin G., Majeed M., Giagulli C., Piccio L., Kim J.Y., Butcher E.C., Laudanna C. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity.* 2000; 13:759-769.

Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol 2001; 22: 633-640.

Coudert J.D., Zimmer J., Tomasello E., Cebecauer M., Colonna M., Vivier E., Held W. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. Blood 2005;106:1711-1717.

Coyle A.J., Lloyd C., Tian J., Nguyen T., Erikkson C., Wang L., Ottoson P., Persson P., Delaney T., Lehar S., Lin S., Poisson L., Meisel C., Kamradt T., Bjerke T., Levinson D., Gutierrez-Ramos J.C. Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med* 1999; 190:895-902.

Créput C., Durrbach A., Menier C., Guettier C., Samuel D., Dausset J., Charpentier B., Carosella E.D., Rouas-Freiss N. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. J Hepatol 2003;39:587-594 (a).

Créput C., Le Friec G., Bahri R., Amiot L., Charpentier B., Carosella E., Rouas-Freiss N., Durrbach A. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. Hum Immunol. 2003;64:1033-1038 (b).

Crisa L., McMaster M.T., Ishii J. K., Fisher S.J., Salomon D.R. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. J. Exp. Med. 1997;186: 289–298.

Crome S.Q., Wang A.Y., Levings M.K. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. Clin Exp Immunol. 2010; 159:109-19.

Crough T., Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. Clin Microbiol Rev 2009 ;22:76-98.

Csencsits K., Wood S.C., Lu G., Faust S.M., Brigstock D., Eichwald E.J., Orosz C.G., Bishop D.K. Transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor and chronic allograft rejection. Am J Transplant 2006; 959–966.

Cua D.J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C.A., Joyce B., Seymour B., Lucian L., To W., Kwan S., Churakova T., Zurawski S., Wiekowski M., Lira S.A., Gorman D., Kastelein R.A., Sedgwick J.D. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature 2003; 421:744–748.

Daar A.S., Fuggle S.V., Fabre J.W., Ting A., Morris P.J. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. Transplantation 1984 ;38:287-292 (a).

Daar AS., Fuggle S.V., Fabre J.W., Ting A., Morris P.J. The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. Transplantation. 1984;38:293-298 (b).

Dale D.C., Boxer L., Liles W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. Blood 2008; 112:935-945.

Dale D.C., Fauci A.S., Guerry D.IV., Wolff S.M. Comparison of agents producing a neutrophilic leukocytosis in man. J Clin Invest 1975; 56:808-813.

Dallman M.J., Larsen C.P., Morris P.J. Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 1991;174:493– 496.

Das A., Saxena R.K. Role of interaction between Ly49 inhibitory receptors and cognate MHC I molecules in IL2-induced development of NK cells in murine bone marrow cell cultures. *Immunol Lett* 2004;94:209-214.

Delgado J.F., Sánchez V., Sáenz de la Calzada C. Acute rejection after heart transplantation. Expert.Opin. Pharmacother 2006; 7:1139-1149.

Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F., Giudizi M.G., Biagiotti R., Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol.* 1993; 150:353-360.

De Winter P., Leoni P., Abraham D. Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. Growth Factors 2008; 26:80–91.

Diaz J.A., Booth A.J., Lu G., Wood S.C., Pinsky D.J., Bishop D.K. Critical role for IL-6 in hypertrophy and fibrosis in chronic cardiac allograft rejection. Am J Transplant. 2009 ;9:1773-1783.

Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T., Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. J Exp Med 2001; 193: 1303-1310.

Dinarello C.A. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 2000; 11:483-486.

Dinarello C.A., Wolff S.M. The role of interleukin-1 in disease. N Engl J Med 1993; 328:106-1013.

Domínguez-Villar M., Muñoz-Suano A., Anaya-Baz B., Aguilar S., Novalbos J.P., Giron J.A., Rodríguez-Iglesias M., Garcia-Cozar F. Hepatitis C virus core protein up-regulates anergy-related genes and a new set of genes, which affects T cell homeostasis. J Leukoc Biol 2007; 82:1301-1310.

Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:329-333.

Dumitriu I.E., Araguás E.T., Baboonian C., Kaski J.C. CD4+ CD28 null T cells in coronary artery disease: when helpers become killers. Cardiovasc Res 2009; 81:11-19.

Eckstein R., Mempel W., Bolte H.D. Reduced suppressor cell activity in congestive cardiomyopathy and in myocarditis. Circulation 1982 ;65:1224-1229.

Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. Immunol Rev 2005; 205:147-157.

Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppler HA, Starling RC, Sørensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH, Bernhardt P; RAD B253 Study Group. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. N Engl J Med. 2003; 349:847-858.

Ellis, S. A., Sargent, I. L., Redman, C. W., and McMichael, A. J. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. Immunology. 1986; 59, 595–601.

Epstein SE, Zhou YF, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. Circulation 1999; 100: e20-28.

Eylar EH, Lefranc CE, Yamamura Y, Báez I, Colón-Martinez SL, Rodriguez N, Breithaupt TB. HIV infection and aging: enhanced Interferon- and Tumor Necrosis Factor-alpha production by the $CD8^+$ $CD28^-$ T subset. BMC Immunol 2001; 2:10.

Fábrega E., López-Hoyos M., San Segundo D., Casafont F., Pons-Romero F. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15:629-633.

Fan Y.Y., Yang B.Y., Wu C.Y. Phenotypically and functionally distinct subsets of natural killer cells in human PBMCs. *Cell Biol Int* 2008; 32: 188–197.

Farrar M.A., Schreiber R.D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. Annu Rev Immunol 1993; 11:571-611.

Faust S.M., Lu G., Marini B.L., Zou W., Gordon D., Iwakura Y., Laouar Y., Bishop D.K. Role of T cell TGFbeta signaling and IL-17 in allograft acceptance and fibrosis associated with chronic rejection. J Immunol 2009;183:7297-7306.

Favero J. y Lafont V. Effector pathways regulating T cell activation. Biochemical Pharmacology 1998; 56: 1539-1547.

Fehérvari Z., Sakaguchi S. $CD4^+$ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004;114:1209-1217.

Fenoglio D., Ferrera F., Fravega M., Balestra P., Battaglia F., Proietti M., Andrei C., Olive D., Antonio L.C., Indiveri F., Filaci G. Advancements on phenotypic and functional characterization of non-antigen-specific CD8+ CD28- regulatory T cells. Hum Immunol 2008; 69:745–750.

Fernández-Miguel G, Alarcón B, Iglesias A, Bluethmann H, Alvarez-Mon M, Sanz E, de la Hera A. Multivalent structure of an alphabetaT cell receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:1547-1552.

Figuera Aymerich D. The history of the heart transplant in Spain. Rev Esp Cardiol 1995;48 Suppl 7:7-10.

Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, Ansaldo G, Borgonovo G, Traverso P, Villaggio B, Ferrera A, Kunkl A, Rizzi M, Ferrera F, Balestra P, Ghio M, Contini P, Setti M, Olive D, Azzarone B, Carmignani G, Ravetti JL, Torre G, Indiveri F. $CD8^+$ $CD28^-$ T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J Immunol* 2007; 179:4323–4334.

Filaci G., Fravega M., Fenoglio D., Rizzi M., Negrini S., Viggiani R., Indiveri F. Non-antigen specific $CD8^+$ T suppressor lymphocytes. *Clin Exp Med* 2004; 4:86–92.

Fons P., Chabot S., Cartwright J.E., Lenfant F., L'Faqihi F., Giustiniani J., Herault J.P., Gueguen G., Bono F., Savi P., Aguerre-Girr M., Fournel S., Malecaze F., Bensussan A., Plouët J., Le Bouteiller P. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* 2006; 108:2608–2615.

Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.

Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005;6:331-337.

French L.E., Hahne M., Viard I., Radlgruber G., Zanone R., Becker K., Müller C., Tschopp J. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol* 1996 ;133:335-343.

Fretz, H., Albers, M. W., Galat, A., Standaert, R. F., Lane, W. S., Burakoff, A. J., Crabtree, G., Schreiber, S. L. Rapamycin and FK506 binding proteins (immunophilins) *J. Am. Chem. Soc* 1991; 113:1409–1411.

Fuse S., Zhang W., Usherwood E. J. Control of memory CD8 T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response. *J Immunol* 2008; 180:1148-1157.

Gallagher G., Eskdale J., Jordan W., Peat J., Campbell J., Boniotto M., Lennon G.P., Dickensheets H., Donnelly R.P. Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4:615-626.

García-Alonso A.M., Minguela A., Muro M., Ontañón J., Torío A., Marín L., López-Segura P., Miras M., Alvarez-López M.R. CD28 expression on peripheral blood T lymphocytes after orthotopic liver transplant: upregulation in acute rejection. *Hum Immunol* 1997 Mar;53:64-72.

Garrett H.J., Duvall-Seaman D., Helsley B., Groshart K. Treatment of vascular rejection with rituximab in cardiac transplantation. J Heart Lung Transplant. 2005;24:1337-1342.

Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; 436:1186-1190.

Gerard J. Tortora y Bryan H. Derrickson, 11ª edición. Principios de anatomía y fisiología, 2006.

Gerard J. Tortora y Bryan Derrickson, 2ª edición.Principles of anatomy and physiology, 2008.

Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schönbeck U. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implication for atherogenesis. *J. Exp. Med.* 2002; 195:245–257.

Gerli R., Rambotti P., Spinozzi F., Bertotto A., Chiodini V., Solinas P., Gernini I., Davis S. Immunologic studies of peripheral blood from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J.* 1986;112:350-355.

Gokmen M.R., Lombardi G., Lechler R.I. The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr. Opin. Immunol* 2008; 20: 568–574.

González-Molina Alcaide, M. y Alonso Ortiz, A. Biología de la inmunosupresión del trasplante de órganos. Ed: Novartis Farmacéutica, España, 2005.

Goodfellow P.N., Jones E.A., Van Heyningen V., Solomon E., Bobrow M., Miggiano V., Bodmer W.F. The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* 1975;254:267-269.

Grazia T.J., Plenter R.J., Weber S.M., Lepper H.M., Victorino F., Zamora M.R., Pietra B.A., Gill R.G. Acute cardiac allograft rejection by directly cytotoxic CD4 T cells: parallel requirements for Fas and perforin. *Transplantation* 2010; 89:33-39.

Gredmark S., Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits differentiation of monocytes into dendritic cells with the consequence of depressed immunological functions. *J Virol* 2003 ;77:10943-10956.

Gregori S., Magnani C.F., Roncarolo M.G. Role of human leukocyte antigen-G in the induction of adaptive type 1 regulatory T cells. *Hum Immunol* 2009; 70:966-969.

Grewal I.S., Foellmer H.G., Grewal K.D., Xu J., Hardardottir F., Baron J.L., Janeway C.A. Jr, Flavell R.A: Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1996, 273:1864-1867.

Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R., Ferguson T.A. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. Science. 1995;270:1189-1892.

Groetzner J., Meiser B., Landwehr P., Buehse L., Mueller M., Kaczmarek I., Vogeser M., Daebritz S., Ueberfuhr P., Reichart B. Mycophenolate mofetil and sirolimus as calcineurin inhibitor-free immunosuppression for late cardiac-transplant recipients with chronic renal failure. *Transplantation* 2004; 77:568-574.

Groh V., Rhinehart R., Randolph-Habecker J., Topp M.S., Riddell S.R., Spies T. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 2:255-260.

Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H., Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6879-6884.

Groh V., Steinle A., Bauer S., Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; 279: 1737–1740.

Guery JC, Adorini L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to clase II- restrictes T cells. J. Immunol. 1995;154: 536-544.

Gumá M., Angulo A., López-Botet M. NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection. Curr Top Microbiol Immunol 2006;298: 207-223.

Gunturi A., Berg R.E., Forman J. The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity. Immunol Res 2004; 30: 29-34.

Hadaya K., de Rham C., Bandelier C., Bandelier C., Ferrari-Lacraz S., Jendly S., Berney T., Buhler L., Kaiser L., Seebach J.D., Tiercy J.M., Martin P.Y., Villard J. Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008;8:2674-2683.

Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med. 2004 Dec 23;351:2715-2729.

Halloran PF, Miller LW, Urmson J, Ramassar V, Zhu LF, Kneteman NM, Solez K, Afrouzian M. IFN-gamma alters the pathology of graft rejection: protection from early necrosis. *J Immunol*. 2001; 166:7072–7081.

Hansson G.K., Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology* 2011;12: 204-212.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT . Interleukin 17-producing $CD4^+$ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 2005; 6:1123–1132.

Hart-Matyas M., Nejat S., Jordan J.L., Hirsch G.M., Lee TD. IFN-gamma and Fas/FasL pathways cooperate to induce medial cell loss and neointimal lesion formation in allograft vasculopathy. *Transpl Immunol* 2010 ;22:157-164.

Hart O.M., Athie-Morales V., O'Connor G.M., Gardiner C.M. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 2005; 175:1636-1642.

Hathcock K.S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P., Hodes R.J. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. J Exp Med 1994; 180:631–640.

Healy D.G., Watson R.W., Fitzpatrick J.M., Wood A.E. Differential white cell count relationships with human cardiac allograft rejection. *Transplant Proc* 2007; 39:218-222.

Heeger P.S. T cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update*. Am. J.* Transplant 2003; 3: 525–533.

Hernandez-Fuentes M.P., Baker R.J., Lechler R.I. The alloresponse. *Rev. Immunogenet*. 1999;1: 282–296.

Herrera O.B., Golshayan D., Tibbott R., Salcido Ochoa F., James M.J., Marelli-Berg F.M., Lechler R.I. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol* 2004; 173:4828–4837.

Hirokawa M, Kuroki J, Kitabayashi A, Miura AB. Transmembrane signalling through CD80 (B7-1) induces growth arrest and cell spreading of human B lymphocytes accompanied by protein tyrosine phosphorylation. Immunol Lett 1996; 50:95–98.

Holland S.M., DeLeo F.R., Elloumi H.Z., Hsu A.P., Uzel G., Brodsky N., Freeman A.F., Demidowich A., Davis J., Turner M.L., Anderson V.L., Darnell D.N., Welch P.A., Kuhns D.B., Frucht D.M., Malech H.L., Gallin J.I., Kobayashi S.D., Whitney A.R., Voyich J.M., Musser J.M., Woellner C., Schäffer A.A., Puck J.M., Grimbacher B. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med.* 2007; 357:1608-1619.

Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdörfer B., Giese T., Endres S., Hartmann G. Quantitative expression of Toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531–4537.

Horuzsko A., Lenfant F., Munn D.H., Mellor A.L. Maturation of antigen presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. *Int Immunol* 2001; 13:385-394.

Höyer S., Berglin E., Pettersson G., Edvardsson N., Waagstein F. Cardiac transplantation in patients with active myocarditis. *Transplant Proc* 1990; 22:1450.

Huang N., Han S., Hwang I., Kehrl J. B cells productively engage soluble antigen-pulsed dendritic cells: visualization of live-cell dynamics of B cell-dendritic cell interactions. *J. Immunol* 2005; 175:7125–7134.

Inaba K., Witmer-Pack M., Inaba M., Hathcock K.S., Sakuta H., Azuma M., Yagita H., Okumura K., Linsley P.S., Ikehara S., Muramatsu S., Hodes R.J., Steinman R.M. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* 1994; 180:1849–1860.

Ishitani A., Geraghty D. Alternative Splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3947-3951.

Issa F., Schiopu A., Wood K.J. Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; 6:155-169.

Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 1991; 66:233-243.

Izutani H., Miyagawa S., Shirakura R., Matsumiya G., Nakata S., Shimazaki Y., Matsuda H. Evidence that graft coronary arteriosclerosis begins in the early phase after transplantation and progresses without chronic immunoreaction. *Transplant* 1995; 60:1073–1079.

Janssens W., Carlier V., Wu B., VanderElst L., Jacquemin M.G., Saint-Remy J.M. CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol* 2003; 171: 4604-4612.

Jeannin P., Delneste Y., Lecoanet-Henchoz S., Gauchat J.F., Ellis J., Bonnefoy J.Y. CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *J Biol Chem* 1997; 272:15613–15619.

Jensen P. E. Recent advances in antigen processing and presentation. Nat Immunol 2007; 8:1041-1048.

Jiang S., Herrera O., Lechler R.I. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 550–557.

Jiang S., Lechler R.I., He X.S., Huang J.F. Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Hum Immunol* 2006; 67:765-776.

Jiménez R., Carracedo J., Ramírez R., Rodríguez A., del Castillo D., Pérez R., Aljama P. Senescencia replicativa en células T $CD8^+$ de pacientes con rechazo agudo en trasplante renal. *Nefrología* 2006; 26: 609-614.

Jinushi M., Takehara T., Kanto T., Tatsumi T., Groh V., Spies T., Miyagi T., Suzuki T., Sasaki Y., Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003; 170:1249–1256.

Johnson D.E., Alderman E.L., Schroeder J.S., Gao S.Z., Hunt S., DeCampli W.M., Stinson E., Billingham M: Transplant coronary artery disease: Histopathological correlations with angiographic morphology. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:449 -457.

Jonasson L., Tompa A., Wikby A. Expansion of peripheral CD8+ T cells in patients with coronary artery disease: relation to cytomegalovirus infection. Journal of Internal Medicine 2003; 254:472-478.

Josefowicz S.Z., Lu L.F., Rudensky A.Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:531-564.

June C.H., Bluestone J.A., Nadler L.M., Thompson C.B: The B7 and CD28 receptor families. Immunol Today 1994; 15: 321–331.

