



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**TESIS DOCTORAL**

***ESTUDIO DE LA MOLÉCULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD,  
HLA-G, EN EL TRASPLANTE CARDÍACO: RELACIÓN CON LOS  
EPISODIOS DE RECHAZO AGUDO Y EL TRATAMIENTO  
INMUNOSUPRESOR***

***Juan Luque Moruno***

**Granada, Enero de 2008**





**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA.**

.

Tesis doctoral

*ESTUDIO DE LA MOLÉCULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD, HLA-G, EN  
EL TRASPLANTE CARDÍACO: RELACIÓN CON LOS EPISODIOS DE  
RECHAZO AGUDO Y EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR.*

Tesis presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada,  
por el licenciado:

Don Juan Luque Moruno

Los directores:

Profesor D. José Peña Martínez      Dr. D. Francisco Javier Gómez Jiménez

Dra. Dña. María Isabel Torres López

**Granada, marzo 2008**

**D, José Peña Martínez**, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada, Catedrático de Inmunología por la Universidad de Córdoba, Jefe de servicio de Inmunología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

**CERTIFICA:** que don Juan Luque Moruno, Licenciado en Biología, ha realizado personalmente bajo mi dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral titulada: ***ESTUDIO DE LA MOLÉCULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD, HLA-G, EN EL TRASPLANTE CARDÍACO: RELACIÓN CON LOS EPISODIOS DE RECHAZO AGUDO Y EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR***

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para optar al grado de doctor, y ser calificado.

**Fdo. Dr. D. José Peña Martínez**

**Granada, Enero de 2008.**



**D. Francisco Javier Gómez Jiménez**, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Granada, Profesor Titular y Secretario del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de Granada.

**CERTIFICA:** que Juan Luque Moruno, Licenciado en Biología, ha realizado personalmente bajo mi dirección en el Departamento de Medicina los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral titulada: ***ESTUDIO DE LA MOLÉCULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD, HLA-G, EN EL TRASPLANTE CARDÍACO: RELACIÓN CON LOS EPISODIOS DE RECHAZO AGUDO Y EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR.***

El que suscribe ha revisado personal y exhaustivamente el citado trabajo y lo encuentra adecuado para su presentación y para someterlo al superior juicio del Tribunal correspondiente.

**Fdo. Dr. D. Francisco Javier Gómez Jiménez**

**Granada, Enero de 2008**



**Dña. María Isabel Torres López**, Doctora en Biología por la Universidad de Granada, Profesora Titular del Departamento de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias experimentales de la Universidad de Jaén.

**CERTIFICA:** que don Juan Luque Moruno, Licenciado en Biología, ha realizado personalmente bajo mi dirección, los trabajos de investigación correspondientes a la Tesis Doctoral titulada: ***ESTUDIO DE LA MOLÉCULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD, HLA-G, EN EL TRASPLANTE CARDÍACO: RELACIÓN CON LOS EPISODIOS DE RECHAZO AGUDO Y EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR.***

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para optar al grado de doctor, y ser calificado.

**Fdo. Dra. Dña. María Isabel Torres López**

**Granada, Enero de 2008.**

*A M<sup>a</sup> José, Antonio, Dolores y Amalia  
Realmente puedo decir que esta tesis es en parte vuestra.*

*A Thaïs, sobre todo.*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento,

Al Prof. José Peña Martínez, por la dirección de esta tesis, por su confianza, por su constante ayuda y por su afán de perfección. Igualmente por el tiempo que ha dedicado a la preparación de los trabajos de esta tesis.

Al Dr. Fco. Javier Gómez Jiménez, por aceptar la codirección de esta tesis, por su inestimable ayuda, por hacer que esto sea posible.

A la Dra. Maria Isabel Torres López, por poder contar con ella siempre que la he necesitado, por enseñarme lo importante que es este trabajo, por ilusionarme con lo que hago.

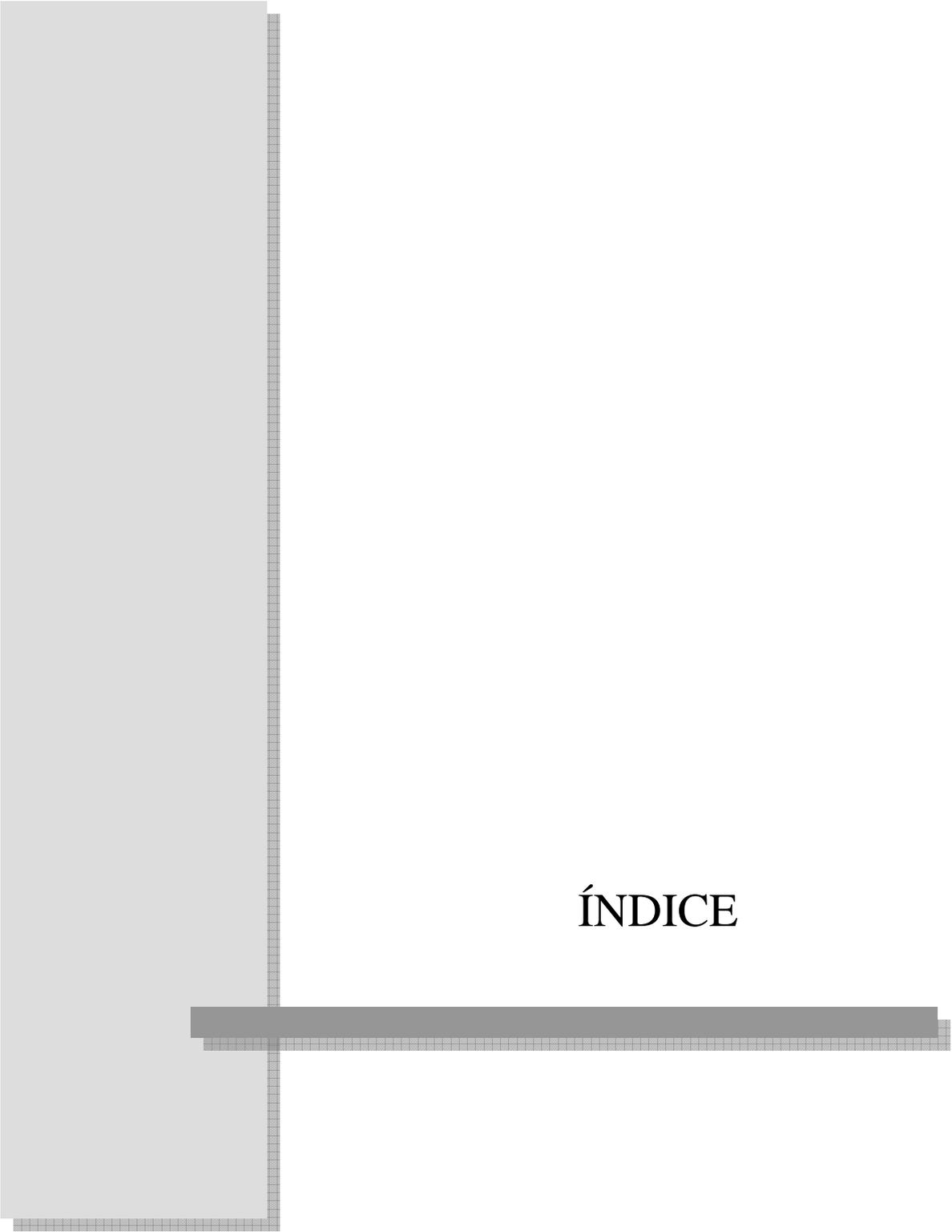
A los Dres. Fernando López-Rubio, Dolores Aumente y Dr. Arizón así como los pacientes trasplantados de corazón por su colaboración desinteresada en el desarrollo de esta tesis.

A todos los miembros del Servicio de Inmunología, facultativos, técnicos, residentes, que me han hecho sentir parte integrante de este hospital, a Pilar, Rafi, M<sup>a</sup> José Prados, Rafael González, Rafael Solana, Manolo, Corona, Magdalena y M<sup>a</sup> José Fernández, etc....

Especialmente a las personas que me han acompañado en este viaje: Almudena, Gema, Carmen, Olga, José Manuel, Esther, M<sup>a</sup> Luisa, Mario, Juan Carrillo e Inma. Por haberme ayudado a sonreír frente a los problemas del laboratorio y haberme soportado estos años. Ellos han sido lo mejor de este periodo y sin duda mi agradecimiento se queda corto.

Al Dr. Lluís Rucabado y la Dra. Anna Rucabado, por ayudarme y aconsejarme en todo lo que he necesitado.

Y por último a Marisa, porque se ha preocupado por mí como nadie durante éste periodo. Por ser como es.



# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE</b>	19
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	21
<b>ABREVIATURAS</b>	25
<b>I. ANTECEDENTES</b>	29
<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b>	29
1.1.1 Breve introducción del trasplante cardíaco	29
1.1.2 Rechazo en trasplante cardíaco	30
1.1.3 Inmunosupresión en trasplante cardíaco	32
<b>1.2 INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE CARDÍACO</b>	38
1.2.1 Breve introducción histórica	38
1.2.2 Reconocimiento de aloantígenos	39
1.2.3 Respuesta inmune alogénica	42
1.2.4 Rechazo agudo. Bases Inmunológicas	44
<b>1.3 MOLÉCULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD NO CLÁSICA HLA-G</b>	46
1.3.1 Complejo mayor de histocompatibilidad	46
1.3.1.1 Estructura de las moléculas de histocompatibilidad de tipo I	47
1.3.1.2 Expresión de los antígenos HLA	48
1.3.2 Estructura de la molécula de histocompatibilidad HLA-G	49
1.3.2.1 HLA-G1	49
1.3.2.2 HLA-G2, -G3, -G4	52
1.3.2.3 HLA-G5, -G6, -G7	52
1.3.3 HLA-G y respuesta alogénica	55
1.3.3.1 Papel de HLA-G in vivo	55
1.3.3.2 Inhibición de la respuesta por HLA-G	57
1.3.3.2.1 <i>Inhibición de la adhesión y la migración transendotelial</i>	58
1.3.3.2.2 <i>Inhibición de las interacciones entre APCs y células T CD4, CD8</i>	59
<b>II. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b>	63
<b>2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	63
<b>2.2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b>	64
<b>III. OBJETIVOS</b>	69

<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	73
4.1 MÉTODO Y SUJETOS DE ESTUDIO	73
4.2 TERAPIAS INMUNOSUPRESORAS ANTIRRECHAZO	74
4.3 MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE RECHAZO	74
4.4 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE HLA-G EN MIOCARDIOCITOS	76
4.5 TÉCNICA DE ELISA PARA EL ESTUDIO DE LAS ISOFORMAS SOLUBLES sHLA-G1+HLA-G5 Y sHLA-I TOTAL EN PLASMA.	80
4.6 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE HLA-G	83
4.7 ESTUDIO ESTADÍSTICO	84
<b>V. RESULTADOS</b>	87
5.1 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HLA-G5 Y sHLA-G1 EN PACIENTES TRASPLANTADOS DE CORAZÓN	87
5.1.1 Niveles de sHLA-G previos al trasplante y su relación con el rechazo agudo	87
5.1.2 Niveles de HLA-G5 y sHLA-G1 durante el primer año post-trasplante	88
5.1.3 Niveles de HLA-G5 y sHLA-G1 post trasplante y relación con los episodios de rechazo agudo	92
5.2 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HLA-G5 Y sHLA-G1 Y RELACIÓN CON EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR	93
5.2.1 Niveles de sHLA-G1 +HLA-G5 tras la administración de la triple terapia durante el primer post-trasplante	93
5.2.2 Comparación entre los niveles sHLA-I totales y sHLA-G tras la dosis diaria de inmunosupresores en el primer mes post-trasplante.	98
5.3 EXPRESIÓN DE HLA-G EN BIOPSIAS DE MIOCARDIO DE CORAZONES TRASPLANTADOS DE CORAZÓN	99
5.3.1 Expresión y distribución de HLA-G en miocardio de corazón trasplantado	99
5.3.2 Expresión de HLA-G de membrana y relación con los episodios de rechazo agudo	101
5.4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 14-pb del GEN HLA-G	104
5.4.1 Polimorfismo 14-pb del gen HLA-G y niveles de sHLA-G	104
5.4.2 Polimorfismo 14-pb del gen HLA-G y niveles de ciclosporina	108
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	113

<b>VII. APLICABILIDAD Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b>	125
<b>7.1 APLICABILIDAD</b>	125
7.1.1 Limitaciones del estudio	126
7.1.2 Puntos fuertes del estudio	126
<b>VIII. CONCLUSIONES.</b>	129
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b>	133
<b>ANEXO I: Artículos derivados de la tesis</b>	147

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>FIGURA 1.1:</b> Esquema de las dianas de los fármacos inmunosupresores actuales	34
<b>FIGURA 1.2.</b> Tipos de reconocimiento de aloantígenos.	40
<b>FIGURA 1.3.</b> Respuesta inmune alogénica	44
<b>FIGURA 1.4.</b> Ordenación génica del complejo mayor de histocompatibilidad.	47
<b>FIGURA 1.5.</b> Estructura de las moléculas de histocompatibilidad humanas e imagen de la hendidura del péptido donde se presentan los péptidos.	48
<b>FIGURA 1.6.</b> Estructura y ordenación génica de las isoformas de HLA-G-.	50
<b>FIGURA 1.7.</b> Efecto de las diferentes isoformas de HLA-G sobre la respuesta alogénica.	58
<b>FIGURA 5.1:</b> Niveles de sHLA-G pre-trasplante y rechazo	88
<b>FIGURA 5.2.</b> Niveles de sHLA-G post-trasplante.	90
<b>FIGURA 5.3:</b> Detección de las isoformas sHLA-G1 y HLA-G5 mediante ELISA en pacientes trasplantados de corazón durante las tres primeras semanas post-trasplante y el día previo al trasplante	91
<b>FIGURA 5.4.</b> Efecto del tratamiento inmunosupresor sobre los niveles de plasma de sHLA-G.	94
<b>FIGURA 5.5:</b> Niveles de sHLA-G (HLA-G5+sHLA-G1) en diferentes días post-trasplante, en dos pacientes tipo en los tiempos Co y C2	95
<b>FIGURA 5.6.</b> Niveles en plasma de sHLA-G cuantificados mediante ELISA después de la dosis diaria de inmunosupresores	96
<b>FIGURA 5.7 (A)</b> Niveles de HLA-I soluble total y sHLA-G cuantificados en plasma de pacientes trasplantados de corazón	98
<b>FIGURA 5.8:</b> HLA-G en biopsias de miocardio.	99
<b>FIGURA 5.9:</b> Estudio por inmunohistoquímica de la distribución de HLA-G e isoformas detectadas en biopsias de miocardio de pacientes trasplantados de corazón;	100
<b>FIGURA 5.10:</b> Expresión de HLA-G en miocardiocitos mediante inmunohistoquímica y rechazo agudo	102
<b>FIGURA 5.11:</b> Porcentaje de Miocardiocitos que expresan HLA-G de membrana y grado de rechazo que presentó la biopsia estudiada.	102
<b>FIGURA 5.12:</b> Expresión de HLA-G en biopsias de miocardio en pacientes libres de episodios de rechazo agudo (no rechazo) y pacientes que presentaron uno o varios episodios de rechazo agudo 3 <sup>a</sup>	103
<b>FIGURA 5.13.</b> Gen HLA-G	104
<b>FIGURA 5.14.</b> Polimorfismo 14 pb del gen de HLA-G y niveles en plasma de sHLA-G1+HLA-G5	108

<b>FIGURA 5.15.</b> Absorción de ciclosporina en C0 y relación con el polimorfismo 14 pb de HLA-G	109
<b>FIGURA 5.16</b> Concentración máxima de Ciclosporina en sangre en C2 y polimorfismo HLA-G.	110
<b>TABLA 5.1:</b> Niveles de HLA-G5+sHLA-G1 (ng/ml) en plasma de pacientes trasplantados de corazón	89
<b>TABLA 5.2 :</b> Grupos de Pacientes según niveles de sHLA-G y episodios de rechazo agudo	92
<b>TABLA 5.3:</b> Perfil farmacológico, y episodios de rechazo agudo en los pacientes trasplantados de corazón	97
<b>TABLA 5.4.</b> Frecuencias alélicas y genóticas para el polimorfismo HLA-G 14-pb	107

---

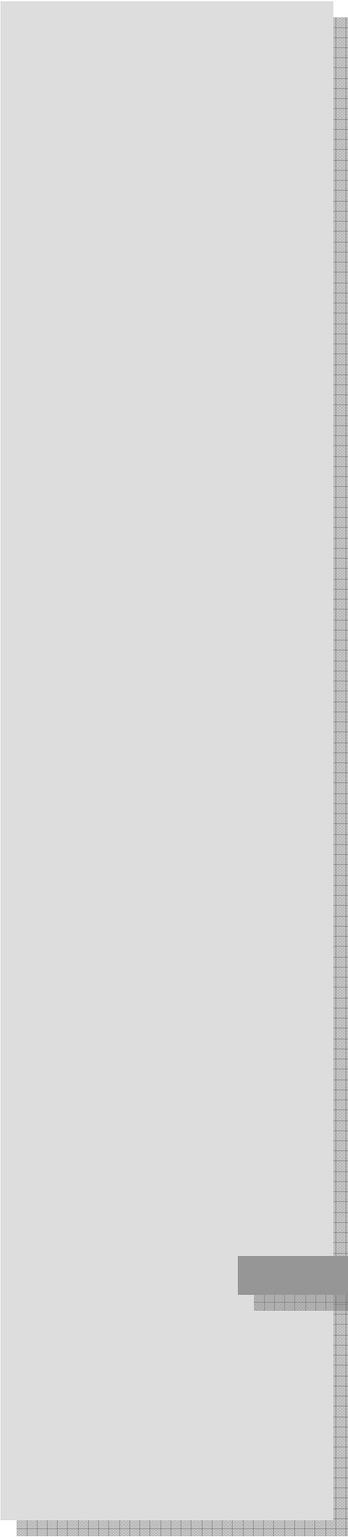
**Abreviaturas**

---

AA	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
APC	Células presentadoras de antígenos
AUC	Area bajo la curva
BEC	Células Epiteliales biliares
CD	Células dendríticas
C0	Concentración de ciclosporina en sangre antes de la dosis de inmunosupresión
C2	Concentración de ciclosporina en sangre 2h tras dosis de inmunosupresión
CEP	Células endoteliales porcinas
CHO	Células ováricas de hamster chino
CsA	Ciclosporina
CTLs	Linfocitos citotóxicos
DAB	Diaminobenzidina
EVE	Everolimus
FK506	Tacrólimus
FKBP12	Proteína 12 de unión a FK
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de colonias de granulocitos-monocitos
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HLA-G	Atígeno leucocitario humano G

IFN- $\gamma$	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ILT	<i>Immunoglobulin-like transcript</i>
KIR	<i>Killer-like immunoglobulin receptor</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMF	Micofenolato mofetil
MP	Metilprednisona
NF-AT	Factor nuclear de linfocitos T activados
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclears cells</i>
PB	Pares de bases de nucleotidos
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating nuclear cell antigen</i>
TAC	Tacrólimus
TCR	Receptor célula T
TGF- $\beta$	Factor transformador del crecimiento $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$





## ANTECEDENTES

# **I ANTECEDENTES**

---

## **1.1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1.1 BREVE INTRODUCCIÓN DEL TRASPLANTE CARDIACO.**

Como consecuencia de una mejora en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos y de la mayor longevidad de la población en los países más desarrollados, el número de pacientes con fallos cardíacos está aumentando considerablemente. La prevalencia e incidencia en los países desarrollados se estima que está alrededor del 1% y 0.15% respectivamente (1), hasta el 10% de las personas con fallo cardíaco están en una edad avanzada. En paralelo, el desarrollo de nuevas técnicas ha conducido al concepto del reemplazo cardíaco mediante trasplante. El primer trasplante de corazón con éxito ocurrió en 1967 en el Groote-Schuur-Hospital, Kapstadt, Sudáfrica (2). Poco más tarde, en 1968, un comité ad-hoc de la universidad de Harvard estableció los criterios de muerte cerebral, desde entonces más de 55 000 trasplantes cardíacos se han realizado en más de 200 hospitales de todo el mundo. La combinación de altos índices de éxito quirúrgico y la presencia de un número creciente de programas de trasplante bien equipados ha creado un enorme flujo de pacientes con fallo cardíaco entre estos centros. Aunque el número de trasplantes en nuestro país y en el resto del mundo crece considerablemente es evidente que el trasplante cardíaco continuará jugando un papel limitado cuantitativamente en el tratamiento del fallo cardíaco avanzado. Todavía, su importancia residirá como una opción de último resorte para los pacientes con fallo cardíaco avanzado.

Una vez realizada la operación del trasplante cardíaco el primer problema que encontramos es el rechazo al injerto, para evitar esto el paciente ha de ser inmunodeprimido, principalmente durante los primeros meses. Actualmente y gracias al desarrollo de nuevos fármacos se ha podido controlar hasta cierto punto la enorme respuesta inmune que supone el colocar un corazón alogénico en un organismo.

Todo esto conlleva otro tipo de complicaciones (3) (4), las más importantes son:

- **Infección.** Las complicaciones infecciosas son la principal causa de mortalidad después del trasplante cardíaco. Por ello, es necesario mantener un estrecho equilibrio entre tratamiento inmunosupresor y el riesgo de infección.

- **Enfermedad vascular del injerto o arteriopatía del injerto.** A diferencia de los episodios de rechazo agudo, es una patología lentamente evolutiva, caracterizada por una afectación coronaria, cuyas manifestaciones clínicas aparecen tardíamente.

- **Neoplasias.** La utilización de fármacos inmunosupresores ha condicionado la aparición de una serie de neoplasias en los pacientes trasplantados. Su incidencia varía según el área geográfica que se considere, debido a la elevada incidencia de cánceres cutáneos en algunas zonas, consideradas de elevado riesgo. Excluido el cáncer de piel, la incidencia media es del 4 % de los pacientes trasplantados, incidencia 100 veces mayor que la esperada en el resto de la población con edad similar. Dentro de estas neoplasias, después del cáncer de piel le siguen en frecuencia los linfomas, que se desarrollan en el 2 % de los pacientes trasplantados.

- **Toxicidad por fármacos.** A las complicaciones infecciosas y desarrollo de neoplasias relacionadas con el tratamiento inmunosupresor, es necesario añadir la toxicidad producida por estos fármacos. Así, algunos de estos fármacos pueden producir hipertensión arterial, insuficiencia renal o insuficiencia hepática. **1.1.2**

### **RECHAZO EN TRASPLANTE CARDÍACO**

El rechazo envuelve daños hacia el órgano trasplantado mediados por células del sistema inmune y anticuerpos como un resultado del reconocimiento del alo-injerto como no propio. Este proceso está categorizado histológicamente e inmunológicamente en tres grandes tipos: hiperagudo, agudo, y crónico. El rechazo hiperagudo se produce cuando aparece una gran pérdida de la función del injerto en minutos u horas después de que la circulación fuese establecida en el órgano, es un

proceso que está mediado por anticuerpos preexistentes específicos para alo-antígenos de las células endoteliales del órgano del donante. Estos anticuerpos fijan complemento promoviendo trombosis intravasculares y formando rápidas oclusiones en los vasos del injerto y por lo tanto un rechazo del mismo (5). El cross-matching para los antígenos HLA y para los grupos sanguíneos (ABO) se utiliza actualmente para prevenir el rechazo hiperagudo.

El rechazo agudo es principalmente un proceso mediado por células que normalmente ocurre desde la primera semana hasta varios años después del trasplante. Está caracterizado por necrosis de las células parenquimales del órgano trasplantado. Después del trasplante (6), el 61% de los pacientes están libres de rechazo durante el primer mes, el 38% de los pacientes no tienen rechazo hasta 6 meses después del trasplante, el 34% de los pacientes están libres de rechazo durante el primer año. El mayor riesgo para padecer un episodio de rechazo agudo está sobre el mes post-trasplante. El rechazo crónico, o fallo tardío del injerto, es un deterioro gradual e irreversible de la función del injerto que ocurre desde meses hasta años después del trasplante. Está caracterizado por fibrosis produciendo una oclusión luminal de los vasos del órgano (7). La vasculopatía del trasplante cardiaco se detecta por angiografía en el 44% de los receptores de trasplante de corazón a los 3 años (8). De esta manera el rechazo está envuelto por una gran cantidad de componentes del sistema inmune: Células T, citoquinas, macrófagos y moléculas de adhesión (9). En este sentido, tanto factores inmunológicos como no inmunológicos parecen estar envueltos en el daño a las funciones del órgano. El rechazo agudo tratado inadecuadamente, un gran número de episodios de rechazo agudo, una inmunosupresión insuficiente a largo plazo, anormalidades lipídicas e infecciones se han asociado con una mayor incidencia de rechazo crónico (10).

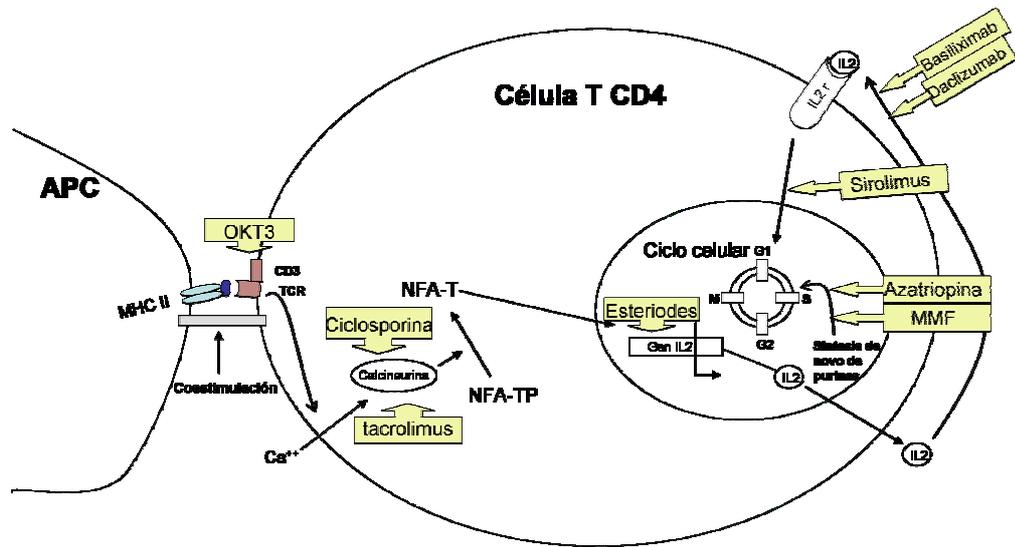
### **1.1.3 INMUNOSUPRESIÓN EN TRASPLANTE CARDIACO**

Los regímenes de inmunosupresión comprenden la terapia de inducción, terapia de mantenimiento y terapia de rechazo. La terapia de inducción es una

inmunosupresión en el peri-operatorio. Originalmente se diseñó para inducir tolerancia hacia el injerto, aunque todavía no se ha alcanzado este objetivo (11). Aún así, el concepto de inducción es útil porque resalta el hecho de que las respuestas contra el donante son típicamente más potentes poco tiempo después del trasplante, donde los estímulos como muerte cerebral, isquemia/reperfusión y traumas debidos a la operación aumentan la expresión de antígenos por parte del donante lo que conduce a un aumento de la respuesta inmune del receptor. Los beneficios de la terapia de inducción es una reducción del rechazo en los días próximos al post-operatorio donde la disfunción del injerto y la disfunción renal son muy problemáticos. La terapia de inducción también permite la introducción de inhibidores de la calcineurina más tardía los cual retrasaría el empeoramiento de la función renal. La desventaja de las terapias de inducción es el incremento de los riesgos de infección, aparición de tumores y el incremento del coste económico. Los agentes linfólitos (ATGAM, y timoglobulina), se dan generalmente en los primeros días post-operatorios y suelen ser los estándares en este tipo de terapia. Recientemente se están utilizando los antagonistas del receptor de la IL-2 (IL-2R). Con la introducción de drogas más potentes, las terapias de inducción y especialmente los agentes linfólitos están reservados para pacientes con alto riesgo de rechazo o fallo renal.

