

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DIVISIÓ DE CIÈNCIES CLÍNIQUES
FACULTAT DE MEDICINA

**AL·LORESPOSTA LIMFOCITÀRIA T DE MEMÒRIA I
REGULADORA DONANT-ESPECÍFICA,
BIOMARCADORS EN EL TRASPLANTAMENT RENAL**

Doctorand: ORIOL BESTARD MATAMOROS

Directors: Professor JOSEP M^a GRINYÓ BOIRA

Dr. JOSEP M^a CRUZADO GARRIT

En **Josep M^a GRINYÓ I BOIRA**, Doctor en Medicina i Cirurgia, Cap del Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge i Professor del Departament de Medicina de la Universitat de Barcelona, i en **Josep M^a CRUZADO I GARRIT**, Doctor en Medicina i Cirurgia i Metge Adjunt del Servei de Nefrologia de l'Hospital de Bellvitge

FAN CONSTAR:

Que n'**ORIOI BESTARD MATAMOROS**, Llicenciat en Medicina i Cirurgia, ha realitzat sota la nostra direcció el treball de recerca per a elaborar la seva Tesi Doctoral titulada **Al·loresposta limfocitària T de memòria i reguladora donant-específica, biomarcadors en el trasplantament renal**, i mitjançant aquest escrit autoritzen la seva presentació per a optar al Grau de Doctor en Medicina i Cirurgia.

La qual cosa es fa constar per la present i a tots els efectes a Barcelona a 15 de Juny de 2009.

Josep M^a GRINYÓ I BOIRA

Tutor i Director de la Tesi

Josep M^a CRUZADO I GARRIT

Codirector de la Tesi

A mon pare, amb qui desgraciadament no he pogut
compartir aquest treball. Segur però, que ho hagués
convertit, com tot, en música i en un somriure.

A ma mare, per la fortalesa i amor que sempre ens
ha trasmès.

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi doctoral ha estat fruit de la conjunció de l'esforç i ajut inestimable, en diferents àmbits, de tota una sèrie de persones. La seva contribució, d'una manera o altra m'ha permès portar a terme aquest treball, en el que l'entusiasme, la dedicació i sobretot, les ganes d'aprendre han estat les premisses que han prevalgut al llarg d'aquest temps.

Voldria, en primer lloc, ressaltar i agrair al Dr. Josep M^a Grinyó, director d'aquesta tesi, haver-me donat la possibilitat i confiança per a realitzar aquesta tasca de recerca. La seva excepcional qualitat professional i humana, així com la seva constant i incansable capacitat de motivació, han fet que tots aquests anys de corva d'aprenentatge en la Nefrologia i en el trasplantament renal en especial, hagin estat molt més fàcils.

Al Dr. Josep M^a Cruzado, co-director de la tesi, per la seva ajuda constant tant intel·lectual com personal. La seva clarividència i capacitat d'anàlisi han estat fonamentals per a poder realitzar aquesta tesi doctoral.

M'agradaria agrair de forma especial als Professors Petra Reinke i Hans-Dieter Volk de l'Hospital de La Charité de Berlin, amb qui vaig tenir la sort de conviure durant un any i mig al seu centre on m'acolliren com un més dins el seu grup. La seva capacitat de feina i coneixements que m'han trasmès, han estat fonamentals per al desenvolupament d'aquesta tesi.

Als companys i amics del servei de Nefrologia, Drs. Salvador Gil-Vernet, Daniel Serón, Joan Torras, Alberto Martínez-Castelao, Francesc Moreso, Xavier Fulladosa, Miquel Hueso, Rafael Poveda, Teresa Gonzalez i Lluís Carreras per haver-me ensenyat els seus diferents punts de vista de la Nefrologia i de la vida en general durant tots aquests anys.

A les Dres. Marina Noris i Federica Cashiragi de l'Institut de recerca Mario Negri de Bergamo per haver-me introduït en la recerca de la Immunologia del Trasplantament.

A les meves companyes de residència, les Drs. Inés Rama i Meritxell Ibernón, pels fantàstics anys de residència compartits al servei durant els intensos anys de formació.

A l'excel·lent grup d'assajos clínics, Anna Caldés, Maria Sarrias, Carol Polo i Eulàlia Molinas, sense elles tota la feina de recerca no seria factible.

A la Dra. Mariona Mestre i al Dr. Jordi Bas del Servei d'Immunologia de l'Hospital de Bellvitge, per haver-me acollit i ajudat durant l'any que vaig passar al seu laboratori.

A les Dres. Marta Carrera i Montse Gomà del servei d'Anatomia Patològica, per la seva inestimable i constant ajuda en la lectura i anàlisi histològica.

A tot el grup del Laboratori de Nefrologia experimental, Dres. Nuria Lloberas, Immaculada Herrero, Marcel·la Franquesa, Linda Cassis i Nuria Bolaños per la seva desinteressada ajuda en diferents tasques de laboratori.

Als meus estimats amics Richard Mast, Joan B. Gornals, Toni Llabrés, Sergi Cànovas i Carles Castilla per sempre ser-hi quan fa falta.

Al meus germans Maurici i Esteve per la seva inconscient omnipresència al meu costat i recordar-me sempre qui sóc i d'on vinc.

Als meus avis, per ser una font inesgotable de bons consells.

INDEX

	Pàgines
I. Introducció	1
II. Hipòtesi	17
III. Objectius	18
IV. Treballs	19
V. Resultats	47
VI. Discussió	59
VII. Conclusions.....	68
VIII. Referències bibliogràfiques.....	70
IX. Taules i figures	83

I. INTRODUCCIÓ

La insuficiència renal crònica (IRC) és una patologia d'incidència creixent i en conseqüència, els requeriments de tractament substitutiu renal són també cada cop majors a les societats occidentalitzades (1). El trasplantament renal és el tractament substitutiu d'elecció en els pacients que desenvolupen IRC terminal, aportant una major supervivència (2), qualitat de vida i és menys costosa que la resta de teràpies substitutives renals (3).

Des de que al 1954 es realitzà el primer trasplantament renal reeixit fins a l'actualitat, s'ha recorregut un camí molt llarg. El trasplantament renal ha passat de ser una teràpia anecdòtica i exclusiva, practicada solament en casos molt seleccionats, a fer-se de forma rutinària com a tractament electiu als centres hospitalaris.

Els resultats del trasplantament renal a curt termini han millorat de forma significativa en els darrers quinze anys, assolint una taxa de supervivència de l'empelt de quasi el 95% durant el primer any del trasplantament (www.unos.org). És evident que l'avenç significatiu en el coneixement dels mecanismes de la resposta immunitària ha permès l'elaboració de noves drogues immunosupressores, cada cop més selectives dirigides sobre dianes específiques i claus en l'activació de la resposta immunològica (Figura 1). Entre aquests fàrmacs cal destacar l'aparició durant les dècades dels 80 i 90 dels inhibidors de la calcineurina (ciclosporina i tacrolimus) i l'antiproliferatiu micofenolat mofetil, i a partir del 2000 els inhibidors de m-TOR (mammalian target of rapamycin) i les noves formulacions de l'àcid micofenòlic així com nous anticossos monoclonals i policlonals utilitzats com a teràpia d'inducció. Amb ells, s'aconseguí una reducció significativa dels episodis de rebuig agut cel·lulars, passant d'una incidència del 30-40% a una incidència actual entre el 10-15%. Malgrat tot, l'aparició inexorable de disfunció

crònica de l'empelt, que es tradueix histològicament en lesions inespecífiques de fibrosi intersticial i atrofia tubular, i la mort del pacient essencialment degut a malaltia cardiovascular i al càncer, ambdues causes paradoxalment relacionades a l'ús crònic d'aquestes potents teràpies immunosupressores, han fet que la supervivència de l'empelt renal a llarg termini no s'hagi incrementat en els darrers 15 anys tal i com s'hauria esperat. De fet, aproximadament el 50-60% d'empelts renals es perden al voltant dels 10 anys després del trasplantament (4). Aquest fet té unes conseqüències clíniques, econòmiques i emocionals enormes tant pel malalt com també a nivell de recursos socio-sanitaris, incloent-hi el retorn del pacient a diàlisi, la nova inclusió en la llista d'espera per a un retrasplantament així com l'increment del risc de mort del pacient. Per tant, malgrat les noves estratègies terapèutiques immunosupressores aparegudes en les darreres dues dècades, no s'ha pogut evidenciar un impacte significatiu en la supervivència de l'empelt a més llarg termini.

És per aquest motiu que sorgeix en els darrers anys una corrent de pensament, cada cop més majoritària entre la comunitat científica, que es postula a favor d'intentar preparar o programar al sistema immunològic per assolir un estat d'hiporesposta o tolerància immunològica específica enfront el donant, amb la finalitat de poder reduir o fins i tot en casos seleccionats, eliminar totalment el tractament immunosupressor d'una forma segura. Per assolir aquest objectiu però, és essencial disposar de marcadors biològics i eines de monitoratge de la resposta immunològica amb prou sensibilitat i especificitat que ens permetin conèixer l'estat funcional d'aquesta resposta d'una manera dinàmica i en els diferents períodes evolutius del trasplantament.

El sistema immunològic està programat epigenèticament per a defensar l'organisme de patògens (antígens) externs, però en canvi tolerar o reconèixer com a propis els antígens d'un mateix. Així, el trasplantament renal es pot entendre com un insult al sistema immunològic que provocarà ineludiblement la seva activació i resposta al llarg de tot el temps que perduri el trasplantament. Aquest procés, complex i altament especialitzat, anirà incidint i lesionant l'empelt en major o menor mesura segons el diferent grau d'activació de la resposta immunològica enfront els al·loantígens corresponents.

L'aparició de disfunció crònica de l'empelt es desenvolupa degut a múltiples insults que van incidint i lesionant l'òrgan de forma continua i progressiva al llarg del temps, traduint-se finalment a nivell histològic amb l'aparició de fibrosi inespecífica i generalitzada de l'empelt. Clàssicament, tots aquests factors és categoritzen segons si tenen relació o no amb l'activació de la resposta immunològica. Entre els factors que incideixen independentment de la resposta immunològica trobem principalment les lesions preexistents del donant, la necrosi tubular aguda, el dany per isquèmia-reperussió, la hipertensió arterial, el reflux vesico-ureteral i les infeccions urinàries de repetició així com el dany per l'efecte nefrotòxic dels fàrmacs inhibidors de la calcineurina (5). Totes elles són etiologies identificables i per tant potencialment modificables a la pràctica clínica diària. Per altra banda, es troben les lesions que es produiran per l'activació de la resposta immunològica donant-específica. Tots aquests factors patogènics conflueixen en una mateixa lesió histològica inespecífica que actualment reb el nom de fibrosi intersticial i atrofia tubular (IF/TA) (6). Aquesta entitat, pot anar acompanyada o no de certes lesions que indirectament ens orientin a un potencial origen immunològic del dany. En aquest sentit, certes lesions estructurals molt específiques com l'aparició de dobles contorns a nivell de la membrana basal glomerular o la multilaminació de la membrana basal tubular juntament amb dipòsits de

la fracció del complement C4d de forma difusa a nivell dels capil·lars peritubulars ens orientarien a un dany histològic mediat per un mecanisme immunològic humoral. En canvi, les lesions relacionades amb un dany vehiculitzat per un mecanisme efector cel·lular són escasses o molt inespecífiques, bàsicament associats a la presència d'infiltrats mononuclears (6).

En la pràctica clínica actual, el monitoratge del risc immunològic d'un pacient enfront al donant es centra exclusivament en la vessant efectora humoral, mitjançant la detecció d'anticossos circulants contra els antígens del complex major d'histocompatibilitat humà (HLA). Paradoxalment però, el mecanisme efector cel·lular o mediat pel limfòcit T, diana de la pràctica majoria dels fàrmacs immunosupressors, no és avaluat en cap moment del trasplantament. L'estudi diagnòstic de la disfunció tant aguda com crònica de l'empelt es basa essencialment en l'avaluació de paràmetres clínics com la funció renal (canvis en la creatinina sèrica o filtrat glomerular i nivells de proteïnúria), els nivells plasmàtics dels fàrmacs immunosupressors i l'estudi histològic de l'empelt. Cap d'ells però permet conèixer de manera fidedigne l'estat de la resposta immunològica donant-específica d'una forma funcional i dinàmica.