Kaczmarek I., Deutsch M.A., Rohrer M.E., Beiras-Fernandez A., Groetzner J., Daebritz S., Schmoeckel M., Spannagl M., Meiser B., Reichart B. HLA-DR Matching Improves

Survival After Heart Transplantation: Is it Time to Change Allocation Policies?. J Heart Lung Transplant 2006; 25:1057-1062.

Kaech S.M., Wherry E.J., Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:251–262.

Kahan BD. Cyclosporine. N Engl J Med 1989;321:1725-1738.

Kamradt T, Mitchinson NA. Tolerance and Autoimmunity. N Eng J Med 2001; 344: 655-664.

Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114:1265-1274.

Keogh A. Calcineurin inhibitors in heart transplantation. J Heart Lung Transplant 2004;23:S202-206.

Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, Macdonald P, Esmore D, Muller D, Faddy S. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. Circulation. 2004;110:2694-2700.

Khanna, A. K., Hosenpud, J. S., Plummer, M. S., & Hosenpud, J. D. Analysis of transforming growth factor-h and profibrogenic molecules in a rat cardiac allograft model treated with cyclosporine. Transplantation 2002; 73: 1543– 1549.

Kim KS, Denton MD, Chandraker A, Knoflach A, Milord R, Waaga AM, Turka LA, Russell ME, Peach R, Sayegh MH. CD28-B7- mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection: differential role of B7-1 in initiation versus progression of graft arteriosclerosis. Am J Pathol 2001; 158: 977-986.

Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E Dausset J, Carosella ED. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblast and evidence for the presence of HLA-G transcrip in adult lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 4209-4213.

Kishimoto C, Hiraoka Y. Clinical and experimental studies in myocarditis.Curr Opin Cardiol. 1994;9:349-356.

Klaus S. J., PinchuK H. D., Ochs H. D., Law C. L., Fanslow W. C., Armitage R. J., Clark E. A. Costimulation through CD28 enhance T cell-dependet B cell activation via CD40-CD40L. *J Immunol* 1994; 152:5643-5652.

Klein J, Sato A. The HLA system. First of Two parts. N Engl J Med. 2000;343:702-709.

Klinkert ME. Lymphoid dendritic accesory cells of the rat, Immunol Rev 1990; 117: 103-120.

Kobashigawa J.A., Kirklin J.K., Naftel D.C., Bourge R.C., Ventura H.O., Mohanty P.K., Cintron G.B., Bhat G. Pretransplantation risk factors for acute rejection after heart transplantation: a multiinstitutional study. The Transplant Cardiologists Research Database Group. *J.Heart Lung Transplant* 1993;12:355-366.

Kobashigawa J., Miller L., Renlund D., Mentzer R., Alderman E., Bourge R., Costanzo M., Eisen H., Dureau G., Ratkovec R., Hummel M., Ipe D., Johnson J., Keogh A., Mamelok R., Mancini D., Smart F., Valantine H. A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. Transplantation. 1998;66:507-515.

Kolanus W, Romeo C, Seed B. T cell activation by clustered tyrosine kinases. Cell. 1993; 74:171-183.

Konforte D., Simard N., Paige C.J. IL-21: an executor of B cell fate. *J Immunol.* 2009; 182:1781-1787.

Koppel E.A., Wieland C.W., Van den Berg V.C., Litjens M., Florquin S., Van Kooyk Y., Van der Poll T., Geijtenbeek T.B. Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary Streptococcus pneumoniae infection. *Eur. J. Immunol* 2005; 35:2962–2969.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. Nature.2007; 448:484–487.

Kowalski R.J., Post D.R., Mannon R.B., Sebastian A., Wright H.I., Sigle G., Burdick J., Elmagd K.A., Zeevi A., Lopez-Cepero M., Daller J.A., Gritsch HA, Reed EF, Jonsson J, Hawkins D, Britz JA. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. Transplantation. 2006;82:663-668.

Kreijveld E., Koenen H. J. P. M., van Cranenbroek B., van Rijssen E., Joosten I., Hilbrands L. B. Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS ONE* 2008; 3: e2711.

Kubala L., Cíz M., Vondrácek J., Cerný J., Nemec P., Studeník P., Cizová H., Lojek A. Perioperative and postoperative course of cytokines and the metabolic activity of neutrophils in human cardiac operations and heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124:1122-1129.

Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995; 80:707–18.

Labarrere C.A., Jaeger B.R. Biomarkers of heart transplant rejection: the good, the bad, and the ugly!. Transl Res. 2012 ;159:238-251.

Lanier LL. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev.* 2009; 227: 150–160.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:225-274.

Lanzavecchia A., Sallusto F. Dynnamics of T lymphocyte Responses Intermediates, effector and memory cells. *Science* 2000; 290: 92-97.

Leask A., Abraham D.J. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol 2003*;81:355–363.

Lechler R. I., Lombardi G., Batchelor J. R., Reinsmoen N., Bach F. H. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11:83-88.

Le Discorde M., Moreau P., Sabatier P., Legeais J.M., Carosella E.D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum. Immunol* 2003; 64:1039–1044.

Le Dréan E., Vély F., Olcese L., Cambiaggi A., Guia S., Krystal G., Gervois N., Moretta A., Jotereau F., Vivier E. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* 1998; 28:264-276.

Le Friec G., Laupèze B., Fardel O., Sebti Y., Pangault C., Guilloux V., Beauplet A., Fauchet R., Amiot L. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol* 2003 ;64:752-761.

Le Gal F.A., Riteau B., Sedlik C., Khalil-Daher I., Menier C., Dausset J., Guillet J.G., Carosella E.D., Rouas-Freiss N. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 1999; 11: 1351-1356.

Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73:1373–1381.

LeMaoult J., Caumartin J., Daouya M., Favier B., Le Rond S., Gonzalez A., Carosella E.D. Immune regulation by pretenders: Cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 2007; 109: 2040-2048.

LeMaoult J., Krawice-Radanne I., Dausset J., Carosella E.D. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive $CD4^+$ T cells. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:7064–7069.

LeMaoult J., Rouas-Freiss N., Carosella E.D. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. *Autoimmun Rev* 2005; 4:503-509.

Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, Nabavi N, Jellis CL, Gray GS, Miller J, Bluestone JA. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11054–11058.

Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:233–258.

Le Priol Y, Puthier D, Lécureuil C, Combadière C, Debré P, Nguyen C, Combadière B. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent $CD8^+CD57^+$ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol* 2006;177:5145-5154.

Le Rond S., Azema C., Krawice-Radanne I., Durrbach A., Guettier C., Carosella E.D., Rouas-Freiss N. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *J Immunol* 2006; 176:3266–3276.

Le Rond S., Le Maoult J., Créput C., Menier C., Deschamps M., Le Friec G., Amiot L., Durrbach A., Dausset J., Carosella E.D., Rouas-Freiss N. Alloreactive CD4+ and CD8+ T

cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. *Eur J Immunol* 2004 Mar; 34:649-660.

Lerut J., Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2006;6:1774-1780.

Libri V., Azevedo R.I., Jackson S.E., Di Mitri D., Lachmann R., Fuhrmann S., Vukmanovic-Stejic M., Yong K., Battistini L., Kern F., Soares M.V., Akbar A.N. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional $CD4^{+}CD45RA^{+}CD27^{-}$ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology* 2011; 132:326-339.

Li H, Pascal V, Martin MP, Carrington M, Anderson SK. Genetic Control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-direccional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genetics* 2008; 4:e1000254.

Li J, Liu Z, Jiang S, Cortesini R, Lederman S, Suciu-Foca N. T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J Immunol*. 1999; 163:6386-6392.

Lila N., Amrein C., Guillemain R., Chevalier P., Latremouille C., Fabiani J.N., Dausset J., Carosella E.D., Carpentier A. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. Circulation. 2002; 105:1949-1954.

Lila N., Carpentier A., Amrein C., Khalil-Daher I., Dausset J., Carosella E.D. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 2000; 355:2138.

Liles W.C., Kiener P.A., Ledbetter J.A., Aruffo A., Klebanoff S.J. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. J Exp Med. 1996;184:429-440.

Lindelow B., Bergh C., Lamm C., Andersson B., Waagstein F. Graft coronary artery disease is strongly related to the aetiology of heart failure and cellular rejections. *Eur Heart J* 1999; 20: 1326-1334.

Linsley P.S., Brady W., Urnes M., Grosmaire L.S., Damle N.K., Ledbetter J.A. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*. 1991 ;174:561-569.

Linsley P.S., Ledbetter J.A: The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 191–212.

Lin Y. X., Wang L. L., Yan L. N., Cai P., Li B., Wen T. F., Zeng Y. Analysis of $CD8^+CD28^-$ T-suppressor cells in living donor liver transplant recipients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8:241-246.

Litwin V., Gumperz J., Parham P., Phillips J.H., Lanier L.L. NKB1: An NK cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J. Exp. 1994*; Med. 180:537–543.

Liu G., Butany J. Morphology of graft arteriosclerosis in cardiac transplant recipients. *Hum Pathol* 1992 ;23:768-773.

Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Lederman S, Suciu-Foca N. Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by T suppressor cells. *Hum Immunol* 1999; 60:568-574.

Liu Z., Tugulea S., Cortesini R., Suciu-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted $CD8^+CD28^-$ T cells. *Int Immunol* 1998; 10:775-783.

Liuzzo G., Goronzy J.J., Yang H., Kopecky S.L., Holmes D.R., Frye R.L., Weyand C.M. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. Circulation. 2000;101:2883-2888.

Ljunggren H.G., Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11:237-244.

Llano M., Lee N., Navarro F., García P., Albar J.P., Geraghty D.E., López-Botet M. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 1998;28:2854-2863.

Lodoen M.B., Lanier L.L. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:391-398.

Long E.O. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells.; *Immunity* 2007; 26:385-387.

Loong, C.C., Hsieh, H.G., Lui, W.Y., Chen, A., Lin, C.Y. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J. Pathol* 2002; 197:322-332.

López Álvarez MR. HLA-C y células T $CD8^{+}KIR2D^{+}$ en trasplante hepático. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 2011.

López-Álvarez MR, Moya-Quiles MR, Minguela A, Gil J, Miras M, Campillo JA, Díaz-Alderete MA, García-Alonso AM, Sánchez-Bueno F, Vicario JL, Muro M, Alvarez-López MR. HLA-C matching and liver transplants. Donor-recipient genotypes influence early outcome and $CD8^{+}KIR2D^{+}$ T cells recuperation. *Transplantation* 2009; 88:S54-61.

López-Botet M, Bellón T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11:301-307.

Lower, R.R., Shumway, N.E: Studies on orthotopic homotransplantation of the canine heart. S*urg. Forum* 1960; 11:18-19.

Luckraz H., Charman S.C., Wreghitt T., Wallwork J., Parameshwar J., Large S.R. Does cytomegalovirus status influence acute and chronic rejection in heart transplantation during the ganciclovir prophylaxis era? *J Heart Lung Transplant* 2003; 22:1023-1027.

Luque J., Torres M.I., Aumente M.D., Marín J., García-Jurado G., González R., Pascual D., Guerra N., López-Rubio F., Alvarez-López M.R., Arizón J.M., Peña J. Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy. *Hum Immunol* 2006; 67:257-263.

Luster A. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Eng J Med* 1998; 338:436–445.

Mahle WT, Fourshee MT, Naftel DM, Alejos JC, Caldwell RL, Uzark K, Berg A, Kanter KR; Pediatric Heart Transplant Study Group. Does cytomegalovirus serology impact outcome after pediatric heart transplantation?. Pediatric Heart Transplant Study Group. J Heart Lung Transplant. 2009;28:1299-1305.

Manavalan J. S., Kim-Schulze S., Scotto L., Naiyer A. J., Vlad G., Colombo P.C., Marboe C., Manzini D., Cortesini R., Suciu-Foca N. Alloantigen specific $CD8^{+}CD28^{-}$ $FOXP3^{+}$ T suppressor cells induce $ILT3^{+}ILT4^{+}$ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 2004; 16:1055-1068.

Mandelboim O., Lieberman N., Lev M., Paul L., Arnon T.I., Bushkin Y., Davis D.M., Strominger J.L., Yewdell J.W., Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001; 409:1055-1060.

Manetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., Piccinni M.P., Maggi E., Trinchieri G., Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. J Exp Med 1993; 177:1199-1204.

Marín L., Minguela A., Moya-Quiles M.R., Torío A., Muro M., García-Alonso A.M., Sánchez-Bueno F., Bru M., Parrilla P., Álvarez-López M.R. Expression of CD95 and apoptosis induction in peripheral blood cells from liver graft recipients. Transplant Proc 2002;34:280-282.

Martín M. y Jaraquemada D. Procesamiento de Antígenos. En: www.inmunologiaonline.es. Coordinador: José Peña. Editores: Universidad de Córdoba y Sweden Diagnostics. 2003.

Martínez-Dolz L., Almenar L., Arnau M.A., Osa A., Rueda J., Vicente J.L., García-Sánchez F., Palencia M., Caffarena J.M. Analysis of factors that can influence the appearance of acute heart transplant failure. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56:168-174.

Martínez-Llordella M., Lozano J.J., Puig-Pey I., Orlando G., Tisone G., Lerut J., Benítez C., Pons J.A., Parrilla P., Ramírez P., Bruguera M., Rimola A., Sánchez-Fueyo A. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; 118:2845-2857.

Martorell J. Bases Inmunológicas del rechazo. En: Cuervas-Mons V, del Castillo-Olivares JL editores. Introducción al trasplante de órganos y tejidos. 2ª ed. Arán ediciones, Madrid 1999; 135-144.

McCormack P.L., Keating G.M. Tacrolimus: in heart transplant recipients. Drugs. 2006; 66:2269-2279.

Mehra M.R., Crespo-Leiro M.G., Dipchand A., Ensminger S.M., Hiemann N.E., Kobashigawa J.A., Madsen J., Parameshwar J., Starling R.C., Uber P.A. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29:717-727.

Mendler M., Kwok H., Franco E., Baron P., Weissman J., Ojogho O. Monitoring peripheral blood CD4+ adenosine triphosphate activity in a liver transplant cohort:

insight into the interplay between hepatitis C virus infection and cellular immunity. *Liver Transpl* 2008; 14:1313-1322.

Merino J, Martínez-González MA, Rubio M, Inogés S, Sánchez-Ibarrola A, Subirá ML. Progressive decrease of CD8high^{+}CD28^{+}CD57^{-} cells with ageing. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:48-51.

Mestroni L., Rocco C., Gregori D., Sinagra G., Di Lenarda A., Miocic S., Vatta M., Pinamonti B., Muntoni F., Caforio A.L., McKenna W.J., Falaschi A., Giacca M., Camerini. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:181-190.

Methe H., Zimmer E., Grimm C., Nabauer M., Koglin J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation* 2004; 78:1324–1331.

Millán O., Sánchez-Fueyo A., Rimola A., Guillen D., Hidalgo S., Benitez C., Campistol J.M., Brunet M. Is the intracellular ATP concentration of CD4+ T-Cells a predictive biomarker of immune status in stable transplant recipients? Transplantation. 2009; 88:S78-84.

Miller DM, Zhang Y, Rahill BM, Waldman WJ, Sedmak DD. Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. J Immunol 1999; 162:6107-6113.

Milner J.D., Brenchley J.M., Laurence A., Freeman A.F., Hill B.J., Elias K.M., Kanno Y., Spalding C., Elloumi H.Z., Paulson M.L., Davis J., Hsu A., Asher A.I., O'Shea J., Holland S.M., Paul W.E., Douek D.C. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008; 452:773-776.

Minegishi Y., Saito M., Nagasawa M., Takada H., Hara T., Tsuchiya S., Agematsu K., Yamada M., Kawamura N., Ariga T., Tsuge I., Karasuyama H. Molecular explanation for

the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J Exp Med* 2009; 206:1291-1301.

Mingari M. C., Ponte M., Cantoni C., Vitale C., Schiavetti F., Bertone S., Bellomo R., Tradori-Cappai A., Biassoni R. HLA-class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: molecular characterization, distribution in lymphoid tissues and co-expression by individual T cells**.** *Int Immunol* 1997; 9:485-491.

Mingari M. C., Schiavetti F., Ponte M., Vitale C., Maggi E., Romagnani S., Demarest J., Pantaleo G., Fauci A. S., Moretta L. Human $CD8^+$ T lymphocyte subsets that express HLA class-I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc Natl Acad Sci USAl* 1996; 93:12433-12438.

Minguela A. Células y factores solubles implicados en el mantenimiento y ruptura de la tolerancia en el trasplante hepático. Tesis doctoral. Murcia. Universidad de Murcia. 1998.

Minguela A., García-Alonso A.M., Marín L., Torio A., Sánchez-Bueno F., Bermejo J., Parrilla P., Alvarez-López M.R. Evidence of CD28 upregulation in peripheral T cells before liver transplant acute rejection. *Transplant Proc* 1997; 29:499-500.

Minguela A., Marín L., Torío A., Muro M., García- Alonso A. M., Moya- Quiles M. R., Sánchez Bueno F., Parrilla P., Álvarez- López M. R. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 costimulatory molecules are mainly involved in acceptance or rejection of human liver transplant. *Hum Immunol* 2000; 61:658-669.

Minguela A, Miras M, Bermejo J, Sánchez-Bueno F, López-Alvarez MR, Moya-Quiles MR, Muro M, Ontañón J, Garía-Alonso AM, Parrilla P, Alvarez-López MR. HBV and HCV infections and acute rejection differentially modulate CD95 and CD28 expression on peripheral blood lymphocytes after liver transplantation. Hum Immunol. 2006;67:884-893.

Mirabet S, Gelpí C, Roldán C, Brossa V, Mendoza CA, Lopez L, Molto E, Alvaro Y, Martinez V, Padró JM, Roig E. Assessment of immunological markers as mediators of graft vasculopathy development in heart transplantation. *Transplant Proc* 2011; 43:2253-2256.