La terapia de mantenimiento consiste generalmente en una combinación con un antimetabolito, un inhibidor de la calcineurina y esteroides. El régimen de mantenimiento está diseñado para disminuir la nefrotoxicidad de los inhibidores de la calcineurina y la toxicidad metabólica de los esteroides. Por lo tanto muchos regímenes añaden sirolimus y everolimus (inhibidores TOR) y menos dosis de inhibidores de la calcineurina reduciendo los inhibidores de la calcineurina y/o los esteroides. Las terapias actuales combinan varias dianas en distintos pasos de la activación de las células T, permitiendo bajar las dosis de cada droga individual (Figura 1.1). La terapia de mantenimiento de cada centro es específica y varia según la edad, presensibilización y episodios de rechazo previos, ya que estos determinan el riesgo de rechazo posterior por parte del paciente. La terapia de mantenimiento temprana consiste en esteroides, inhibidores de la calcineurina con ciclosporina (nivel en sangre, 300 a 350 ng/mL) o tacrolimus (nivel en sangre, 10 a 15 ng/mL), y

micofenolato mofetil (1g). La mayoría de los centros han sustituido la azatriopina por el MMF. Esta terapia se va reduciendo con el tiempo y los niveles diana para la ciclosporina están alrededor de los 200ng/mL y para el tacrolimus los niveles están sobre los 5 a 10 ng/mL a los dos años después del trasplante. Debido los efectos adversos a largo plazo, se están haciendo esfuerzos para minimizar la terapia de mantenimiento con corticoides. Pequeños estudios en receptores de trasplante cardiaco sugieren que una retirada en los esteroides se puede realizar en el 30% de los pacientes a los seis meses tras el trasplante, y hasta en un 80% de los pacientes a los dos años del trasplante sin riesgos sustanciales ni un empeoramiento en los efectos negativos a largo plazo (12). Por lo tanto, los pacientes trasplantados de corazón que sobreviven más de un año están tomando dosis menores de inhibidores de la calcineurina y MMF, junto con una pequeña dosis de prednisona o sin esteroide alguno. Mayores reducciones en la inmunosupresión son posibles en pacientes que han presentado poco rechazo. Además, se ha sugerido que las drogas inmunosupresoras que previenen del rechazo agudo también cortan la posibilidad de tolerancia específica hacia el trasplante (13). Datos preliminares en trasplantados de riñón indican que la tolerancia puede ser alcanzable en un porcentaje no despreciable de pacientes con una reducción significativa de los niveles de inmunosupresión crónica (14). La terapia de rechazo (o rescate) se refiere a la terapia inmunosupresora que se la al paciente para paliar un episodio de rechazo. La intensidad de la terapia de rechazo depende del tipo, la severidad y las consecuencias hemodinámicas del rechazo, si es mediada por células T o es humoral, así como de las diferencias entre los distintos protocolos de los centros.



**FIGURA 1.1:** Esquema de las dianas de los fármacos inmunosupresores actuales. Adaptada de Xavier M et al (15)

Entre los distintos fármacos inmunosupresores que se utilizan actualmente se pueden destacar varios tipos.

### *Inhibidores de la calcineurina.*

Los inhibidores de la calcineurina actualmente utilizados son la ciclosporina (CsA), que es un undecapéptido lipofílico y el Tacrolimus (TAC), que es un macrólido (antes conocido como FK506). Ambos son la piedra angular de la terapia de mantenimiento inmunosupresora

### *Mecanismos de Acción*

Tanto la CsA como el TAC actúan bloqueando la calcineurina activada por calcio (16), (17). La CsA y el tacrolimus entran en la célula por difusión y se unen a diferentes inmunofilinas: La CsA se une a la ciclofilina y el TAC se une a la proteína de unión FK12 (FKBP-12). El complejo droga/inmunofilina se va a unir a la calcineurina, que es una fosfatasa que va a desfosforilar diversas moléculas, incluyendo el factor nuclear de las células T activadas (NF-AT). El NF-AT desfosforilado se trasloca al núcleo de las células T, el cual se une a secuencias

específicas del ADN las cuales están situadas en las regiones promotoras de distintas citoquinas, entre las cuales se encuentra la IL-2. De esta manera, tanto la CsA como el TAC inhiben la transcripción de la IL-2 y otras citoquinas, la CsA también estimula la producción de TGF-B, el cual contribuye a su acción inmunosupresora (18) (Figura 1.1).

#### *Monitorización de la ciclosporina*

El análisis de los niveles de CsA a las dos horas después de la dosis (C2) se ha mostrado eficaz para una inmunosupresión adecuada basada en los ensayos clínicos en adultos receptores de trasplante cardiaco, con una mejor profilaxis de rechazo agudo y una mejor correlación con la exposición total al fármaco (19). Asimismo, los niveles medidos a una y a dos horas (niveles C2) proporcionan información acerca de la absorción de CsA. En definitiva, los niveles C2 pueden ser los mejores en predecir la eficacia de los inmunosupresores de CsA en comparación con la monitorización clásica en los valores de C0, es decir, antes de la dosis.

Los estudios farmacodinámicos indicaron cuales eran los niveles máximos que mejor se correlacionan con la inhibición de la calcineurina y, en general, con la inmunosupresión. Graves consecuencias clínicas pueden ocurrir en el trasplante a causa de una baja dosis o sobredosificaciones en los niveles de CsA. Por lo tanto, la individualización de la dosis de CsA es indiscutible. La estrategia óptima de la terapia con CsA aún se está debatiendo. Recientes estudios sobre la farmacocinética y farmacodinámica de CsA han demostrado que la CsA induce una mayor inhibición de la calcineurina y producción de IL-2 en la primera hora y dos horas después de la administración del inmunosupresor (20). El ajuste de dosis de CsA para cumplir la meta de alcanzar los niveles C2 ha dado lugar a bajas tasas de rechazo en trasplante, sin disminución de la tolerabilidad a la CsA.

#### *Antimetabolitos: Micofenolato mofetil (MMF)*

El MMF es un inhibidor no competitivo de la inosina monofosfato deshidrogenasa, una enzima clave en la síntesis de novo del nucleótido guanina. Los

linfocitos que van a proliferar son dependientes de la ruta de síntesis de novo de la guanina porque es la única ruta para la síntesis de purinas y la replicación de ADN. Otras células usan tanto la ruta de novo como la ruta de salvamento para la síntesis de purinas. Por lo tanto el MMF es un inhibidor selectivo de la proliferación de linfocitos. Tanto in vivo como in vitro el ácido micofenólico inhiben la proliferación de linfocitos en respuesta a una estimulación alogénica sin inhibir el crecimiento de otras células (21). (Figura 1.1)

### ***Corticoides***

Los corticoides se encuentran entre las primeras drogas inmunosupresoras utilizadas en trasplante, han quedado como un componente importante en las terapias de inducción, mantenimiento y rechazo. Los glucocorticoides son unos potentes agentes antiinflamatorios e inmunosupresores. Estos difunden libremente por las membranas celulares y se unen a receptores de glucocorticoides citoplasmáticos de alta afinidad. El complejo glucocorticoide-receptor se transloca al núcleo, donde este se une a un elemento de respuesta a glucocorticoides en el ADN (22) (Figura 1.1). Este complejo también se puede unir a otros elementos reguladores, inhibiendo su unión al ADN. Ambas cosas producen regulación transcripcional, de ese modo alteran la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria. Los glucocorticoides afectan al número, distribución y función de todos los tipos de leucocitos (linfocitos T y B, granulocitos, macrófagos y monocitos), así como las células endoteliales. El efecto principal en los linfocitos parece ser mediante la inhibición de dos factores de transcripción, el activador de la proteína 1 y el factor nuclear (NF)  $\kappa$ -B (23), (24). Esto afecta a la expresión de un gran número de genes entre los que se incluyen factores de crecimiento, citoquinas, el ligando de CD40, GM-CSF así como de moléculas de adhesión. En células no linfoides, los esteroides causan un descenso en la producción de factores vasoactivos, quimio-atrayentes, enzimas lipolíticas y proteolíticas. Lo que lleva a una inhibición de la adhesión de neutrófilos con las células endoteliales y de la diferenciación a macrófagos, y subregulación de la función endotelial, incluyendo el descenso en la expresión de la miosina de cadena

pesada. Algunos de los efectos antiinflamatorios de los esteroides están regulados a través de la liberación de la lipocortina, la cual actúa inhibiendo a la fosfolipasa A, esto conllevaría a la inhibición de la producción de leucotrienos y prostanglandinas (22).

## **1.2 INMUNOLOGIA DEL TRASPLANTE**

### **1.2.1 BREVE INTRODUCCIÓN HISTÓRICA**

Peter Medawar fue el primero en demostrar que el sistema inmune era el responsable del rechazo de órganos sólidos. Medawar empezó sus trabajos pioneros en Glasgow con injertos de piel en un modelo murino, en estos trabajos pioneros encontró que la piel del ratón donante era rechazada en unos diez días, pero un segundo injerto de piel era rechazado inmediatamente. Medawar sugirió que el rechazo era un proceso inmunológico, indicando además que esto era debido a que el sistema inmune recordaba la presencia de un intruso lo cual aceleraba el proceso de rechazo en el segundo trasplante (25). A principio de los años 50 Medawar, en otros experimentos, inoculó embriones de ratón con células de ratón pertenecientes a otra cepa. Después de su nacimiento se le realizó un injerto con piel de la cepa de ratón a la cual había sido expuesto en el útero, estos injertos no fueron rechazados, introduciendo el concepto de tolerancia inmunológica adquirida. Posteriormente, Frank Burnet sugirió que las células inmunes del cuerpo aprenden muy tempranamente a aceptar a los tejidos como parte del cuerpo y solo atacan y rechazan el material que se presenta más tarde (26). Esta teoría desarrollo más tarde la noción de selección clonal y la selección de lo propio y no propio por el sistema inmune de los vertebrados (27). En 1958, Jean Dausset describe por primera vez el primer antígeno leucocitario, MAC (Ahora conocido como HLA-A2) (28). Este conocimiento permitió estudiar la compatibilidad de tejidos. El estudio en los años posteriores de estas moléculas de histocompatibilidad ha permitido un avance espectacular en el campo de trasplantes de órganos sólidos. En capítulos posteriores se describirá la estructura y los diferentes tipos de moléculas de histocompatibilidad que se conocen.

### **1.2.2 RECONOCIMIENTO DE ALOANTÍGENOS**

El sistema inmune ha desarrollado mecanismos sofisticados para evadir o destruir a los patógenos. La adquisición de la capacidad para reconocer no sólo organismos completos sino pequeños péptidos derivados de una digestión parcial, es un éxito biológico importante, después de la respuesta innata, para poder mejorar la capacidad y eficiencia de la respuesta contra microorganismos, se ha de desarrollar un concepto inmune completo con células presentadoras de antígenos (APC), para indicar la presencia de patógenos invasores, y células T capaces de recibir las señales y organizar una respuesta inmune efectiva.

En el centro del diálogo de células APC y células T están las moléculas HLA que son codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El alto grado de de polimorfismo observado en estas moléculas las hace individualmente únicas, lo cual representa una ventaja importante en la lucha contra los patógenos no solo como individuo sino también como especie.

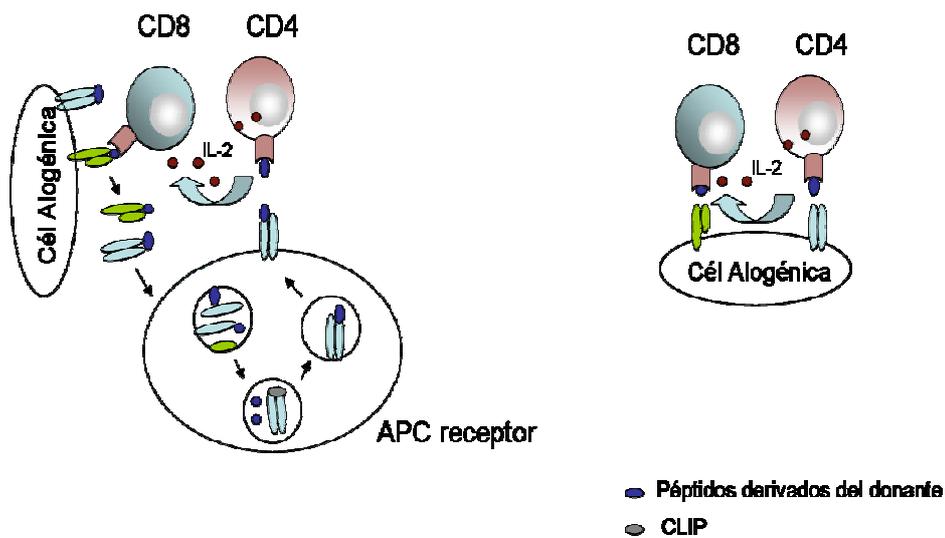
Cuando un órgano es trasplantado, éstas moléculas HLA polimórficas son reconocidas como extrañas por el receptor. Este fenómeno se denomina aloreconocimiento. Como consecuencia de este proceso una respuesta inmune es organizada y destruirá el órgano trasplantado si no se toman medidas inmunosupresoras rápidas y específicas. Por tanto, las moléculas HLA representan una ventaja a la hora de combatir patógenos pero un perjuicio para la práctica del trasplante, de hecho estas moléculas se descubrieron en experimentos de trasplante de tejidos entre individuos incompatibles realizados por Gorer a finales de los años 30.

Ha sido ampliamente observado que los MHC aloantigénicos del donante pueden ser presentados al sistema inmune del receptor por distintas rutas (29), (30). Además, el modo de la presentación antigénica parece estar relacionado con el tipo de rechazo que tiene lugar. Esto da luz sobre la importancia de explorar las rutas de presentación antigénica, en este sentido existen actualmente descritos tres mecanismos de presentación alo-antigénica.

En la *presentación directa* (Figura 2) las moléculas MHC-I y MHC-II intactas presentes en la superficie de las APC del donante son reconocidas directamente por las células T CD8+ y CD4+ del receptor, respectivamente.

En la *presentación indirecta* (Figura 1.2) las moléculas MHC-I y II del donante son recogidas, procesadas y presentadas por APC del receptor a células T CD8+ y CD4+ del receptor, respectivamente.

## Aloreconocimiento indirecto    Aloreconocimiento directo



**FIGURA 1.2.** Tipos de reconocimiento de aloantígenos. Adaptada de Jiang S. et al. (29).

El repertorio del receptor de la célula T contiene una única y alta frecuencia de células T aloreactivas a la presentación directa y una relativa baja frecuencia de células T aloreactivas para la presentación indirecta. Esto sugiere que el reconocimiento directo es el mayor responsable de los episodios de rechazo agudo temprano mientras que el reconocimiento indirecto cobra más importancia para los episodios de rechazo tardío.

Esto va en consonancia con la noción de que las APC del donante en el órgano trasplantado van desapareciendo con el tiempo, haciendo progresivamente al reconocimiento directo inoperante. Por otra parte, la adquisición, procesamiento y

presentación de moléculas MHC del donante por APCs del receptor es un proceso más lento pero más eficiente en periodos más tardíos después del trasplante.

Una tercera ruta se ha propuesto recientemente, la *presentación semi-directa*. Esta ruta sirve para unir los otros tipos de reconocimiento. En esta ruta, las células dendríticas del receptor pueden adquirir moléculas MHC de células del donante y asumir la presentación directa sobre las células T del receptor.

### **1.2.3 RESPUESTA INMUNE ALOGÉNICA**

El rechazo al injerto está mediado de una manera antígeno independiente (sistema inmune innato) y de una manera antígeno dependiente (respuesta inmune adquirida)

El sistema inmune innato (ej. Monocitos, células NK, neutrófilos) comprende tipos celulares que carecen de mecanismos específicos de reconocimiento antigénico, pero los cuales reconocen un amplio espectro de antígenos consistentes en motivos conservados de patógenos. Estos motivos se denominan “patrones moleculares asociados a patógenos”. El reconocimiento de patógenos por monocitos (diferente al de linfocitos, como veremos más tarde) no requiere de una expansión clonal. Existen evidencias de que los componentes del sistema inmune innato es responsable del daño al injerto en las etapas más tempranas de la operación de trasplante cardiaco (Ej. durante la fase de muerte cerebral y el daño por isquemia reperfusión). Además, el injerto es infiltrado por monocitos y neutrófilos muy precozmente justo después de la implantación del órgano, dando como resultado la expresión de nuevas moléculas, que incluyen moléculas de adhesión, citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas, lo que promueve la infiltración en el injerto por parte de los linfocitos. El complemento puede activarse en ausencia de anticuerpos, por lo que se considera parte del sistema inmune innato. La activación del complemento ocurre durante el proceso de daño por isquemia-reperfusión y causa daños tisulares amplificando a su vez la respuesta inmune.

La respuesta inmune adquirida es la respuesta mediada por linfocitos antígeno-específicos frente a los aloantígenos del órgano del donante. El rasgo más importante de la respuesta inmune adquirida es su habilidad para responder rápidamente a antígenos extraños con los cuales se ha encontrado anteriormente y se consigue mediante la selección clonal y la expansión de linfocitos antígeno específicos.

El punto inicial de la alorespuesta es la unión del complejo TCR/CD3 y los correceptores CD4 o CD8 en conjunción con las señales coestimuladoras, que van a provocar la señal de transducción con la activación de segundos mensajeros como las proteínas kinasas (31). Las concentraciones de calcio citoplasmático aumentan debido al flujo de entrada de calcio extracelular. Las enzimas dependientes del calcio, entre ellas la calcineurina, se activan (32). La calcineurina, desfosforila los factores nucleares de las células T activadas (NF-AT), lo que permite a estos factores entrar en el núcleo, donde se unen específicamente al promotor del gen de la IL-2, facilitando la transcripción del gen de la IL-2 (32). La interacción de la IL-2 con su receptor (IL-2R) en la superficie de membrana de las células induce la proliferación celular y la producción de citocinas específicas de las células T (33).

#### 1.2.4 RECHAZO AGUDO. BASES INMUNOLÓGICAS

El rechazo agudo es dependiente de las células T. En este sentido, ratones a los cuales se le han reducido o son deficientes en células T son incapaces de provocar un rechazo del injerto.

El Papel de las células T CD4 positivas está estudiado en experimentos en los cuales las subpoblaciones de células T se han transferido a animales T deficientes (para ver si eran capaces de rechazar un trasplante) mostraron que las células T CD4 juegan un papel principal en la destrucción del injerto (34), estas células pueden causar daño al injerto de diferente forma:

**Colaborador-** Estas células podrían actuar como células T “ayudantes” en la activación de los linfocitos B y su diferenciación a células plasmáticas. Ellas pueden actuar de esta manera solo si se han activado mediante la vía indirecta de aloreconocimiento ya que estas deben interactuar con las moléculas MHC II de los linfocitos B del receptor. La ayuda para la activación de las células B esta mediada por citoquinas secretadas por las células T colaboradoras, las cuales se dividen en dos subpoblaciones dependiendo de las citoquinas que producen. La subpoblación T colaboradora 2 (*Th2*) es la que produce las citoquinas necesarias para la producción de anticuerpos; estas citoquinas incluyen la interleuquina -4,-5 y -6.

**Citotóxica-** Las células CD4 pueden actuar como células T citotóxicas. Aunque no causan gran daño parenquimal ya que reconocen directamente MHC de clase II que está presente en endotelio activado o epitelio (virtualmente inexistente en órganos trasplantados). Estas podrían ser las responsables de la endotelitis.

**Interferón** – Las células T CD4 colaboradoras pueden ser del tipo 1 (*Th1*) las cuales producen IFN- $\gamma$  e IL-2. Estas células se pueden activar por la vía directa e indirecta de aloreconocimiento. El IFN- $\gamma$  tiene diversos efectos en el trasplante. Incrementa la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio del injerto, facilitando la adhesión de linfocitos circulantes a las paredes de los vasos sanguíneos y su migración hacia el injerto. La infiltración en el injerto es una de las

características del rechazo agudo, el IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos y les induce a secretar enzimas, radicales libres y agentes oxidantes (con la intención de eliminar la “infección”), así como citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$ ). En esta ruta, las células T específicas para antígenos del injerto que activan macrófagos son muy importantes en el daño que se va a producir en el órgano trasplantado (Figura 1.3). En particular los pacientes trasplantados de corazón que han mostrado concentraciones más altas de TNF- $\alpha$  *in vitro* o que tienen un genotipo asociado a una mayor producción de TNF- $\alpha$  tienen más posibilidades de perder el injerto por rechazo agudo. El IFN- $\gamma$  también incrementa la expresión de las moléculas HLA de clase II en el parénquima y endotelio del injerto, también incrementa la habilidad de las APC para activar a las células T incrementando su habilidad para procesar y presentar moléculas coestimuladoras.

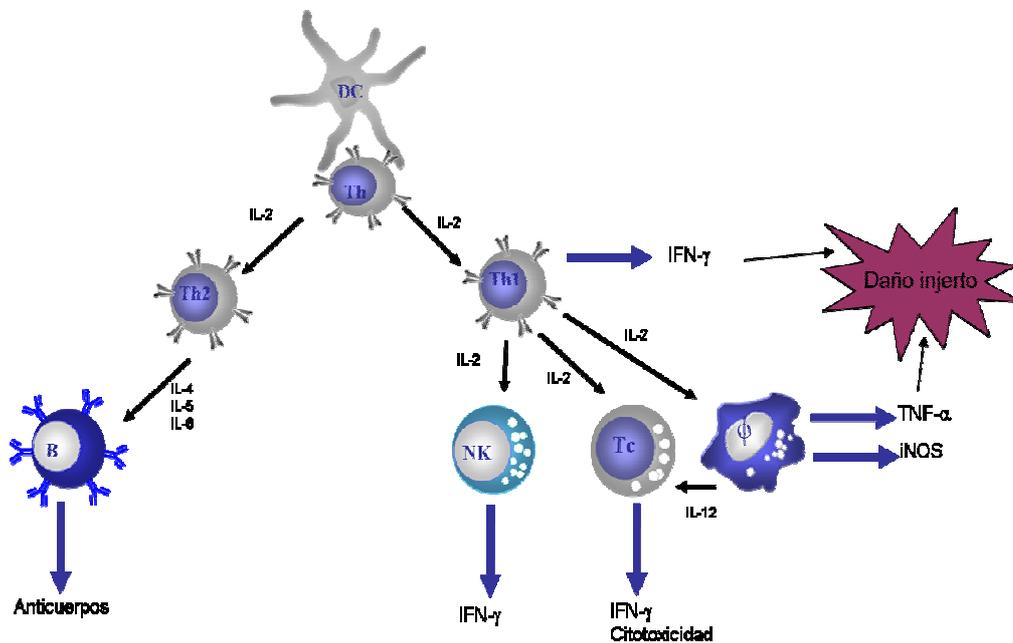


FIGURA 1.3. Respuesta inmune alógena. Adaptada de Rose ML. et al. (35)

La IL-2 tiene una influencia vital en el rechazo agudo. Es un factor de crecimiento para células T y B, incrementando su proliferación y supervivencia. Uno de los tipos celulares dependientes de la IL-2 para su activación es el linfocito T CD8 citotóxico (Figura 1.3). El papel que juega la célula T CD8 en el rechazo es polémico

(35), pueden ser activados por la vía directa para dañar al injerto. Causan daño a las células diana induciendo muerte apoptótica o lítica. Se piensa que ambas formas de actuar juegan un papel en el rechazo al injerto y la ruta apoptótica explicaría como los CTLs pueden atacar al injerto sin causar evidencias histológicas de lisis en tejidos o células. La muerte por lisis celular está causada directamente por la liberación de dos moléculas sobre la superficie de las células diana:

- Perforina: Permeabiliza la membrana de la células diana.
- Granzima: Entra en la célula e inicia el proceso lítico.

La expresión de estas moléculas en biopsias de trasplante cardiaco y en sangre periférica ha sido estudiada como un marcador molecular del rechazo agudo. La muerte por lisis es un proceso patológico y no es parte de los mecanismos normales de muerte en los tejidos. La muerte apoptótica en cambio es un proceso fisiológico normal que regula el tamaño de las poblaciones celulares y remodela los tejidos (Ej. embriogénesis). Las células T CD8+ citotóxicas inducen apoptosis en las células dianas mediante la unión Fas-Fas ligando.

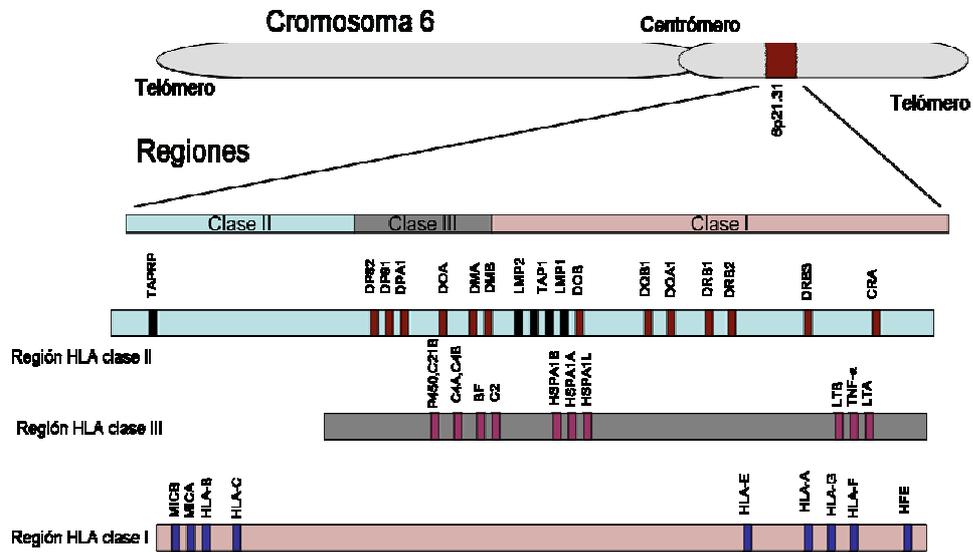
## **1.3 MOLÉCULA DE HISTOCOMPATIBILIDAD NO CLÁSICA HLA-G**

### **1.3.1 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD MHC**

El complejo mayor de histocompatibilidad se localiza en la porción distal de la banda 6p21.3, en el brazo corto del cromosoma 6, y supone aproximadamente un 0.1% del genoma humano. Se han conseguido identificar unos 400 genes en el MHC humano o murino, y se piensa que se han podido conservar unidos en grupos (*clusters*) durante la evolución.