Així, la recerca i estudi de biomarcadors immunològics sensibles i específics que representin d'una forma dinàmica l'estat de l'alloresposta donant-específica en diferents períodes del trasplantament és de vital importància per poder plantejar una estratègia terapèutica individualitzada dirigida a incrementar o reduir el tractament immunosupressor de forma segura. Actualment, són molts els esforços centrats en el desenvolupament de noves aproximacions que permetin predir o descriure l'evolució de l'empelt després del trasplantament i que ens permetin destriar els principals factors desencadenants de disfunció. Entre ells, s'inclouen la caracterització específica

d'anticossos circulants en sang perifèrica mitjançant diferents tècniques diagnòstiques (7), l'ús de marcadors solubles o de superfície cel·lular (tant proteïnes com gens) tant a sang perifèrica com en orina (8). També, més recentment diversos grups han mostrant un important interès en la recerca de determinats perfils genètics i/o patrons d'expressió proteïca a diferent nivells biològics (sang, orina i fins i tot en el teixit de l'empelt) que permetin ser utilitzats com a marcadors de dany histològic de l'empelt amb un origen immunològic o no (9, 10). No obstant, degut a la complexitat tècnica i metodològica d'aquestes noves aproximacions i el baix nombre de malalts avaluats, fa que la majoria siguin encara eines exclusives de l'àmbit de la recerca més que per ser emprades en la pràctica clínica diària.

L'assoliment d'un estat de tolerància o d'hiporesposta immunològica, ve identificat clàssicament per la preservació del funcionalisme de l'empelt de forma estable al llarg del temps sense presència de tractament immunosupressor concomitant. A diferència del ronyó, cor intestí i pàncrees, el trasplantament hepàtic sembla presentar un privilegi immunològic tal com ho suggereixen els anàlisis de supervivència i la molt menor incidència d'episodis de rebuig que a més a més, tenen una escassa influència en l'evolució de l'empelt (11, 12). Aquesta diferència en la tolerabilitat immunològica entre aquests òrgans, sembla recaure principalment en els diferents graus d'immunogenicitat dels teixits degut a la diferent presència de cèl·lules amb elevada expressió de molècules HLA i a les seves capacitats presentadores antigèniques (13, 14).

L'assoliment d'un estat de tolerància enfront un empelt renal és actualment factible en diversos models experimentals tant de rosegadors com d'altres mamífers superiors com porcs, gossos i primats no-humans (15-21). Per això, sembla que el rebuig d'un empelt

no és un procés biològicament impossible d'evitar sense tractament immunosupressor de manteniment. No obstant, en humans l'estat de tolerància enfront un empelt s'ha pogut comprovar en un nombre molt reduït de pacients (<1%) i el seu assoliment segueix essent poc freqüent i sobretot impredecible, encara que dades recents suggereixen que determinats perfils gènics podrien predir l'assoliments de tolerància (22). Aquest escenari es manifesta a través d'una extensa varietat de processos immunològics que actuen de forma simultània, entre els que s'inclouen modulacions en la freqüència dels precursors efectors cel·lulars, l'eficiència en la presentació antigènica, el llindar d'activació de la cèl·lula efectora, l'alteració en el tràfic cel·lular i l'aparició de mecanismes reguladors de la resposta immunològica. Per tant, el coneixement i monitoratge dels mecanismes de resposta immunològica d'una forma precisa, permetrien reconèixer els pacients amb un perfil immunològic predisposat a una millor o pitjor acceptació de l'empelt.

Mecanismes de resposta immunològica

La resposta immunològica s'inicia a través del reconeixement antigènic del limfòcit T mitjançant les molècules del sistema major d'histocompatibilitat (HLA) a nivell de les cèl·lules presentadores d'antigen professionals. Aquest reconeixement antigènic es realitza a través de dues vies diferents; una via directa on els limfòcits T del receptor reconeixeran els al·lopèptids a nivell de la cèl·lules presentadores d'antigen professionals del donant directament, i per una via indirecta on els limfòcits T del receptor reconeixeran els al·lopèptids a la cèl·lules presentadores d'antigen professionals del propi receptor un cop processats i presentats a la superfície cel·lular juntament amb les molècules d'HLA de classe II. El tipus de presentació antigènica que es produeixi, tindrà un paper rellevant en la resposta immunològica que se'n derivi posteriorment; sembla que la via directa s'associa a una major i ràpida resposta immunològica, en canvi, la via indirecta té unes implicacions més a llarg termini degut a l'absència de cèl·lules presentadores d'antigen professionals del donant, produint així una resposta immunològica constant al llarg del temps (23). No obstant, estudis recents suggereixen que ambdues vies de presentació antigènica podrien persistir i ser rellevants en el desenvolupament de la IF/TA de l'empelt a llarg termini. D'aquesta manera, Herrera i col·laboradors (24) demostren com les cèl·lules presentadores d'antigen del receptor o cèl·lules endotelials podrien adquirir nivells significatius del complex al·logènic HLA-pèptid i activar seguidament els limfòcits T per les 2 vies de presentació. Aquesta, s'anomena tercera via de presentació o semi-directa (figura 2).

Un cop produït el reconeixement antigènic, els mecanismes efectors de resposta immunològica que s'activaran són diversos i molt especialitzats. Aquests, variaran segons el "milieu" de citoquines generat localment després del reconeixement antigènic específic, segons l'origen biològic de la cèl·lula presentadora d'antigen i del tipus de

subpoblacions cel·lulars especialitzades presents. El paradigma clàssic dels mecanismes efectors de la resposta immunitària ve determinat tradicionalment per la diferenciació del limfòcit T CD4+ cap a una via Th1 cel·lular o bé Th2 humoral (25). D'una banda, la resposta efectora Th1 derivarà en l'activació del limfòcit T, convertint-se aquesta en la cèl·lula efectora principal productora de citokines proinflamatòries com interferó-gamma (IFN- γ) i perforines. En canvi, la via efectora Th2 és la que portarà a l'activació del limfòcit B produint-se una resposta humoral o mitjançada per anticossos antígen-específics a través de la diferenciació en cèl·lules plasmàtiques.

És ben conegut que per produir-se l'activació plena del limfòcit T CD4+ naïve (LTnaïve) i que aquest proliferi, s'expandeixi clonalment i porti a terme una resposta efectora eficaç, és condició *sine qua non* que es succeeixin tres senyals estimuladores. La primera senyal és la generada després del reconeixement antigènic mitjançant el receptor de la cèl·lula T i les molècules d'HLA a la cèl·lula presentadora d'antigen. La segona senyal d'activació és la produïda per molècules coestimuladores entre el limfòcit T i la cèl·lula presentadora d'antigen, entre les més conegudes es troben els receptors de superfície CD28 i CD154 (CD40 Ligand) i els complexos B7 (CD80/CD86) i CD40, respectivament. Aquesta segona senyal es produeix exclusivament a través de les CPA professionals. L'absència d'aquesta segona senyal convertirà el limfòcit en anèrgic i s'induirà la seva mort programada o apoptosi. Un cop rebuda la senyal del reconeixement antigènic mitjançant el receptor de la cèl·lula T s'induirà l'aparició de receptors citoquínics i altres factors de creixement a nivell de la superfície cel·lular que permetran l'expansió clonal limfocitària tant de limfòcits citotòxics com col·laboradors antígen-específics. La citokina amb l'efecte més conegut és la IL-2 que interactua a través del seu receptor (IL-2R o CD25). Aquesta unió és l'anomenada tercera senyal d'activació limfocitària.

A banda, d'aquestes respostes efectores clàssiques que induiran el rebuig de l'empelt, l'aparició d'una resposta supressora o tolerogènica (Th3) mitjançada per una subpoblació limfocitària anomenada reguladora (Treg), sembla cada cop adquirir un rol més rellevant en la inducció i manteniment d'un estat de tolerància antigen-específic (26-30). Aquesta subpoblació cel·lular, sota unes condicions biològiques favorables molt específiques, tindrà la capacitat de suprimir o inhibir les respostes efectores tant cel·lulars com humorals i afavorir l'acceptació de l'empelt al llarg del temps.

Recentment (31), ha estat descrita una altra subpoblació limfocitària T CD4⁺ (Th17), que apareixeria en el context d'un ambient molt concret, ric en IL-23, TGF- β i IL-6. Aquesta subpoblació limfocitària, productora de citoquines proinflamatòries (IL-17, IL-22 y TNF- α) és responsable d'induir diversos trastorns autoimmunes i sembla tenir un paper important en el desenvolupament d'episodis de rebuig agut al induir la granulopoesi i la seva migració cap a teixits inflamats sobretot en situacions on la resposta Th1-IFN- γ estaria inhibida. A més, aquesta via tindria un efecte contrari a la generació de Tregs degut a la presència d'IL-6 (figura 3).

Memòria limfocitària T

Dins la població limfocitària T, es troben els limfòcits T de memòria (LTm). Aquesta subpoblació cel·lular exerceix un rol essencial en el desenvolupament de l'altresposta antígen-específica que conduirà al rebuig tant agut com crònic de l'empelt renal. Davant una segona exposició a un mateix antígen, aquesta subpoblació limfocitària produirà una resposta molt més ràpida, vigorosa i eficaç que la produïda pel LTnaïve. Aquestes característiques biològiques dels LTm, dona unes qualitats protectores molt beneficioses a l'organisme enfront de patògens, però en canvi en el trasplantament, la presència d'aquests LTm primats específicament contra antígens del donant serà potencialment deletèria. Malgrat aquest fet, l'impacte d'aquesta subpoblació limfocitària en el camp del trasplantament ha estat infravalorat, reconeixent-se només en els darrers temps que el control de la resposta que desencadena aquesta subpoblació cel·lular és força més difícil que la que es requereix per controlar la subpoblació LTnaïve.

Tanmateix, el perfil biològic d'aquesta subpoblació limfocitària és la que li confereix aquesta especial efectivitat; característicament aquestes cèl·lules tenen una localització determinada, ja sigui en teixits limfàtics (LTm centrals) o bé circulant en la perifèria (LTm perifèriques o efectores). A més, aquesta subpoblació cel·lular antígen-específica no requereix tant de la segona senyal de coestimulació per a una completa activació. També, s'ha demostrat que exhibeixen una cinètica d'actuació diferent; ràpida funció secretora de citokines citotòxiques com IFN- γ , ràpida capacitat proliferativa, major cinètica de resposta a menor dosi d'exposició antigènica i un efecte citolític directe (32,33). A més i molt important, a diferència dels LTnaïve, els LTm tenen la capacitat de lisar directament cèl·lules després del nou reconeixement antigènic sense necessitat de diferenciar-se ni proliferar clonalment (34). Els LTm poden ser activats i diferenciats en cèl·lula citotòxica efectora a través de cèl·lules presentadores d'antigen no

professionals com per exemple cèl·lules endotelials (35), fet que els confereix encara una major perillositat (taula 1). Amb l'aparició de nous fàrmacs immunosupressors, la importància clínica d'aquesta subpoblació cel·lular s'ha incrementat significativament donades les observacions que apunten a la major resistència dels LTm enfront determinats agents immunosupressors: hi ha estudis que suggereixen que els fàrmacs inhibidors de la calcineurina i especialment tacrolimus, tenen una major potència inhibidòria tant a nivell proliferatiu com secretor citoquínic sobre els LTm que els inhibidors mTOR, àcid micofenòlic o azatioprina (36).

Clàssicament, sabem que aquesta subpoblació limfocitària es genera després d'una primera exposició a al·loantigens. En el cas del trasplantament doncs, la seva presència serà previsible en pacients amb politransfusions sanguínies prèvies (37), antecedent d'embaràs (38), trasplantaments previs (39) per reacció creuada amb antígens virals o bacterians (immunitat heteròloga) que implícitament s'associa a un major risc de rebuig agut i pitjor funció de l'empelt renal i fins i tot el temps en hemodiàlisi implica un major risc de sensibilització cel·lular (40).