Mitchell R.N. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. Annu Rev Pathol. 2009;4:19-47.

Mitchell R.N., Libby P. Vascular remodeling in transplant vasculopathy. *Circ Res* 2007;100:967-978.

Miura M., El-Sawy T., Fairchild R.L. Neutrophils mediate parenchymal tissue necrosis and accelerate the rejection of complete major histocompatibility complex-disparate cardiac allografts in the absence of interferon-gamma. *Am J Pathol* 2003; 162:509-519.

Mizutani K., Terasaki P., Bignon J.D., Hourmant M., Cesbron-Gautier A., Shih R.N., Pei R., Lee J., Ozawa M: Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum Immunol* 2006; 67:683–691.

Molet S., Hamid Q., Davoine F., Nutku E., Taha R., Pagé N., Olivenstein R., Elias J., Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:430-438.

Molinero LL, Marcos CY, Mirbaha F, Fainboim L, Stastny P, Zwirner NW. Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. *Eur J Immunogenet* 2002; 29:315-319.

Monk N.J., Hargreaves R.E., Simpson E., Dyson J.P., Jurcevic S. Transplant tolerance: models, concepts and facts. *J Mol Med* 2006; 84:295-304.

Moreau P., Adrian-Cabestre F., Menier C., Guiard V., Gourand L., Dausset J., Carosella E.D., Paul P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999; 11:803–811.

Moreau P., Dausset J., Carosella E.D., Rouas-Freiss N. Viewpoint on the functionality of the human leukocyte antigen-G null allele at the fetal-maternal interface Biol Reprod 2002; 67:1375-1378.

Moreau P, Flajollet S, Carosella ED. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med* 2009; 13:2973-2989.

Moretta A., Bottino C., Pende D., Tripodi G., Tambussi G., Viale O., Orengo A., Barbaresi M., Merli A., Ciccone E., Moretta L. Identification of four subsets of human $CD3^{-}CD16^{+}$ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 1990; 172:1589-1598.

Moretta A., Bottino C., Tripodi G., Vitale M., Pende D., Morelli L., Augugliaro R., Barbaresi M., Ciccone E., Millo R. Novel surface molecules involved in human NK cell activation and triggering of the lytic machinery. *Int J Cancer Suppl* 1992;7:6-10.

Moretta L., Biassoni R., Bottino C., Mingari M.C., Moretta A. Natural killer cells: a mystery no more. *Scand J Immunol* 2002; 55:229-232.

Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. Two types of murine helper Tcell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol* 1986; 136:2348–2357.

Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:145-173.

Murphy C.A., Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R.A., Sedgwick J.D., Cua D.J. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med* 2003; 198:1951-1957.

Nagata T., Koide Y. Induction of specific CD8 T cells against intracellular bacteria by CD8 T-cell-oriented immunization approaches.*J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:764542.

Nagler A., Lanier L.L., Cwirla S., Phillips J.H. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143:3183–3191.

Naji A., Le Rond S., Durrbach A., Krawice-Radanne I., Creput C., Daouya M., Caumartin J., LeMaoult J., Carosella E.D., Rouas-Freiss N. CD3+CD4 low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. Blood 2007; 110:3936-3948.

Nickel R., Beck L.A., Stellato C., Schleimer R.P. Chemokines and allergic disease. J *Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 723-742.

Niedbala W., Wei X.Q., Cai B., Hueber A.J., Leung B.P., McInnes I.B., Liew F.Y. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* 2007; 37:3021-3029.

Nittoh T., Fujimori H., Kozumi Y., Ishihara K., Mue S., Ohuchi K. Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. Eur J Pharmacol 1998; 354:73-81.

Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007; 448:480-483.

O'Connell J.B., Dec G.W., Goldenberg I.F., Starling R.C., Mudge G.H., Augustine S.M., Costanzo-Nordin M.R,. Hess M.L., Hosenpud J.D., Icenogle T.B. Results of heart

transplantation for active lymphocytic myocarditis. *J Heart Transplant* 1990; 9:351-355.

Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C., Ponstingl H., Krammer P.H. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992; 267:10709-10715.

Ogasawara K., Benjamin J., Takaki R., Phillips J.H., Lanier L.L. Function of NKG2D in natural killer cellmediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat Immunol* 2005; 6:938-945.

Oni A.A., Ray J., Hosenpud J.D. Coronary venous intimal thickening in explanted cardiac allografts. Evidence demonstrating that transplant coronary artery disease is a manifestation of a diffuse allograft vasculopathy. *Transplantation.* 1992; 53:1247-1251.

Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans J.C., Xu Y., Hunte B., Vega F., Yu N., Wang J., Singh K., Zonin F., Vaisberg E., Churakova T., Liu M., Gorman D., Wagner J., Zurawski S., Liu Y., Abrams J.S., Moore K.W., Rennick D., de Waal-Malefyt R., Hannum C., Bazan J.F., Kastelein R.A. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13:715-725.

Orlando G., Soker S., Wood K. Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol* 2009; 50:1247-1257.

Ozkaynak E., Gao W., Shemmeri N., Wang C., Gutierrez-Ramos J.C., Amaral J., Qin S., Rottman J.B., Coyle A.J., Hancock W.W. Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol* 2001; 2:591-596.

Paniagua M.J., Crespo-Leiro M.G.,. De la Fuente L., Tabuyo T., Mosquera I., Cañizares A., Naya C., Fariña P., Juffé A., Castro-Beiras A. Prevention of cytomegalovirus disease after heart transplantation: preemptive therapy with 7 days' intravenous ganciclovir. *Transplant Proc* 2002; 34:69-70.

Parham P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol* 2005; 42:459-462 (a).

Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. Nat Rev Immunol 2005; 5:201-214 (b).

Park H., Li Z., Yang X.O., Chang S.H., Nurieva R., Wang Y.H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q., Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat. *Immunol* 2005; 6:1133–1141.

Parry R.V., Chemnitz J.M., Frauwirth K.A., Lanfranco A.R., Braunstein I., Kobayashi S.V., Linsley P.S., Thompson C.B., Riley J.L. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005; 25:9543-9553.

Pascual J. Everolimus: un inmunosupresor con propiedades antiproliferativas. Nefrología 2004; 24:112-123.

Paul P., Cabestre A.F., Ibrahim E., Lefebvre S., Khalil-Daher I., Vazeux G., Moya R.M., Bermond F., Dausset J., Carosella E.D. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000; 61: 1138-1149.

Pentcheva-Hoang T., Egen J.G., Wojnoonski K., Allison J.P. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 2004; 21:401–413.

Pereyra F., Rubin R.H. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17:357-361.

Pérez E.C., Shulzhenko N., Morgun A., Diniz R.V., Almeida D.R., Musatti C.C., Gerbase-DeLima M. Expression of Fas, FasL, and soluble Fas mRNA in endomyocardial biopsies of human cardiac allografts. *Hum Immunol* 2006;67:22-26.

Pethig K., Heublein B., Wahlers T., Dannenberg O., Oppelt P., Haverich A. Mycophenolate mofetil for secondary prevention of cardiac allograft vasculopathy: influence on inflammation and progression of intimal hyperplasia. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23:61-66.

Petrakopoulou P., Kübrich M., Pehlivanli S., Meiser B., Reichart B., von Scheidt W., Weis M. Cytomegalovirus infection in heart transplant recipients is associated with impaired endothelial function. *Circulation* 2004; 110:II207-II212.

Pita-Lopez M.L., Gayoso I., DelaRosa O., Casado J.G., Alonso C., Muñoz-Gomariz E., Tarazona R., Solana R. Effect of ageing on CMV-specific CD8 T cells from CMV seropositive healthy donors. *Immun Ageing* 2009; 6:11.

Pons J.A., Revilla-Nuin B., Baroja-Mazo A., Ramírez P., Martínez-Alarcón L., Sánchez-Bueno F., Robles R., Rios A., Aparicio P., Parrilla P. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation* 2008 ;86:1370-1378.

Potena L., Grigioni F., Magnani G., Lazzarotto T., Musuraca A.C., Ortolani P., Coccolo F., Fallani F., Russo A., Branzi A. Prophylaxis versus preemptive anti-cytomegalovirus approach for prevention of allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:461-467.

Potena L., Holweg C.T., Chin C., Luikart H., Weisshaar D., Narasimhan B., Fearon W.F., Lewis D.B., Cooke J.P., Mocarski E.S., Valantine H.A. Acute rejection and cardiac allograft vascular disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation* 2006; 82:398-405.

Rajagopalan S., Bryceson Y.T., Kuppusamy S.P., Geraghty D.E., van der Meer A., Joosten I., Long E.O. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. PLoS Biol. 2006;4:e9.

Rajagopalan S., Fu J., Long E.O. Cutting edge: Induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. J Immunol.2001; 167: 1877–1881.

Raulet D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003;3:781-790.