El sistema MHC, en humanos, se conoce con el nombre de HLA y se puede subdividir en tres subregiones: clase I, clase II y clase III. La región de clase I, más cercana al telomero, contiene los loci HLA-A, -B, -C que agrupan genes que codifican series de antígenos definidos de manera serológica y, posteriormente, confirmados por técnicas moleculares y son conocidos como los antígenos HLA clásicos de trasplante, estos genes se conocen como de clase MHC Ia. Otros tres genes de clase I, denominados MHC Ib, HLA-E, -F, -G codifican moléculas funcionales (36) cuya función hasta hace poco no era muy clara, pero ya se le conocen funciones muy interesantes en el caso de HLA-E y HLA-G. Más cercanos al centrómero se encuentra la región de clase III que originariamente se creía circunscrita a los genes del complemento C4, C2 y Bf, e incluye también genes tan importantes como los del *factor de necrosis tumoral* (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ), los de la enzima *21-hidroxilasa* y los que codifican para tres miembros de la familia de las “proteínas de choque térmico” (*Heat shock protein*). La región de clase II está situada en posición más centromérica y engloba los genes: HLA-DR, -DQ y -DP (Figura 1.4). Uno de los hechos más relevantes del complejo HLA es su polimorfismo extremo. Ya que se conocen al menos 414 alelos para HLA-B, 209 para HLA-A, 101 para HLA-C y 273 para HLA-DRB1 (37). Debido a esto la heterocigosidad es de un 90%, y la mayoría de los alelos tienen una frecuencia menor de 0,15. Los antígenos HLA se heredan de una forma mendeliana dominante. Debido a la cercanía de los diferentes loci del complejo mayor de histocompatibilidad y la resultante baja

frecuencia de “*cross over*”, los genes son heredados juntos la mayoría de las veces. Esta combinación de determinantes genéticos es referida como haplotipo. Ya que el cromosoma 6 es un autosoma, todos los individuos tienen dos haplotipos HLA (uno para cada cromosoma).



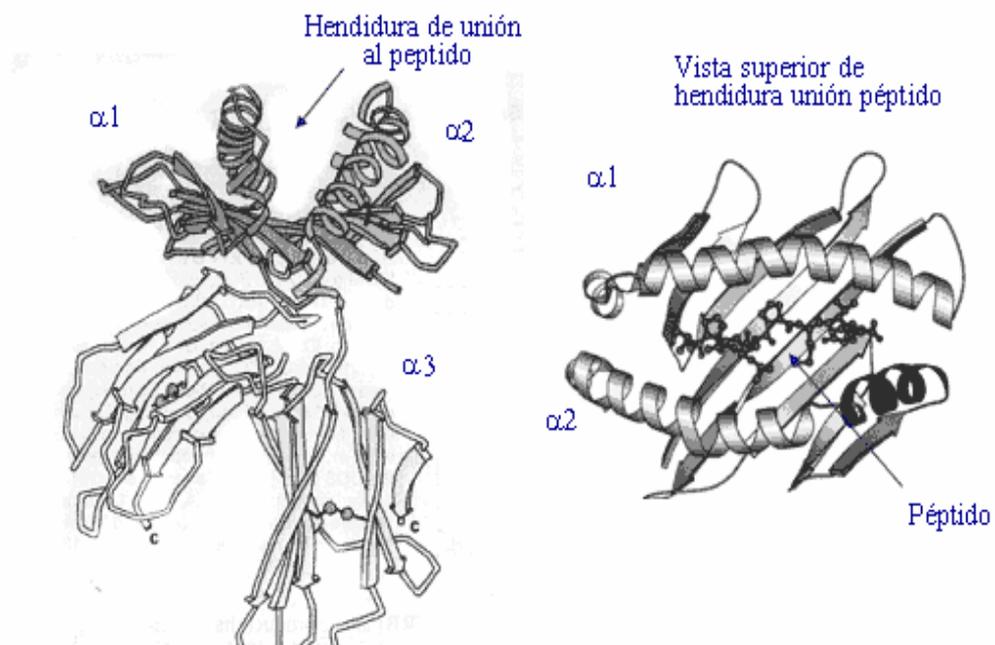
**FIGURA 1.4.** Ordenación genética del complejo mayor de histocompatibilidad. Adaptada de Trowsdale, J. et al (38)

### 1.3.1.1 Estructura de las moléculas de histocompatibilidad de clase I clásicas

Los antígenos de histocompatibilidad son antígenos de superficie celular capaces de inducir una respuesta inmune en un receptor genéticamente diferente (alógeno), lo que resulta en un rechazo de los tejidos o células que tengan asociados estos antígenos. Los antígenos MHC de tipo I se presentan en todas las células nucleadas y están cada una compuesta de una cadena pesada  $\alpha$  de 45 Kd codificada por los genes de los loci HLA-A, HLA-B o HLA-C del cromosoma 6 y están asociadas no covalentemente con una proteína de 12 Kd, B2 microglobulina, que está codificada de un gen del cromosoma 15 (figura 1.5) y cuya función principal es dar estabilidad a la estructura, la unión se realiza a través del dominio  $\alpha 3$  de la cadena

pesada, y es necesaria para la expresión de la molécula HLA de clase I en la superficie celular.

Las cadenas  $\alpha$  son glicoproteínas de membrana tipo I (el extremo carboxilo terminal se encuentra en el citoplasma, mientras que el amino terminal se sitúa en el exterior de la membrana celular). La región extracelular tiene unos 300aas, la porción hidrofóbica transmembrana (TM) de 25 aas, que es muy parecida a la de otras proteínas expresadas en membrana, y la región citoplasmática que tiene unos 30aas. Los tres dominios extracelulares tienen, cada uno, cerca de 90 aas y se extienden desde la región  $\alpha 3$ , adyacente a la membrana, a las regiones más distales  $\alpha 2$  y  $\alpha 1$ , las cuales tienen restos de carbohidratos. La mayor cantidad de polimorfismo en la secuencia de estas moléculas se encuentra en unas *regiones hipervariables* (HVR) dentro de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (39). El dominio  $\alpha 3$  tiene un plegamiento del tipo de Igs, es menos polimórfico que los anteriores, y en su estructura se encuentra el sitio de unión a la molécula CD8 del linfocito T.



**FIGURA 1.5.** Estructura de las moléculas de histocompatibilidad humanas e imagen de la hendidura del péptido donde se presentan los péptidos. Imagen adaptada de *Chien YH y col.* (40)

Los sitios de unión con el péptido están formados por una hoja de 8 cadenas  $\beta$ , envuelta por 2 regiones de hélices  $\alpha$ . Los péptidos se unen en el surco que se sitúa entre las 2 hélices  $\alpha$ , y en contacto con la cara superior de la hojas  $\beta$  (40), quedando dos dominios de inmunoglobulina por debajo del sitio de unión del péptido. Los péptidos que se pueden unir a las proteínas de clase I suelen tener una longitud de 8 a 10 aas, que generalmente son de origen endógeno (41). La localización de los sitios antigénicos polimórficos (epítomos) en la hendidura de unión con el péptido, cerca del sitio de unión con el TCR, ha conducido a especular sobre el papel de estos polimorfismos en los trasplantes de órganos y la susceptibilidad ciertas enfermedades (42).

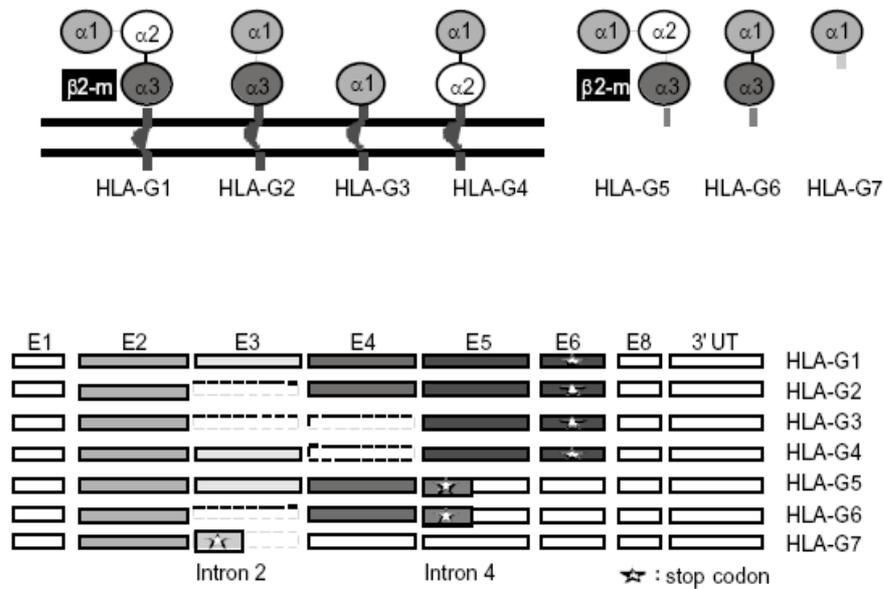
### **1.3.1.2 Expresión de los antígenos HLA**

La respuesta del sistema inmune hacia un injerto es mayoritariamente inducida por antígenos presentes en el injerto, pero ausentes en el receptor. Los antígenos codificados por el MHC son los principales desencadenantes del proceso inflamatorio que conduce a la activación de células capaces de dañar al injerto y son, además la diana de la respuesta allogénica. Otros antígenos que pueden jugar un papel en la aceptación o rechazo del injerto son, los del grupo sanguíneo ABO, los antígenos menores de histocompatibilidad y antígenos específicos de tejido.

Los antígenos HLA son la mayor diana que puede conducir a un rechazo del injerto, existiendo dos hechos claves respecto a la expresión de estas moléculas MHC. Primero, la expresión no es constante en las células, sino que puede ser aumentada por citoquinas y disminuida por sustancias que bloqueen o inhiban la función de estas citoquinas. Segundo, los cambios cuantitativos en la expresión van a alterar la magnitud y tipo de la respuesta allogénica.

### 1.3.2 ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA HLA-G Y SUS DIFERENTES ISOFORMAS FUNCIONALES.

El transcrito primario de HLA-G sufre un *splicing* alternativo, dando como resultado siete ARNm alternativos que codifican para cuatro isoformas de membrana (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) y tres isoformas solubles (HLA-G5, -G6, -G7) (Figura 1.6) (43;44). A continuación se describen las peculiaridades de las distintas isoformas.



**FIGURA 1.6.** Estructura y ordenación génica de las isoformas de HLA-G-. Tomada de M. I. Torres (45)

#### 1.3.2.1 Proteína HLA-G1

ARNm HLA-G1 codifica una proteína de 39 kDa que contiene los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  unidos al dominio transmembrana codificado por el exón 5 y a una reducida cola citoplasmática, debido a la existencia de un prematuro codon de parada en el exón 6. Esta isoforma presenta una estructura similar a otras moléculas HLA de clase I en que está asociada con  $\beta 2$ -microglobulina y une un péptido de 9 aas (46) (Figura 1.6).

Varias líneas de evidencia indican que la función primaria de HLA-G1 es servir como un ligando inhibitorio para células inmunocompetentes, contribuyendo al establecimiento de una tolerancia periférica. HLA-G1 es reconocido por los receptores, ILT2 (*Immunoglobulin-like transcript*) expresado en células mielomonocíticas (47), ILT4 expresado en monocitos, macrófagos y células dendríticas y p49/KIR2DL4 (CD158d) expresado en células NK y células T (48). En cualquier caso la naturaleza de las interacciones entre HLA-G y KIR2DL4 necesita explorarse con más detalle ya que se han obtenidos resultados divergentes sobre este punto (48) (49). A través de estos receptores HLA-G1 puede interactuar directamente con las células NK, T, B, y APC

Por otra parte, *Gao et al* (50) ha descrito la unión de HLA-G1 con CD8 $\alpha\alpha$  con una afinidad (150 $\mu$ M) comparable con la que CD8 $\alpha\alpha$  presenta con HLA-A2. Por lo tanto, es posible que esta interacción pueda facilitar el reconocimiento HLA-G-restringido por CTLs. Aunque HLA-G1 se une a CD8 y presenta nona-péptidos, queda por determinar si HLA-G1 es capaz de presentar péptidos bacterianos y virales a las células T y provocar una respuesta citotóxica HLA-G restringida de una manera similar a otras moléculas HLA de clase I.

Finalmente, células transfectadas con HLA-G1 han mostrado que modulan la producción de citoquinas de células mononucleares tanto deciduales como de sangre periférica. Las cantidades de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  liberadas por células mononucleares deciduales y de sangre periférica se vieron descendidas, mientras que la cantidad de IL-4 secretada se aumentó (51). También se ha asociado una respuesta Th2 (supra-regulación de IL-10 e IL-4, y subregulación de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) con la exposición a altas concentraciones de HLA-G1 purificada (52). Recientemente se ha descubierto que HLA-G1 afecta la producción general de citoquinas en linfocitos granulares de la decidua de una forma no consistente en el paradigma Th1/Th2 (descenso de la producción de IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  y GM-CSF) (53).

### 1.3.2.2 Proteínas HLA-G2.-G3 y -G4

Los transcritos primarios de HLA-G2, G3 y G4 que respectivamente excluyen exón 3, exón 3 y 4, y exón 4, generan isoformas truncadas que poseen solo el dominio  $\alpha 1$  en HLA-G3, los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  para HLA-G2, y los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  para HLA-G4, unidos a la región transmembrana (Figura 1.6). Sus conformaciones estructurales “no convencionales”, exhibiendo uno o dos dominios extracelulares (monómeros, dímeros, heterodímeros, o polímeros) queda todavía por elucidarse.

Al contrario que HLA-G1, el análisis de los patrones de expresión de estas otras isoformas de HLA-G resulta complicado, debido escasez de reactivos capaces de reconocer específicamente a cada una de ellas y en concreto de anticuerpos monoclonales que distinguan entre las distintas isoformas. Compilando datos sobre la expresión de estas proteínas truncadas, varias conclusiones pueden destacarse: (i) Estas isoformas son expresadas fisiológicamente en el citotrofoblasto (54) y patológicamente en células tumorales, como las de melanoma (55), y coriocarcinoma (56), así como en células transfectadas (57). Se ha observado que estas isoformas inhiben la citólisis tanto de las células NK como la mediada por las células CTL específicas mediante una ruta HLA-E específica (58). Quizás estas isoformas truncadas tengan mayor relevancia en situaciones en las que la expresión de HLA-G1 esté impedida, como en células deficientes en  $\beta 2$ -microglobulina, ya que HLA-G2,-G3 y -G4 no requieren una asociación con ésta para su expresión (59), y en individuos homocigotos para el alelo nulo HLA-G\*0105N (60). La funcionalidad potencial de este alelo, el cual puede producir moléculas HLA-G truncadas funcionales en la interfase materno-fetal, ha sido recientemente discutida (61).

### 1.3.2.3 Proteínas HLA-G5, G6 y G7

Las isoformas solubles de HLA-G están desprovistas de las partes transmembrana y citoplásmica, debido a la presencia de un codón de parada en el intrón 4 (-G5, y -G6) o en el intrón 2 (-G7) dejando una cola específica C-Terminal para estas formas solubles (Figura 1.6). La isoforma completa HLA-G5 es una glicoproteína de 37 kDa que guarda idénticos dominios líder,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  pero incluyendo una secuencia del intrón 4 que produce una región de lectura abierta que codifica para 21 aas unidos al dominio  $\alpha 3$  y excluye el dominio transmembrana (62). De igual manera, la isoforma HLA-G6 mantiene la secuencia del intrón 4, dando lugar a una proteína soluble la cual carece del dominio  $\alpha 2$  (63). HLA-G7 es la isoforma que ha sido descrita más recientemente, es una proteína soluble de 17 kDa producida por una variante de *splicing* en la cual la secuencia de lectura abierta continúa en el intrón 2, el cual contiene un codón de parada. HLA-G7 está formada por el dominio  $\alpha 1$  unido a dos aas codificados por el intrón 2 (63).

Debido a la disponibilidad de anticuerpos, como el anticuerpo monoclonal 16G1, el policlonal PAG5-6 y actualmente con el monoclonal 5A6G7 que son específicos para el extremo C-terminal (residuos codificados por el intrón 4) tanto de HLA-G5 como HLA-G6, se ha podido investigar estas moléculas. También, los anticuerpos descritos que reconocen la isoforma de membrana HLA-G1 también reaccionan con la proteína soluble HLA-G5 como el anticuerpo MEM-G/09.

La isoforma HLA-G5 ha sido descrita en varios fluidos corporales, como el líquido amniótico y suero de mujeres embarazadas (64-66), pacientes con cáncer (67;55) pacientes trasplantados de corazón (68;69). También ha sido descrito en trofoblasto (70;71), Timo (72), oocitos (73), embriones pre-implantados (74;75) y durante la reactivación del citomegalovirus humano (76). Se ha sugerido que la isoforma soluble HLA-G6 está presente en la sangre materna durante el embarazo (77), y hasta ahora ha sido claramente detectada *in vivo* en suero de pacientes trasplantados de corazón (69). La presencia de HLA-G7 como una proteína secretada

tanto en los sobrenadantes de células transfectadas como en fluidos corporales no ha sido aún detectada.

Mientras que las propiedades funcionales de las isoformas solubles HLA-G6 y -G7 quedan todavía por elucidar, las de HLA-G5 han sido estudiadas, utilizando la proteína recombinante HLA-G5 producida por células procariotas (78) o células eucariotas (79-81), o por otra parte HLA-G5 producida naturalmente por células del trofoblasto (82;52). La proteína HLA-G5 recombinante exhibe propiedades inhibitorias y se une a CD8 y receptores inhibidores, como lo hace HLA-G1. De hecho, la isoforma HLA-G5 inhibe la lisis mediada por células NK y células T CD8+ (81;83) y la respuesta alógena de los CTLs. Por otra parte, la isoforma HLA-G5 producida naturalmente por células T CD4+ aloreactivas inhibe su respuesta proliferativa, a través de efectos inhibitorios por *feedback* (82). También se ha observado que la proteína recombinante HLA-G5 influye en la liberación de citoquinas por las PBMCs estimulando su liberación de IL-10, TNF- $\alpha$ , e INF- $\gamma$  (84).

### 1.3.3 RESPUESTA ALOGÉNICA Y HLA-G

La investigación sobre el papel que desempeña HLA-G en la respuesta alodérmica, y su potencial uso para la prevención del rechazo ha ido incrementándose en los últimos años. Las razones para este interés son que mientras que HLA-G difiere de las moléculas clásicas HLA en su bajo polimorfismo y en su ampliamente descrito efecto no alo-estimulador. HLA-G es un ligando para receptores inhibidores de la respuesta inmune, lo que hace tan atractiva a esta molécula es que todas las poblaciones celulares envueltas en el rechazo poseen al menos un receptor para HLA-G. Por lo tanto HLA-G tiene el potencial de ser tolerogénico, mediante su acción sobre los receptores inhibidores de las células responsables del rechazo impidiendo la activación de la respuesta alodérmica.

La implicación de HLA-G en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia al injerto ha sido ampliamente estudiada *in vitro* y ha habido algunos estudios también *in vivo*, en el contexto de alo- y xenotrasplante, en humanos y modelos animales. También se ha estudiado su función es expresada por diferentes tipos celulares.

#### 1.3.3.1 Papel de HLA-G en el trasplante. Estudios *in vivo*.

HLA-G es una molécula que en circunstancias normales no está expresada, excepto en la interfase materno fetal y en las células epiteliales tímicas. Por otra parte se ha demostrado que hay expresión de HLA-G en pacientes trasplantados de corazón, hígado y riñón (85). Dos estudios de Lila et al han mostrado que el 18% de los pacientes trasplantados de corazón. A su vez ha sido detectado la presencia de las isoformas HLA-G5 y HLA-G6 en suero de estos pacientes HLA-G positivos. Finalmente la expresión de HLA-G por los miocardiocitos en los pacientes trasplantados parece ser estable en el tiempo. Interesantemente la presencia de HLA-G en pacientes trasplantados de corazón parece estar unida a un número reducido de

episodios de rechazo agudo ( $1.2 \pm 1.1$  en pacientes HLA-G positivos frente a  $4.5 \pm 2.8$  en pacientes HLA-G negativos) y no presentan rechazo crónico, mientras que los pacientes con niveles bajos de HLA-G presentaron rechazo crónico en un 27% de los casos (69). En recientes trabajos se ha identificado la expresión de HLA-G en biopsias de trasplantados de hígado-riñón, en concreto en las células epiteliales biliares (BEC), y esta correlacionado con la ausencia de rechazo de estos dobles trasplantados (86;87).

Los mecanismos por los cuales la expresión de novo ocurre en los pacientes trasplantados son todavía desconocidos, pero hasta la fecha existen datos que sugieren que la misma alo-reacción lo podría estar promoviendo. De hecho, Lila et al (82) ha mostrado *in vitro* que HLA-G es producida y secretada por células T CD4+ alo-reactivas en reacciones linfocitarias mixtas. Además, este HLA-G5 procedente de éstas células T era funcionalmente activo y capaz de inhibir otras células T CD4+ durante la alo-proliferación *in vitro*.

Estos datos fueron los primeros que unieron la expresión natural de HLA-G con la aceptación a largo tiempo del injerto *in vivo* en humanos. En modelos murinos hay resultados similares (88) los cuales muestran que HLA-G humana se puede unir al homólogo murino de ILT-4, el receptor PIR-B, y esta unión promueve la supervivencia del alo-injerto de piel. También muestran que los ratones HLA-G transgénicos exhiben respuestas inmunes celulares reducidas. De hecho la supervivencia del injerto en ratones HLA-G+ se prolonga el doble de tiempo, comparado con los controles no transgénicos, incluso cuando la función de las células T en los ratones transgénicos era normal. Los autores demuestran que la supervivencia más prolongada era debida a un defecto en la maduración inducido por HLA-G en las APC de los ratones transgénicos, produciendo una estimulación defectuosa de las células T alo-reactivas. Siguiendo esta línea y trabajando con animales no transgénicos Liang et al (89) confirmó que HLA-G induce un defecto en la maduración de las APC, y demostró que la inmunización de animales receptores con bolas de látex unidas a HLA-G un día antes, y 4 días después de un trasplante de

piel incrementaba la supervivencia del injerto el doble de tiempo. Estos datos son cruciales porque muestran por primera vez que la inmunización *in vivo* con HLA-G humana es efectiva y conlleva supervivencia del injerto.

Los mecanismos por los cuales HLA-G puede alterar el proceso del trasplante no se han investigado *in vivo*. Sin embargo, hay estudios *in vitro* con resultados suficientemente claros para dar un poco de luz a lo que realmente podría estar ocurriendo, indicando que HLA-G está actuando sobre múltiples parámetros y células que son vitales en el proceso del rechazo al injerto.

### **1.3.3.2 Inhibición de la respuesta allogénica por HLA-G**

El rechazo de un alo- o xenotrasplante es un proceso con muchos pasos y complejo. Si las células potencialmente reactivas son las NK, necesitarán alcanzar el injerto, adherirse al tejido, y finalmente lisarlo. Por otra parte, si las células potencialmente reactivas son las T, la respuesta allogénica debe ser iniciada a través de (i) captura de aloantígenos y la presentación por APCs infiltradas; (ii) maduración de estas APCs; (iii) estimulación mutua de células T CD4 y CD8 aloespecíficas y APCs; (iv) migración de las células citolíticas hacia el injerto; y finalmente, (v) lisis. Estudios *in vitro* indican que HLA-G es capaz de interferir con cada uno de estos pasos, provocando una protección múltiple del injerto (Figura 1.7).

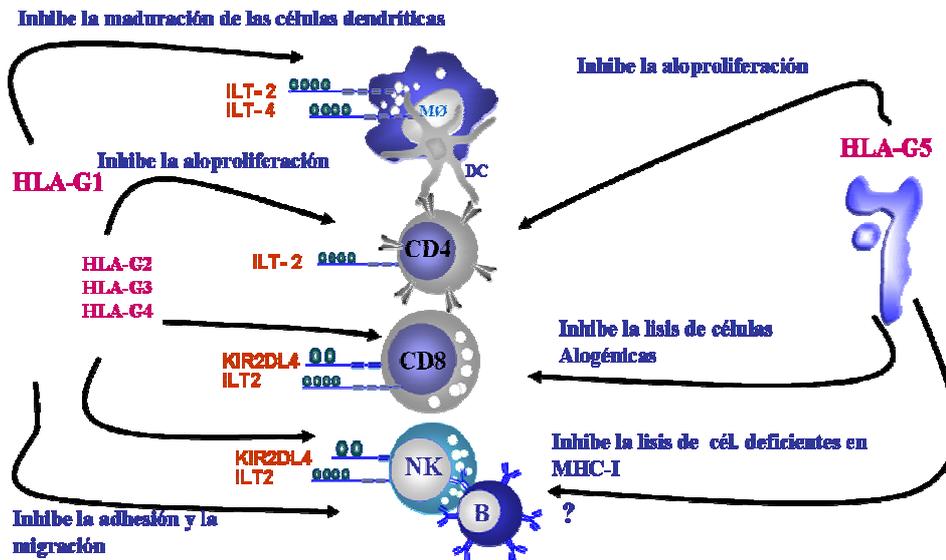


FIGURA 1.7. Efecto de las diferentes isoformas de HLA-G sobre la respuesta alógena.

### 1.3.3.2.1 Inhibición de la adhesión y la migración transendotelial

Una buena adhesión de las células NK a sus dianas es un prerequisite para su función citolítica. La influencia de HLA-G en la adhesión y a migración de las células NK ha sido estudiada en el contexto del xeno-reconocimiento, donde juegan un papel crucial en el rechazo.

Forte et al (90;91) mostró que la expresión en superficie de HLA-G en células endoteliales monocapa porcinas (CEP) inhibe la adhesión de células NK humanas activadas. En este estudio, la adhesión de líneas celulares NK humanas a CEP transfectadas con HLA-G fue inhibida en un 50%, comparada con CEP no transfectadas. El efecto no fue totalmente mediado por el receptor ILT2, ya que el bloqueo de este receptor solo disminuye parcialmente la inhibición de la adhesión producida por HLA-G. Esto podría sugerir que KIR2DL4 podría estar envuelto principalmente en la inhibición de la adhesión NK, o cualquier otro receptor no descubierto aún.