L'estudi d'aquesta subpoblació limfocitària s'ha fet mitjançant diferents tècniques de monitoratge, bàsicament amb tests de precursors limfocitaris citotòxics mitjançant anàlisi per dilució limitant (LDA) (41), detecció de citoquines secretades mitjançant citometria de flux (42, 43) o el *Trans vivo assay* d'hipersensibilitat retardada (44). Totes elles però, són tècniques molt laborioses i han mostrat poca sensibilitat i reproductibilitat pràctica per a monitoritzar de forma funcional aquesta subpoblació limfocitària.

Una de les tècniques més sensibles i precises que permet el monitoratge funcional dels LTm antígen-específics, és la tècnica d'immunoanàlisi d'Elispot IFN- γ (45). Aquesta, permet detectar la freqüència de secreció d'IFN- γ per cada cèl·lula estimulada en un

cultiu mixt limfocitari de curta durada (20-22 hores). Així, mitjançant un programa d'anàlisi d'imatge d'alta resolució es comptabilitzen el nombre de spots (IFN- γ) secretats per nombre de cèl·lules estimulades específiques pels antígens exposats en el cultiu mixt cel·lular.

En el trasplantament renal el monitoratge d'aquesta subpoblació limfocitària mitjançant la tècnica d'Elispot IFN- γ s'ha dut a terme principalment durant el període inicial de trasplantament. La presència abans del trasplantament de LTm donant-específics circulants en sang perifèrica i activats per la via directa de presentació antigènica, s'ha associat a un major risc de rebuig agut cel·lular post-trasplantament renal. També, la seva detecció durant les primeres setmanes del trasplantament s'ha associat a una pitjor funció de l'empelt als 6 mesos del trasplantament (46, 47). És interessant també conèixer com la presència d'aquests LTm altament al·loreactius circulants no sempre es correlaciona amb el grau de sensibilització humoral, suggerint així una certa independència d'actuació entre els mecanismes efectors immunològics cel·lulars activats per via directa de presentació antigènica i humorals (48, 49).

D'aquesta manera, semblaria que aquesta subpoblació limfocitària de memòria avaluada a través de la tècnica d'Elispot podria ser un biomarcador força sensible per al monitoratge del grau d'al·loreactivitat cel·lular donant-específica en el trasplantament renal.

Resposta immunològica T reguladora

De forma contraposada al paradigma efector clàssic de resposta limfocitària efectora Th1/Th2/Th17 exposada anteriorment, el sistema immunològic conté una subpoblació limfocitària T supressora anomenada reguladora (Treg). Aquesta subpoblació limfocitària Treg té capacitat supressora, essent capaç de controlar o inhibir respostes immunològiques efectores enfront d'antígens específics sent per tant un mecanisme d'autoregulació, facilitant així la inducció d'un estat de tolerància central i perifèrica. En els darrers anys aquesta subpoblació limfocitària ha anat adquirint una importància creixent dins el camp de l'auto i al·loimmunitat. De fet, sabem que el sistema immunològic en condicions normals produeix endògenament, com a constituent cel·lular propi, aquest tipus de subpoblació limfocitària reguladora.

Les Tregs estan altament especialitzades en portar a terme una funció supressora de resposta immunològica; de fet, alteracions en el nombre i funció d'aquestes cèl·lules han mostrat ser el punt de partida de patologies autoimmunitàries o inflamatòries tant en animals com en humans (50). Així, les Tregs han demostrat tenir un paper crucial en múltiples escenaris immunològics: en la prevenció de processos d'origen autoimmune com la diabetes tipus 1 (51, 52) i immunoinflamatoris (53), regulant la resposta immunitària enfront infeccions víriques i parasitàries (54, 55), en el manteniment de la tolerància materno-fetal (56) i inhibint la immunitat anti-tumoral (57). En el camp del trasplantament concretament, el rol d'aquesta subpoblació cel·lular és cada cop de major interès, ja que la seva actuació semblaria ser capaç d'induir i mantenir un estat d'hiporesposta antígen-específica (58).

Malgrat que s'han descrit diferents estirps cel·lulars de Tregs, les més conegudes són aquelles que expressen l'anomenat "master gene" i que les identifica; aquest és el factor de transcripció intranuclear forkhead box p3 (FoxP3). De fet, ni en humans ni ratolins

es coneixen cèl·lules amb activitat reguladora amb mutacions o absència d'aquest gen (59). No obstant, en humans algunes cèl·lules sense capacitat reguladora poden arribar a expressar de forma transitòria aquest gen després d'èsser activades via reconeixement antigènic pel receptor de cèl·lula T (60).

Les Tregs poden diferenciar-se en 2 subpoblacions principals; les majoritàries i més conegudes són aquelles que es generen de forma natural al timus i surten a la circulació perifèrica com a cèl·lules madures funcionals (“natural occurring” CD4+CD25+FoxP3+ Treg o nTregs) (61, 62) i les CD4+ Tregs induïdes a la perifèria procedents de precursors limfocitaris CD4+CD25- o expandides de la subpoblació limfocitària CD4+CD25+ gràcies a l'efecte de certs factors solubles com el TGF- β o la IL-10 (63, 64). La diferenciació dels limfòcits T cap aquest fenotip funcional regulador dependrà dels diferents factors que es produeixin després del reconeixement antigènic via RCT: el “milieu” citoquínic local, l'origen de la CPA i la presència de Treg pre-existents. A més, aquesta subpoblació cel·lular expressa altres molècules com el GITR (glucocorticoid-induced TNFR family related gene), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen) i una baixa expressió de CD127. Tanmateix però, el factor essencial pel manteniment de l'efecte regulador/supressor d'aquesta subpoblació limfocitària és l'expressió del factor de transcripció FoxP3. El manteniment de la seva expressió s'explica gràcies a una exposició antigènica persistent i constant. Una de les característiques més importants d'aquestes cèl·lules és la seva especificitat antigènica (65). Aquest fenomen es converteix en essencial per a poder induir un estat de tolerància antígen-específica.

Aquestes propietats supressores amb especificitat antigènica tan selectiva fan que aquesta subpoblació cel·lular sigui molt atractiva, no tan sols per ésser considerada com a biomarcador d'un estat immunològic protolerogènic sinó també per a ser utilitzada en

el futur com a potencial teràpia immunosupressora en el trasplantament. De fet, en models murins de trasplantament cutani i cardíac, l'administració de Tregs sensibilitzades prèviament contra antigens del donant per via directa i indirecta de presentació antigènica han mostrat ser capaces d'evitar satisfactòriament el rebuig tant agut com crònic de l'empelt (66).

En el trasplantament renal, nivells elevats de mRNA-FoxP3 en orina durant episodis de rebuig agut han mostrat ser un marcador favorable en quan a la reversibilitat de l'episodi de rebuig i supervivència de l'empelt comparat amb aquells pacients amb nivells baixos, suggerint indirectament el rol protector d'aquesta subpoblació cel·lular infiltrant l'empelt renal en quan a l'acceptació immunològica de l'empelt (67). De fet, diferents treballs experimentals de trasplantament de pell, cardíac i renal han mostrat com la presència d'infiltrats cel·lulars amb Tregs directament a nivell de l'empelt exerceixen un paper beneficiós per a l'acceptació de l'empelt (68-70). Aquest fet suggereix que no tots els infiltrats limfocitaris en l'empelt tenen el mateix significat biològic. La diferenciació entre infiltrats cel·lulars pro-inflamatoris i pro-tolerogènics adquireix una especial rellevància en l'entitat histopatològica anomenada *rebuig agut subclínic*. Aquesta entitat és definida com la presència de patrons histològics exactament iguals als observats durant episodis de rebuig agut clínic però aquests es presenten en pacients amb funció renal estable. El significat pronòstic del rebuig agut subclínic és força controvertit, i aquesta controvèrsia és encara més evident, quan s'analitza l'efecte del tractament d'aquests infiltrats (71-73). Per tant, diferenciar entre infiltrats protectors i inflamatoris permetria teòricament establir una estratègia terapèutica diferent en cada cas.

De forma interessant, alguns agents immunosupressors semblen exercir també un paper diferent sobre aquesta subpoblació cel·lular. Així, els fàrmacs ICN, donada la inhibició

que produeixen sobre la síntesi d'IL-2 via calcineurina, inhibeix la formació i expansió d'aquestes cèl·lules. La manca d'IL2 impedeix la sobreexpressió del seu receptor (CD25), factor clau per la supervivència de les Tregs tant *in vitro* (74) com *in vivo* (75). En canvi, els fàrmacs inhibidors de m-TOR, malgrat inhibir la senyal transductora provinent de la unió d'IL-2 al seu receptor han mostrat tenir la capacitat d'expandir i mantenir aquesta subpoblació cel·lular en sang perifèrica, probablement degut a que aquesta inhibició és restringeix exclusivament a nivell de la subpoblació limfocitària efectora activada (76). De la mateixa manera, els anticossos anti-limfocitaris policlonals com la r-ATG (rabbit anti-thymocyte globulin) han mostrat tenir unes propietats favorables al permetre la inducció i expansió *in vitro* de Tregs funcionals en sang perifèrica, bàsicament mitjançant la conversió de limfòcits T CD4+CD25⁻ a CD4+CD25^{high} a la periferia (77).

Per tant, l'exploració funcional d'aquesta subpoblació limfocitària en el trasplantament renal podria ser de gran importància per a poder conèixer quins pacients són susceptibles d'acceptar l'empelt i per tant subsidiaris de minimitzar de forma segura el seu tractament immunosupressor.

II. HIPÒTESI

La hipòtesi d'aquesta tesi doctoral és que el monitoratge de les subpoblacions limfocitàries T de memòria/efectora secretora d'IFN- γ i T reguladora FoxP3+ donant-específiques en el trasplantament renal podria exercir un paper rellevant com a biomarcadors de la funció immunològica donant-específica i per tant relacionar-se amb la funció i el dany histològic de l'empelt, tant en protocols protolerogènics com en el seguiment del pacient trasplantat en tractament de manteniment.

III. OBJECTIUS

1. El primer objectiu del treball de tesi és avaluar si el monitoratge dels limfòcits T de memòria/efectors circulants donant-específics i activats per les dues vies de presentació antigènica (directe i indirecte) mitjançant la tècnica d'Elispot IFN- γ en pacients portadors d'un empelt renal de llarga evolució (>2 anys), és un bon biomarcador capaç de discriminar aquells pacients que presenten alteracions de la funció renal.

2. El segon objectiu és avaluar si la presència de cèl·lules Tregs (CD4+CD25+FoxP3+) entre infiltrats cel·lulars en pacients diagnosticats de rebuig agut subclínic, és un bon biomarcador per a diferenciar entre infiltrats lesius d'aquells amb un rol protector sobre l'empelt.

3. El tercer objectiu d'aquest treball és avaluar els mecanismes a través dels quals l'administració d'un protocol immunosupressor amb propietats immunomoduladores basat amb un tractament inductor deplecionador limfocitari T amb rATG a dosis baixes, acompanyat d'un tractament de manteniment amb sirolimus i micofenolat mofetil, sense esteroides ni fàrmacs anti-calcineurínics, és capaç d'induir un estat d'hiporesposta donant-específica després del trasplantament renal. Per assolir aquest objectiu, es realitza un monitoratge acurat de les diferents respostes immunològiques efectores d'aquests pacients en diferents períodes del trasplantament; la resposta cel·lular donant-específica per tècnica d'Elispot IFN- γ , la resposta humoral mitjançant l'estudi d'aloanticossos donant-específics (DSA) circulants i presència de C4d a nivell de capil·lars peritubulars de l'empelt i la resposta reguladora estudiant la presència i comportament funcional de les TregsFoxP3+ tant en sang perifèrica com directament a nivell de l'empelt renal.

IV. ESTUDIS

V. RESULTATS

Estudi 1.

Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients.

J Am Soc Nephrol. Jul; 19(7):1419-1429, 2008.

A 34 pacients portadors d'un trasplantament renal de més de 2 anys d'evolució se'ls estudià la presència de cèl·lules T de memòria/efectores donant-específiques circulants en sang perifèrica activades per ambdues vies de presentació antigènica (directa i indirecta) mitjançant la tècnica d'ELISpot IFN- γ . La seva presència o absència fou correlacionada amb l'evolució clínica respectiva de cada pacient. A més, s'avaluà també la presència d'anticossos donant-específics circulants en tots els pacients seleccionats.

La via directa de presentació antigènica fou realitzada *in vitro* mitjançant la utilització de cèl·lules presentadores d'antigen del donant presents en sang perifèrica. La via indirecta en canvi, fou mimetitzada *in vitro* mitjançant la utilització d'al·lopèptids dels respectius donants obtinguts per fragmentació mecànica de cèl·lules perifèriques mononucleades. Aquesta tècnica es diferencia de la resta de mètodes utilitzats fins a l'actualitat on s'utilitzen pèptids concrets del sistema HLA, permetent obtenir així un perfil antigènic del donant molt més similar al real al tenir tot l'espectre al·loantigènic present.

Variables clíniques:

- Els pacients que havien presentat algun episodi de rebuig agut cel·lular (n=16) presentaren una significativa pitjor funció renal que els que no n'havien presentat cap

(n=18; creatinina sèrica $2,1\pm 1$ versus $1,5\pm 0,4$ mg/dL; $p=0,007$). A més, aquells pacients amb episodis de rebuig agut tardà (>3 mesos, n=12) també tenien una significativa pitjor funció renal que la resta (creatinina sèrica $2,2\pm 2,2$ versus $1,5\pm 0,5$ mg/dL; $p=0,0019$). Aquells amb més d'un episodi de rebuig agut (n = 10) tenien una tendència a la significació estadística a tenir una pitjor creatinina sèrica ($2,1\pm 1,2$ versus $1,6\pm 0,5$ $p=0,051$) que la resta (n = 24), (taula 2 a l'article) .

A l'anàlisi univariant cap variable clínica com l'edat i gènere tant del receptor com del donant, el temps transcorregut després del trasplantament així com el nombre de miss-match HLA entre receptor i donant i el diferent tipus de tractament immunosupressor foren predictores de la funció renal (tant de creatinina sèrica com de filtrat glomerular (FG) o proteïnúria).

Monitoratge immunològic:

- Inicialment es comprovà la validesa de la tècnica per reproduir la via indirecta de presentació antigènica *in vitro* (figura 7 a l'article). Així, després de realitzar un cultiu mixte de 6 dies de duració entre limfòcits T procedents d'un individu sa i al·loèptids procedents de la fragmentació mecànica de les proteïnes de membrana de cèl·lules presentadores d'antigen d'un altre individu sa amb complet missmatch HLA (DR, B i A) (comprovant-se la presència de molècules HLA als sobredants per tècnica de Western-blot), s'agafaren de nou els limfòcits T del cultiu i es tornaren a exposar als mateixos al·loèptids del mateix individu estimulador per comprovar el grau de resposta immunològica de memòria. Aquesta línia limfocitària de memòria presentà una major i molt important proliferació cel·lular T (bàsicament a expenses de la subpoblació T CD4+) i secreció citoquínica d'IFN-gamma després de ser reestimulades amb els mateixos al·loèptids amb els que havien estat primats anteriorment.

- Els 34 pacients foren avaluats per la via directa de presentació antigènica, i 33 per la via indirecta. En 20/34 (58%) pacients es detectà al·loreactivitat cel·lular de memòria antigen-específica per via directa de presentació antigènica. Per la seva part, la via indirecta de presentació fou detectada en 20/33 (60%) dels pacients. El grau de resposta fou molt diferent entre les dues vies de presentació, essent les freqüències de resposta per via directa de presentació antigènica aproximadament unes 3 vegades majors que per la via indirecta (figura 1 a l'article). Malgrat que 14 pacients presentaren al·loreactivitat de memòria per les 2 vies alhora i 8 malalts no presentaren cap tipus d'al·loresposta, no s'observà cap relació entre les 2 vies en l'anàlisi univariant.

1. Via directa (VD)

- La via directa es correlacionà positivament amb la creatinina sèrica i inversament amb el filtrat glomerular ($r=0,551$, $p=0,001$ i $r=-0,34$, $p=0,042$, respectivament). Cap correlació fou objectivada entre la via directa i la presència de proteïnúria (estimada de forma semiquantitativa), (figura 2A a l'article).

- Els pacients amb més d'un episodi de rebuig agut i aquells amb episodis de rebuig agut tardà (>3m) presentaren una significativa major al·loreactivitat per via directa (figura 2B a l'article).

- Catorze dels trenta-quatre pacients (41,2%) manifestaren un estat d'hiporesposta donant-específica per via directa. Aquests, mostraven una significativa millor filtrat glomerular que els no hiporespondors donant-específics ($59,7 \pm 17$ versus $41,2 \pm 16$ ml/min; $p=0,006$), (figura 3 a l'article). A més, a major nombre d'incompatibilitats HLA (A, B i DR) entre el receptor i el donant, major grau d'al·loreactivitat per la via directa de presentació antigènica (figura 4 a l'article).

2. Via indirecta (VI)

- Aquesta via no es correlacionà amb la funció renal ni tampoc amb antecedents de rebuig agut, però sí amb la presència de proteïnúria. Així, la presència de proteïnúria s'associà significativament a una elevada al·loreactivitat per via indirecta ($29,2 \pm 24,3$ *versus* $12,3 \pm 38,1$ spots en malalts amb/sense proteïnúria, respectivament; $p=0,022$), (figura 5A a l'article).

- A diferència de la via directa, la presència d'al·loreactivitat per via indirecta es correlacionà positivament amb el temps de trasplantament; a major temps trasplantat, major al·loreactivitat indirecta ($r=0,351$, $p=0,045$), (figura 5B a l'article).

3. Al·loreactivitat cel·lular global

- Quaranta-dos percent dels pacients estudiats presentaren al·loreactivitat per les dues vies de presentació antigènica (VD+/VI+), 24% no presentaren cap signe d'al·loreactivitat per cap via (VD-/VI-), 15,1% mostraren positivitat només per la via directa (VD+/VI-) i un 18% presentà al·loreactivitat per la via indirecta solament (VD-/VD+).

- Aquells pacients altament al·loreactius per les dues vies mostraren una creatinina sèrica significativament pitjor que aquells amb al·loreactivitat indetectable per cap via i que aquells amb només al·loreactivitat per via indirecta ($2,1 \pm 1$ *versus* $1,1 \pm 0,3$ mg/dL; $p=0,004$ i $2,1 \pm 1$ *versus* $1,3 \pm 0,3$ mg/dL; $p=0,023$). Aquells pacients amb al·loreactivitat per via directa exclusivament no presentaren cap diferència en quan a la funció renal respecte aquells amb elevada al·loreactivitat per ambdues vies de presentació (figura 6 a l'article).

4. Al·loreactivitat humoral

- Només un pacient presentà anticossos donant-específics circulants després del trasplantament. Aquest, només presentà al·loreactivitat per via indirecta.

Anàlisi multivariant

A l'anàlisi multivariant s'estudiaren totes les variables que s'havien associat a la funció renal (creatinina sèrica) i presència de proteinúria en l'anàlisi univariant (taula 3 a l'article). De totes elles, només l'assoliment d'un estat d'hiporesposta per via directa és correlacionà de forma independent amb la funció renal (coeficient $\beta=-0,505$, $p=0,003$). Respecte la presència de proteïnúria, només l'al·loreactivitat per via indirecta fou la variable de correlació independent (RR=1,047, $p=0,04$).

Estudi 2.

Presence of FoxP3+ regulatory T cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts.

J Am Soc Nephrol. Oct; 19(10):2020-2026, 2008.

A 37 pacients portadors d'un trasplantament renal diagnosticats mitjançant biòpsies de protocol als 6 mesos del trasplantament de rebuig agut subclínic (funció renal estable definida com a variabilitat de <15% de la funció renal en les 2 setmanes prèvies i posteriors a la biòpsia i signes histològics de canvis borderline i/o rebuig agut tubular-intersticial Banff grau ≥ 1), se'ls avaluà la presència de cèl·lules Tregs FoxP3+ entre els infiltrats cel·lulars, la seva proporció entre la resta de població limfocitària T (CD4+, CD8+ i CD25+) i l'impacte en l'evolució clínica d'aquests pacients.

- Dels 37 pacients, 12 malalts (32,5%) no presentaven evidència de Tregs entre els infiltrats cel·lulars i 25 (67,5%) si tenien presència de Tregs. La major part d'aquestes cèl·lules eren CD4+CD25+. El percentatge de Tregs dins la subpoblació limfocitària T (Treg/CD3+) varià entre el 0,7% a un 52%.

- Entre les variables clíniques associades a la presència o absència de Tregs als infiltrats tubular-intersticials, només l'antecedent d'haver rebut teràpia d'inducció bàsicament amb agent deplecionador T (Timoglobulina) i sirolimus s'associaren significativament a la presència de Tregs entre els infiltrats (taula 2 a l'article). A més, només la combinació immunosupressora de Timoglobulina i sirolimus (rATG+SRL) s'associà significativament a la presència de Tregs als infiltrats. En canvi, els pacients sota anti-calcineurínics o que no havien rebut teràpia inductora presentaren significativament menor infiltració per aquesta subpoblació limfocitària.

- Cap variable clínica o demogràfica s'associà a la presència o absència d'aquesta població Treg. Tampoc els antecedents de rebuig agut, funció renal/proteinúria, scores tant aguts/crònics de la classificació de Banff en els diferents compartiments histològics renals ni els tipus d'agregats limfocitaris (nodulars/difusos) s'associaren a la presència de cèl·lules Tregs entre els infiltrats.

- Els pacients amb presència de Tregs entre els infiltrats cel·lulars, presentaren una millor evolució de la funció renal (creatinina sèrica i FG) als 2 i 3 anys després del trasplantament que aquells malalts sense Tregs (figura 2A i 2B a l'article). A més, el percentatge de Tregs/CD3+ entre els infiltrats es correlacionà positivament amb el FG als 2 anys del trasplantament ($r=0,36$, $p=0,03$), (figura 2C a l'article). De forma interessant, quan s'analitzà la proporció de Tregs respecte el total de l'infiltrat limfocitari (CD3+), aquells pacients amb menor grau de lesió crònica (Banff score de cronicitat a nivell tubulo-intersticial <2) eren els que tenien un major proporció de Tregs entre els infiltrats ($14,2\pm 16,2$ *versus* $8,3\pm 8,1\%$, $p=0,035$).

- Els pacients sota SRL presentaren una significativa millor funció renal que aquells pacients amb ICN als 2 i 3 anys del trasplantament (FG $78,3\pm 21$ *versus* $55,1\pm 18,2$ ml/min [$p=0,003$] i $89,7\pm 11$ *versus* $56,1\pm 18,2$ ml/min [$p=0,003$], respectivament), (figura 3A a l'article). No obstant aquest fet, en analitzar l'impacte de les Tregs exclusivament entre els pacients tractats amb fàrmacs ICN, aquells malalts amb presència de Tregs entre els infiltrats, presentaren també una significativa millor funció renal als 2 i 3 anys del trasplantament renal (FG $63\pm 17,1$ *versus* $44,5\pm 5$ ml/min [$p=0,02$] i 62 ± 20 *versus* $52,3\pm 16,6$ ml/min [$p=0,04$], respectivament), (figura 3B a l'article).

- En quan a l'anàlisi de Kaplan-Meyer, es considerà "event" aquells pacients amb un FG <40 ml/min (obtingut per anàlisi de corba de ROC), els pacients amb Tregs entre els

infiltrats tenien un risc significativament menor d'arribar durant el seguiment a un FG <40ml/min que aquells sense Tregs. Tot seguit, tant en l'anàlisi univariant com multivariant, només la creatinina sèrica als 6 mesos del trasplantament i la presència de Tregs als infiltrats foren les úniques variables independents predictores per a mantenir un FG \geq 40ml/min (figura 4 a l'article).