Raulet D.H., Vance R.E., McMahon C.W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:291-330.

Reth M. Antigen receptor tail clue. Nature.1989; 338:383–384.

Richardson P., McKenna W., Bristow M., Maisch B., Mautner B., O'Connell J., Olsen E., Thiene G., Goodwin J., Gyarfas I., Martin I., Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93:841-842.

Riteau B., Menier C., Khalil-Daher I., Sedlik C., Dausset J., Rouas-Freiss N., Carosella E.D. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol* 1999; 43:203-11.

Robertson M.J., Manley T.J., Pichert G., Cameron C., Cochran K.J., Levine H., Ritz J. Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* 1995 ;17:51-61.

Rodriguez E.R; International Society for Heart and Lung Transplantation. The pathology of heart transplant biopsy specimens: revisiting the 1990 ISHLT working formulation *J Heart Lung Transplant* 2003; 22:3-15.

Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 2005; 238:67-75.

Rogers N. J., Lechler R. I. Allorecognition. Am J Transplant 2001; 1:97-102.

Rogers P.R., Croft M. CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen. *J. Immunol 2000;* 164:2955–2963.

Rollins B. Chemokines. *Blood*. 1997; 90:909 –928.

Roncarolo M.G., Bacchetta R., Bordignon C., Narula S., Levings M.K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001; 182:68-79.

Roncarolo M.G., Gregori S., Battaglia M., Bacchetta R., Fleischhauer K., Levings M.K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212:28–50.

Rot A., von Andrian U.H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:891-928.

Rouas-Freiss N., Marchal R.E., Kirszenbaum M., Dausset J., Carosella E.D. The alpha 1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5249-5254.

Rouas-Freiss N., Naji A., Durrbach A., Carosella E.D. Tolerogenic functions of human leukocyte antigen G: from pregnancy to organ and cell transplantation. *Transplantation* 2007;84:S21-5.

Rowshani A.T., Bemelman F.J., van Leeuwen E.M., van Lier R.M., ten Berge I.J. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005; 79:381–386.

Ruiz Cabello F., Jiménez P., González R., Fontán G. Inmunofarmacología. En: www.inmunologiaonline.es. Coordinador: José Peña. Editores: Universidad de Córdoba y Sweden Diagnostics. 2003.

Rulifson IC., Sperling A.I., Fields P.E., Fitch F.W., Bluestone J.A. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J. Immunol 1997;* 158:658–665.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol. 2005; 6:345-352.

Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., Yamazaki S., Sakihama T., Itoh M., Kuniyasu Y., Nomura T., Toda M., Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol Rev. 2001; 182:18-32.

Salama A. D., Womer K. L., Sayegh M. H. Clinical transplantation tolerance: many rivers to cross. J Immunol 2007; 178:5419-5423.

Sallusto F., MacKay C.R., Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 593-620.

Salomon B., Bluestone J.A. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J. Immunol.1998;* 161:5138–5142.

Sata M., Luo Z., Walsh K. Fas ligand overexpression on allograft endothelium inhibits inflammatory cell infiltration and transplant-associated intimal hyperplasia. *J Immunol* 2001; 166:6964-6971.

Sata M., Walsh K. TNFalpha regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nat Med* 1998; 4:415-420.

Scanlon Valerie C, Sanders Tina. Essentials of Anatomy and Fisiology. 5ª edición. 2006.

Schönbeck U., Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci. 2001;58:4-43.

Schweitzer A.N., Sharpe A.H. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J. Immunol.1998;* 161:2762–2771.

Seder R.A., Paul W.E., Davis M.M. Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992; 176:1091-1098.

Segovia J., Pulpón L.A., Sanmartín M., Tejero C., Serrano S., Burgos R., Castedo E., Ugarte J. Primary graft failure in heart transplantation: a multivariate analysis. *Transplant Proc* 1998; 30:1932.

Serra P., Amrani A., Yamanouchi J., Han B., Thiessen S., Utsugi T., Verdaguer J., Santamaria P. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. Immunity 2003; 19:877-889.

Sharples L.D., Jackson C.H., Parameshwar J., Wallwork J., Large S.R. Diagnostic accuracy of coronary angiography and risk factors for post-heart-transplant cardiac allograft vasculopathy. Transplantation 2003; 76:679-682.

Sheinman R. I., Cogswell P. C., Lofquist A. K., Baldwin A. S. Jr. Role of transpcriptional activation of IkBα in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270:283-286 (a).

Sheinman R. I., Gualberto A., Jewell C. M., Cidlowski J. A., Baldwin AS. Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 943-953 (b).

Sheppard P., Kindsvogel W., Xu W., Henderson K., Schlutsmeyer S., Whitmore T.E., Kuestner R., Garrigues U., Birks C., Roraback J., Ostrander C., Dong D., Shin J., Presnell S., Fox B., Haldeman B., Cooper E., Taft D., Gilbert T., Grant F.J., Tackett M., Krivan W., McKnight G., Clegg C., Foster D., Klucher K.M. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003; 4:63-68.

Sherman, L. A., Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:385-402.

Sheshgiri R., Rouas-Freiss N., Rao V., Butany J., Ramzy D., Krawice-Radanne I., Ross H.J., Carosella E.D., Delgado D.H. Myocardial HLA-G reliably indicates a low risk of acute cellular rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27:522-527.

Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001;182:58-67.

Shiba N., Chan M.CY., Valantine H.A., Gao S.Z., Robbins R.C., Hunt S.A. Longer-Term Risks Associated With 10-Year Survival After Heart Transplantation in the Cyclosporine Era. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22:1098-1106.

Shiina T., Inoko H., Kulski J. K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004; 64:631-649.

Shilling R.A., Clay B.S., Tesciuba A.G., Berry E.L., Lu T., Moore T.V., Bandukwala H.S., Tong J., Weinstock J.V., Flavell R.A., Horan T., Yoshinaga S.K., Welcher A.A., Cannon J.L., Sperling A.I. CD28 and ICOS play complementary non-overlapping roles in the development of Th2 immunity in vivo. *Cell Immunol* 2009; 259:177-184.

Shirali A., Goldstein D. Activation of the innate immune system by the endogenous ligand hyaluronan. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13:20–25.

Shoskes D. A., Wood K. J. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994; 15:32-38.

Sindhi R., Manavalan J.S., Magill A., Suciu-Foca N., Zeevi A. Reduced immunosuppression in pediatric liver-intestine transplant recipients with CD8+CD28- T-suppressor cells. *Hum Immuno* 2005; 66:252-257.

Singh N., Gayowski T., Marino I. R. Causes of leukocytosis in liver transplant recipients: relevance in clinical practice. *Transplantation* 1998; 65:199-203.

Sivori S., Falco M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Vitale M., Moretta L., Moretta A. CpG and doublestranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.2004; 101:10116–10121.

Smith J.D., Rose M.L., Pomerance A., Burke M., Yacoub M.H. Reduction of cellular rejection and increase in longer-term survival after heart transplantation after HLA-DR matching. *Lancet* 1995; 346:1318-1322

Söderberg-Nauclér C., Fish K.N., Nelson J.A. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91:119-26.

Sonoda E., Matsumoto R., Hitoshi Y., Ishii T., Sugimoto M., Araki S., Tominaga A., Yamaguchi N., Takatsu K. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med.* 1989; 170:1415-1420.

Speiser D. E., Valmori D., Rimoldi D., Pittet M. J., Liénard D., Ceundolo V., MacDonald H. R., Cerottini J. C., Romero P. CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur. J. Immunol* 1999; 29:1990-1999.

Spencer J.V., K.M. Lockridge P.A. Barry G., Lin M., Tsang M.E., Penfold Schall T.J., Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J. Virol* 2002; 76:1285–1292.

Spyridopoulos I., Hoffmann J., Aicher A., Brümmendorf T.H., Doerr H.W., Zeiher A.M., Dimmeler S. Accelerated telomere shortening in leukocyte subpopulations of patients with coronary heart disease: role of cytomegalovirus seropositivity. *Circulation* 2009; 120:1364-1372.

Sporn M.B., Roberts A.B. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992; 119:1017-1021.

Stary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W.Jr., Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler R.W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355-1374.

Stempfle H.U., Klauss V., Mudra H., Jung P., Rieber J., Scholz S. The influence of HLA compatibility on the incidence of cardiac allograft vasculopathy detected by intravascular ultrasound. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15 (abstr):S72.

Stewart S., Winters G.L., Fishbein M.C., Tazelaar H.D., Kobashigawa J., Abrams J., Andersen C.B., Angelini A., Berry G.J., Burke M.M., Demetris A.J., Hammond E., Itescu S., Marboe C.C., McManus B., Reed E.F., Reinsmoen N.L., Rodriguez E.R., Rose A.G., Rose M., Suciu-Focia N., Zeevi A., Billingham M.E. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J. Heart Lung Transplant* 2005;24:1710-1720.