Dorling et al (92) demostró que HLA-G retrasa la migración transendotelial de células NK humanas a través de PEC en al menos una hora y media. Este efecto puede ser totalmente revertido al bloquear el receptor ILT2 en las células NK.

#### **1.3.3.2.2 Inhibición de las interacciones entre APCs y células T CD4, CD8**

La generación de una alo-respuesta comprende al menos tres subpoblaciones de células diferentes: Células T CD4 alo-reativas, células T CD8 alo-reativas y APCs. Una activación y maduración correcta de las APCs y células T CD4 alo-específicas es necesaria para la generación de CTLs alo-específicas. HLA-G puede actuar sobre las células T CD4 alo-específicas y APCs produciendo una inhibición de la alo-respuesta *in vitro*.

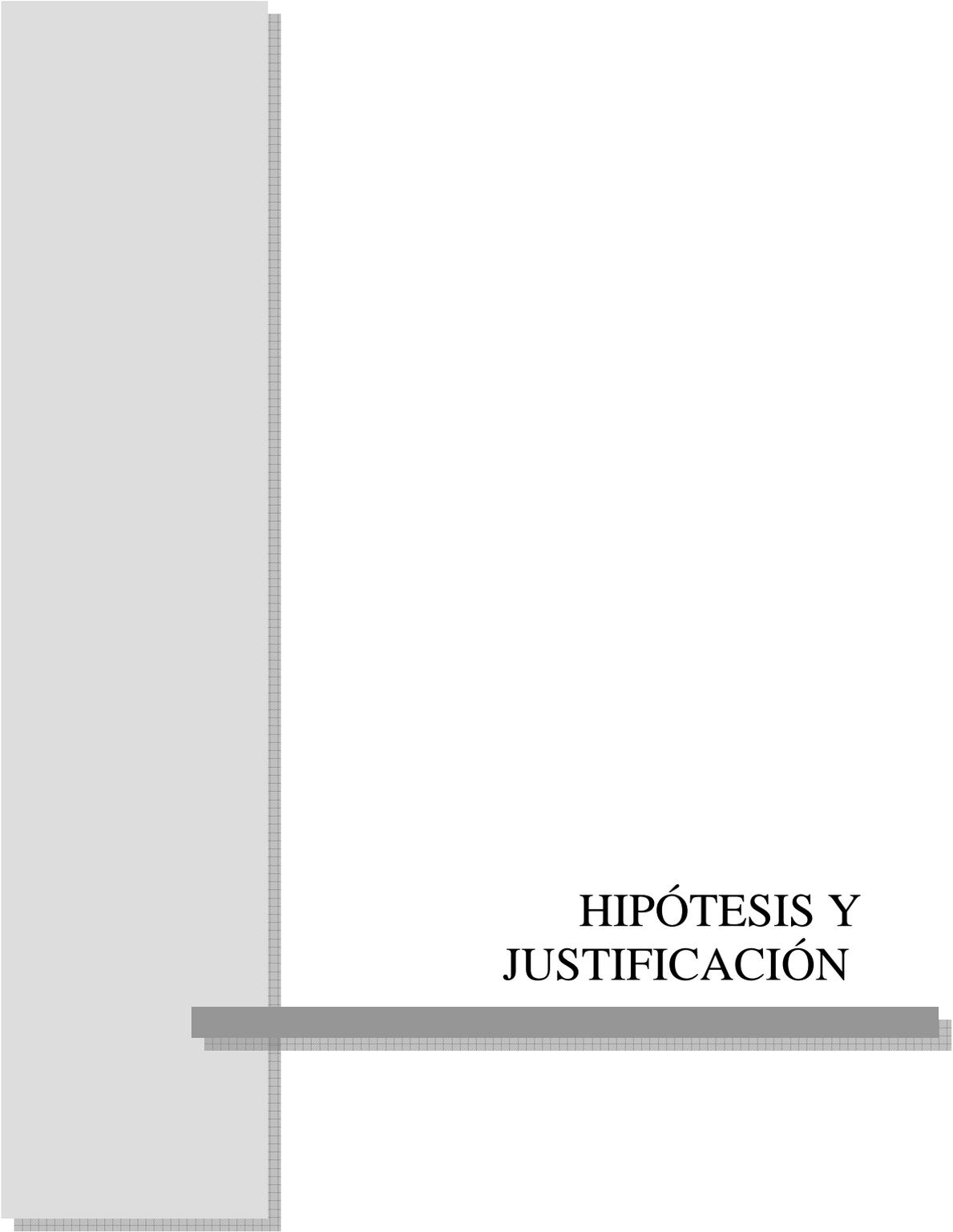
La inhibición de la proliferación de las células T CD4 por HLA-G1 ha sido investigada en varios estudios (93;94) los cuales demostraron que células MHC II positivas transfectadas con HLA-G1 inhiben la proliferación de éstas en un 80% comparadas con células no transfectadas. Resultados similares se han observado cuando células K562 (no expresan moléculas HLA) fueron transfectadas con HLA-G1, o cuando HLA-G5 soluble estaba presente (94). Es importante resaltar que en estos experimentos HLA-G puede unirse potencialmente a las células T CD4 (a través de ILT2) así como a las APCs (a través de ILT2 y/o ILT4). Por lo tanto es difícil determinar como actúa HLA-G, en células T CD4 y las previene de ser activadas, sobre las APCs previniendo su completa maduración y una correcta estimulación de células T CD4, o en ambas poblaciones de células.

La cuestión sobre si HLA-G tiene un efecto directo en las células T CD4 no está todavía resuelto, pero recientes trabajos han dado algo de luz sobre los efectos de HLA-G en APCs. Uniéndose al receptor murino PIR-B, HLA-G induce un defecto en la maduración de las células dendríticas *in vivo* en ratones HLA-G transgénicos (88;82). Este efecto funcional sobre las APCs ha sido observado también en el estudio

de Ristich et al (95) el cual muestra que una sobreexpresión de ILT-4 en APCs no induce proliferación de células T CD4 alo-específicas. Si observamos los datos de estos dos grupos, juntos en un sistema humano, parece que si HLA-G se une a su receptor en células dendríticas ILT-4, podría ser capaz de prevenir una maduración funcional de las APCs y la generación de una respuesta alógena. Este mismo efecto podría ser potenciado por el efecto directo de HLA-G en los linfocitos T. Por otro lado, la inhibición de la función NK por células xenogénicas transfectadas con HLA-G está bien documentada. Las células NK humanas son capaces de lisar dianas tanto alógenas como xenogénicas. Como HLA-G es una molécula HLA tipo I muy poco polimórfica puede actuar como un ligando de los receptores inhibidores ILT2 y/o KIR2DL4 de células NK, y protegerlas de la lisis mediada por las células NK (Figura 1.7)

La transfección de ADNc o ADN genómico de HLA-G en PEC o en células ováricas de hámster chino (CHO) permiten una inhibición desde parcial hasta completa de la función citolítica de células policlonales NK humanas y de la mayoría de las líneas celulares NK humanas (90;95-97). Fortaleciendo estos argumentos hay dos estudios que muestran una correlación entre los niveles de HLA-G1 en superficie de células CEP y el alcance de la inhibición funcional de las células NK (90;96).

En resumen, estos estudios muestran que HLA-G de membrana y soluble están expresadas en el contexto del alo-trasplante y son capaces de inhibir la función citolítica de las células NK, así como la alo-respuesta de células T CD4 y CD8 (Figura 1.7). Sin poder excluir el posible efecto que HLA-G puede tener sobre los linfocitos B, en este sentido se ha publicado recientemente un trabajo que indica una menor presencia de anticuerpos citotóxicos en individuos trasplantados de riñón (98) está asociada a la presencia de HLA-G5 en suero. Lo que no se conoce es el efecto de HLA-G funcionalmente más importante, pero el hecho de que inmunización *in vivo* con HLA-G prolonga la supervivencia de injertos en ratones es en si bastante prometedor.



## HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

## **II HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

---

### **2.1 HIPOTESIS DE TRABAJO**

El trasplante de corazón ortópico es un excelente modelo para el estudio de la inducción o ruptura de la tolerancia específica frente a la estimulación alogénica, puesto que la alta presencia de episodios de rechazo agudo durante el primer año, así como la incidencia de rechazo crónico, indican que las características inmunológicas de este son fundamentales para el desarrollo normal del injerto. De hecho, aunque se ha descrito la presencia de la molécula HLA-G en individuos trasplantados de corazón, en la actualidad no se conoce claramente el papel de la molécula HLA-G en este tipo de trasplante, esto hace muy interesante profundizar en el conocimiento y la función de ésta molécula de histocompatibilidad en este tipo de trasplante.

En este sentido, sería de interés tener en cuenta dos aspectos principales, el primero ver la relación que tiene esta molécula durante el primer año en la aparición de episodios de rechazo agudo y en segundo lugar que papel juega el tratamiento inmunosupresor que están recibiendo estos pacientes en la expresión de dicha molécula. Por tanto y bajo éstas premisas, nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

1. Si existe relación entre la presencia de ésta molécula, tanto en su forma soluble como de membrana, y una mejor o peor aceptación del injerto.
2. Si variaciones en la expresión de HLA-G, especialmente en suero y biopsias de miocardio afectan a una mayor incidencia de episodios de rechazo agudo en individuos trasplantados de corazón.
3. Si el tratamiento inmunosupresor que están recibiendo estos pacientes está modulando la expresión de HLA-G en los pacientes trasplantados de corazón

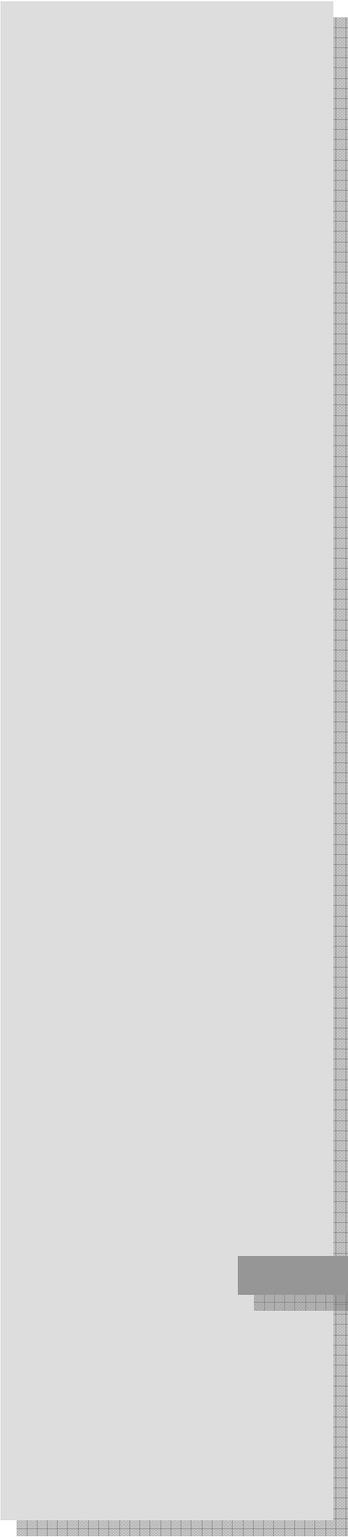
## 2.2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La respuesta inmune de un paciente receptor de un corazón alogénico es dependiente de la respuesta de células T. Está dirigida parcialmente en el contexto de presentación alogénica del antígeno a células T y puede derivar en apoptosis, anergia, o activación completa. El desarrollo de los inmunosupresores actuales actúa inhibiendo los diferentes pasos de las rutas de activación de las células T. Aunque el tratamiento para los episodios de rechazo agudo temprano está teniendo resultados bastante satisfactorios, no está exento de importantes efectos perjudiciales, entre los que se pueden destacar infecciones, nefrotoxicidad así como el desarrollo de neoplasias. Los fármacos más recientes (El receptor antagonista de la IL-2, micofenolato mofetil, rapamicina, inhibidores de la calcineurina) se han introducido en un intento de reducir o eliminar estos efectos no deseados. La inducción de tolerancia hacia el injerto y un periodo de supervivencia a largo plazo libre de inmunosupresores es el objetivo principal de los inmunólogos dedicados al trasplante de órganos sólidos.

Los mecanismos descritos para HLA-G incluyen tolerancia inmunológica inhibición de la respuesta alogénica y redirección inmunológica. Aunque gran cantidad de métodos de inducción de tolerancia se han probado experimentalmente, ninguno de ellos ha probado una inducción de tolerancia capaz de aplicarse en la rutina clínica. La inmunosupresión sigue siendo la piedra angular del éxito de los trasplantes de órganos, hasta que se ponga en marcha un método fiable para inducir tolerancia específica en los individuos receptores o al menos un método para medir la tolerancia potencial de un paciente trasplantado. Esto nos permitiría reajustar la terapia inmunosupresora individualmente y en muchos pacientes nos permitiría reducirla de manera significativa lo cual reduciría enormemente los efectos no deseados de la terapia inmunosupresora.

En resumen, la profundización sobre los mecanismos de tolerancia específica, la expresión de moléculas con funciones tolerogénicas así como de las células con capacidad de controlar la respuesta alogénica, abre nuevas vías para la individualización de la terapia inmunosupresora en los pacientes trasplantados de

corazón. Esto permitirá en un futuro cercano, junto con la mejora de los fármacos actuales, una reducción considerable de los efectos adversos de la terapia inmunosupresora, con la consiguiente mejora en la calidad de vida de los pacientes trasplantados de corazón.



## OBJETIVOS

### III OBJETIVOS

---

Para tratar de demostrar las hipótesis formuladas, se propone los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar la expresión de HLA-G en biopsias de miocardio de individuos trasplantados de corazón durante el primer año post-trasplante
2. Cuantificar los niveles de HLA-G soluble durante el primer año post trasplante.
3. Valorar si la presencia de HLA-G tanto en biopsia como en suero puede tener implicación en la buena o mala aceptación del injerto.
4. Valorar si las posibles variaciones en los niveles de HLA-G de un mismo paciente pueden tener una relación con el desarrollo del injerto.
5. Relacionar los niveles de HLA-G soluble con el tratamiento inmunosupresor que están recibiendo estos pacientes en el primer mes post-trasplante
6. Analizar el polimorfismo de inserción /delección de las 14 pb del extremo 3'UTR del exón 8 del gen HLA-G en pacientes con trasplante cardiaco en el periodo previo al trasplante (pre-trasplante) y posterior al mismo durante el primer mes (post-trasplante), tras instaurarse la inmunosupresión
7. Determinar si las frecuencias de los genotipos HLA-G están en equilibrio Hardy-Weinberg

8. Determinar el papel que ejerce la presencia o ausencia de las 14 -bp en el trasplante cardiaco, en relación con el rechazo y con la inmunosupresión (Ciclosporina).



# METODOLOGÍA

## IV MATERIAL Y METODOS

---

### 4.1 MÉTODO Y GRUPOS DE ESTUDIO

Se seleccionaron pacientes con trasplantes ortópicos de corazón realizados en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (n=55) y del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (n=19), durante su primer año post-trasplante. A lo largo del estudio, se revisaron las historias clínicas de cada uno de los trasplantados de corazón, recogiendo de ellas la siguiente información: Edad, causa del trasplante, presencia o no de rechazo agudo, tratamiento inmunosupresor que reciben. Los individuos trasplantados de corazón tenían una media de edad de  $49 \pm 23.3$  (rango de 16 a 64 años) y el 67.34% eran de sexo masculino, mientras que solo el 32,68% fueron de sexo femenino. Las causas del trasplante fueron: Cardiomiopatía Isquémica en el 37.3% de los pacientes; Cardiomiopatía dilatada en el 23.5% de los pacientes; Cardiomiopatía ideopática en el 18.6% de los pacientes; Cardiomiopatía congénita en el 13.7% de los pacientes; Otras en el 6.9% de los pacientes.

Además se seleccionaron individuos sanos al azar voluntarios no relacionados como población control para los niveles de expresión de HLA-G soluble en sangre.

En función de la aparición de, al menos un episodio de rechazo agudo en el periodo de seguimiento, los pacientes se clasificaron en dos grupos:

- Grupo A: Pacientes que no presentaron episodios de rechazo agudo severo recurrente
- Grupo B: Pacientes que presentan episodios de rechazo agudo severo recurrente

## **4.2 TERAPIAS INMUNOSUPRESORAS Y ANTIRRECHAZO**

La terapia inmunosupresora utilizada habitualmente en los protocolos de trasplante cardíaco es un régimen farmacológico triple a base de ciclosporina (CsA) o tacrolimus (FK506), metilprednisona (MP) y micofenolato mofetil (MMF). La ciclosporina comienza con una dosis de 4 mg/kg/día (administrada en dos dosis), en las primeras 24h después del trasplante, después la dosis se ajusta para mantener los niveles de  $C_0$  (antes de la dosis diaria de inmunosupresión) en: Durante el primer mes 200-400ng/ml; 4-6 meses 150-250ng/ml; 6-12 meses 100-200 ng/ml. Los niveles de ciclosporina en sangre se cuantificaron usando FPIA (Fluorescent Polarization Immunoassay, AxSYM). La inmunosupresión adicional consistió en corticoides: Metilprednisona 500 mg IV intra-operatoria, 125 mg por 3 dosis IV en el día 1, seguido por Deflazacort oral en el orden de 0.2-0.3 mg/kg/día durante un mes, 0.15-0.20 mg/kg/día los tres siguientes meses, 0.1-0.2 mg/kg/día a partir de los meses, y 0.05mg/kg/día posteriormente; El MMF comienza con una dosis de 1g b.i.d y se ajustará de acuerdo con el rango terapéutico del ácido micofenólico (MPA): 2.5-4.5 µg/ml. Los niveles MPA se medirán por EMIT (Homogeneous enzyme immunoassay). El tacrolimus se administró en una dosis de 0.3 mg/kg/día en los días 1-3 post trasplante en dos dosis con el objetivo de alcanzar unos niveles en sangre de FK506 de 10-20ng/ml.

## **4.3 MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE RECHAZO AGUDO**

El diagnóstico de rechazo agudo se estableció por el servicio de anatomía patológica, y se basó en criterios convencionales clínicos, y anatomopatológicos. El examen histopatológico para el diagnóstico del rechazo agudo post-trasplante cardíaco requiere la evaluación de dos criterios fundamentales: infiltrado inflamatorio y alteraciones de las fibras miocárdicas. La descripción patológica y la clasificación de la severidad del rechazo vienen clasificados según los criterios internacionalmente

aceptados de la ISHLT (*Internacional Society of Heart and Lung Transplantation*) [99].

#### **4.4 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE HLA-G EN MIOCARDIOCITOS**

##### ***Material en parafina***

Se obtuvieron secciones de 3-4 micras mediante micrótopo rotatorio convencional, montándose sobre portaobjetos con adhesivo celular. Se secaron a temperatura ambiente durante una hora y después se depositaron en una estufa a 37° C, para favorecer la adherencia de la sección. No usándose temperaturas mayores para evitar daños antigénicos.

##### ***Anticuerpos.***

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-HLA-G humana MEM-G/01 (Exbio, Praga. R. Checa) y 4H84 (Cedido por el Dr. Carosella) los cuales reconocen todas las isoformas desnaturalizadas de HLA-G. El anticuerpo 5A6G7 (Exbio, Praga. R. Checa) que reconoce las isoformas solubles HLA-G5 y HLA-G6.

##### ***Buffers Usados***

Se utilizaron como buffers o tampones, el fosfato salino tamponado (*Phosphate Buffered Saline: PBS*), 0.01M, a pH 7.2 y se prepara como sigue: a un litro de agua destilada se añade 1.48g de fosfato sódico dibásico anhidro, 0.43g de fosfato potásico mono básico anhidro y 7.2g de cloruro sódico. Tras cada nuevo elemento añadido se agitará la disolución para que no quede poso. Una vez preparado se comprobará el pH mediante pHmetro convencional, ajustándolo si fuese necesario. La solución se guardará a 4° C.

Tampón citrato para la recuperación antigénica. Se utilizó el de la casa DAKO (DakoCytomation Target Retrieval Solution, Citrate pH 6. S 2369)

### **Técnica de inmunotinción**

Se utilizó el método avidina-biotina-peroxidasa mediante al Kit para inmunomarcaje de Immunotech (HRP 2391. Marseille, Francia)

#### **Realización de la técnica:**

- Se secarán las secciones de la estufa y se dejan a temperatura ambiente así como en el resto de material que vamos a utilizar.
- Desparafinar, en dos cubas con xilol las secciones son introducidas 10 minutos en cada una.
- Hidratación en alcohol etílico decreciente (absoluto, 90° ,70 ° y 50°) 10 minutos para cada paso.
- Las muestras se calentaran en una olla a presión con tampón citrato.
- Se dibujará sobre el porta y alrededor de la sección un círculo mediante el lápiz hidrófobo (Dako, Glostrup, Dinamarca; S-2002) que da una lámina de un polímero plástico hidrófobo, que evita el desparramamiento de las soluciones por el porta, asegurando una cantidad adecuada y uniforme de reactivo sobre la sección.
- Inhibición de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, durante 5 minutos. Esta solución deberá prepararse en el acto.
- Lavaremos en PBS, 5 minutos.
- Incubaremos con el anticuerpo primario adecuadamente diluido (1/1000) durante una hora a temperatura ambiente.
- Lavaremos tres veces con PBS, 5 minutos cada repetición.
- Incubación con anticuerpo anti-ratón biotinilado del kit comercial HRP 2391; Immunotech, Marsella. Francia) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavaremos tres veces con PBS, 5 minutos cada repetición.

- Incubación con complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavaremos tres veces con PBS, 5 minutos cada repetición.
- Incubación con la solución cromógena del kit , durante 8 minutos a temperatura ambiente , recién preparada.
- Lavado en agua corriente, 5 minutos.
- Contratación nuclear con hematoxilina convencional. Aproximadamente 2 minutos.
- Lavado abundante con agua destilada.
- Secamos con papel absorbente los excesos de agua.
- Montaje permanente con gel fijador (Glicergel, Dako, Dinamarca).
- Colocaremos un cubre y depositaremos en oscuridad hasta que la sección se fije.

### **Valoración de las tinciones**

La cuantificación de marcaje se ha realizado mediante el software WCIF ImageJ (Western Research Institute. Toronto. Canadá)

### ***Controles de las técnicas***

#### **A) *Control negativo***

Su función es detectar alteraciones del tejido en estudio que produzcan tinciones inespecíficas o bien alteraciones en el sistema de detección (anticuerpo, complejo del sistema de detección, cromógeno)

Para ello se usaron secciones de tejidos conocidamente negativos que fueron inmunoteñidos de forma similar a las secciones de estudio, no debiéndose obtener tinción si la técnica está bien hecha.

B) *Control positivo*

Su función es chequear el adecuado comportamiento del anticuerpo usado y secundariamente del sistema de detección.

Para ello utilizaremos secciones de trofoblasto materno donde ha sido ampliamente descrita la presencia de HLA-G1 (100).

#### 4.5 TECNICA DE ELISA (ENZIME LINKED IMMUNOABSORBENT ASSAY) PARA EL ESTUDIO DE LAS ISOFORMAS SOLUBLES sHLA-G1+HLA-G5 Y sHLA-I TOTAL EN PLASMA.

##### *Muestras de plasma*

La sangre total se recogió en tubos EDTA, el plasma se obtuvo centrifugando a 1700 rpm la sangre total quedándonos con la parte soluble de la sangre total. Esta se almacenará en tubos Eppendorf y se congelará a -20°C hasta su posterior análisis.

##### *Cuantificación de sHLA-G1 y HLA-G5 en plasma*

La cuantificación se llevó a cabo mediante el Kit de sHLA-G de Exbio (Cat. RD194070100, Exbio, Praga), todos los componentes necesarios para la realización del ELISA vienen suministrados en este Kit. Previamente se preparó la solución de lavado que se hace como sigue: Se diluye 100 ml de la solución de lavado del Kit sHLA-G (Exbio) con 400 ml de agua deionizada y destilada.

Por otra parte se ha de reconstituir la proteína estándar sHLA-G (Exbio) con 0.2 ml de agua destilada y deionizada, La concentración de HLA-Gs resultante es de 1000 Unid/ml (solución *stock*). Para la preparación de la curva estándar realizamos diluciones seriadas de la solución *stock*:

Volumen del estándar	Tampón de dilución	Concentración del estándar
Solución <i>stock</i> estándar	----	1000 Unid/ml
100 µl de Solución <i>stock</i> estándar	400 µl	200 Unid/ml
100 µl of est. 200 Unid/ml	100 µl	100 Unid/ml
100 µl of est. 100 Unid/ml	100 µl	50 Unid/ml
100 µl of est. 50 Unid/ml	100 µl	25 Unid/ml
100 µl of est. 25 Unid/ml	100 µl	12.5 Unid/ml

100 µl of est. 12.5 Unid/ml	100 µl	6.25 Unid/ml
100 µl of est. 6.25 Unid/ml	100 µl	3.125 Unid/ml

### **Realización de la técnica**

- 1) Pipetear 50 µl del tampón de dilución en los pocillos.
- 2) Pipetear 50 µl de las muestras y de los estándares en duplicado. En los pocillos apropiados.
- 3) Incubar la placa a temperatura ambiente (24°C) durante 1 hora, en un agitador de microplacas.
- 4) Lavar los pocillos 3 veces con solución de lavado (0.35 ml por pocillo).
- 5) Añadir 10 µl de la solución conjugada.
- 6) Incubar la placa a temperatura ambiente (24°C) durante una hora en un agitador de microplacas.
- 7) Lavar los pocillos 3 veces con solución de lavado (0.35 ml por pocillo).
- 8) Añadir 100 µl de la solución sustrato. (No colocar la placa en exposición directa a la luz solar). Se cubrirá con papel de aluminio.
- 9) Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Añadir 100 µl de la solución de parada.
- 11) Determinar la absorbancia de la placa a 450nm. (La Absorbancia se debe leer en menos de cinco minutos después del paso 10).

### ***Cuantificación de sHLA-I total en plasma***

Las moléculas solubles HLA de tipo I totales se cuantificaron utilizando el anticuerpo monoclonal W6/32 (8 µg/ml) como anticuerpo de captura. Como muestras estándar se utilizó muestras de suero de nuestro laboratorio para calibrar y calcular los datos de densidad óptica

### **Realización de la técnica**

- 1) Preparación del tampón carbonato a pH=9,5  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{NaHCO}_3$  +  $\text{NaN}_3$
- 2) Tapizado de la placa con el anticuerpo W6/32 diluido 1/400 en el tampón carbonato.
- 3) Incubar la placa a 4° C overnight.
- 4) Añadir BSA (2-3%) e incubar durante 1 hora a 37° C en agitador de placas.
- 5) Lavar los pocillos 3 veces con solución de lavado (0.35 ml por pocillo).
- 6) Añadir las muestras de plasma (100 $\mu$ ) Incubar la placa a temperatura ambiente (24°C) durante una hora en un agitador de microplacas.
- 7) Lavar los pocillos 3 veces con solución de lavado (0.35 ml por pocillo).
- 8) Añadir Ac 2° conejo anti-  $\beta$ 2-microglobulina humana e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
- 9) Lavar los pocillos 3 veces con solución de lavado (0.35 ml por pocillo).
- 10) Incubar 30 minutos con el amplificador DAKO Envision System HRP rabbit
- 11) Lavar los pocillos 3 veces con solución de lavado (0.35 ml por pocillo).
- 12) Revelamos con sustrato cromógeno orthofenilenediamina (Sigma, St Louis, MO, USA) y 8 $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, durante 20 minutos en la oscuridad.
- 13) Añadir solución de Parada  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M
- 14) Determinar la absorbancia de la placa a 492 nm.