Estudi 3.

Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FoxP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates.

J Immunol. Oct; 179(7):4901-4909, 2007.

En 20 pacients trasplantats renals de baix risc immunològic se'ls administrà un protocol immunosupressor lliure d'anticalcineurínics i esteroides, basat en inducció amb baixes dosis de timoglobulina i tractament de manteniment amb sirolimus (SRL) i micofenolat mofetil (MMF). Durant els 2 primers anys del trasplantament fou avaluada la resposta immunològica donant-específica cel·lular i humoral en sang perifèrica així com l'evolució de les diferents subpoblacions limfocitàries i el grau d'apoptosi cel·lular. També, l'estudi del dany histològic fou avaluat en biòpsies de protocol realitzades als 6 mesos del trasplantament i en totes elles, es realitzà la caracterització fenotípica dels infiltrats cel·lulars.

A. Variables clíniques

- La mitjana de seguiment fou de 34 mesos (rang: 21-47 mesos). La supervivència del pacient i de l'empelt foren de 95 i 85%, respectivament. La incidència de rebuig agut comprovat per biòpsia (BPAR) fou 35% (12/20), 3 dels quals (15%) foren diagnosticats de *canvis borderline* (taula II a l'article). Tots els rebutjos van ser sensibles als esteroides. Al final del seguiment, no hi hagueren diferències estadísticament significatives en quan a la funció renal o als nivells de proteïnúria entre els pacients amb BPAR i els que no van patir BPAR (figura 1 a l'article).
- A 34 mesos de seguiment, 70% dels pacients continuaven sense rebre fàrmacs ICN i un 35% sense esteroides. Dos pacients es trobaven sota SRL en monoteràpia.

- Un pacient presentà virèmia per citomegalovirus i fou tractat amb ganciclovir sense majors complicacions. Un altre, desenvolupà un seminoma testicular 27 mesos després del trasplantament, controlat per quimioteràpia amb excel·lent resposta clínica. Un pacient fou èxitus per una pneumònia extrahospitalària als 42 mesos post-trasplantament, i aquest es trobava sota un fàrmac ICN.

B. Monitorització Immunològica en sang perifèrica

1. Subpoblacions limfocitàries i apoptosi cel·lular

- Després del trasplantament hi hagué una deplecció significativa de totes les subpoblacions limfocitàries durant els primers 2 mesos (subpoblacions limfocitàries T, B i Natural Killer), apareixent una lenta però progressiva recuperació. Als 2 anys del trasplantament, el recompte limfocitari T total (CD3+) i la subpoblació CD4+ era encara significativament menor que a nivell basal. En canvi, el nombre total de CD8+, CD19+ i CD56+ s'havia recuperat (figura 2 a l'article).

- Després del trasplantament, la única subpoblació limfocitària que s'incrementà significativament respecte el basal fou la CD4+CD25^{high}. Als 2 anys, els pacients que havien assolit un estat d'hiporesposta cel·lular donant-específica presentaren una significativa major presència de Tregs (CD4+CD25^{high}FoxP3+) a sang perifèrica (55±9% *versus* 28±13%, p=0,005). Aquest fet s'associà a manteniment del tractament immunosupressor amb SRL (48±11% *versus* 38±13%, p=0,005), (figura 4 a l'article).

- Després de la profunda depleció limfocitària inicial, al 5è dia post-trasplantament s'objectivà un pic màxim d'apoptosi restringida bàsicament a nivell de la subpoblació CD8+ activada (HLA DR+), (figura 3 a l'article).

2. Monitoratge de l'al·loreactivitat cel·lular (Elispot IFN- γ)

- La presència d'elevada al·loreactivitat donant-específica pre-trasplantament s'associà a major incidència de rebuig agut ($p=0,02$), (figura 5A a l'article). Durant els primers 6 mesos del trasplantament es produí una hiporesposta generalitzada en la majoria dels pacients. Als 6 mesos del trasplantament, 9 pacients adquiriren un estat d'hiporesposta donant-específica i aquest estat immunològic fou mantingut fins als 2 anys del trasplantament (figura 6 a l'article).
- Aquells pacients hiporespondors donant-específics als 6 mesos del trasplantament presentaven una significativa millor funció renal que els no hiporespondors, i als 24 també s'objectivà aquesta tendència cap a la significació estadística (figura 7 a l'article).
- Per tal de confirmar que aquest estat immunitari d'hiporesposta donant-específic fou assolit gràcies a l'efecte supressor donant-específic de les Tregs d'aquests pacients, és repetiren els tests funcionals *in vitro* aquest cop però, descartant del cultiu mixte les cèl·lules CD4+CD25^{high} mitjançant *cell-sorting* (figura 8 a l'article). D'aquesta manera, la deplecció de la població CD4+CD25^{high} d'aquells pacient hiporespondors donant-específics provocava una recuperació de l'al·loreactivitat cel·lular. En canvi, la deplecció d'aquesta subpoblació cel·lular a aquells pacient respondors provocava un estat d'hiporesposta suggerint que en aquest subgrup de pacient, més que Tregs, aquestes cèl·lules CD4+CD25^{high} eren limfòcits T activats. La confirmació de que l'efecte supressor d'aquesta subpoblació Treg era antígen-específic, es demostrà mitjançant l'aparició de supressió immunològica només quan aquestes cèl·lules eren afegides a un cultiu mixte al·logènic amb presència de cèl·lules del donant respecte al qual aquestes Tregs havien estat exposades prèviament.

3. Monitorització al·loresposta humoral

- Cap dels 20 pacients presentà anticossos donant-específics circulants a l'any del trasplantament. En cap d'aquests pacients s'objectivà dipòsits de C4d a nivell de capil·lars peritubulars en les biòpsies de protocol.

C. Anàlisi histològic en biòpsies de protocol als 6 mesos

- Aquells pacients que havien assolit l'estat d'hiporesposta donant-específica, presentaven un menor grau de lesió crònica en l'estudi histològic. En canvi, aquells amb un major grau de dany histològic crònic (Banff>Ia), no havien assolit aquest estat de "privilegi" immunològic (taula IV a l'article).

- Dins els infiltrats cel·lulars tubular-intersticials, la presència de Tregs entre la població limfocitària T (CD3+) fou significativament major entre els pacients hiporesponedors donant-específics que entre el no hiporesponedors (figura 9 a l'article).

- Cap d'aquests pacients s'objectivà dipòsits de C4d a nivell de capil·lars peritubulars en les biòpsies de protocol respectives.

VI. DISCUSSIÓ

La resposta immunològica donant-específica és present en diferents graus d'activació en cada individu en els diferents períodes del trasplantament i segons quins siguin els mecanismes, efectors o reguladors, de resposta immune que predominin, es produirà l'acceptació o rebuig de l'empelt renal. Aquest treball de tesi s'ha centrat en la recerca de nous marcadors biològics que ens permetin conèixer quin és l'estat immunològic predominant en el pacient trasplantat renal en els diferents períodes evolutius del trasplantament i de quina manera algunes estratègies immunosupressores tenen capacitat de modular aquesta resposta immunològica enfront l'empelt renal.

Així, aquí es mostra com el monitoratge funcional de dues subpoblacions limfocitàries, els limfòcits T de memòria/efectors altament reactius secretors d'IFN- γ i els limfòcits T reguladors amb expressió del factor de transcripció intranuclear FoxP3+, ambdues amb funcions immunològiques molt específiques, semblen tenir un paper rellevant per ésser emprades com a biomarcadors immunològics de rebuig o contràriament, d'acceptació de l'empelt en el trasplantament renal, respectivament.

Fins ara, l'avaluació *in vitro* del grau d'al·loresposta immunològica donant-específica en el trasplantament s'ha realitzat mitjançant tècniques bàsicament de proliferació cel·lular i precursors citotòxics, mesurant així les poblacions limfocitàries naïve i de memòria alhora. Aquí en canvi, es mostra com el monitoratge de l'al·loresposta cel·lular T de memòria/efectora antígen-específica és mesurable en diferents períodes del trasplantament de forma molt sensible mitjançant la tècnica d'Elispot IFN- γ , mostrant una excel·lent correlació amb l'evolució funcional de l'empelt renal. Estudis recents, han qüestionat si el monitoratge de l'al·loresposta cel·lular durant els diferents períodes del trasplantament, hauria de fer-se estudiant de forma independent, les diferents

subpoblacions limfocitàries que resulten a partir de la seva activació a través de les 2 vies de presentació antigèniques conegudes fins ara; la directa i la indirecta (78-80). Així, en aquest treball es mostra com mitjançant la tècnica d'Elispot IFN- γ , hom pot mimetitzar *in vitro* el grau d'al·loreactivitat de les subpoblacions limfocitàries T de memòria/efectores activades per les dues vies de presentació antigèniques de forma fidedigna. També, i a diferència de treballs anteriors on es monitoritzaren simultàniament l'al·loreactivitat cel·lular directa i indirecta en pacients trasplantats renals (78), aquí s'ha utilitzat, per primer cop, fragments al·logènics de cèl·lules de donants en comptes de pèptids sintètics al·logènics per tal de cobrir tot l'espectre d'epítops presents en els respectius donants. L'avantatge d'aquest mètode és que permet reproduir *in vitro* de forma més acurada la realitat, ja que s'inclou tot el repertori d'epítops incloent-hi també els mismatch del complex menor d'histocompatibilitat.

De forma rellevant, en aquesta tesi es mostra com la presència de cèl·lules T de memòria/efectores donant-específiques primades per via directa, tan abans com en períodes posteriors del trasplantament, és detectable en un nombre important de pacients i a més, aquestes cèl·lules semblen jugar un paper primordial en la disfunció tan aguda com crònica de l'empelt. Per una banda, la detecció d'aquesta subpoblació cel·lular abans del trasplantament ens indica una al·losensibilització limfocitària T prèvia enfront antígens del donant i aquesta, s'associa a un major risc de rebuig agut cel·lular post-trasplantament. De forma interessant, aquest fet és independent del grau de sensibilització humoral. D'altra banda, i en contraposició amb les evidències reportades en la literatura fins ara (81), aquí es mostra com la presència d'aquesta subpoblació limfocitària primada de forma persistent a través de la via directa de presentació antigènica, segueix essent detectable en un nombre important de pacients (en més d'un

50%) més enllà dels 2 anys post-trasplantament. Aquest fenomen persisteix tot i rebent tractament immunosupressor de manteniment i la teòrica desaparició de cèl·lules presentadores d'antigen professionals del donant. L'actiavació de la via directa a llarg terme, permet diferenciar de forma sensible aquells pacients amb una funció renal preservada d'aquells amb disfunció evident de l'empelt. Aquest fet, suggereix indirectament la major susceptibilitat d'aquests pacients a estar exposats a un dany estructural de l'empelt mediat per un mecanisme immunològic efector cel·lular. Això posa en evidència d'alguna manera, l'empíric maneig del tractament immunosupressor que es realitza en la pràctica clínica actualment, on a mesura que avança el temps després del trasplantament, es realitza una progressiva i generalitzada reducció de la dosi immunosupressora, a l'inferir que la resposta immunològica efectora va disminuint al llarg del temps en tots els pacients trasplantats. Els resultats d'aquest treball suggereixen la necessitat de l'assessorament de la resposta immunològica donant-específica per a poder ajustar el tractament immunosupressor al llarg del temps.

Són diverses les explicacions biològiques que justificarien la persistència d'activació limfocitària per la via directa en períodes llunyans després del trasplantament; per un banda, la menor necessitat de coestimulació i requeriment antigènic de les cèl·lules T efectores/memòria per mantenir-se permanentment activades, i d'altra banda que aquesta presentació antigènica directa es podria portar a terme, tal i com s'ha descrit recentment (24), a través de les mateixes cèl·lules presentadores d'antigen del propi receptor amb capacitat d'adquirir molècules HLA de classe I i II a la seva superfície, anomenada *tercera via* o *via semi-directa* de presentació antigènica o fins i tot, podrien ser activades a través d'altres poblacions cel·lulars de l'empelt com cèl·lules endotelials. Clàssicament, el nombre de mismatch HLA entre donant i receptor, s'ha associat a uns pitjors resultats a llarg termini i especialment, entre els pacients hipersensibilitzats (82).