St Goar F.G., Pinto F.J., Alderman E.L., Valantine H.A., Schroeder J.S., Gao S.Z., Stinson E.B., Popp R.L. Intracoronary ultrasound in cardiac transplant recipients. In vivo evidence of "angiographically silent" intimal thickening. *Circulation* 1992;85:979-987.

Strioga M., Pasukoniene V., Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011;134:17-32.

Suárez-Álvarez B., López-Vázquez A., Díaz-Molina B., Bernardo-Rodríguez M.J., Álvarez-López R., Pascual D., Astudillo A., Martínez-Borra J., Lambert J.L., González S., López-Larrea C. The predictive value of soluble major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) levels on heart allograft rejection.Transplantation. 2006; 82:354-361.

Suárez-Álvarez B., López-Vázquez A., Gonzalez M.Z., Fdez-Morera J.L., Díaz-Molina B., Blanco-Gelaz M.A., Pascual D., Martínez-Borra J., Muro M., Alvarez-López M.R., López-Larrea C. The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. Am J Transplant. 2007;7:1842-1848.

Suda T., Okazaki T., Naito Y., Yokota T., Arai N., Ozaki S., Nakao K., Nagata S. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol.* 1995;154:3806-3813.

Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* 1993;75:1169-1178.

Suitters A., Rose M., Higgins A., Yacoub M.H: MHC antigen expression in sequential biopsies from cardiac transplant patients correlation with rejection. *Clin Exp Immunol* 1987; 69:575-583.

Sumpter T. L., Abe M., Tokita D., Thomson A. W. Dendritics cells, the liver and transplantation. *Hepatology* 2007; 46:2021-2031.

Suthanthiran M., Strom T.B. Mechanisms and management of acute renal allograft rejection. Surg Clin North Am 1998; 78:77-94.

Suvas S., Singh V., Sahdev S., Vohra H., Agrewala J.N. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem 2002*; 277:7766–7775.

Sykes M. Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation. *J Intern Med* 2007; 262:288-310.

Takami H., Backer C.L., Crawford S.E., Zales V.R., Mavroudis C. Influence of gender on allograft rejection in rat heart transplant model. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14:529-536.

Tamachi T., Maezawa Y., Ikeda K., Kagami S., Hatano M., Seto Y., Suto A., Suzuki K., Watanabe N., Saito Y., Tokuhisa T., Iwamoto I., Nakajima H. IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:606-614.

Tanaka K., Ozawa K., Teramukai S., Takada Y., Egawa H., Kaihara S., Fujimoto Y., Ogura Y., Kasahara M., Ono M., Sato H., Takai K., Fukushima M., Minato N. Classification of human liver transplant recipients by their preoperative $CD8^+$ T cell subpopulation and its relation to outcome. *Liver Transpl* 2006; 12:792-800.

Tarazona R., De la Rosa O., Alonso C., Ostos B., Espejo J., Peña J., Solana R. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev* 2000;121:77-88.

Taylor D.O., Edwards L.B., Boucek M.M., Trulock E.P., Keck B.M., Hertz M.I. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report--2004. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23:796-803.

Taylor D.O., Stehlik J., Edwards L.B., Aurora P., Christie J.D., Dobbels F., Kirk R., Kucheryavaya A.Y., Rahmel A.O., Hertz M.I. Registry of the International Society for

Heart and Lung Transplantation: twenty-sixth official adult heart transplant report—2009. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28: 1007-1022.

Taylor-Wiedeman J., Hayhurst G.P., Sissons J.G., Sinclair J.H. Polymorphonuclear cells are not sites of persistence of human cytomegalovirus in healthy individuals. *J. Gen. Virol*. 1993; 74:265–268.

Taylor-Wiedeman J., Sissons J.G., Borysiewicz L.K., Sinclair J.H. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1991; 72:2059–2064.

Tellides G., Pober J. Interferon-γ axis in graft arteriosclerosis. *Circ. Res*.2007; 100:622–632.

Theleman K.F., Nuipper J.J., Roberts W.C. Acute myocarditis sudden death without heart failure. Am J Cardiol. 2001;88:1078-1083.

Thompson C.B: Distinct roles for the costimulatory ligands B7–1 and B7–2 in T helper cell differentiation. Cell 1995; 81: 979–982.

Timmerman L.A., Clipstone N.A., Ho S.N., Northrop J.P., Crabtree G.R. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca2+ signals and immunosuppression. Nature 1996;383:837-840.

Tippner C., Nashan B., Hoshino K., Schmidt-Sandte E., Akimaru K., Böker K.H., Schlitt H.J. Clinical and subclinical acute rejection early after liver transplantation: contributing factors and relevance for the long-term course. *Transplantation* 2001; 72:1122-1128.

Topilsky Y., Hasin T., Raichlin E., Boilson B.A., Schirger J.A., Pereira N.L., Edwards B.S., Clavell A.L., Rodeheffer R.J., Frantz R.P., Maltais S., Park S.J., Daly R.C., Lerman A., Kushwaha S.S. Sirolimus as primary immunosuppression attenuates allograft

vasculopathy with improved late survival and decreased cardiac events after cardiac transplantation. *Circulation* 2012; 125:708-720.

Torres MI, Moreau P, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carosella ED. HLA-G today. Immunología; 2001; 20:18-29.

Tortora Gerard J, Derrickson Bryan H. Principios de Anatomía y Fisiología. 11ª Edición. 2006.

Tortora Gerard J, Derrickson Bryan H. Principles of Anatomy and Physiology. 12ª Edición. 2008.

Trinchieri G. Biology of natural killer cells. Adv Immunol. 1989;47:187-376.

Trivedi H. L. Immunobiology of rejection and adaptation. *Transplant Proc* 2007; 39:647-652.

Tsukishiro T., Donnenberg A.D., Whiteside T.L. Rapid turnover of the CD8 (+) CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunothe*r 2003; 52:599–607.

Tuzcu E.M., De Franco A.C., Goormastic M., Hobbs R.E., Rincon G., Bott-Silverman C., McCarthy P., Stewart R., Mayer E., Nissen S.E. Dichotomous pattern of coronary atherosclerosis 1 to 9 years after transplantation: insights from systematic intravascular ultrasound imaging. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 27:839-846.

Ubilla M., Mastrobuoni S., Martín Arnau A., Cordero A., Alegría E., Gavira J.J., Iribarren M.J., Rodríguez-Fernández T., Herreros J., Rábago G. Heart transplant. *An Sist Sanit Navar.* 2006; 29 Suppl 2:63-78.

Uehara S., Chase C.M., Colvin R.B., Russell P.S., Madsen J.C. Further evidence that NK cells may contribute to the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplant Proc.* 2005;37:70-71 (a).

Uehara S., Chase C.M., Kitchens W.H., Rose H.S., Colvin R.B., Russell P.S., Madsen J.C. NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. *J Immunol.* 2005; 175:3424-3430 (b).

Valantine H. Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: risk factors and management. *J Heart Lung Transplant.* 2004; 23:S187-193.

Valantine H., Pinto F., St-Goar G., Alderman E., Popp R. Intracoronary ultrasund imaging in heart transplan recipients: The Stanford Experience. *J Heart Lung Tansplant* 1992; 11:S60-S64.

Valerie C. Scanlon and Tina Sanders. Essentials of Anatomy and Phisiology. 5ª edición 2007.

Vanaudenaerde B.M., Dupont L.J., Wuyts W.A., Verbeken E.K., Meyts I., Bullens D.M., Dilissen E., Luyts L., Van Raemdonck D.E., Verleden G.M. The role of interleukin-17 during acute rejection after lung transplantation. *Eur Respir J.* 2006; 27:779-787.

Van Bergen J., Thompson A., Van Der Slik A., Ottenhoff T.H., Gussekloo J., Koning F. Phenotypic and functional characterization of CD4 T cells expressing killer Ig-like receptors. J Immunol 2004; 173:6719-6726.

Van der Harst P., van der Steege G., de Boer R.A., Voors A.A., Hall A.S., Mulder M.J., van Gilst W.H., van Veldhuisen D.J; MERIT-HF Study Group. Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure. J Am Coll Cardiol 2007; 49:1459-1464.

Van der Meer A., Lukassen H.G.M., van Lierop M.J.C., Wijnands F., Mosselman S., Braat D.D.M., Joosten I. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-{gamma} production by uterine natural killer cells. Mol Hum Reprod 2004; 10:189-195.

Van der Veken L.T., Campelo M.D., van der Hoorn M.A., Hagedoorn R.S., van Egmond H.M., van Bergen J., Willemze R., Falkenburg J.H., Heemskerk M.H. Functional analysis of killer Ig-like receptor-expressing cytomegalovirus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 2009;182:92-101.

Van Loosdregt J., van Oosterhout M.F., Bruggink A.H., van Wichen D.F., van Kuik J., de Koning E., Baan C.C., de Jonge N., Gmelig-Meyling F.H., de Weger R.A. The chemokine and chemokine receptor profile of infiltrating cells in the wall of arteries with cardiac allograft vasculopathy is indicative of a memory T–helper 1 response. *Circulation* 2006; 114:1599–1607.

Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M., Stockinger B. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24:179–189.

Vely F., Peyrat M., Couedel C., Morcet J., Halary F., Davodeau F., Romagne F., Scotet E., Saulquin X., Houssaint E., Schleinitz N., Moretta A., Vivier E., Bonneville M. Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements. *J Immunol* 2001; 166:2487-294.

Verbsky J.W. Therapeutic use of T regulatory cells. Curr Opin Rheumatol. 2007;19:252–258.

Vesely M.D., Kershaw M.H., Schreiber R.D., Smyth M.J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annu Rev Immunol. 2011; 29:235-271.

Villarino A.V., Huang E., Hunter C.A. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol* 2004; 173:715-720.

Vivier E., Anfossi N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. Nat Rev Immunol. 2004; 4:190-198.

Vivier E., Daeron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. Immunol Today. 1997;18:286-91.

Vivier E., Raulet D.H., Moretta A., Caligiuri M.A., Zitvogel L., Lanier L.L., Yokoyama W.M., Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011; 331:44-49.

Vlad G, Cortesini R, Suciu-Foca N. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. J Immunol 2005; 174:5907–5914.

Von Hundelshausen P., Weber K.S., Huo Y., Proudfoot A.E., Nelson P.J., Ley K., Weber C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation 2001;* 103:1772–1777.

Waiser J., Dell K., Bohler T., Dogu E., Gaedeke J., Budde K., Neumayer H.H. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-h1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 :1568–1577.

Walunas T.L., Bakker C.Y., Bluestone J.A: CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med 1996;* 183: 2541–2550.

Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A: CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994, 1:405-413.

Walzer T., Dalod M., Robbins S.H., Zitvogel L., Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*. 2005; 106:2252-2258.

Wallace D.L., Masters J.E., De Lara C.M., Henson S.M., Worth A., Zhang Y., Kumar S.R., Beverley P.C., Akbar A.N., Macallan D.C. Human cytomegalovirus-specific CD8 (+) T-cell

expansions contain long-lived cells that retain functional capacity in both young and elderly subjects. *Immunology* 2011; 132:27-38.

Wang Y.C., Herskowitz A., Gu L.B., Kanter K., Lattouf O., Sell K.W., Ahmed-Ansari A. Influence of cytokines and immunosuppressive drugs on major histocompatibility complex class I/II expression by human cardiac myocytes in vitro. *Hum Immunol*. 1991; 31:123-133.

Wang Y.H., Ito T., Homey B., Watanabe N., Martin R., Barnes C.J., McIntyre B.W., Gilliet M., Kumar R., Yao Z., Liu Y.J. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity* 2006; 24:827-838.

Ward Jeremy PT, Clarke Robert W, Linden Roger WA. Fisiología médica en esquemas. 1ª edición. 2005.

Wasowska B. A., Zheng X. X., Strom T. B., Kupieck-Weglinski J.W. Adjunctive rapamycin and CsA treatment inhibits monocyte/ macrophage associated cytokines/chemokines in sensitized cardiac graft recipients. *Transplantation* 2001; 71:1179–1183.

Weill D. Role of cytomegalovirus in cardiac allograft vasculopathy. *Transpl Infect Dis*. 2001; 3:44-48.

Weiner H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev. 2001; 182:207-214.

Weis M., Cooke J.P. Cardiac allograft vasculopathy and dysregulation of the NO synthase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:567-575.

Weis M., Kledal T.N., Lin K.Y., Panchal S.N., Gao S.Z., Valantine H.A., Mocarski E.S., Cooke J.P. Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway: role of

asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. Circulation. 2004; 109:500-5.

Welte S.A., Sinzger C., Lutz S.Z., Singh-Jasuja H., Sampaio K.L., Eknigk U., Rammensee H.G., Steinle A. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol* 2003;33:194-203.

Wenke K., Meiser B., Thiery J., Nagel D., von Scheidt W., Krobot K., Steinbeck G., Seidel D., Reichart B. Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation*. 2003; 107:93-97.

Westall G.P., Brooks A.G., Kotsimbos T. CD8+ T-cell maturation following lung transplantation: the differential impact of CMV and acute rejection. *Transpl Immunol.* 2007;18:186-92.

Weyand C.M., Brandes J.C., Schmidt D., Fulbright J.W., Goronzy J.J. Functional properties of $CD4^+$ $CD28^-$ T cells in the aging immune system. *Mech Ageing Dev* 1998;102:131–147.

Wiederrecht G., Lam E., Hung S., Martin M., Sigal N. The mechanism of action of FK506 and cyclosporin A. *Ann NY Acad Sci* 1993; 696:9-19.

Wood K.J., Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:199-210.

Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., Phillips J.H. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. Science. 1999; 285:730-732.

Wykes M., Pombo A., Jenkins C., MacPherson G. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J. Immunol*.1998; 161:1313–1319.

Yakoub-Agha I., Saule P., Magro L., Cracco P., Duhamel A., Coiteux V., Bruno B., Dufossé F., Jouet J. P., Dessaint J. P., Labalette M. Immune reconstitution following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the impact of expanding CD28 negative $CD8^+$ T cells on relapse. Biol Blood Marrow Transplant 2009; 15:496-504.

Yamani M.H., Cook D., Starling R.C., Ratliff N.B., McMahon J.T., Abdo A., Tuzcu M., McCarthy P., Young J.B. Myocardial ischemic injury following heart transplantation is associated with decreased risk of acute cellular rejection in the absence of humoral rejection. J Heart Lung Transplant. 2001;20:238.

Yamani M.H., Haji S.A., Starling R.C., Tuzcu E.M., Ratliff N.B., Cook D.J., Abdo A., Crowe T., Secic M., McCarthy P., Young J.B. Myocardial ischemic-fibrotic injury after human heart transplantation is associated with increased progression of vasculopathy, decreased cellular rejection and poor long-term outcome. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39:970-977.

Yang Y, Wilson JM: CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 1996,273:1862-1864.

Yan WH, Lin A, Chen BG, Chen SY. Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection. J Infect Dis. 2009; 200:820-826.

Yla-Herttuala S., Lipton B., Rosenfeld M., Sarkioja T., Yoshimura T., Leonard E., Witztum J., Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage–rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88:5252–5256.

Young J.B., Hauptman P.J., Naftel D.C., Ewald G., Aaronson K., Dec G.W., Taylor D.O., Higgins R., Platt L., Kirklin J. Determinants of early graft failure following cardiac

transplantation, a 10-year, multi-institutional, multivariable analysis [abstract]. J Heart Lung Transplant 2001;20:212.

Yuan X., Paez-Cortez J., Schmitt-Knosalla I., D'Addio F., Mfarrej B., Donnarumma M., Habicht A., Clarkson M.R., Iacomini J., Glimcher L.H., Sayegh M.H., Ansari M.J. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J Exp Med* 2008; 205:3133–3144.

Yuan Y.C., Xia Z.K., Mu J.J., Zhang Q.C., Yin B.L. Increased connective tissue growth factor expression in a rat model of chronic heart allograft rejection. *J Formos Med Assoc* 2009; 108(3): 240–246.

Yu Y.R., Tian X.H., Wang Y., Feng M.F. Rapid production of human KIR2DL4 extracellular domain and verification of its interaction with HLA-G. *Biochemistry (Mosc).* 2006; 71 Suppl 1:S60-4, 4-5.

Zal B., Baboonian C., Kaski J.C. Autoreactive $CD4^{+}CD28^{-}$ T cells and acute coronary syndromes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Mar; 27(3):e18; author reply e19.

Zerbe T.R., Arena V.C., Kormos R.L., Griffith B.P., Hardesty R.L., Duquesnoy R.J. Histocompatibility and other risk factors for histological rejection of human cardiac allografts during the first three months following transplantation. Transplantation 1991;52:485-490.

Zhao D.X., Hu Y., Miller G.G., Luster A.D., Mitchell R.N., Libby P. Differential expression of the IFN-γ-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell α chemoattractant in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. *J. Immunol 2002;* 169:1556–1560.

Zhou L., Ivanov I.I., Spolski R., Min R., Shenderov K., Egawa T., Levy D.E., Leonard W.J., Littman D.R. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol*.2007; 8:967–974.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. . Differentiation of effector CD4 T cell populations. Annu Rev Immunol. 2010;28:445-489.

Zlotnik A., Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000; 12:121-127.

Zou N., Ao L., Cleveland J.C. Jr, Yang X., Su X., Cai G.Y., Banerjee A., Fullerton D.A., Meng X. Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 294:H2805–H2813.

Zou Y., Bresnahan W., Taylor R.T., Stastny P. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. J Immunol. 2005; 174:3098-3104.

Zou Y., Stastny P. The role of major histocompatibility complex class I chain-related gene A antibodies in organ transplantation. Curr Opin Organ Transplant. 2009; 14:414-418.

Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. Hum Immunol 1999; 60:323–330.