#### 4.6 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE HLA-G

Estudiamos el polimorfismo de la inserción/delección de los 14 pares de bases (14pb) que se sitúa en el exón 8 del gen HLA-G. Para ello se extrajo el ADN de los pacientes trasplantados a los que se les había determinado previamente la expresión de HLA-G en sangre, El Kit que se utilizó para la extracción fue *Plasma Nucleospin Blood* (Machery-Nagel.Dttren, Alemania). Mediante PCR se realizó la amplificación de ese fragmento (14pb) de ADN. Los cebadores utilizados fueron los siguientes: RHG4 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA y GE14HLA-G 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC (101) y se generaron los fragmentos de ADN de 224 pb (inserción) o 210 pb (delección). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 92°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 92°C durante 30 segundos, 64°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos y para finalizar un paso final de elongación a 72°C durante 10 minutos. Se amplificaron 100 ng de ADN genómico en 25ul que contenían dNTPs 0,2mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, cebadores a una concentración de 10pmol cada uno y 1 U de Taq polimerasa. Los productos resultantes de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio.

## **ESTUDIO ESTADISTICO**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante SPSS versión 12.0 software y JMP IN Statistical software package (4.0.2. SAS Institute, Cary, NC, USA) para entorno Windows. Se utilizó el test Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de las variables. En el caso de variables con distribución normal se compararon mediante el test T de Student cuando estaban reunidas en dos grupos, en el caso de más de dos grupos se utilizó el test ANOVA paramétrico. Cuando las muestras no presentaron una distribución normal, las comparaciones se realizaron mediante el test no paramétrico Mann-Whitney para dos grupos, si fue entre más grupos se utilizó el test Kruskal-Wallis. Si el test ANOVA resultó significativo. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativos.



## RESULTADOS

---

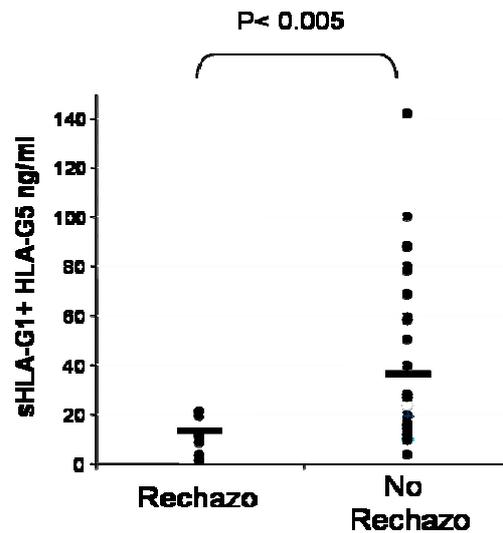
## V RESULTADOS

---

### 5.1 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HLA-G5 Y sHLA-G1 EN PACIENTES TRASPLANTADOS DE CORAZÓN

#### 5.1.1 Niveles de sHLA-G previos al trasplante y su relación con el rechazo agudo

Al analizar los niveles de HLA-G5+sHLA-G1 previos al trasplante se observó que había una gran variabilidad en los valores para HLA-G5+sHLA-G1 en los pacientes estudiados (n=47), con un rango que oscila entre 2.45 y 141.4 ng/ml. Interesantemente, cuando se analizó la relación entre los niveles de HLA-G5 y sHLA-G1 y los episodios de rechazo agudo sufridos por estos pacientes durante el primer año post-trasplante, encontramos que los pacientes que padecieron episodios de rechazo agudo recurrentes durante el primer año post-trasplante mostraban niveles significativamente más bajos de HLA-G5+sHLA-G1 ( $p=0.0041$ ) en comparación con los que no sufrieron episodios de rechazo agudo recurrente ( $13.4\pm 6.9$  ng/ml vs.  $36.37\pm 33.2$  ng/ml) (Figura 5.1).



**FIGURA 5.1:** Niveles de sHLA-G pre-trasplante y rechazo. Los niveles pre-trasplante de HLA-G5+sHLA-G1 en plasma (n=47) fueron cuantificados mediante la técnica de ELISA. Cada punto representa un valor individual de HLA-G soluble, y la media está representada con una línea.

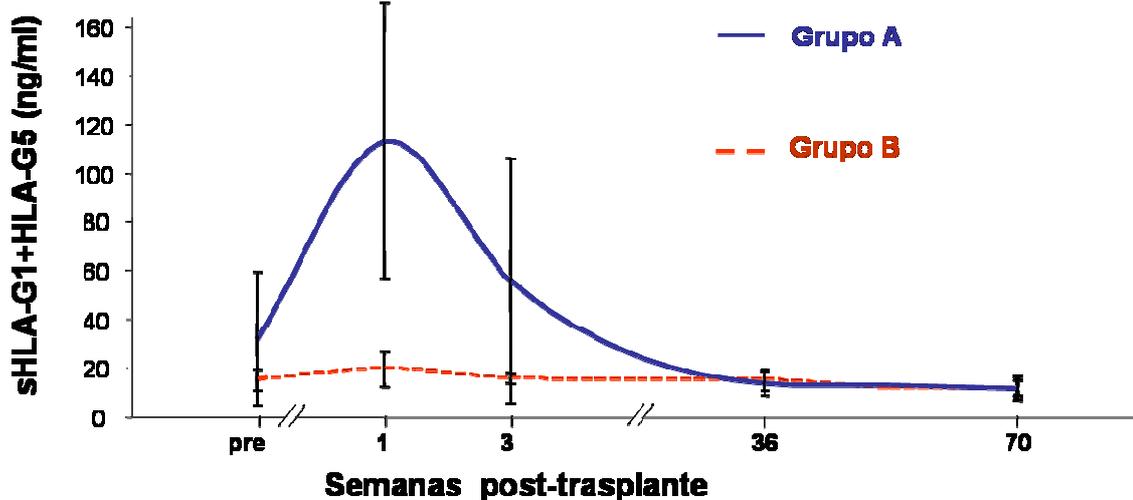
### 5.1.2 Niveles de HLA-G5 y sHLA-G1 durante el primer año post-trasplante.

Para el estudio de los niveles de HLA-G5 y sHLA-G1 durante el primer año post-trasplante se analizaron los plasmas de pacientes trasplantados de corazón mediante ELISA en varios puntos a lo largo del primer año tras el trasplante. Las muestras tomadas fueron: Previa al trasplante, una semana post-trasplante, tres semanas post-trasplante, 9 meses tras el trasplante y 1 año después del trasplante. Los niveles observados revelaron la existencia de una gran variabilidad de las isoformas solubles HLA-G5 y sHLA-G1 en los pacientes trasplantados de corazón. Podemos distinguir dos grupos diferentes de pacientes de acuerdo con los niveles de HLA-G soluble que presentaron (Tabla 5.1).

**TABLA 5.1: Niveles de HLA-G5+sHLA-G1 (ng/ml) en plasma de pacientes trasplantados de corazón**

Pacientes		pre-trasplante	Semanas post-trasplante				Intensidad rechazo**
			1 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	
A	T2	58.0	152.9	12.0	-	8.4	severo
	T3	10.0	57.4	172.6	-	14.0	no
	T6	27.9	117.0	58.0	-	16.0	no
	T7	11.5	224.7	27.92	-	11.4	no
	T9	10.6	125.7	41.7	-	9.3	no
	T14	88.3	56.8	43.6	8.0	-	débil
	T18	23.8	81.7	62.4	17.4	-	débil
	T20	26.8	87.7	27.5	17.1	-	débil
	T40	78.2	72.75	30.1	24.8	-	no
media ± SD	37.23±30.0	108.5±54.2*	52.9±47.6*	16.8±6.8	11.8±3.1		
B	T1	14.3	19.0	14.8	-	17.1	no
	T4	21.3	27.1	19.8	9.8	-	sev rec
	T5	10.0	9.0	9.6	-	8.9	débil
	T8	15.6	8.3	8.0	-	8.2	no
	T10	19.2	18.0	17.0	14.0	-	sev rec
	T11	10.8	28.0	15.9	18.4	-	sev rec
	T13	12.3	20.8	22.0	14.24	-	sev rec
	T19	19.4	21.7	20.2	18.8	-	débil
	T38	1.2	2.3	2.9	3.5	-	sev rec
	T39	16.4	9.4	1.35	-	15.74	no
media ± SD	14±5.8	17.1±8.6	13.2±7.6	13.1±5.7	12.48±4.5		
Individuos sanos: 50.18±39.56							

Los pacientes se reagruparon en pacientes con altos niveles de HLA-G soluble (A>50 ng/ml) y pacientes con niveles bajos (B, < 30ng/ml); \* P<0.05 (Kruskal-Wallis test). \*\* Débil, rechazo menor de 3A; Severo, 3A; Sev rec, episodios de 3A recurrentes.



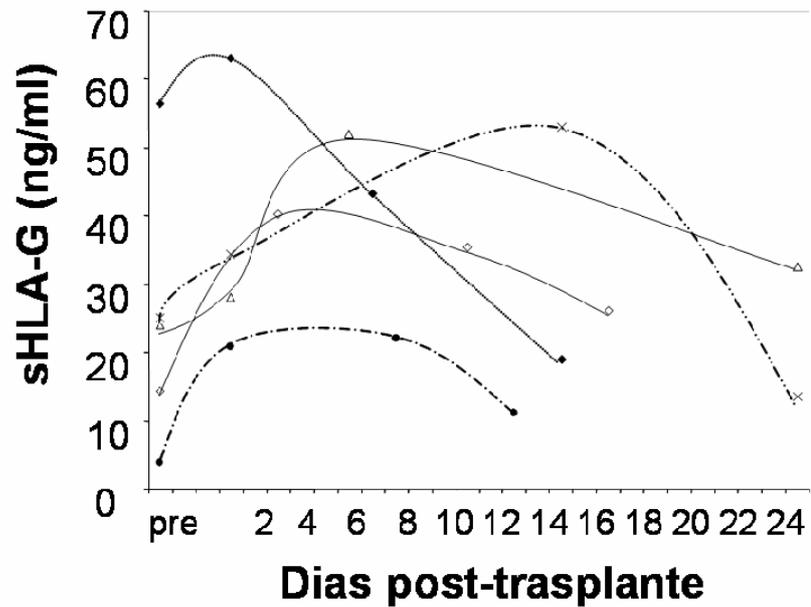
**FIGURA 5.2.** Niveles de sHLA-G post-trasplante. La detección de las isoformas solubles de HLA-G se realizó mediante ELISA, en plasma de individuos trasplantados de corazón. Podemos distinguir los dos grupos de pacientes, el grupo B con niveles de sHLA-G inferiores a 30 ng/ml durante todo el estudio, y el grupo A en el cual, los pacientes presentaron niveles más altos de 50ng/ml durante el periodo de estudio tras el trasplante.

En el *grupo A* hemos incluido los pacientes con niveles de sHLA-G superiores a 50 ng/ml en cualquiera de los tiempos post-trasplante estudiados, y en el *grupo B* se incluyeron los pacientes que no superaron en ningún punto del estudio los 30 ng/ml.

Los pacientes incluidos en el *Grupo A* mostraron un incremento significativo ( $p \leq 0.001$ ) de los niveles de sHLA-G1+HLA-G5 durante el primer mes post-trasplante, que gradualmente se reduce hasta alcanzar los niveles encontrados previos al trasplante, por otra parte los pacientes del *grupo B* mantuvieron los niveles de HLA-G5+sHLA-G1 bajos (0–30 ng/ml) y estables durante todo el periodo de estudio (Figura 5.2). Entre los dos grupos de pacientes A y B (tabla 5.1) se observaron diferencias significativas de niveles de sHLA-G en los valores pre-trasplante ( $p = 0,0281315$ ), durante la primera semana post-trasplante ( $p = 0,0000571963$ ) y en la tercera semana post trasplante ( $p = 0,0182675$ ).

En vista de los resultados obtenidos, se decidió analizar en un nuevo grupo de pacientes, el periodo de tiempo que va desde la operación del trasplante hasta las tres

semanas post-trasplante, ya que es el periodo de tiempo donde se observó los cambios de sHLA-G más importantes. Curiosamente lo que se encontró es que los niveles de sHLA-G se incrementan rápidamente en la primera semana post-trasplante y caen al poco tiempo a niveles más bajos. (Figura 5.3).



**FIGURA 5.3:** Detección de las isoformas sHLA-G1 y HLA-G5 mediante ELISA en pacientes trasplantados de corazón durante las tres primeras semanas post-trasplante y el día previo al trasplante (pre).

### 5.1.3 Niveles de HLA-G5 y sHLA-G1 post trasplante y relación con los episodios de rechazo agudo

La gran variabilidad en los niveles de sHLA-G observados entre los distintos pacientes estudiados, y el hecho de que sHLA-G tenga unas características tolerogénicas nos obligó a relacionar los datos obtenidos con los episodios de rechazo agudo que presentaron estos pacientes durante el primer año post-trasplante. Al analizar los datos conjuntos de los pacientes, se encontró que el 41.6% de los pacientes incluidos en el grupo B, es decir, los pacientes con niveles de sHLA-G bajos durante todo el periodo de estudio presentaron episodios de rechazo agudo severo recurrente (varios episodios de grado 3A), mientras que el 20.8% presentaron rechazos severos (3A) y solo el 37.6% tuvieron ausencia de rechazo en el periodo de tiempo estudiado. En el grupo A, solo el 4.78% de los pacientes presentaron episodios de rechazo agudo severo recurrentes, el 66.6% de los pacientes estuvieron libres de rechazo y el 28.6% de los pacientes presentaron un episodio de rechazo agudo severo (tabla 5.2).

**Tabla 5.2 : Grupos de Pacientes según niveles de sHLA-G y episodios de rechazo agudo**

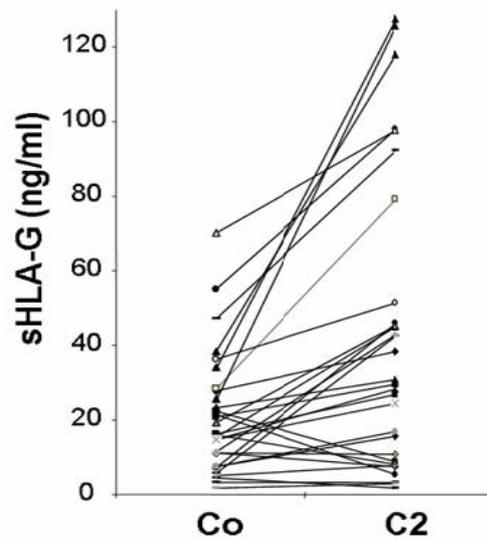
Grupo de Pacientes	n	Rechazo Sev Rec	Rechazo Severo	No rechazo	sHLA-G *
A	21	1	6	14	75.85±51.2 ng/ml
B	24	10	5	9	14.89±7.3 ng/ml

Grupo A, pacientes con niveles > 30 ng/ml durante el primer mes; Grupo B, pacientes con niveles < 30 ng/ml durante el primer post-trasplante; \* Valores medios de sHLA-G durante la primera semana. P< 0.05 significativa entre ambos grupos

## **5.2 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HLA-G5 Y sHLA-G1 Y RELACIÓN CON EL TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR**

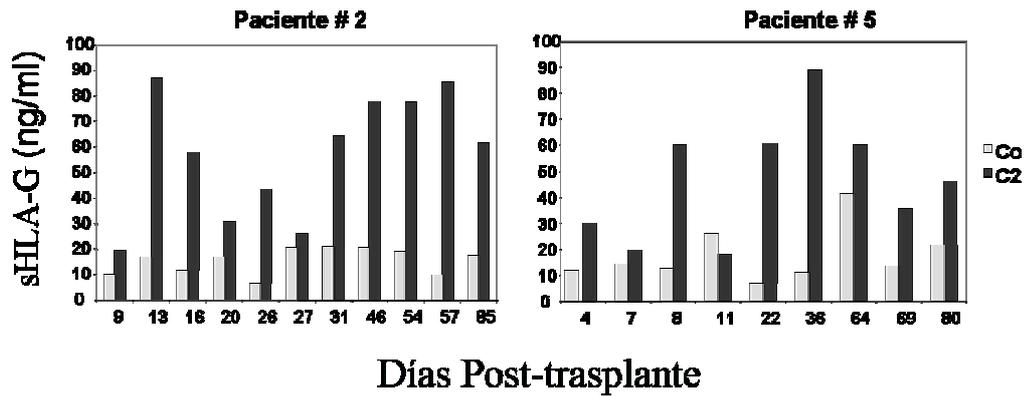
### **5.2.1 Niveles de sHLA-G1 +HLA-G5 tras la administración de la triple terapia durante el primer post-trasplante**

El hecho de observar niveles de sHLA-G elevados en los primeros días post-trasplante, nos planteó la cuestión de estudiar si las altas dosis de tratamiento inmunosupresor que reciben estos pacientes podrían estar afectando a la expresión de esta molécula en plasma de individuos trasplantados de corazón en el periodo crítico del primer mes después del trasplante. Para este propósito se analizaron los niveles de sHLA-G (HLA-G5+sHLA-G1) justo antes de la administración diaria de los fármacos inmunosupresores (C0) y 2 horas después de ésta dosis (C2), en la primera semana post-trasplante. Estos tiempos son los que se utilizan para estudiar la farmacocinética de absorción de la CsA y es el momento donde ejerce su mayor efecto inmunosupresor. Se observó un incremento significativo ( $p= 0.008$ ) de los niveles de sHLA-G a las dos horas de recibir el tratamiento inmunosupresor en el 60% de los pacientes trasplantados estudiados (C2) (Figura 5.4). Se realizó un seguimiento a los pacientes que presentaban un incremento de sHLA-G a las dos horas de administrarle la dosis diaria de inmunosupresores y se observó que este incremento se repetía en diferentes días, en los primeros meses tras el trasplante (figura 5.5).



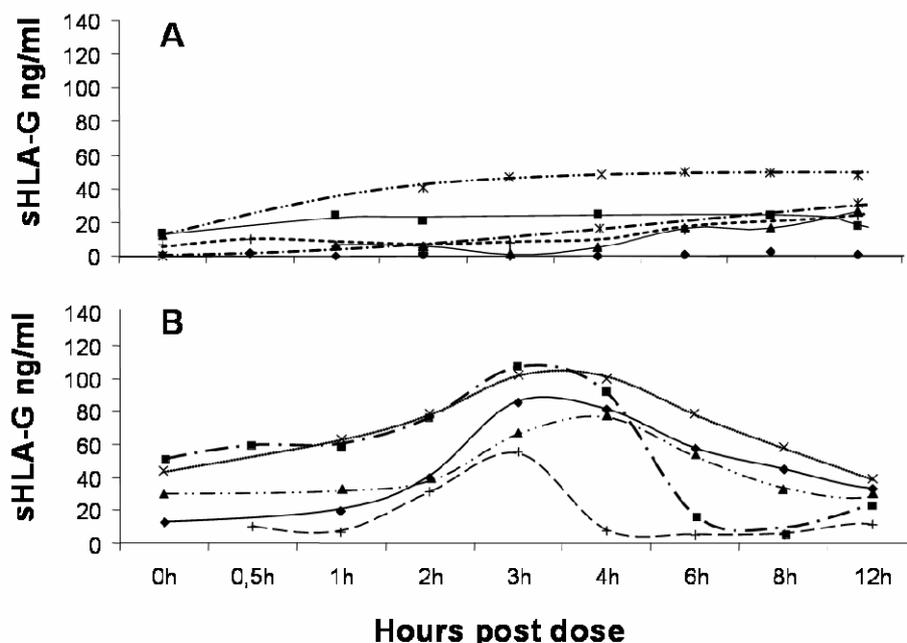
**FIGURA 5.4.** Efecto del tratamiento inmunosupresor sobre los niveles de plasma de sHLA-G. Se observó un incremento significativo de los niveles de sHLA-G a las 2 horas de administrarle la dosis diaria de inmunosupresores (C2) comparado con los niveles observados en pre-dosis (C0) ( $p \leq 0.01$ , Student's *t*-test).

En un nuevo grupo de pacientes ( $n=12$ ) se analizaron los niveles de sHLA-G durante un periodo de 12 h, desde la administración de la primera dosis diaria de inmunosupresores hasta el momento de la 2ª dosis diaria de inmunosupresores, se encontraron dos tipos de pacientes en relación a los cambios observados en los niveles de sHLA-G en respuesta al tratamiento inmunosupresor. Un primer grupo (grupo A) mostraba niveles bajos y estables (Figura. 6A) en el cual no se observaron cambios durante el periodo de doce horas tras la dosis de inmunosupresores, mientras que en el otro grupo (grupo B) presentó un incremento de los niveles de sHLA-G, el cual aumentó como mínimo el doble del nivel inicial en el intervalo de tiempo que va desde las 2h a 4h post dosis (al igual que habíamos observado anteriormente a las dos horas), para después caer a los niveles iniciales a las 10 horas post-dosis (Figura 5.6B)



**FIGURA 5.5:** Niveles de sHLA-G (HLA-G5+sHLA-G1) en diferentes días post-trasplante, en dos pacientes tipo en los tiempos Co y C2; Co, nivel de sHLA-G antes de administrarle la dosis diaria de inmunosupresores; C2, dos horas tras la administración de la dosis diaria.

Curiosamente, ninguno de los pacientes del grupo B presentó episodios de rechazo agudo recurrente, mientras que el 42.8% de los pacientes del grupo A (Tabla 5.3), presentó episodios de rechazo agudo recurrente durante el primer año post-trasplante, al igual que habíamos observado en el grupo de pacientes donde se estudió los niveles de sHLA-G después del trasplante y presentaron niveles altos durante el primer mes post-trasplante.



**FIGURA 5.6.** Niveles en plasma de sHLA-G cuantificados mediante ELISA después de la dosis diaria de inmunosupresores. Cada paciente está representado por una línea. Dos grupos de pacientes se pueden distinguir en relación a sus niveles de sHLA-G; Grupo A, en donde no se observan cambios (Figura. 5.6 A) y grupo B, en el cual se observa un incremento de sHLA-G (Figura. 5.6B).

Debido a que no conocemos la causa de este incremento de sHLA-G observado después de la administración de la dosis de inmunosupresores, se analizaron los niveles de CsA en sangre durante este periodo de tiempo y no se observaron diferencias significativas en la media de absorción de CsA entre los dos grupos A (AUC=5739 ng h/ml) y B (AUC=6698 ng h/ml), aunque el pico de sHLA-G observado en el grupo B de pacientes (Figura 5.6B) se solapa (en tiempo) con las máximas concentraciones en sangre de CsA. Tampoco, se encontró ninguna relación entre los niveles de sHLA-G y el ratio de aclaramiento del fármaco ni su concentración máxima (Tabla 5.3) Debido a la absorción errática del MMF no podemos obtener ninguna conclusión sobre su efecto en los niveles de sHLA-G.

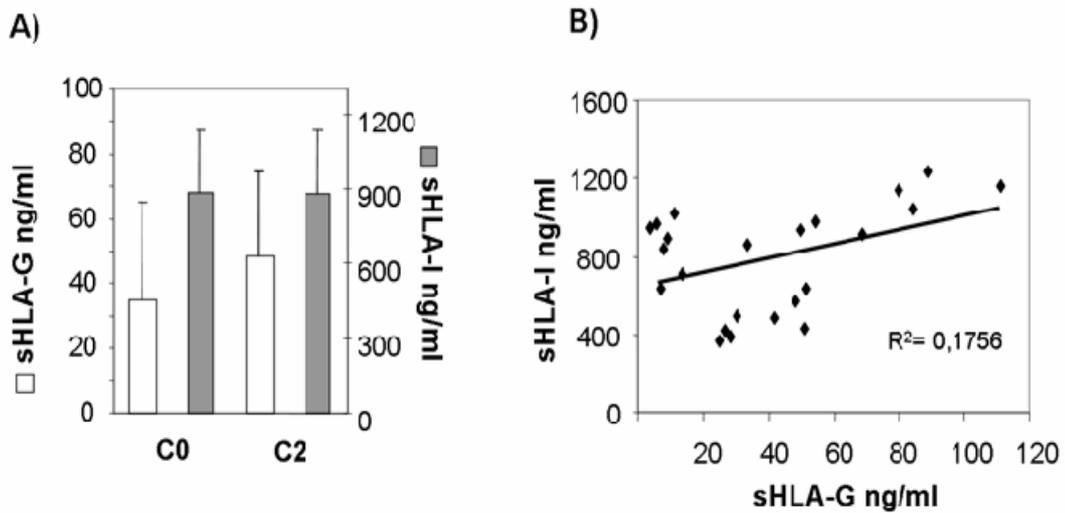
**TABLA 5.3: Perfil farmacológico, y episodios de rechazo agudo en los pacientes trasplantados de corazón estudiados durante el periodo de 12h tras la dosis diaria de inmunosupresores**

Pacientes		AUC CsA	Ratio aclaramiento	Cmax CsA	sHLA-G (ng/ml)	Rechazo Agudo
Grupo						
A	T1	6325,2	24,035	1115	3.5	severo
	T2	4778,3	31,392	1326	20.7	rec sev <sup>+</sup>
	T3	7051,6	24,817	1188	68.9	no
	T4	5078,81	29,535	1128	8.6	rec sev <sup>+</sup>
	T5	4375,86	42,773	995	100.1	no
	T9	5764,22	30,307	1115	12.3	no
	T10	6801,6	18,378	1485	3.5	rec sev <sup>+</sup>
media±SD		5739±1033	28.78±7.6	1193±162	31.1±38	
Grupo						
B	T6 (FK506)*	83,42	35,960	13.1	80.3	no
	T7	2492,71	30,088	1203	59.6	no
	T8	7044,8	35,487	1077	39.74	no
	T11	--	--	--	52.3	no
	T12	10557,41	21.310	1841	142.4	severo
Media±SD		6698±4011**	28.9±7.1**	1373±409**	74.8±40.56	

Pacientes no respondedores (grupo A) y respondedores (grupo B) incrementando los niveles de sHLA-G después de la dosis de terapia inmunosupresora. AUC, ng<sub>h</sub>/ml. Ratio de aclaramiento, L/h. Cmax, pico máximo de concentración de CsA (ng/ml) y FK506 (µg/ml). Niveles de sHLA-G un día antes del trasplante. <sup>+</sup> Rechazo agudo severo (3A) recurrente. \* FK506 como inhibidor de la calcineurina, sin CsA. \*\* Media sin tener en cuenta el valor del paciente T6

### 5.2.2 Comparación entre los niveles sHLA-I totales y sHLA-G tras la dosis diaria de inmunosupresores en el primer mes post-trasplante.