En aquesta línia, en aquest treball de tesi s'ha objectivat que una pobre compatibilitat HLA entre donant-receptor es tradueix amb una major al·loreactivitat cel·lular donant-específica en el post-trasplantament, emfatitzant d'alguna manera l'impacte del grau de compatibilitat HLA a llarg termini en el trasplantament renal.

D'altra banda, aquí també es mostra la importància de l'al·loreactivitat per via indirecta de presentació antigènica. Tal i com és conegut a la literatura, l'activació limfocitària per via indirecta sembla adquirir major rellevància funcional a mesura que passa el temps després del trasplantament. Aquest fet es corrobora en aquest treball al comprovar la major al·loreactivitat per via indirecta en aquells pacients de més llarga durada. Aquest fenomen s'explicaria degut al constant recanvi cel·lular que succeeix a l'empelt, comportant un continu processament de molècules al·logèniques per part de les cèl·lules presentadores d'antigen.

De forma similar a l'activació limfocitària per via directa, la presència d'al·loreactivitat cel·lular per via indirecta sembla també jugar un paper patogènic en el desenvolupament del dany estructural a nivell de l'empelt (83-87). Aquesta hipòtesi sorgeix de l'observació d'una significativa major presència de proteïnúria en aquells pacients amb elevada al·loreactivitat per via indirecta. En aquest sentit, alguns treballs experimentals han mostrat com en la resposta immunològica humoral donant-específica, el canvi d'isotip d'IgM a IgG és mitjançada per la via indirecta de presentació antigènica (88, 89), motiu pel que es podria especular que el desenvolupament de la glomerulopatia del trasplantament, entitat histopatològica causada per un mecanisme immunològic humoral, podria ser originada inicialment per l'activació de la via indirecta de presentació antigènica.

Sembla evident doncs, que el coneixement del grau d'al·loreactivitat cel·lular de efectora/memòria donant-específica a través de les dues vies de presentació

antigèniques *in vitro* mitjançant un test sensible com l'Elispot IFN- γ , pot ser de gran utilitat per tal de reconèixer aquells pacients susceptibles d'estar en risc de patir un dany estructural a l'empelt d'origen immunològic.

De la mateixa manera que el monitoratge de l'alloreactivitat cel·lular efectora/memòria, l'estudi de la subpoblació limfocitària T reguladora Foxp3+ (CD4+CD25^{high}Foxp3+) ha mostrat tenir un paper molt important en la regulació de resposta immunològica, pel que semblaria també poder ésser rellevant com a biomarcador funcional en el trasplantament renal en determinades situacions clíniques. En aquest sentit, aquí es mostra com aquesta subpoblació limfocitària reguladora, és capaç de proliferar i aparèixer de forma significativa després del trasplantament tant en sang perifèrica com directament a l'empelt renal entre agregats limfocitàris tubulo-intersticials, característicament en aquells pacients amb una excel·lent evolució funcional de l'empelt al llarg del temps.

Clàssicament, la infiltració de cèl·lules mononucleades a nivell tubulo-intersticial de l'empelt en pacients trasplantats renals amb funció renal estrictament estable és un fenomen etiquetat com a rebuig agut subclínic cel·lular al mimetitzar el patró histològic objectivat en pacients amb rebuig agut clínic. Aquesta entitat histopatològica és força controvertida en quan al seu impacte en l'evolució de l'empelt (71-73, 90-93). Un dels principals obstacles que més probablement dificulta la interpretació funcional d'aquests infiltrats cel·lulars asimptomàtics, és la manca d'informació funcional d'aquesta població cel·lular infiltrant l'empelt, atribuint-se en tots ells, un mateix mecanisme efector agressor. Així, en aquest treball de tesi es mostra per primer cop en humans, com la presència de la subpoblació Treg Foxp3+ entre aquests infiltrats mononuclears en pacients diagnosticats de rebuig agut subclínic en biòpsies de protocol als 6 mesos

del trasplantament, permet discriminar per si sol, aquells pacients amb una significativa millor evolució funcional de l'empelt renal al llarg del temps i contràriament, com l'absència de Tregs entre aquests infiltrats limfocitaris comporta un significatiu major risc de disfunció progressiva de l'empelt. A més, aquells pacients amb una major proporció de Tregs entre aquests infiltrats mononuclears presenten una millor preservació estructural de l'empelt segons els criteris actualitzats de Banff'07 (6).

En aquest sentit, són diversos els treballs experimentals que mostren com la infiltració de cèl·lules amb un fenotip regulador (Foxp3+) en empelts renals estables (66, 68-70), exerceix un efecte protector sobre l'empelt, representant probablement aquest fet un fenomen de reconeixement antigènic específic d'aquestes Tregs directament a l'empelt per posteriorment poder portar a terme la seva funció supressora antígen-específica.

Aquesta hipòtesi, es veu recolzada pel fet que els pacients amb presència de Tregs entre els infiltrats mononuclears tubulo-intersticials asimptomàtics, són pacients que han tingut la capacitat d'assolir un estat d'hiporesposta donant-específica en la perifèria, estat immunològic vehiculitzat per l'efecte supressor antígen-específic d'aquesta mateixa subpoblació limfocitària reguladora Foxp3+. De forma remarcable a més, aquest estat de privilegi immunològic assolit per aquest conjunt de pacients, molt més que ser un estat biològic simplement estàtic semblaria tenir un paper extremadament dinàmic al tenir una rellevant repercussió funcional: la presència de limfòcits Foxp3+ a l'empelt renal s'associa a un significatiu millor funcionalisme renal a llarg termini.

És de vital importància destriar aquest fenomen, objectivat en pacients amb funció renal estable, d'aquells amb disfunció aguda o subaguda de l'empelt per episodis de rebuig agut presentant els mateixos tipus d'infiltrats mononuclears tubulo-intersticials. En aquest sentit, diferents estudis reportats a la literatura han mostrat forces discrepàncies en quant al impacte de les Tregs entre els infiltrats cel·lulars en pacients amb rebuig

agut clínic (94, 95). L'explicació més plausible d'aquest fenomen i ben documentat a la literatura, ve donat molt probablement pel fet que sota condicions inflamatòries severes, les cèl·lules Tregs perden la capacitat de desenvolupar la seves activitats supressores de resposta immunològica (96, 97). És important tenir en compte a més, que en humans el factor de transcripció Foxp3 pot ser expressat de forma molt transitòria en limfòcits T CD4⁺CD25⁺ activats després del reconeixement antigènic via receptor de la cèl·lula T, però sense presentar aquesta activitat supressora antigen-específica. Aquest fet doncs, podria induir a una falsa identificació fenotípica de Tregs, fonamentalment en situacions d'elevada al·loreactivitat. Per tant, semblaria que durant els episodis de rebuig agut de l'empelt les cèl·lules Tregs estarien bàsicament exercint una funció reactiva o compensadora de l'efecte destructiu de la població limfocitària efectora, més que exercint un paper protolerogènic i de reconeixement antigènic.

Les característiques biològiques d'aquesta subpoblació limfocitària reguladora fa que tingui una sensibilitat especial per diferenciar-se i proliferar sota l'efecte de determinats agents immunosupressors (98, 99). En aquest sentit, són diversos els treballs *in vitro* que mostren com específicament SRL i Timoglobulina tenen un efecte afavoridor de diferenciació i proliferació d'aquesta subpoblació limfocitària reguladora (77, 100). En concordança amb aquestes troballes experimentals, en aquest treball de tesi es mostra també com l'efecte d'aquests dos fàrmacs immunosupressors afavoreix l'aparició de Tregs directament infiltrant l'empelt, tot i que cal també tenir en compte que alguns pacients sota tractament immunosupressor amb anti-calcineurínics també poden presentar Tregs entre les infiltrats cel·lulars tubulo-intersticials mantenint d'igual manera, l'impacte beneficiós en l'evolució funcional de l'empelt amb el temps després del trasplantament.

En disposar d'aquests biomarcadors immunològics, és aleshores quan el disseny i avaluació d'estratègies immunosupressores amb l'objectiu principal d'assolir estats d'hiporesposta donant-específica per aconseguir una major supervivència de l'empelt a llarg termini, són factibles. Així, en aquesta tesi doctoral es mostra com amb un protocol immunosupressor basat en dosis baixes de Timoglobulina i manteniment amb SRL i MMF, sense l'ús d'esteroides ni anti-calcineurínics, l'assoliment d'un estat d'hiporesposta donant-específica és viable i pot ser mantingut amb el pas del temps en una proporció important de pacients.

De forma rellevant, aquest protocol posa de manifest com són aquells pacients sense al·loreactivitat cel·lular de memòria/efectora abans del trasplantament els que més es poden beneficiar d'aquesta estratègia immunosupressora des de l'inici del trasplantament, al presentar un significatiu menor risc de rebuig agut cel·lular. No obstant això, és important destacar que malgrat el desenvolupament de rebuig agut sota aquesta estratègia immunosupressora, aquest fet no és un impediment per a assolir aquest estat de privilegi immunològic tant als 6 com als 2 anys després del trasplantament. Aquest fet suggereix doncs, que aquells pacients altament al·loreactius es beneficiarien probablement més d'un règim immunosupressor inicial sota agents anti-calcineurínics o simplement adjuntant dosis baixes d'esteroides al tractament de manteniment amb SRL i MMF.

Sota aquest protocol immunosupressor, l'assoliment d'un estat d'hiporesposta donant-específic té una dramàtica repercussió funcional, ja que s'associa a una significativa millor preservació estructural de l'empelt i per tant, a una millor funció renal als 6 mesos, i als 2 anys de seguiment post-trasplantament, confirmant d'alguna manera els resultats obtinguts en l'estudi transversal. De forma important, aquí a més es mostra com l'estat d'hiporesposta donant-específic assolit per aquests pacients sota aquest

protocol d'immunosupressor és vehiculitzat per l'efecte supressor donant-específic de cèl·lules TregsFoxp3+ presents tant en sang perifèrica com directament formant agregats en l'empelt renal. Aquest fet es demostra de forma molt clara en aquesta tesi, quan en retirar la subpoblació limfocitària reguladora als individus hiporesponders donant-específics en els tests funcionals mitjançant cell-sorting, aquests malalts es converteixen en respondors donant-específics. En canvi, aquest fenomen no succeeix en aquells pacients respondors donant-específics on, contràriament, en retirar aquesta subpoblació limfocitària dels tests funcionals es converteixen en hiporesponders. Això demostra com en aquest grup de pacients respondors, aquesta subpoblació limfocitària és, més que Tregs, limfòcits T activats efectors. A més i de forma molt rellevant, aquest estat de privilegi immunològic mediat per l'efecte supressor de les Tregs, és un efecte extremadament específic, ja que només tenen la capacitat de suprimir la resposta immunològica efectora enfront els respectius donants.

En definitiva en aquesta tesi doctoral es mostra com l'homeòstasi biològica assolida entre dues poblacions limfocitàries amb funcions immunològiques oposades i influenciades pels diversos tractaments immunosupressors, és la que permetrà aconseguir una millor o pitjor acceptació de l'empelt renal i mantenir-se al llarg del temps. Aquest fenomen doncs, posa de manifest la importància de conèixer l'estat funcional de la resposta immunològica donant-específica en cada pacient i en diferents períodes del trasplantament per tal d'individualitzar l'estratègia immunosupressora més adient i poder interpretar de forma coherent l'evolució funcional de l'empelt renal.