En paralelo se analizaron los niveles de HLA-I soluble total en estos pacientes y se observó que los niveles de HLA-I soluble total no cambiaron a las dos horas de la administración diaria de los fármacos inmunosupresores (Figura 5.7A). Tampoco se encontró correlación entre los niveles obtenidos de sHLA-I y sHLA-G cuando fueron comparados (Figure 5.7B).

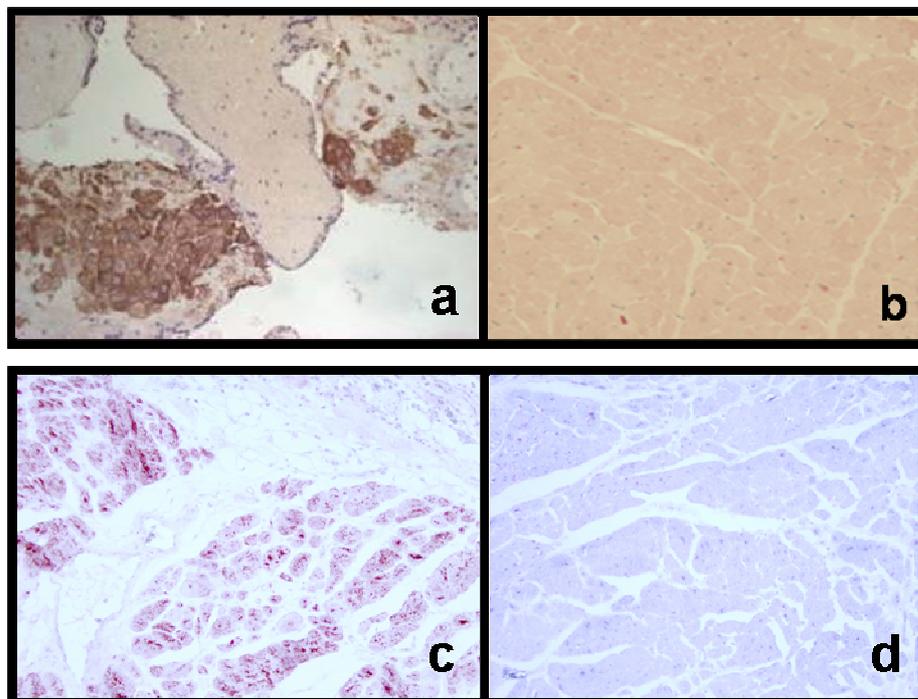


**FIGURA 5.7** (A) Niveles de HLA-I soluble total y sHLA-G cuantificados en plasma de pacientes trasplantados de corazón a las 2 horas después de las dosis de inmunosupresores (C2) y los valores predosis (C0). (B) Correlación entre los niveles obtenidos de sHLA-I y sHLA-G.

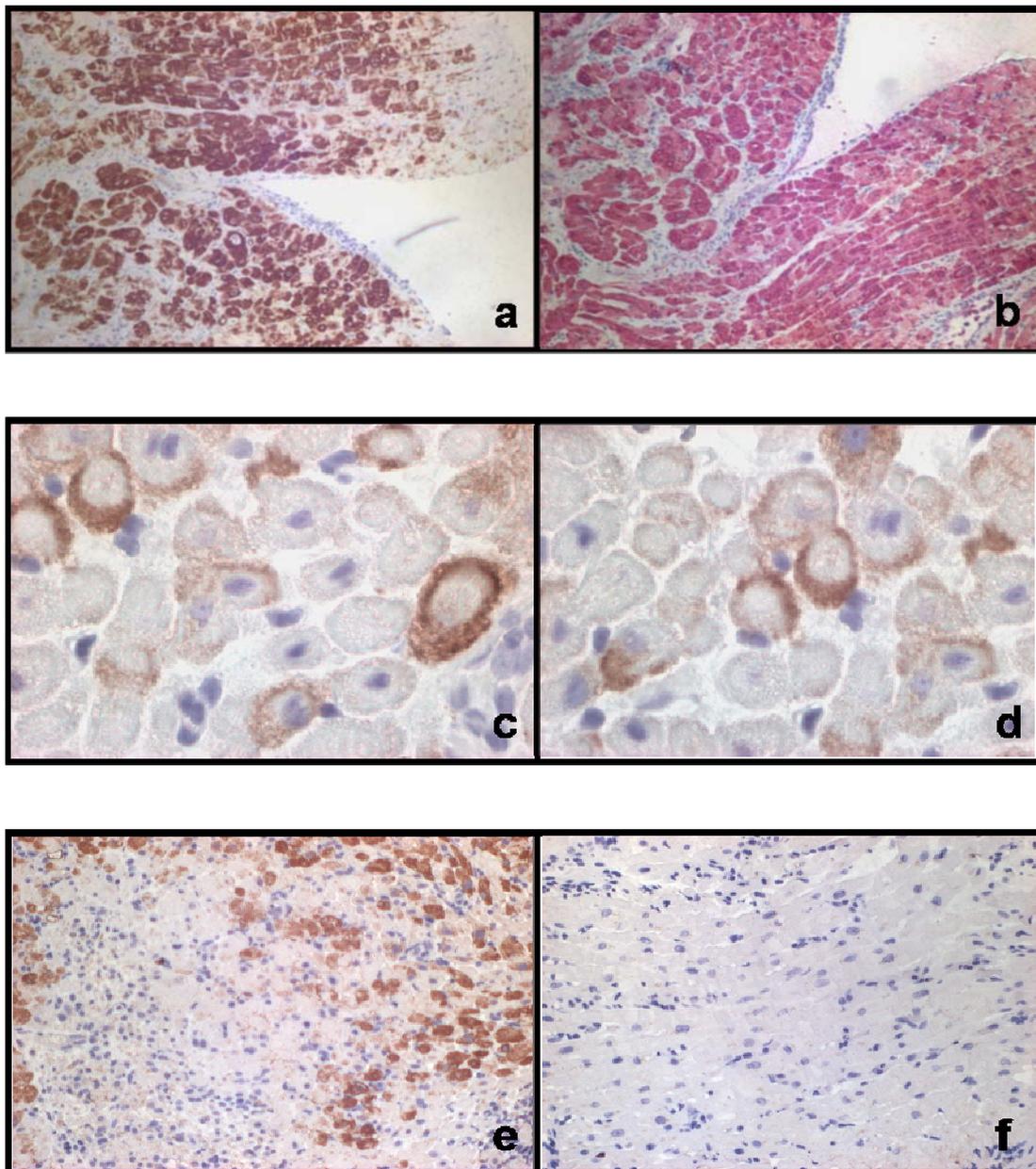
### 5.3 EXPRESIÓN DE HLA-G EN BIOPSIAS DE MIOCARDIO DE CORAZONES TRASPLANTADOS DE CORAZÓN

#### 5.3.1 Expresión y distribución de HLA-G en miocardio de corazón trasplantado

Mediante las técnicas de inmunohistoquímica empleadas, encontramos una fuerte expresión de HLA-G en el tejido cardíaco correspondiente al trasplante en comparación con el control perteneciente a individuos no trasplantados, sin ninguna patología cardíaca diagnosticada, los cuales no presentaron expresión alguna de las isoformas de HLA-G. Esta expresión fue validada mediante el uso de los anticuerpos monoclonales MEM-G/01 y 4H84 (Figura 5.8).



**FIGURA 5.8:** HLA-G en biopsias de miocardio. a) Control positivo de la técnica, biopsia de trofoblasto materno-fetal, expresión de HLA-G marcada con cromógeno DAB (di-aminobenzidina); b) Biopsia de miocardio de corazón no trasplantado, ausencia de expresión de HLA-G; c) Biopsia de corazón trasplantado, expresión de HLA-G marcada con cromógeno DAB; d) Control de isotipo de la reacción con anticuerpo monoclonal.



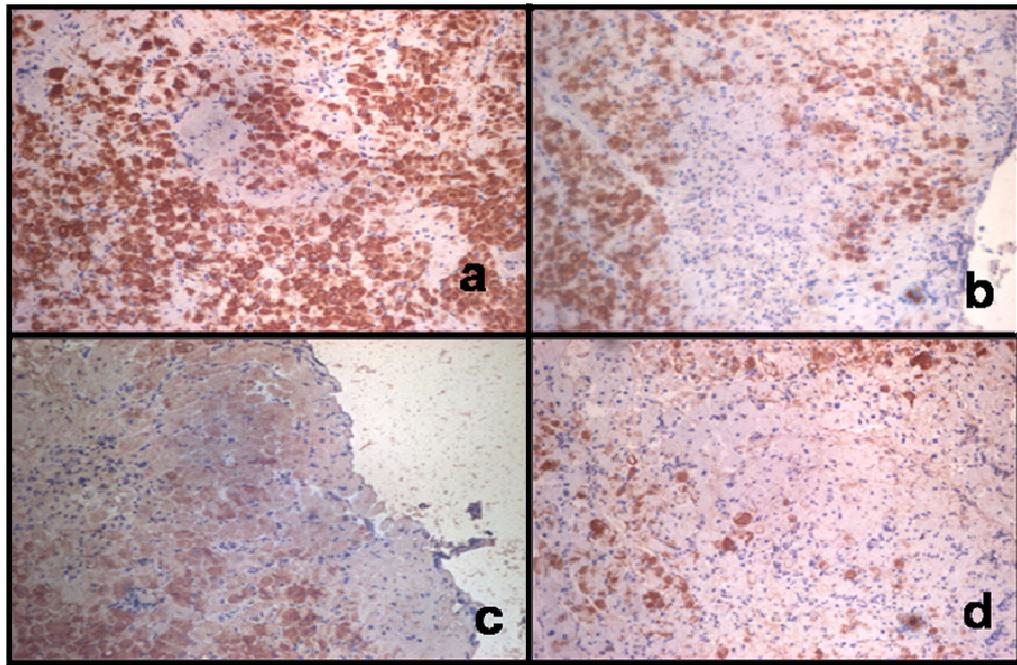
**FIGURA 5.9:** Estudio por inmunohistoquímica de la distribución de HLA-G e isoformas detectadas en biopsias de miocardio de pacientes trasplantados de corazón; a) marcaje con anti-HLA-G; b) marcaje con anti-miosina (solo presente en las células musculares); c y d) expresión de HLA-G en miocardiocitos y ausencia de expresión de HLA-G en células infiltradas; e) marcaje con MEM-G/01 anticuerpo que reconoce todas las isoformas de HLA-G y f) marcaje con el anticuerpo 5A6G7 que reconoce solo las isoformas solubles HLA-G5 y HLA-G6.

Se ha identificado el tipo celular que está expresando HLA-G en el miocardio, encontrando inmuno-reactividad sólo en las células musculares cardiacas (miocardiocitos) (Figuras 5.9a y 5.9b), que son las que van a expresar HLA-G, y no encontramos expresión de HLA-G en las células infiltradas a nivel del miocardio (Figura 5.9c y 5.9d). La expresión de HLA-G por parte de los miocardiocitos corresponde a las formas unidas a membrana, puesto que no encontramos inmuno-reactividad para las isoformas solubles de HLA-G con el anticuerpo 5A6G7 (reconoce HLA-G5 y G6) (Figura 5.9f), mientras que la misma biopsia si resultó positiva para MEM-G/01 que reconoce todas las formas desnaturalizadas de HLA-G (Figura 5.9e).

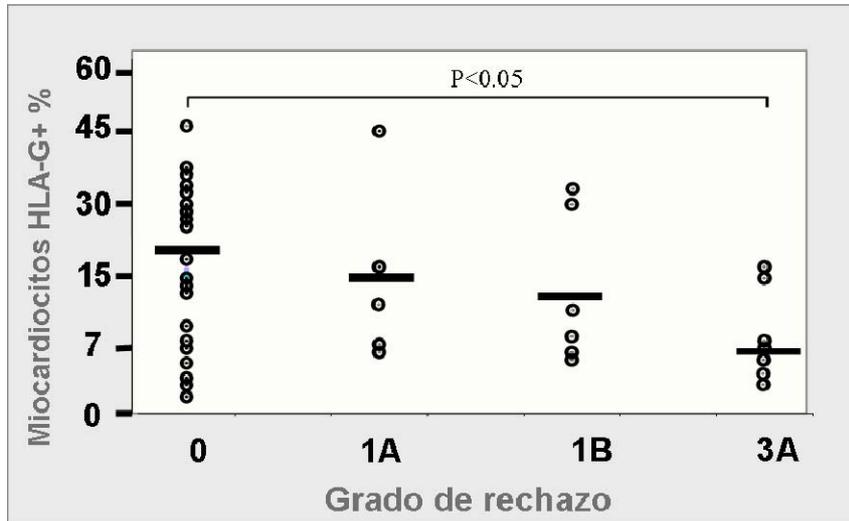
### **5.3.2 Expresión de HLA-G de membrana y relación con los episodios de rechazo agudo**

Se realizó un seguimiento de los pacientes durante un año desde el momento del trasplante, en el cual se suceden una serie de etapas en las que puede o no aparecer diferentes grados de rechazo al trasplante. Así, analizando las biopsias mediante técnicas de inmunohistoquímica, hemos observado que existe una correlación entre grado de inmuno-reactividad para HLA-G (que se traduce en una mayor expresión de ésta molécula) y el grado de rechazo al trasplante. En aquellas biopsias que no presentaban signos de rechazo agudo (grado 0) observamos que tenían un mayor número de miocardiocitos que estaban expresando HLA-G y una mayor intensidad en la reacción inmunohistoquímica, mientras que aquellas biopsias analizadas con alto grado de rechazo, grado 3A, presentaban una débil inmuno-reactividad y menor número de células musculares expresando HLA-G (figura 5.10). En nuestros resultados hemos encontrado una relación inversa entre grado de rechazo al trasplante y los niveles de expresión de HLA-G en el miocardio. El grado de rechazo que presenta el paciente ha sido catalogado como grado 0 (no rechazo)

1A, 1B, 3A y 3B y los niveles de expresión de HLA-G en las biopsias de miocardio, mediante la presencia de inmuno-reacción en el tejido (Figura 5.11).



**FIGURA 5.10:** Expresión de HLA-G en miocardiocitos mediante inmunohistoquímica y rechazo agudo; a) Biopsia sin evidencia de rechazo; b) Biopsia con evidencia de rechazo 1A; c) Biopsia con evidencia de rechazo grado 1B; d) Biopsia con evidencia de rechazo severo 3A.

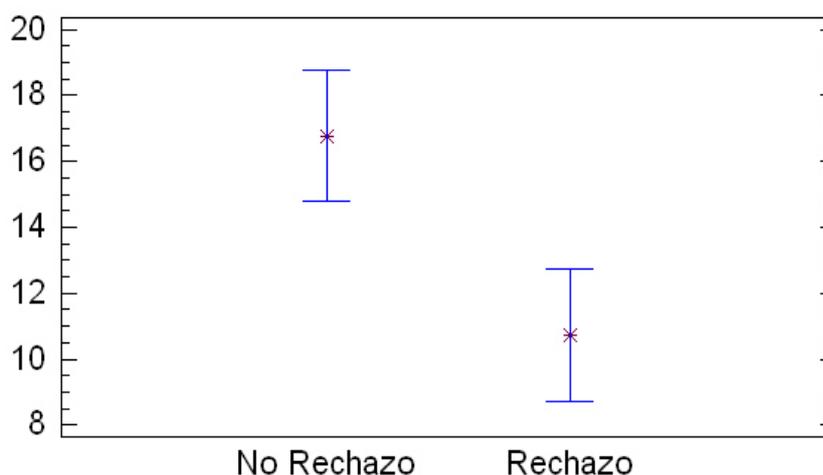


**FIGURA 5.11:** Porcentaje de Miocardiocitos que expresan HLA-G de membrana y grado de rechazo que presentó la biopsia estudiada. Cada punto representa una

biopsia y la línea representa la media del grupo. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las biopsias con rechazo 3A y las que no evidenciaron rechazo.

Para establecer mejor esta correlación cuantificamos el grado o intensidad de marcaje en la biopsia de miocardio mediante el programa de análisis de imagen WCIF ImageJ. Se estableció el porcentaje de área que ocupa dicho marcaje en el miocardio así como el grado de intensidad de marcaje. Para ello se seleccionaron 4 biopsias que correspondían a las 4 primeras semanas después del trasplante de 10 pacientes con ausencia de rechazo en los 6 meses posteriores al trasplante y 10 pacientes que presentaron episodios de rechazo agudo 3A en el mismo periodo de tiempo (figura 5.12). Tal como aparece en la tabla, la mayor intensidad de marcaje así como la mayor extensión corresponde a pacientes que no tenían rechazo.

### % Expresión HLA-G en biopsia



**FIGURA 5.12:** Expresión de HLA-G en biopsias de miocardio en pacientes libres de episodios de rechazo agudo (no rechazo) y pacientes que presentaron uno o varios episodios de rechazo agudo 3A (rechazo) durante el primer año post-trasplante. ( $P=0.04$  Kruskal-Wallis Test).

## 5.4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 14-pb del GEN HLA-G

Dada la gran variabilidad individual observada en los niveles plasmáticos de sHLA-G en el pre-trasplante y después del trasplante durante el primer mes, analizamos si existía alguna relación entre dichos niveles plasmáticos de HLA-G y el polimorfismo de inserción/delección de 14-pb del gen HLA-G.

### 5.4.1 Polimorfismo 14-pb del gen HLA-G y niveles de sHLA-G

El polimorfismo en el gen HLA-G puede influenciar los niveles de expresión de proteína. Las variaciones alélicas del gen HLA-G (Figura 5.13) están caracterizadas por un polimorfismo localizado en la región 3'UTR del exón 8 y consistente en inserción /delección de 14 –pb, dando lugar a los siguientes genotipos: +14/+14-pb, +14/-14-pb y -14/-14-pb. Aunque el polimorfismo alélico en HLA-G es bajo en comparación con los genes HLA tipo I clásicos, éste condiciona que existan diferencias en el nivel de expresión de HLA-G y en el perfil de las distintas isoformas en condiciones patológicas y en condiciones normales.

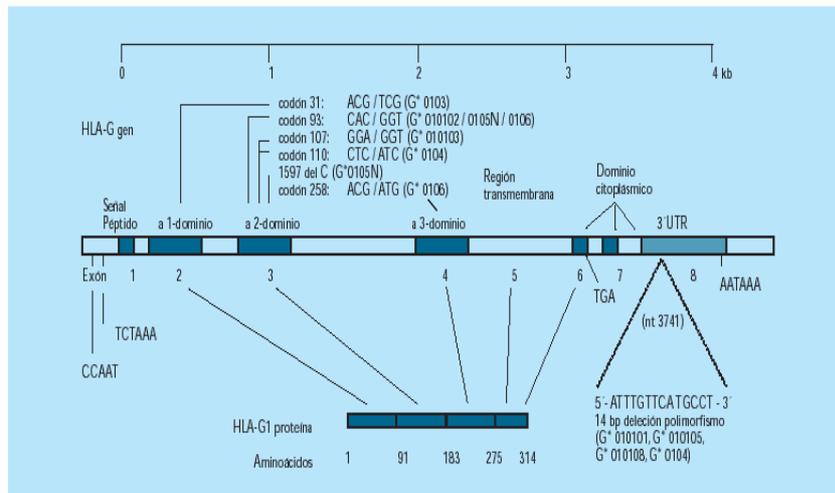
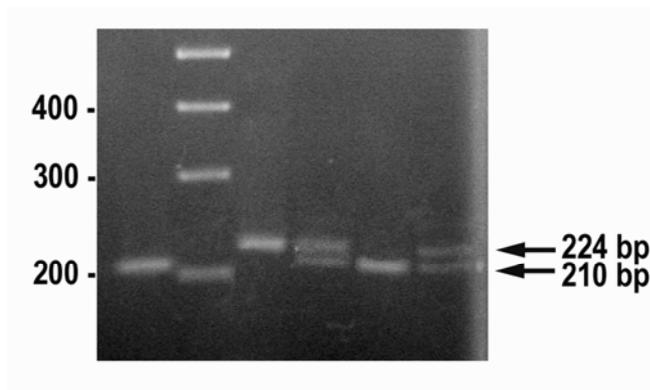


FIGURA 5.13. Gen HLA-G, adaptada de Hviid et al (102).

Numerosos investigadores (103) piensan que puede existir una asociación entre el polimorfismo de HLA-G (basado en la inserción/delección de 14 pares de bases en el exón 8) y alteraciones en la expresión de las diferentes isoformas de HLA-G, así como en presentar diferentes niveles de expresión de HLA-G en la placenta (104). Parece ser, que esta región (14-pb) puede estar implicada en los mecanismos que controlan la regulación post-transcripcional de HLA-G asociado con las variaciones alélicas.

Para confirmar esta hipótesis llevamos a cabo el estudio del polimorfismo de inserción/delección de 14 pb en el exón 8 del gen HLA-G en trasplante cardiaco, en las etapas previas a la realización del trasplante (periodo de pre-trasplante) y en la etapa posterior al trasplante durante el primer mes (periodo post-trasplante), en donde tienen un papel fundamental la inmunosupresión.

Para ellos obtuvimos el ADN y realizamos el genotipo de ADN por secuenciación directa mediante PCR y se analizaron las frecuencias genotípicas. Los pacientes fueron clasificados según si poseían o no la inserción/ delección de esas 14-pb en el exón 8; y en el caso de poseerlas, si eran homocigotos o heterocigotos para dicha inserción/delección, dando lugar a los siguientes genotipos: -14/-14-pb, +14/-14-pb y +14/+14-pb (Figura 5.13).



**FIGURA 5.13.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos del exón 8 del gen *HLA-G* amplificados por PCR. El alelo -14 da lugar a un fragmento de 210 pb, mientras que el alelo +14 da lugar a un fragmento de 224 pb.

Inicialmente analizamos si las frecuencias alélicas para el polimorfismo de 14 pb que presentaban nuestros pacientes trasplantados eran representativas de la población en general, es decir, si estaban en equilibrio de Hardy-Weiber. Encontramos que nuestra población de pacientes trasplantados está en equilibrio ( $\chi^2=1,38$ ). En la tabla 5.4, encontramos las frecuencias alélicas y genotípicas que presentaban. Destacamos que el alelo -14 presentaba un carácter dominante en nuestra población de pacientes trasplantados. La baja frecuencia del genotipo +14/+14-pb (3%) hizo que no se pudiera incluir para los estudios estadísticos.

**Tabla 5.4. Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo HLA-G 14-pb**

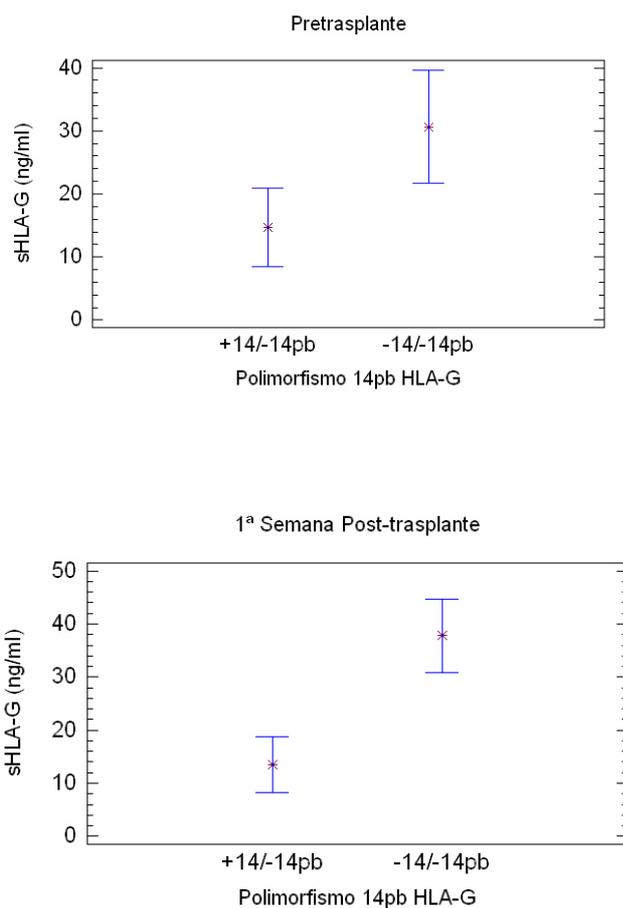
<i>HLA-G 14-pb alelos</i>	<i>Frecuencias</i>	<i>Frecuencias</i>
	<i>Trasplantados</i>	<i>Individuos Sanos</i>
-14	36 (67%)	32 (64%)
+14	18 (33%)	18 (36%)

<i>HLA-G 14-pb genotipo</i>	<i>Frecuencias</i>	<i>Frecuencias</i>
	-14 pb /-14 pb	19 (51%)
-14 pb /+14 pb	17 (46%)	13 (42%)
+14 pb/+14 pb	1 (3 %)	2 (8%)

Las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg ( $\chi^2=1,38$  para los trasplantados de corazón y  $\chi^2= 1,16$  para los individuos sanos )

En este estudio, hemos observado que existe una relación entre los niveles de expresión de formas solubles de HLA-G en plasma de estos pacientes y el genotipo para 14-pb (+14/+14-pb; +14/-14-pb y -14/-14-pb). Encontramos que los pacientes con genotipo homocigoto negativo (-14/-14-pb) presentaban los niveles más elevados de sHLA-G tanto en el periodo de pre-trasplante ( $30,6 \pm 8,9$  vs.  $14,7 \pm 6,2$ ;  $p=0,008$ ) (figura 5.14) como durante el primer mes tras la implantación del injerto cardíaco en comparación con los individuos heterocigotos para la inserción/delección de 14-pb (+14/-14-pb), que presentaban niveles de expresión de sHLA-G más bajos ( $37,8 \pm 6,9$  vs.  $13,50 \pm 5,3$ ;  $p=0.0006$ ) (figura 5.14). En ambos casos tal como se puede comprobar en las figuras esas diferencias alcanzaron significación estadística.



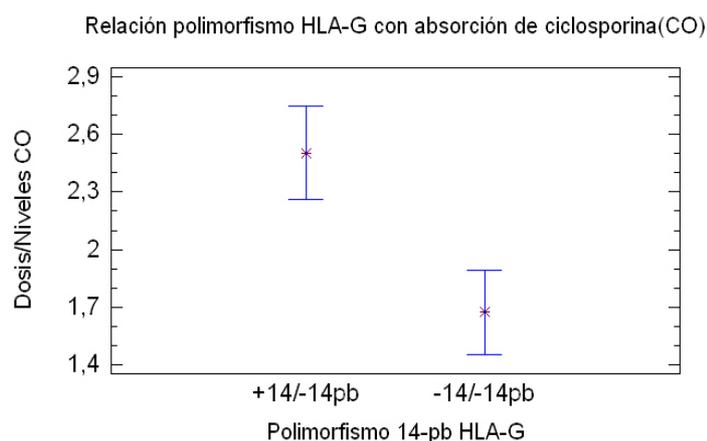
**FIGURA 5.14.** Polimorfismo 14 pb del gen de HLA-G y niveles en plasma de sHLA-G1+HLA-G5 en el periodo pre-trasplante (panel superior) y 1ª semana tras el trasplante (panel inferior).