VII. CONCLUSIONS

1. La presència d'elevada al·loreactivitat cel·lular donant-específica en diferents períodes de temps, i principalment per via directa de presentació antigènica, mitjançant la detecció de limfòcits T de memòria/efectors altament reactius contra antígens del donant, circulants en sang perifèrica, permet discriminar de forma sensible aquells pacients amb un major risc de patir un dany d'origen immunològic en el trasplantament renal

2. L'al·loreactivitat cel·lular donant-específica per via indirecta de presentació antigènica s'incrementa a mesura que avança el temps després del trasplantament i s'associa a la presència de proteinúria.

3. La presència de la subpoblació limfocitària T reguladora amb el marcador de funció FoxP3+, sembla exercir un paper rellevant tant en el reconeixement com en l'acceptació d'al·loantígens, mitjançant la seva funció supressora específica de resposta immunològica. Fins i tot la presència de Tregs en entitats clinicopatològiques controvertides com el rebuig agut subclínic pot ajudar a destriar els casos de mal i bon pronòstic de pèrdua de funció renal.

4. El monitoratge funcional d'ambdues subpoblacions limfocitàries, el limfòcit T de memòria/efector i les Tregs, sembla ser d'utilitat com a biomarcador, per tal de poder estratificar de forma acurada el diferent risc immunològic i així, permetre individualitzar el tipus i càrrega immunosupressora a administrar a cada pacient.

5. La inducció i manteniment d'un estat d'hiporesposta donant-específic és factible evitant l'ús de fàrmacs inhibidors de calcineurina en determinats pacients trasplantats renals i sembla ser vehiculitzat a través de l'efecte supressor específic de resposta immunològica de les cèl·lules Treg (FoxP3+).

6. L'ús d'aquests biomarcadors cel·lulars en els diferents períodes del trasplantament renal, pot facilitar el desenvolupament de nous protocols immunosupressors amb l'objectiu d'induir estats d'hiporesposta donant-específica.

VIII. REFERÈNCIES

1. US Renal Data System: US Renal Data System: Excerpts from the USRDS 2003 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. *Am J Kidney Dis.* 42:s1–s230, 2003.
2. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 341:1725–30, 1999.
3. Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B, Wong C, Muirhead N: A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int.* 50:235–242, 1996.
4. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B: Long-term renal allograft survival: Have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant.* 4: 1289 –95, 2004.
5. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med.* 346:580-90. Review, 2002.
6. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nijkeleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant.* 7:518-526, 2007.

7. Antibody monitoring: a solid approach to predicting clinical outcome. Zachary AA. *Transplantation*. 86:768, 2008.
8. Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal allograft dysfunction. Hu H, Aizenstein BD, Puchalski A, Burmania JA, Hamawny MM, Knechtle SJ. *Am J Transplant*. 4:432-437, 2004.
9. Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, Nicolle L, Karpinski M, Jeffery J, Nickerson P: Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 15:219–227, 2004.
- 10 Schaub S, Wilkins JA, Nickerson P: Proteomics and renal transplantation: Searching for novel biomarkers and therapeutic targets. *Contrib Nephrol*. 160:65–75, 2008.
11. United Network for Organ Sharing: Data, Richmond, VA, United Network for Organ Sharing. Available at: www.unos.org/data. Accessed December 14, 2006.
12. Lerut J, Sanchez-Fueyo A: An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*. 6:1774 –1780, 2006.
13. Donohoe JA, Andrus L, Bowen KM, Simeonovic C, Prowse SJ, Lafferty KJ: Cultured thyroid allografts induce a state of partial tolerance in adult recipient mice. *Transplantation*. 35:62 –67, 1983.
14. Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, John B, Sampson B, Wuensch S: Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev*. 213 : 101 –118, 2006.
15. Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, Binns RM, Davies DA: Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Lancet*. 223:472–476, 1969.
16. Horner BM, Cina RA, Wikiel KJ, Lima B, Ghazi A, Lo DP, Yamada K, Sachs DH, Huang CA: Predictors of organ allograft tolerance following hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant*. 6:2894–2902, 2006.

17. Kuhr CS, Allen MD, Junghanss C, Zaucha JM, Marsh CL, Yunusov M, Zellme E, Little MT, Torok-Storb B, Storb R: Tolerance to vascularized kidney grafts in canine mixed hematopoietic chimeras. *Transplantation*. 73:1487–1493, 2002.
18. Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, Leisenring W, Shulman H: Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood*. 89:3048–3054, 1997.
19. Strober S, Modry DL, Hoppe RT, Pennock JL, Bieber CP, Holm BI, Jamieson SW, Stinson EB, Schroder J, Suomalainen H: Induction of specific unresponsiveness to heart allografts in mongrel dogs treated with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin. *J Immunol*. 132:1013 –1018, 1984.
20. Kean LS, Gangappa S, Pearson TC, Larsen CP: Transplant tolerance in non-human primates: Progress, current challenges and unmet needs. *Am J Transplant* 6 : 884 –893, 2006.
21. Kirk AD: Crossing the bridge: Large animal models in translational transplantation research. *Immunol Rev* 196 : 176 –196, 2003.
22. Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, Benítez C, Pons JA, 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*. 118:2845-2857, 2008.
23. Sayegh MH, Carpenter CB: Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol*. 13:221-229, 1996.

24. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 173:4828-4837, 2004.
25. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7: 145, 1989.
26. Qin, S., S. P. Cobbold, H. Pope, J. Elliott, D. Kioussis, J. Davies, H. Waldmann. "Infectious" transplantation tolerance. *Science.* 259: 974-977, 1993.
27. Waldmann, H., S. Cobbold. Regulating the immune response to transplants: a role for CD4+ regulatory cells?. *Immunity* 14: 399-406, 2001.
28. Zheng, X. X., A. Sanchez-Fueyo, C. Domenig, T. B. Strom. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol. Rev.* 196: 75-84, 2003.
29. Davies, J. D., L. Y. Leong, A. Mellor, S. P. Cobbold, H. Waldmann. T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. *J. Immunol.* 156: 3602-3607, 1996.
30. Wood, K. J., S. Sakaguchi. Regulatory lymphocytes: regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3:199-210, 2003.
31. Chen Y, Wood KJ. Interleukin-23 and TH17 cells in transplantation immunity: does 23+17 equal rejection?. *Transplantation.* 84:1071-1074. Review, 2007.
32. Dutton, R. W., L. M. Bradley, S. L. Swain. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 201-223, 1998.
33. Freitas, A. A., B. Rocha. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 83-111, 2000.
34. Dummer, W., B. Ernst, E. LeRoy, D. Lee, C. Surh. Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J. Immunol.* 166: 2460-2468, 2001.

35. Vella, J. P., M. Spadafora-Ferreira, B. Murphy, S. I. Alexander, W. Harmon, C. B. Carpenter, M. H. Sayegh. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*. 64: 795-800, 1997.
36. Jones DL, Sacks SH, Wong W. Controlling the generation and function of human CD8⁺ memory T cells in vitro with immunosuppressants. *Transplantation*.82:1352-1361, 2006.
37. Kaminski ER, Hows JM, Goldman JM, Batchelor JR. Lymphocytes from multi-transfused patients exhibit cytotoxicity against autologous cells. *Br J Haematol*. 81: 23, 1992.
38. van Kampen CA, Versteeg-van der Voort Maarschalk MF, Langerak-Langerak J, van Beelen E, Roelen DL, Claas FH. Pregnancy can induce long-persisting primed CTLs specific for inherited paternal HLA antigens. *Hum Immunol*. 62: 201, 2001.
39. Pelletier RP, Hennessy PK, Adams PW, Orosz CG. High incidence of donor-reactive delayed-type hypersensitivity reactivity in transplant patients. *Am J Transplant*. 2: 926, 2002.
40. Augustine JJ, Poggio ED, Clemente M, Aeder MI, Bodziak KA, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE. Hemodialysis vintage, black ethnicity, and pretransplantation antidonor cellular immunity in kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 18:1602-1606, 2007.
41. Longitudinal study of the frequency of cytotoxic T cell precursors in kidney allograft recipients. Mestre M, Massip E, Bas J, Alsina J, Romeu A, Castelao AM, Buendia E, Grinyo JM. *Clin Exp Immunol*. 104:108-114, 1996.
42. Volk HD, Kern F. Insights into the specificity and function of (allo)antigen-reactive T cells. *Am J Transplant*. 1:109-114, 2001.

43. Couzi L, Thiebaut R, Carron JC et al. Immunological monitoring of calcineurin inhibitors for predicting cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 86: 1060-1067, 2008.
44. Carrodeguas L, Orosz CG, Waldman WJ, et al. Trans vivo analysis of human delayed-type hypersensitivity reactivity. *Hum Immunol*. 60: 640, 1999.
45. Enzyme-linked immunosorbent assay spot detection of interferon-gamma and interleukin 5-producing cells as a predictive marker for renal allograft failure. Tary-Lehmann M, Hricik DE, Justice AC, Potter NS, Heeger PS. *Transplantation*. 66:219-224, 1998.
46. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol*. 163: 2267, 1999.
47. Nickel P, Presber F, Bold G, Biti D, Schönemann C, Tullius SG, Volk HD, Reinke P. Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation*. 78:1640-1646, 2004.
48. Andree H, Nickel P, Nasiadko C, Hammer MH, Schönemann C, Pruss A, Volk HD, Reinke P. Identification of dialysis patients with panel-reactive memory T cells before kidney transplantation using an allogeneic cell bank. *J Am Soc Nephrol*. 17:573-580, 2006.
49. Augustine JJ, Poggio ED, Clemente M, Aeder MI, Bodziak KA, Schulak JA, Heeger PS, Hricik DE. Hemodialysis vintage, black ethnicity, and pretransplantation

- antidonor cellular immunity in kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 18:1602-1606, 2007.
50. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 133:775-787. Review, 2008.
51. Shevach, EM, et al. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 212:60–73, 2006.
52. Sakaguchi, S, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 212:8–27, 2006.
53. Izcue, A; Coombes, JL; Powrie, F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev.* 212:256–271, 2006.
54. Belkaid, Y; Blank, RB; Suffia, I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev.* 212:287–300, 2006.
55. Rouse, BT; Sarangi, PP; Suvas, S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev.* 212:272–286, 2008.
56. Aluvihare, VR; Kallikourdis, M; Betz, AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 5:266–271, 2004.
57. Beyer, M; Schultze, JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood.* 108:804–811, 2006.
58. Long E, Wood KJ. Understanding FOXP3: progress towards achieving transplantation tolerance. *Transplantation.* 84:459-461. Review, 2007.
59. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Rev Immunol.* 3:199, 2003.
60. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B, et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol.* 176: 3593, 2006.

61. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 299: 1057, 2003.
62. Cupedo T, Nagasawa M, Weijer K, et al. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur J Immunol*. 35: 383, 2005.
63. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, et al. Human CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest*. 116: 2423, 2006.
64. Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, et al. Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop in vivo from CD25⁻CD4⁺ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol*. 172: 923, 2004.
65. Sánchez-Fueyo A, Sandner S, Habicht A, Mariat C, Kenny J, Degauque N, Zheng XX, Strom TB, Turka LA, Sayegh MH. Specificity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function in alloimmunity. *J Immunol*. 176:329-334, 2006.
66. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes. *Nat Med*. 14:88-92, 2008.
67. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, Sharma VK, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Schwartz JE, Suthanthiran M. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med*. 353:2342-2351, 2005.
68. Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med*. 195:1641-2646, 2002.
69. Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW. Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med*. 201:1037-2044, 2005.