### 5.3.2 Polimorfismo 14-pb del gen HLA-G y niveles de ciclosporina

Además de la variabilidad que presentaban los pacientes en cuanto a niveles de expresión de sHLA-G, los pacientes reflejaban una variabilidad farmacocinética de absorción de CsA. Utilizando el nivel C2 para caracterizar la situación de la absorción de la CsA. En nuestro caso, como también han descrito otros autores, podíamos distinguir entre “buenos” y “malos” absorbedores de CsA entre los pacientes

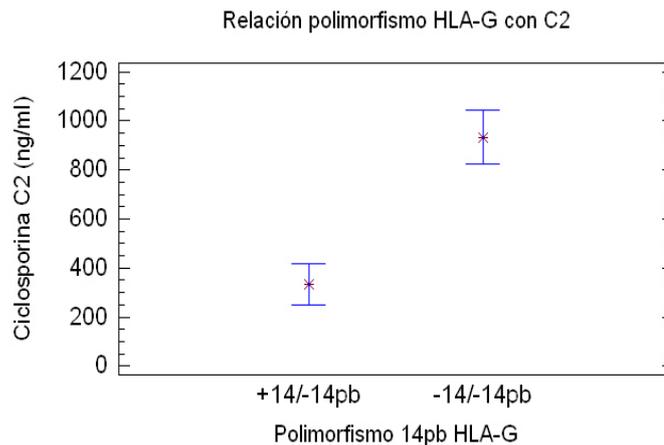
trasplantados de corazón. Los pacientes trasplantados mostraban un coeficiente de variación (CV) interindividual elevado de la dosis ajustados en función de los perfiles de absorción, lo que indicaría que la variabilidad de la absorción es el resultado de factores circunstanciales y de determinantes genéticos. Por ello, determinaremos la posible influencia que el polimorfismo del gen HLA-G puede ejercer sobre la eficacia de absorción de la CsA, proporcionándonos información adicional acerca de la absorción de este inmunosupresor, con posibles importantes aplicaciones clínicas para inducir tasas más bajas de rechazo en el trasplante en relación con el grado de absorción y tolerancia a la CsA.

En nuestro estudio observamos que aquellos pacientes trasplantados que presentaban el genotipo -14/-14pb eran considerados dentro del grupo de “buenos absorbedores” de la ciclosporina, mientras que el genotipo +14/-14-pb presentaban la característica de ser “medios o malos absorbedores” del inmunosupresor (1,7+0,21 vs. 2,5+0,24;  $p=0,01$ ) (Figura 5.15).



**FIGURA 5.15.** Absorción de ciclosporina en C0 y relación con el polimorfismo 14 pb de HLA-G. Un “buen absorbedor” presentaría un coeficiente dosis/nivel CsA bajo (<2), mientras que un “mal absorbedor” presenta un coeficiente dosis/nivel CsA más elevado (>2).

El análisis de los niveles de CsA a las dos horas después de la dosis (C2) se ha mostrado eficaz para una inmunosupresión adecuada basada en los ensayos clínicos en adultos receptores de trasplante cardíaco, con una mejor profilaxis de rechazo agudo y una mejor correlación con la exposición total al fármaco. Asimismo, los niveles medidos a una y a dos horas (niveles C2) proporcionan información acerca de la absorción de CSA.



**FIGURA 5.16** Concentración máxima de Ciclosporina en sangre en C2 y polimorfismo HLA-G.

Cuando analizamos si el polimorfismo de 14-pb de HLA-G influye sobre los niveles de C2, encontramos que los pacientes con genotipo -14/-14-pb presentaban los niveles significativamente más altos de absorción en relación a los pacientes heterocigotos para dicho polimorfismo del gen HLA-G ( $934,2 \pm 108,7$  vs.  $334,2 \pm 83,7$ ;  $p=0,0001$ ) (Figura.5.16).





## DISCUSIÓN

---

## VI DISCUSIÓN

---

El éxito del trasplante de corazón se atribuye al importante adelanto en el campo de la inmunología de la inmunosupresión, al reconocimiento y la clasificación patológica del rechazo de aloinjertos, así como a la mejora en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, con nuevos antimicrobianos.

Hay un renovado interés en la mejora de la vigilancia de drogas terapéuticas y en el manejo de receptores de trasplante de órganos sólidos para prevenir el rechazo del injerto. Uno de los principales objetivos de la investigación en el trasplante, por lo tanto, es la inducción de donantes específicos de la tolerancia, que permitiría una reducción a largo plazo, de la inmunosupresión inespecífica. Además aspectos clínicos y básicos de la inmunosupresión y la tolerancia tienen que ser abordados en paralelo para obtener conclusiones significativas. Este trabajo se centra en aspectos de la tolerancia en el trasplante inducido por HLA-G y su relación con los inmunosupresores.

En los últimos años se han descrito múltiples funciones para HLA-G en contextos muy diferentes, y todas apuntan hacia una acción mayoritariamente inhibidora (105). Por otra parte los tejidos que constitutivamente expresan HLA-G pueden ser todos considerados inmunoprivilegiados, como es el caso de la interfase materno-fetal, timo y cornea (106). Además, el hecho de que, HLA-G inhibe la respuesta alogénica de manera significativa, la presencia de HLA-G tanto en suero como en biopsias de órganos trasplantados está relacionada con una mejor aceptación del injerto (106), son unas premisas que animan a profundizar en el conocimiento de la expresión de esta molécula de histocompatibilidad y su papel en el trasplante de corazón. Por estas razones, se propuso cuantificar los niveles de esta molécula en plasma y biopsias de individuos trasplantados de corazón, donde los episodios de rechazo agudo son relativamente frecuentes.

En relación a la expresión de isoformas de HLA-G expresadas en biopsias de miocardio, se ha observado que el músculo cardíaco expresa HLA-G de membrana,

pero no las isoformas solubles HLA-G5 o HLA-G6, y que esta expresión es significativamente mayor en pacientes libres de episodios de rechazo agudo en comparación con pacientes que presentaron varios episodios de rechazo agudo durante el primer año post-trasplante. Estos resultados están en consonancia con trabajos anteriores que apuntan a una mayor aceptación del injerto en pacientes que expresan HLA-G en las células musculares cardíacas (68;69), así como en otros tipos de trasplantes, como el de hígado y el doble trasplante hígado-riñón (86;87). En el caso del trasplante de hígado Creput *et al* ha descrito que las células que expresan HLA-G son las células epiteliales biliales (BEC) y curiosamente células infiltradas, en concreto macrófagos (87). Esto sugiere que en el trasplante cardíaco el HLA-G de membrana parece tener una función de protección *in situ*, tal y como defiende Carosella *et al* al hablar de HLA-G e inflamación (107). La expresión de HLA-G por miocardiocitos podría permitir que las células T aloreactivas del receptor no reconociesen ni destruyesen estas células del injerto, siendo estas las primeras en ser atacadas en caso de rechazo al igual que ocurre en el hígado con las células epiteliales biliales. Además, esta protección sería estable ya que se detectó la expresión de HLA-G en miocardio hasta varios años después del trasplante, lo cual podría indicar que esta expresión puede ser activada durante los primeros días post-trasplante y mantenida por factores externos como la inmunosupresión durante varios años después del trasplante. Una posible explicación para la expresión de HLA-G de membrana en los primeros días post-trasplante podría estar en el periodo de stress post-operatorio así como en el tiempo de isquemia. Estos factores podrían estar afectando la transcripción de HLA-G y ser los responsables de dicha expresión, en este sentido Gazit E. *et al* (108) han publicado recientemente que cultivos en condiciones de estrés inducen expresión de HLA-G de membrana. Este mecanismo descrito podría imitar el proceso biológico que ocurre durante la implantación del injerto dentro del receptor. En cualquier caso, aunque esto es una posibilidad, no parece ser la causa de este incremento ya que no encontramos ninguna correlación entre el tiempo de isquemia y los valores HLA-G post-trasplante.

En relación a los niveles de sHLA-G en plasma de estos pacientes observamos que alrededor de la mitad mostraron un incremento significativo en los

niveles de sHLA-G durante el primer mes post-trasplante que descendía con el tiempo hasta niveles bajos (10-20 ng/ml). Cuando comparamos los niveles de sHLA-G después del trasplante con la intensidad de los episodios de rechazo agudo padecidos por estos pacientes, es interesante resaltar que el 41% de los pacientes con bajos niveles de sHLA-G presentaron episodios de rechazo agudo severo recurrente, mientras que los pacientes que poseían altos niveles de sHLA-G en plasma menos del 5% presentó episodios de rechazo agudo severo recurrente. Estos resultados demuestran una relación inversa entre los niveles de sHLA-G y los episodios de rechazo agudo severo recurrente y sugieren que altos niveles de sHLA-G en plasma durante los primeros días post-trasplante (>50 ng/ml) predisponen a los individuos trasplantados de corazón a una mejor aceptación del injerto. Estos resultados confirman y complementan los resultados obtenidos por Lila *et al* (4) en los cuales relaciona la presencia de HLA-G5 y HLA-G6 en suero de pacientes trasplantados de corazón y menor incidencia de rechazo agudo y crónico. En los estudios del grupo de Lila y colaboradores la presencia de HLA-G en suero es menor que en nuestros experimentos ya que el describe que solo un 18% de los pacientes presenta HLA-G5 o HLA-G6 mientras que nuestro grupo encuentra alta expresión de HLA-G en el 50 % lo cual podría explicarse ya que Lila utiliza el anticuerpo policlonal PAG5-6 que específicamente reconoce HLA-G5 y HLA-G6 pero no sHLA-G1. Nuestro grupo utilizó el anticuerpo monoclonal MEM-G/09 (validado en el workshop de Essen, Alemania 2004 (109)) el cual reconoce las isoformas HLA-G5 y sHLA-G1 pero no HLA-G6. Otra causa puede ser los diferentes tiempos de estudio utilizados ya que Lila estudia la expresión de sHLA-G en periodos más tardíos después del trasplante. Y por último, que en nuestro estudio se cuantificó sHLA-G en plasma mientras que Lila *et al* lo realizaron en suero. Recientemente se ha descrito que hay diferencias a la hora de cuantificar sHLA-G en suero y plasma (110).

Al igual que ocurre con HLA-G de membrana una posible explicación para los altos niveles encontrados de sHLA-G encontrados en plasma podría ser el stress post-operatorio así como el tiempo de isquemia, los cuales podrían estar afectando la transcripción de las isoformas solubles de HLA-G. Pero tampoco encontramos

ninguna correlación entre el tiempo de isquemia y los valores de sHLA-G durante los primeros días post-trasplante. El incremento de los niveles en plasma de sHLA-G observado en las primeras semanas tras el trasplante parece estar relacionado con la terapia inmunosupresora que reciben estos pacientes, la cual es administrada de manera muy intensa durante los primeros días post-trasplante. El hecho de que gran número de pacientes aumenten los niveles de sHLA-G de 2 a 5 horas tras la dosis diaria de inmunosupresores indica que la terapia ayudaría a prolongar una aceptación del injerto cardíaco mediante tolerancia del hospedador mediada por las funciones de sHLA-G. Basándonos en los experimentos de Lila *et al* (82) donde se describen a las células CD4 aloreactivas como secretoras de sHLA-G, sería razonable especular que el incremento observado en los niveles de sHLA-G pudiera ser debido a las células T CD4 aloreactivas.

En cualquier caso, dos horas después de la administración diaria de inmunosupresores parece ser demasiado temprano para inducir un incremento en la expresión de sHLA-G, lo cual sugiere que este proceso es más un mecanismo de liberación de esta molécula al exterior celular que un aumento de expresión de dicha molécula. sHLA-G se cuantificó hasta 12h después de la administración en 9 puntos de tiempo diferentes. El hecho de que observemos un aumento significativo en muchos pacientes a las horas es bastante relevante ya que es conocido que las dos horas tras la administración diaria de inmunosupresores (C2) es el tiempo donde mejor se predice los efectos biológicos de la CsA (12). Además es importante resaltar que durante el intervalo 2 a 5h post dosis inmunosupresora es tiempo suficiente para inducir:

- i) Una reducción significativa de la producción de IL-2 después de la administración de la dosis de CsA/MMF en pacientes trasplantados de riñón (111). En esta publicación, el mayor efecto inhibitorio en la actividad de la calcineurina se observó a las 2 horas de la iniciación del tratamiento.
- ii) Un efecto inhibitorio máximo del PCNA (*Proliferating nuclear cell antigen*) y de la expresión de CD25, se observó a las 2 horas de

---

iniciar el tratamiento con ácido micofenólico (MMF) en combinación con CsA o Tacrolimus, en linfocitos de sangre total en ensayo in vitro (112).

El hecho de encontrar cambios en los niveles en plasma de sHLA-G pero no en sHLA-I total es importante, ya que confirma la especificidad de nuestro anticuerpo anti-HLA-G utilizado e indica que este aumento de sHLA-G después del tratamiento es específico para sHLA-G y no es debido a una liberación masiva de moléculas HLA solubles como consecuencia de muerte celular o liberación inespecífica, sino como consecuencia de la gran cantidad de drogas inmunosupresoras que les son administradas a los pacientes durante los primeros días. En este sentido Rhynes *et al* mostró que los niveles de sHLA-I total no cambian durante las dos primeras semanas después del trasplante (113).

Nuestros datos sugieren que los inmunosupresores pueden estar directamente relacionados con el aumento de sHLA-G observado, pero en el caso de la CsA no se observaron diferencias en la absorción media de CsA ni la Cmax, ni tampoco en el ratio de aclaramiento, entre pacientes que presentaron picos de sHLA-G y pacientes que presentaron un perfil bajo de sHLA-G a las 2 horas de la administración diaria de la triple terapia inmunosupresora. Aunque si que se solapan en tiempo las máximas concentraciones de CsA y tacrolimus con los mayores niveles de sHLA-G, con lo que no se pudo descartar que una predisposición individual hacia los inhibidores de la calcineurina este relacionada con este aumento. En cuanto al MMF, debido a su errático perfil de absorción, no podemos obtener datos concluyentes sobre los efectos de este fármaco sobre los niveles en plasma de sHLA-G. Hasta la fecha no hay datos que describan un efecto de los inhibidores de la calcineurina (CsA o FK506) o MMF sobre los niveles de sHLA-G. En tercer lugar encontramos los glucocorticoides que constituyen el tercer componente de la triple terapia inmunosupresora, respecto a ellos se ha descrito que los glucocorticoides son capaces de aumentar el nivel de transcritos de HLA-G en las células de trofoblasto materno (114), por lo que podrían estar provocando el aumento de sHLA-G observado en plasma.

Otro dato importante observado es que los pacientes que presentaron niveles de sHLA-G más altos antes del trasplante también mostraron niveles altos después del trasplante, periodo en el cual se ha establecido la terapia inmunosupresora de mantenimiento, como se puede observar en el grupo de pacientes al cual se le hizo un estudio de seguimiento durante el año post-trasplante. Curiosamente estos pacientes con niveles más altos en el pre-trasplante no sufrieron episodios de rechazo agudo severo recurrente, incluso cuando los niveles terapéuticos de inhibidores de calcineurina (CsA/FK506) no fueron alcanzados en los primeros días tras el trasplante. Lo que sugiere que estos pacientes podrían ser tratados con una menor dosis de inhibidores de la calcineurina, lo cual ahorraría gran parte de los efectos secundarios derivados de estos. Y con estudios más extensos que los aquí propuestos podría establecerse este valor pre-trasplante como indicativo de una predisposición a tolerar el injerto en mayor medida que estos que presentaron niveles bajos.

El polimorfismo de genes puede ser importante para explicar la variabilidad interindividual de expresión de sHLA-G que existe en los resultados en el trasplante de corazón. Numerosos estudios han demostrado la importancia de la molécula HLA-G en el trasplante de órganos sólidos, en donde un incremento en la expresión de moléculas HLA-G se correlaciona con un menor riesgo de rechazo. Diferentes estudios han demostrado que el nivel, o incluso la presencia de HLA-G en el plasma se asocia con polimorfismo de HLA-G (9;10). Las variaciones alélicas del gen HLA-G están caracterizadas por un polimorfismo localizado en la región 3'UTR del exón 8 y consistente en inserción /delección de 14 pb, dando lugar a los siguientes genotipos: +14/+14pb, +14/-14pb y -14/-14pb. Aunque el polimorfismo alélico en HLA-G es bajo en comparación con los genes HLA tipo I clásicos, éste condiciona que existan diferencias en el nivel de expresión de HLA-G y en el perfil de las distintas isoformas en condiciones patológicas y en condiciones normales (115). Parece ser, que esta región (14-pb) puede estar implicada en los mecanismos que controlan la regulación post-transcripcional de HLA-G asociado con las variaciones alélicas. Nuestros resultados indican que el polimorfismo de 14 pares de bases del gen HLA-G ejerce

una importante influencia sobre los niveles de expresión de HLA-G encontrados en los pacientes trasplantados, demostrando que existen variaciones significativas a nivel individual entre los pacientes trasplantados de corazón en relación a los niveles de expresión de HLA-G y sugiriendo que el polimorfismo en la expresión de HLA-G, puede explicar las diferencias individuales en cuanto a los niveles de expresión de HLA-G que hemos señalado, determinando que el genotipo -14/-14-pb es el que induce unos niveles más altos de expresión de HLA-G y en consecuencia el que determina un menor grado de rechazo

En nuestro estudio también hemos investigado la asociación entre el polimorfismo de 14-pb del gen HLA-G con la farmacocinética de ciclosporina en pacientes trasplantados de corazón. Este polimorfismo también podría tener influencia sobre las diferencias interindividuales que existen en cuanto a la absorción y farmacocinética de la ciclosporina en los pacientes de trasplante cardiaco. Encontramos una relación entre pacientes mejor “absorbedores” de la ciclosporina y el polimorfismo de HLA-G, siendo los individuos homocigotos para el alelo negativo (-14/-14-pb) los que presentan mejores resultados de absorción.

Nuestros resultados sugieren que el análisis del polimorfismo de HLA-G en pre-trasplante podría ser útil para determinar la medición inicial de forma individualizada de la dosis oral de ciclosporina a administrar en pacientes, para minimizar el riesgo de una baja o elevada inmunosupresión en las primeras fases del trasplante de corazón y de efectos secundarios. La presencia de la delección de los 14-pb (-14/-14pb) determina un incremento en la expresión de HLA G esto conjuntamente con la mejor absorción de CsA que presentan los pacientes con este polimorfismo estaría reduciendo las posibilidades de sufrir episodios de rechazo agudo.

El papel *in vivo* que está jugando HLA-G en los pacientes trasplantados de corazón está todavía por elucidar, pero a raíz de experiencias en la presente tesis y bibliografía reciente podemos sugerir que esta reducción en el número de episodios

de rechazo agudo podría estar condicionada por la capacidad de HLA-G de inducir diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> en células supresoras (116) así como de inhibir las respuestas T alo-citotóxicas, proteger frente a la lisis por NK y capaz de modular el perfil de citoquinas (106). En este sentido, observamos que el efecto de la terapia inmunosupresora sobre los niveles séricos de HLA-G soluble, estaría potenciando la aceptación del injerto en individuos con un determinado polimorfismo HLA-G. Recientemente, Naji A *et al* (117) ha descrito que sangre periférica de pacientes trasplantados de hígado y riñón con altos niveles de sHLA-G contienen altos niveles de IL-10 concomitantes a una alta presencia de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>, con características supresoras, comparados con pacientes trasplantados negativos para sHLA-G e individuos sanos, lo cual tiene muchas implicaciones en lo que se refiere a tolerancia periférica. La identificación de estas células así como de las CD4 supresoras en los receptores de trasplante es de suma importancia, ya que puede ser una señal muy importante de diagnóstico de la tolerancia a los órganos trasplantados en general.

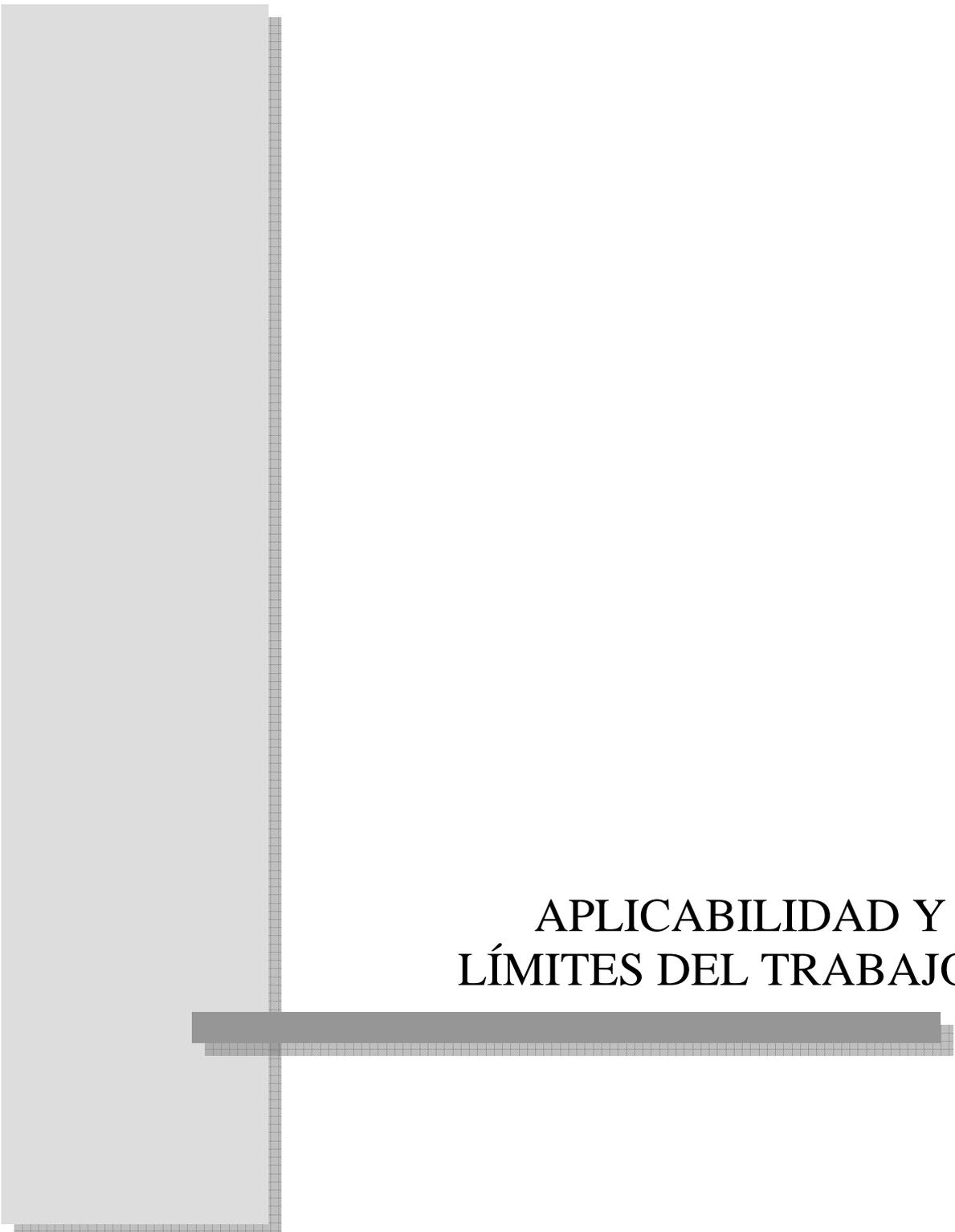
Además, todas las funciones descritas para HLA-G se basan en la capacidad de esta de ser reconocida por varios receptores inhibidores como son el KIR2DL4 expresado en células NK y algunas células T y ILT-2 e ILT-4 los cuales son expresados por monocitos, células dendríticas y células NK (105). Esta capacidad de inhibir a la mayoría de las poblaciones leucocitarias implicadas en la alorespuesta podría ser la causa de una mejor aceptación del injerto observada en los pacientes con alta expresión de HLA-G en células de miocardio y altos niveles de sHLA-G en plasma.

Por otra parte, el hecho de que hay un descenso en el número de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> de sangre periférica en pacientes trasplantados de hígado y que este descenso está asociado a la inmunosupresión podría estar indicando que el tratamiento está afectando los mecanismos tolerogénicos normales (118;119). El hecho de que la expresión de sHLA-G esté aumentada por los inmunosupresores administrados podría ser un mecanismo compensatorio, ya que suprimiría la respuesta

de células T alo-reativas e induciría tolerancia, la cual está en parte bloqueada debido al posible efecto de la terapia inmunosupresora sobre las células T reguladoras CD4+CD25+. Estudios recientes en linfomas cutáneos y colitis ulcerosa han demostrado que HLA-G se puede inducir mediante IL-10 (120;121). En los resultados obtenidos en la presente tesis, podría ser concebible que la alta expresión de HLA-G observada tanto en biopsia como en plasma en pacientes trasplantados de corazón refleje una sub.-regulación de la respuesta inmune frente al injerto cardiaco como apuntan los datos de episodios de rechazo agudo en estos pacientes, junto con la producción de IL-10.

Hasta la fecha, la monitorización del rechazo cardiaco después del trasplante se realiza por evaluación histológica de la biopsia endomiocárdica y en última estancia, por angiografía coronaria. En nuestra institución se toman una media de 20-30 muestras por paciente durante el primer año después del trasplante. La posible utilización de las isoformas solubles de HLA-G como método de monitorización tiene grandes posibilidades ya que es un método no invasivo y no expone a los pacientes a complicaciones como perforación del miocardio, arritmias y regurgitación tricúspide aguda.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que los pacientes que muestran niveles altos de expresión de HLA-G antes del trasplante y en el periodo temprano post-trasplante, tanto en las formas de membrana como las solubles HLA-G5 y sHLA-G1, tienen menos episodios de rechazo agudo severo recurrentes. Y que estos niveles de expresión parecen estar influenciados por el tratamiento inmunosupresor que reciben estos pacientes en el primer post-trasplante. Por otro lado el polimorfismo HLA-G de 14-pb parece estar influenciado los altos niveles observados en algunos pacientes siendo el genotipo -14/-14-pb el que se asocia con una mayor expresión de HLA-G y a su vez con una mejor absorción de la CsA en sangre. Aún así son necesarios estudios más amplios para determinar si HLA-G tiene un valor pronóstico real en trasplante de corazón.