70. Brown K, Moxham V, Karegli J, Phillips R, Sacks SH, Wong W. Ultra-localization of Foxp3⁺ T cells within renal allografts shows infiltration of tubules mimicking rejection. *Am J Pathol.* 171:1915-2922, 2007.
71. Nickerson P, Jeffery J, Gough J, Grimm P, McKenna R, Birk P, Rush D. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol.* 10:1801-1805, 1999.
72. Scholten EM, Rowshani AT, Cremers S, Bemelman FJ, Eikmans M, van Kan E, Mallat MJ, Florquin S, Surachno J, ten Berge IJ, Bajema IM, de Fijter JW. Untreated rejection in 6-month protocol biopsies is not associated with fibrosis in serial biopsies or with loss of graft function. *J Am Soc Nephrol.* 17:2622-2632, 2006.
73. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. Rush D, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, Trpkov K, Solez K, Jeffery J. *J Am Soc Nephrol.* 9:2129-2134, 1998.
74. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, Contag CH, Negrin RS: Inhibition of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood.* 108:390-399, 2006.
75. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Simard JJ, Ohashi PS, Griesser H, et al.: Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science.* 268:1472–1476, 1995.
76. Monti P, Scirpoli M, Maffi P, Piemonti L, Secchi A, Bonifacio E, Roncarolo MG, Battaglia M. Rapamycin monotherapy in patients with type 1 diabetes modifies CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T-cells. *Diabetes.* 57:2341-2347, 2008.

77. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N: A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: Induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol.* 17:2844–2853, 2006.
78. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. *J Am Soc Nephrol.* 13:252-259, 2002.
79. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, Sayegh MH: Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* 64: 795–800, 1997.
80. Ciubotariu R, Liu Z, Colovai AI, Ho E, Itescu S, Ravalli S, Hardy MA, Cortesini R, Rose EA, Suci-Foca N: Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J Clin Invest* 101: 398–405, 1998.
81. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. *J Immunol.* 167:7199-7206, 2001.
82. Opelz G, Wujciak T, Döhler B, et al. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet.* 1: 334, 1999.
83. Vella, J. P., F. M. Spadafora, B. Murphy, S. I. Alexander, W. Harmon, C. B. Carpenter, M. H. Sayegh. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation.* 64:795, 1997.

84. Hornick, P. I., P. D. Mason, R. J. Baker, M. Hernandez-Fuentes, L. Frasca, G. Lombardi, K. Taylor, L. Weng, M. L. Rose, M. H. Yacoub. Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection. *Circulation*. 101:2405, 2000.
85. Ciubotariu, R., Z. Liu, A. I. Colovai, E. Ho, S. Itescu, S. Ravalli, M. A. Hardy, R. Cortesini, E. A. Rose, N. Suciuc Foca. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J. Clin. Invest.* 101:398, 1998.
86. SivaSai, K. S., M. A. Smith, N. J. Poindexter, S. R. Sundaresan, E. P. Trulock, J. P. Lynch, J. D. Cooper, G. A. Patterson, T. Mohanakumar. Indirect recognition of donor HLA class I peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 67:1094, 1999.
87. Valujskikh, A., D. Matesic, A. Gilliam, D. Anthony, T. Haqqi, P. Heeger. T cells reactive to a single immunodominant self-restricted allopeptide induce skin graft rejection in mice. *J. Clin. Invest.* 101:1398, 1998.
88. Steele D, Laufer T, Smiley, Ando Y, Grusby M, Glimcher L, Auchinloss H: Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med*. 183:699 –703, 1996.
89. Bradley JA, Mowat AM, Bolton EM: Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4+ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection. *Immunol Today* 13 : 434 –438, 1992.
90. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, Gil-Vernet S, Cruzado JM, Torras J, Grinyó JM, Serón D. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant*. 6:747-752, 2006.
91. Seron D, Moreso F, Ramón JM, Hueso M, Condom E, Fulladosa X, Bover J, Gil-Vernet S, Castela AM, Alsina J, Grinyó JM: Protocol renal allograft biopsies and the

design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 69: 511–514, 2000.

92. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim YS, Moon IS, Kim SY, Koh YB, Bang BK, Yang CW: Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: Ten-year experience at a single center. *Am J Transplant* 5: 1354–1360, 2005.

93. Roberts IS, Reddy S, Russell C, Davies DR, Friend PJ, Handa AI, Morris PJ: Subclinical rejection and borderline changes in early protocol biopsy specimens after renal transplantation. *Transplantation* 77:1194–1198, 2004.

94. Veronese F, Rotman S, Smith RN, Pelle TD, Farrell ML, Kawai T, Benedict Cosimi A, Colvin RB. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant*. 7:914-922, 2007.

95. Grimbert P, Mansour H, Desvaux D, Roudot-Thoraval F, Audard V, Dahan K, Berrehar F, Dehoule-Poillet C, Farcet JP, Lang P, Le Gouvello S. The regulatory/cytotoxic graft-infiltrating T cells differentiate renal allograft borderline change from acute rejection. *Transplantation*. 83:341-346, 2006.

96. Koulmanda M, Budo E, Bonner-Weir S, Qipo A, Putheti P, Degauque N, Shi H, Fan Z, Flier JS, Auchincloss H Jr, Zheng XX, Strom TB. Modification of adverse inflammation is required to cure new-onset type 1 diabetic hosts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:13074-1379, 2007.

97. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Bäckström BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*. 13:423-431, 2007.

98. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gómez-Alamillo C, Merino R, Benito MJ, Cacho E, Rodrigo E, Palomar R, López-Hoyos M, Arias M. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation*. 82:550-557, 2006.
99. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells increase de novo in kidney transplant patients after immunodepletion with Campath-1H. Bloom DD, Chang Z, Fechner JH, Dar W, Polster SP, Pascual J, Turka LA, Knechtle SJ. *Am J Transplant*. 8:793-802, 2008.
100. Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB: Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant* 7 : 1722 –1732, 2007.

IX. TAULES I FIGURES

Taula 1. Diferències més rellevants entre els linfòcits T naïve i els de memòria.

	Cèl·lula T Naïve	Cèl·lula T de memòria
Fenotip	CD45RO ^{low}	Central / Efectora CD45RO ^{high} CCR7 ^{high} CD62L ^{high} / CCR7 ^{low} CD62L ^{low}
CPA	Professional	No Professional
Resposta a baixa exposició d'Ag	Dèbil	Fora
Funció efectora	Cap (IL 2 → proliferació)	Secreció de Citquines (IFN-γ, Granzym-B), Citolisi directe
Cinètica	Lenta (dies)	Rapida (hores)
Localització	Teixit linfoide	Teixit linfoide i no-linfoide

CPA: Cèl·lula presentadora d'Antigen. Ag: Antigen

Figura 1. Diances terapèutiques dels fàrmacs immunosupressors.

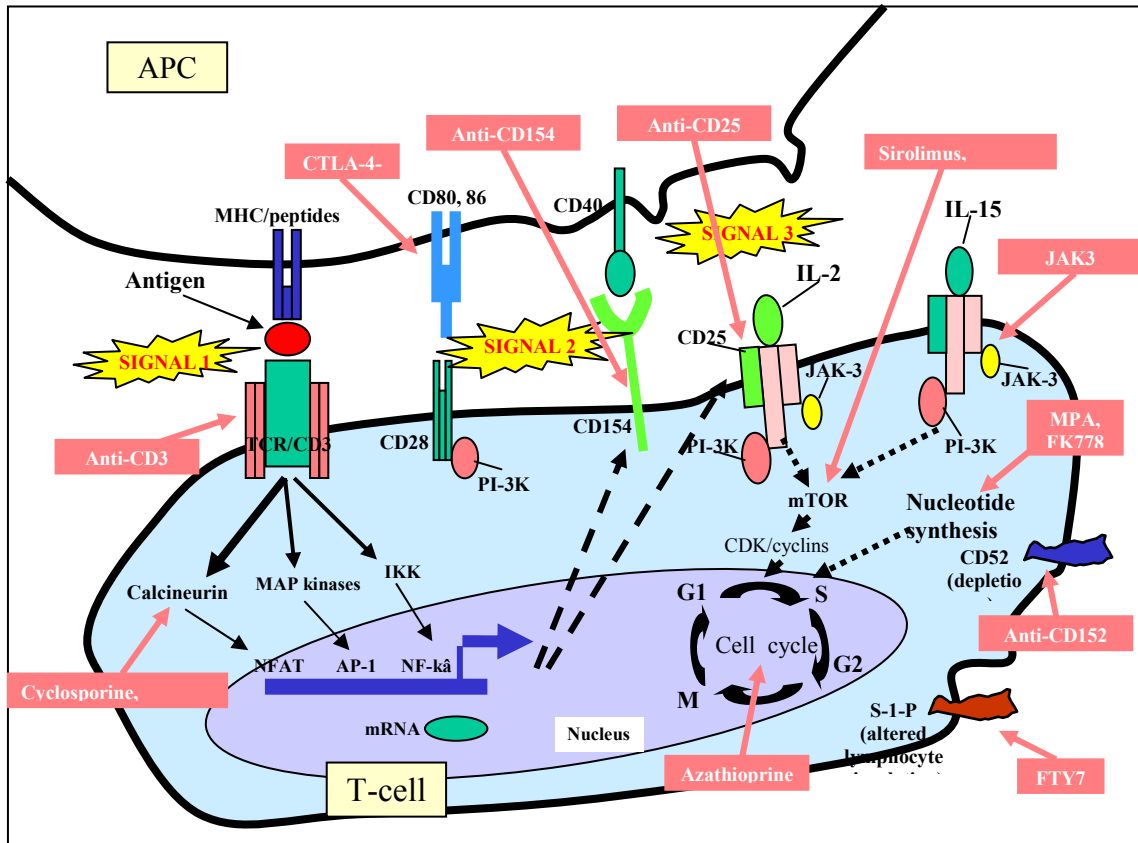
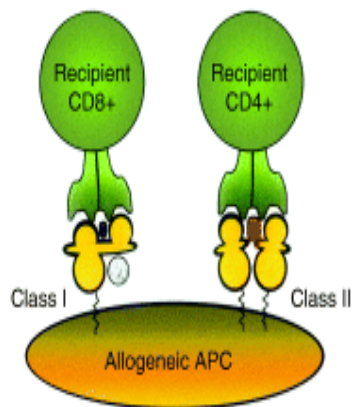
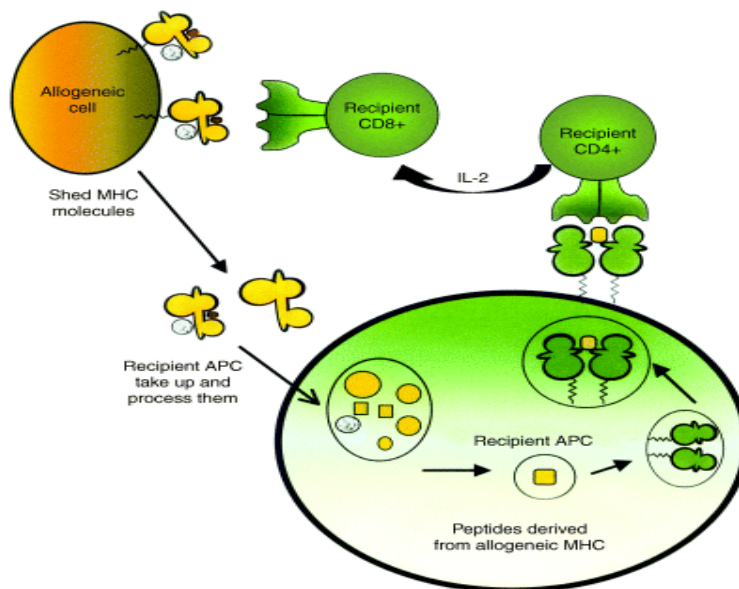


Figura 2. Vies de presentació antigènica

a. Via Directe



b. Via Indirecte



c. Via Semi-directe o tercera via

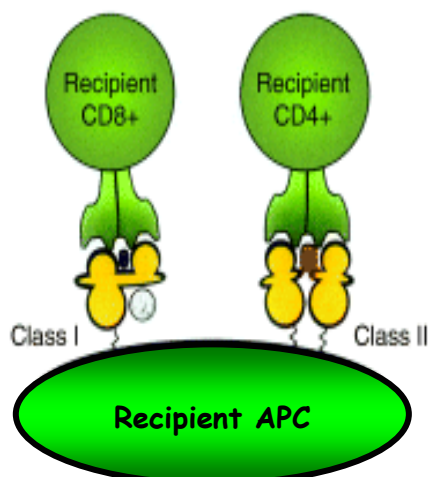


Figura 3. Al·loresposta immunològica