**APLICABILIDAD Y  
LÍMITES DEL TRABAJO**

---

## **VII APLICABILIDAD Y LÍMITES DEL ESTUDIO**

---

### **7.1 APLICABILIDAD**

Está demostrado que la molécula de histocompatibilidad HLA-G interviene en diferentes procesos tolerogénicos y que tiene características inhibitoras muy bien definidas. A la vista de los resultados mostrados en esta tesis y en conjunción con numerosas publicaciones de otros grupos de investigación, podemos pensar que la molécula HLA-G es un candidato perfecto para su monitorización en pacientes trasplantados de corazón ya que la sobre-expresión o la ausencia de ésta parecen condicionar la aceptación del corazón trasplantado. Pudiéndose utilizar los niveles de HLA-G en plasma y en biopsia como marcador predictivo de rechazo, ya que como hemos visto en los resultados, tanto el valor pre-trasplante de HLA-G como el post-trasplante está asociado con un menor número de episodios de rechazo agudo por parte del paciente trasplantado.

Actualmente no existe ningún indicador fiable de tolerancia frente al injerto en la práctica clínica de trasplante cardíaco, el conocimiento sobre la distribución expresión y regulación de moléculas de tolerancia inmunológica, como HLA-G, abre la puerta a una reducción de las dosis de fármacos inmunosupresores. Esta posible reducción reduciría en parte los efectos no deseados de una alta inmunosupresión inespecífica como son las infecciones y el desarrollo de neoplasias. Por otro lado los resultados indican que existe una relación importante del polimorfismo de 14pb del exón 8 de HLA-G con los niveles plasmáticos de HLA-G soluble y la absorción de CsA en sangre de estos pacientes. Determinar el polimorfismo HLA-G previamente al trasplante podría ser una herramienta muy útil para poder individualizar las terapias inmunosupresoras actuales en pacientes con trasplante cardíaco, además nos estaría dando una información muy valiosa de que predisposición va a tener el paciente a sufrir episodios de rechazo agudo.

### **7.1.1 Limitaciones del estudio**

Al realizar este estudio hemos encontrado varias limitaciones. En primer lugar, la metodología para el análisis de las isoformas solubles de HLA-G no se validó hasta el año 2005, por lo que no se pudo hacer un estudio completo de todos los pacientes. Es por ello que no se ha estudiado los niveles de HLA-G soluble y de biopsia conjuntamente, con la consiguiente pérdida de información. Otro punto son las limitaciones que hemos sufrido de muestras, ya que no había un banco de muestras previo, y de pacientes debido a las pocas operaciones de trasplante cardiaco que se realizan anualmente. La evolución y seguimiento del paciente queda limitada en algunos casos al periodo más cercano tras el trasplante ya que muchos de ellos son atendidos en hospitales más próximos geográficamente a su lugar de origen una vez se le ha dado el alta médica.

El estudio aquí propuesto no se adentra en las funciones de HLA-G *in vivo* ni en los mecanismos moleculares que regulan la expresión de esta molécula. Por lo que solo podemos sugerir posibles mecanismos por los cuales podría estar induciéndose la expresión de esta molécula tanto en sus formas solubles o de membrana.

### **7.1.2 Puntos fuertes del estudio**

Esta tesis describe la expresión de HLA-G en los periodos del pre-trasplante, y el periodo de un año post-trasplante en plasma y biopsia de pacientes trasplantados de corazón. Hasta el momento es el estudio más completo que se le ha hecho a esta molécula en el contexto de trasplante de órganos sólidos. Además, se ha analizado el polimorfismo HLA-G de la inserción/delección de 14pb del exón 8 en estos pacientes siendo la primera vez que se estudia en trasplantados de corazón.

En esta tesis se relaciona por primera vez el tratamiento inmunosupresor de pacientes trasplantados de corazón con un aumento de los niveles de HLA-G soluble. Por otra parte, también se ha contemplado la relación del polimorfismo inserción/delección de 14pb del exón 8 con la expresión de HLA-G soluble y la absorción de ciclosporina en sangre.



## CONCLUSIÓN

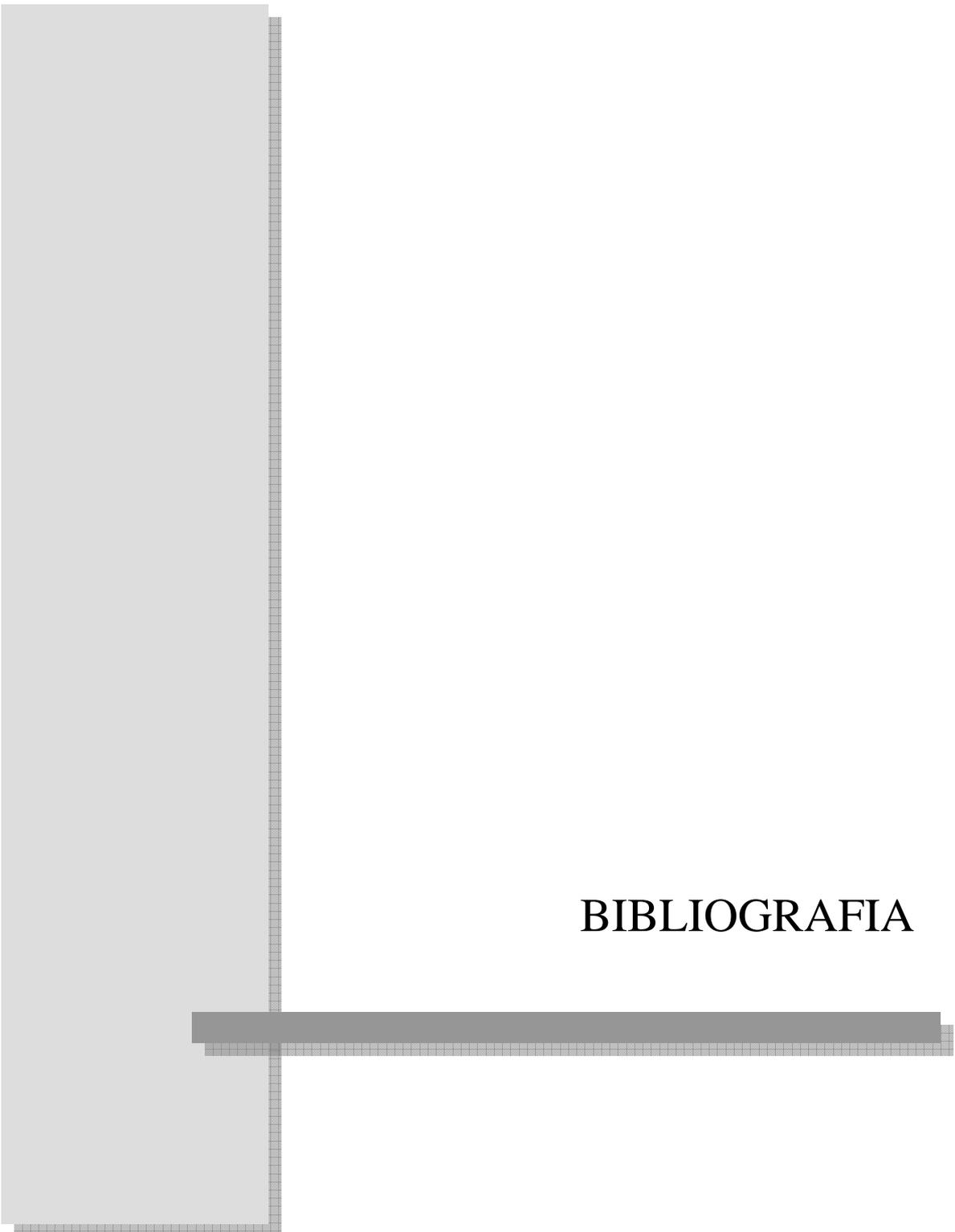
---

## VII CONCLUSIONES

---

- Una alta expresión de HLA-G de membrana en biopsias de miocardio está asociado con un menor número de episodios de rechazo agudo, mientras que niveles bajos de expresión se asocian con la presencia de episodios de rechazo agudo recurrente.
- Los pacientes trasplantados de corazón pueden distribuirse en dos grupos atendiendo a sus niveles de sHLA-G: Niveles “bajos (< 30ng/ml)” y “altos (> 30ng/ml)” durante el primer mes post-trasplante, los cuales están asociados con un alto y bajo número de episodios de rechazo agudo respectivamente.
- Los pacientes que padecieron episodios de rechazo agudo recurrentes durante el primer año post-trasplante mostraban niveles significativamente más bajos de sHLA-G antes del trasplante ( $p=0.0041$ ) que los que no sufrieron episodios de rechazo agudo recurrente ( $13.4\pm 6.9$  ng/ml vs.  $36.37\pm 33.2$  ng/ml)
- Tras la administración diaria de la triple terapia inmunosupresora los niveles de sHLA-G se incrementan en plasma de manera significativa en el 60% de los pacientes estudiados en el intervalo de 2-5 horas tras la dosis. Los pacientes donde se observa este incremento sufren un menor número de episodios de rechazo agudo severo recurrente comparado con los pacientes que no muestran éste incremento, durante el primer año post-trasplante.
- El genotipo -14/-14pb para el polimorfismo de la inserción/delección de las 14 pb del gen HLA-G induce una mayor expresión de las isoformas HLA-G5 y sHLA-G1.

- Existe una relación entre pacientes con mejor “absorción” de la ciclosporina (tanto en niveles C0 y C2) y el polimorfismo de HLA-G, siendo los individuos homocigotos para el alelo negativo (-14/-14-pb) los que presentan mejores resultados de absorción.



## BIBLIOGRAFIA

---

**IX BIBLIOGRAFÍA**

---

- (1) Garlicki M. What is new in heart transplantation. *Ann Transplant* 2005; 10:49-50.
- (2) Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J* 1967; 41(48):1271-1274.
- (3) Deng MC. Orthotopic heart transplantation: highlights and limitations. *Surg Clin North Am* 2004; 84(1):243-255.
- (4) Jurt U, Delgado D, Malhotra K, Bishop H, Ross H. Cardiology patient pages. Heart transplant: what to expect. *Circulation* 2002; 106(14):1750-1752.
- (5) Vasilescu ER, Ho EK, de la TL, Itescu S, Marboe C, Cortesini R et al. Anti-HLA antibodies in heart transplantation. *Transpl Immunol* 2004; 12(2):177-183.
- (6) Massad MG. Current trends in heart transplantation. *Cardiology* 2004; 101(1-3):79-92.
- (7) Hornick P, Rose M. Chronic rejection in the heart. *Methods Mol Biol* 2006; 333:131-144.
- (8) Uretsky BF, Murali S, Reddy PS, Rabin B, Lee A, Griffith BP et al. Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone. *Circulation* 1987; 76(4):827-834.
- (9) Azuma H, Heemann UW, Tullius SG, Tilney NL. Cytokines and adhesion molecules in chronic rejection. *Clin Transplant* 1994; 8:168-180.
- (10) Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res* 2006; 99:801-815.
- (11) Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999; 353:1083-1091.
- (12) Kobashigawa JA, Stevenson LW, Brownfield ED, Gleeson MP, Moriguchi JD, Kawata N et al. Corticosteroid weaning late after heart transplantation: relation to HLA-DR mismatching and long-term metabolic benefits. *J Heart Lung Transplant* 1995; 14(5):963-967.

- (13) Smiley ST, Csizmadia V, Gao W, Turka LA, Hancock WW. Differential effects of cyclosporine A, methylprednisolone, mycophenolate, and rapamycin on CD154 induction and requirement for NFkappaB: implications for tolerance induction. *Transplantation* 2000; 70:415-419.
- (14) Starzl TE, Murase N, bu-Elmagd K, Gray EA, Shapiro R, Egtesad B et al. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 2003; 361:1502-1510.
- (15) Mueller XM. Drug immunosuppression therapy for adult heart transplantation. Part 1: immune response to allograft and mechanism of action of immunosuppressants. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:354-362.
- (16) Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357:695-697.
- (17) Reem GH. Molecular mode of action of cyclosporin and FK506 in human thymocytes. *J Autoimmun* 1992; 5 Suppl A:159-165.
- (18) Shin GT, Khanna A, Ding R, Sharma VK, Lagman M, Li B et al. In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 1998; 65:313-318.
- (19) Barnard JB, Thekkudan J, Richardson S, Bittar MN, Martyszczuck R, Hasan J et al. Cyclosporine profiling with C2 and C0 monitoring improves outcomes after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25:564-568.
- (20) Brunet M, Millan O, Jimenez O, Campistol JM, Vidal E, Rojo I et al. New concepts in cyclosporine pharmacokinetic and dynamic monitoring: the impact of concomitant immunosuppression on target C2 concentrations. *Transplant Proc* 2004; 36:437S-441S.
- (21) Ensley RD, Bristow MR, Olsen SL, Taylor DO, Hammond EH, O'Connell JB et al. The use of mycophenolate mofetil (RS-61443) in human heart transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56:75-82.
- (22) Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE et al. Drug therapy in the heart transplant recipient: part II: immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004; 110:3858-3865.
- (23) Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270:283-286.
- (24) Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270:286-290.

- 
- (25) Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1956; 143:239-357.
- (26) Burnet FM. Immunological recognition of self. *Science* 1961; 133:307-311.
- (27) Mackay IR, Larkin L, Burnet FM. Failure of autoimmune antibody to react with antigen prepared from the individual's own tissues. *Lancet* 1957; 273:122-123.
- (28) Dausset J, Colin M. Technique de recherche des thrombo-agglutinines immunologiques; influence du chauffage préalable de la suspension plaquettaire. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1958; 3:60-61.
- (29) Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:550-557.
- (30) Hornick P. Direct and indirect allorecognition. *Methods Mol Biol* 2006; 333:145-156.
- (31) Whitelegg A, Barber LD. The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens* 2004; 63:101-108.
- (32) Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 1999; 96:611-614.
- (33) Rudensky AY, Gavin M, Zheng Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. *Cell* 2006; 126:253-256.
- (34) Rosenberg AS, Mizuochi T, Sharrow SO, Singer A. Phenotype, specificity, and function of T cell subsets and T cell interactions involved in skin allograft rejection. *J Exp Med* 1987; 165:1296-1315.
- (35) Rose ML. Transplant immunology I: immunological mechanisms of graft injury. *Surgery* 2004; 24(2):47-52.
- (36) Geraghty DE, Pei J, Lipsky B, Hansen JA, Taillon-Miller P, Bronson SK et al. Cloning and physical mapping of the HLA class I region spanning the HLA-E-to-HLA-F interval by using yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(7):2669-2673.
- (37) Marsh SG. Nomenclature for factors of the HLA System, update October 2000. *Eur J Immunogenet* 2001; 28(2):187-188.
- (38) Trowsdale J. Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genet* 1993; 9:117-122.

- (39) Arnett KL, Parham P. HLA class I nucleotide sequences, 1995. *Tissue Antigens* 1995; 46:217-257.
- (40) Chien YH, Davis MM. How alpha beta T-cell receptors 'see' peptide/MHC complexes. *Immunol Today* 1993; 14:597-602.
- (41) Brodsky FM, Lem L, Bresnahan PA. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 1996; 47:464-471.
- (42) She J, Matsui K, Terhorst C, Ju ST. Activation-induced apoptosis of mature T cells is dependent upon the level of surface TCR but not on the presence of the CD3 zeta ITAM. *Int Immunol* 1998; 10:1733-1740.
- (43) Ishitani A, Geraghty DE. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(9):3947-3951.
- (44) Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E, Dausset J, Carosella E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(10):4209-4213.
- (45) Torres MI, Moreau P, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carosella ED. HLA-G Today. *Inmunologia* 2001; 20(1):18-29.
- (46) Lee N, Malacko AR, Ishitani A, Chen MC, Bajorath J, Marquardt H et al. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 1995; 3(5):591-600.
- (47) Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, O'Callaghan CA et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* 1998; 160(7):3096-3100.
- (48) Yu YR, Tian XH, Wang Y, Feng MF. Rapid production of human KIR2DL4 extracellular domain and verification of its interaction with HLA-G. *Biochemistry* 2006; 71 Suppl 1:S60-S65.
- (49) Boyson JE, Erskine R, Whitman MC, Chiu M, Lau JM, Koopman LA et al. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(25):16180-16185.
- (50) Gao GF, Willcox BE, Wyer JR, Boulter JM, O'Callaghan CA, Maenaka K et al. Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8alphaalpha. *J Biol Chem* 2000; 275(20):15232-15238.

- 
- (51) Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A et al. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(2):195-200.
- (52) Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N, Librach CL. HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* 2000; 101(2):191-200.
- (53) Rieger L, Hofmeister V, Probe C, Dietl J, Weiss EH, Steck T et al. Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(3):255-261.
- (54) Menier C, Riteau B, Dausset J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. HLA-G truncated isoforms can substitute for HLA-G1 in fetal survival. *Hum Immunol* 2000; 61(11):1118-1125.
- (55) Adrian CF, Moreau P, Riteau B, Ibrahim EC, Le DC, Dausset J et al. HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J Reprod Immunol* 1999; 43(2):183-193.
- (56) Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(8):4510-4515.
- (57) Mallet V, Proll J, Solier C, guerre-Girr M, DeRossi M, Loke YW et al. The full length HLA-G1 and no other alternative form of HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells. *Hum Immunol* 2000; 61(3):212-224.
- (58) Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Martinozzi S, Pla M, Dausset J et al. HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *Int Immunol* 2001; 13(2):193-201.
- (59) Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* 2001; 166(8):5018-5026.
- (60) Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Castro MJ, Morales P, Moscoso J, Varela P et al. The evolution of the MHC-G gene does not support a functional role for the complete protein. *Immunol Rev* 2001; 183:65-75.
- (61) Moreau P, Dausset J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Viewpoint on the functionality of the human leukocyte antigen-G null allele at the fetal-maternal interface. *Biol Reprod* 2002; 67(5):1375-1378.

- (62) Lee N, Malacko AR, Ishitani A, Chen MC, Bajorath J, Marquardt H et al. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 1995; 3(5):591-600.
- (63) Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G et al. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000; 61(11):1138-1149.
- (64) Rebmann V, Pfeiffer K, Passler M, Ferrone S, Maier S, Weiss E et al. Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens* 1999; 53(1):14-22.
- (65) Puppò F, Costa M, Contini P, Brenci S, Cevasco E, Ghio M et al. Determination of soluble HLA-G and HLA-A, -B, and -C molecules in pregnancy. *Transplant Proc* 1999; 31(4):1841-1843.
- (66) Hamai Y, Fujii T, Miki A, Geraghty DE, Harada I, Takai Y et al. Quantitative assessment of human leukocyte antigen-G protein in amniotic fluid by a double-determinant enzyme-linked immunosorbent assay using anti-human leukocyte antigen-G-specific antibody '87G'. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41(4):293-295.
- (67) Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H, Reinhold U. Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer* 2001; 92(2):369-376.
- (68) Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 2000; 355(9221):2138.
- (69) Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C, Fabiani JN et al. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 2002; 105(16):1949-1954.
- (70) Fournel S, Huc X, guerre-Girr M, Solier C, Legros M, Praud-Brethenou C et al. Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. *Tissue Antigens* 2000; 55(6):510-518.
- (71) Chu W, Fant ME, Geraghty DE, Hunt JS. Soluble HLA-G in human placentas: synthesis in trophoblasts and interferon-gamma-activated macrophages but not placental fibroblasts. *Hum Immunol* 1998; 59(7):435-442.

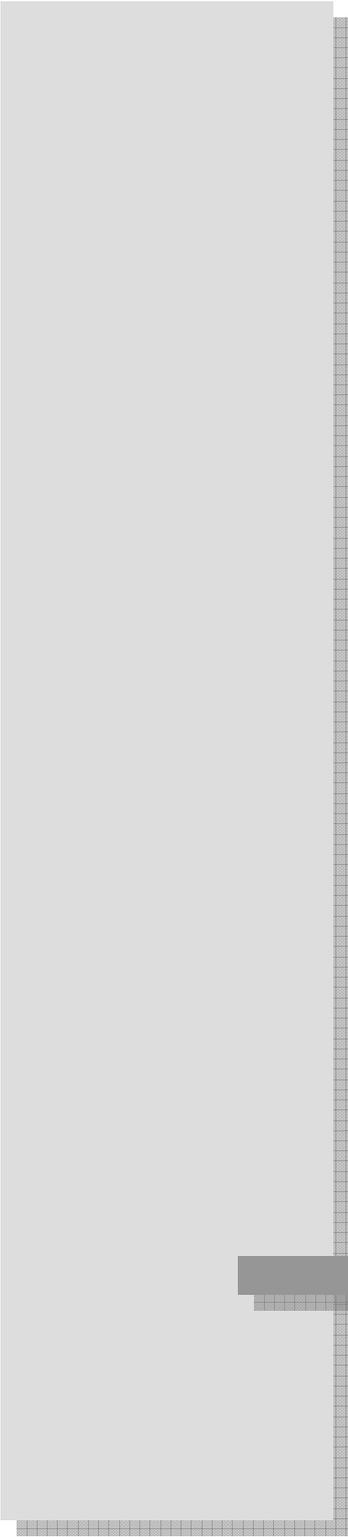
- 
- (72) Mallet V, Blaschitz A, Crisa L, Schmitt C, Fournel S, King A et al. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int Immunol* 1999; 11(6):889-898.
- (73) Menicucci A, Noci I, Fuzzi B, Criscuoli L, Scarselli G, Baricordi O et al. Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immunol* 1999; 60(11):1054-1057.
- (74) Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(1):161-165.
- (75) Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002; 32(2):311-315.
- (76) Onno M, Pangault C, Le FG, Guilloux V, Andre P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2000; 164(12):6426-6434.
- (77) Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(3):682-688.
- (78) Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, Choppin J, Dausset J, Carosella ED et al. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 2001; 33(3):2355-2359.
- (79) Kanai T, Fujii T, Unno N, Yamashita T, Hyodo H, Miki A et al. Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45(2):94-99.
- (80) Fournel S, guerre-Girr M, Campan A, Salauze L, Berrebi A, Lone YC et al. Soluble HLA-G: purification from eukaryotic transfected cells and detection by a specific ELISA. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42(1):22-29.
- (81) Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 2003; 33(1):125-134.
- (82) Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-

- proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(21):12150-12155.
- (83) Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, Choppin J, Dausset J, Carosella ED et al. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 2001; 33(3):2355-2359.
- (84) Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Miki A, Yamashita T, Hyodo H et al. A subclass of soluble HLA-G1 modulates the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua additively to membrane-bound HLA-G1. *J Reprod Immunol* 2003; 60(2):85-96.
- (85) Lemaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. *Autoimmun Rev* 2005; 4:503-509.
- (86) Creput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol* 2003; 39(4):587-594.
- (87) Creput C, Le FG, Bahri R, Amiot L, Charpentier B, Carosella E et al. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. *Hum Immunol* 2003; 64(11):1033-1038.
- (88) Horuzsko A, Lenfant F, Munn DH, Mellor AL. Maturation of antigen-presenting cells is compromised in HLA-G transgenic mice. *Int Immunol* 2001; 13(3):385-394.
- (89) Liang S, Baibakov B, Horuzsko A. HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 2002; 32(9):2418-2426.
- (90) Forte P, Matter-Reissmann UB, Strasser M, Schneider MK, Seebach JD. Porcine aortic endothelial cells transfected with HLA-G are partially protected from xenogeneic human NK cytotoxicity. *Hum Immunol* 2000; 61(11):1066-1073.
- (91) Forte P, Pazmany L, Matter-Reissmann UB, Stussi G, Schneider MK, Seebach JD. HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells. *J Immunol* 2001; 167(10):6002-6008.
- (92) Dorling A, Monk NJ, Lechler RI. HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur J Immunol* 2000; 30(2):586-593.

- 
- (93) Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* 2000; 48(1):17-26.
- (94) Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Sedlik C, Dausset J, Rouas-Freiss N et al. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol* 1999; 43(2):203-211.
- (95) Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 2005; 35:1133-1142.
- (96) Sasaki H, Xu XC, Mohanakumar T. HLA-E and HLA-G expression on porcine endothelial cells inhibit xenoreactive human NK cells through CD94/NKG2-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 1999; 163(11):6301-6305.
- (97) Matsunami K, Miyagawa S, Nakai R, Murase A, Shirakura R. The possible use of HLA-G1 and G3 in the inhibition of NK cell-mediated swine endothelial cell lysis. *Clin Exp Immunol* 2001; 126(1):165-172.
- (98) Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* 2006; 6:2152-2156.
- (99) Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Keck BM, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report--2004. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23:796-803.
- (100) Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990; 248(4952):220-223.
- (101) Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2002; 60(2):122-132.
- (102) Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2006; 12:209-232.
- (103) Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol* 2006; 67:53-62.
- (104) Hviid TV, Larsen LG, Hoegh AM, Bzorek M. HLA-G expression in placenta in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52(3):212-217.

- (105) Favier B, Lemaoult J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. Research on HLA-G: an update. *Tissue Antigens* 2007; 69:207-211.
- (106) Rouas-Freiss N, Naji A, Durrbach A, Carosella ED. Tolerogenic functions of human leukocyte antigen G: from pregnancy to organ and cell transplantation. *Transplantation* 2007; 84:S21-S25.
- (107) Carosella ED, Moreau P, Le MJ, Le DM, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol* 2003; 81:199-252.
- (108) Gazit E, Sherf M, Balbin E, Muratov A, Goldstein I, Loewenthal R. HLA-G expression is induced in Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines by culture conditions. *Hum Immunol* 2007; 68:463-468.
- (109) Rebmann V, Lemaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Grosse-Wilde H. Report of the Wet Workshop for Quantification of Soluble HLA-G in Essen, 2004. *Hum Immunol* 2005; 66:853-863.
- (110) Rebmann V, Lemaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Grosse-Wilde H. Quantification and identification of soluble HLA-G isoforms. *Tissue Antigens* 2007; 69 Suppl 1:143-149.
- (111) Konstandin MH, Sommerer C, Doesch A, Zeier M, Meuer SC, Katus HA et al. Pharmacodynamic cyclosporine A-monitoring: relation of gene expression in lymphocytes to cyclosporine blood levels in cardiac allograft recipients. *Transpl Int* 2007; .
- (112) Barten MJ, Rahmel A, Garbade J, Richter M, Bittner HB, Dhein S et al. C0h/C2h monitoring of the pharmacodynamics of cyclosporin plus mycophenolate mofetil in human heart transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37:1360-1361.
- (113) Rhynes VK, McDonald JC, Gelder FB, Aultman DF, Hayes JM, McMillan RW et al. Soluble HLA class I in the serum of transplant recipients. *Ann Surg* 1993; 217:485-489.
- (114) Moreau P, Faure O, Lefebvre S, Ibrahim EC, O'Brien M, Gourand L et al. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. *Transplant Proc* 2001; 33:2277-2280.
- (115) Rebmann V, van d, V, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001; 57:15-21.

- (116) Lemaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(18):7064-7069.
- (117) Naji A, Le RS, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Creput C, Daouya M et al. CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood* 2007; 110(12):3936-3948.
- (118) San SD, Fabrega E, Lopez-Hoyos M, Pons F. Reduced numbers of blood natural regulatory T cells in stable liver transplant recipients with high levels of calcineurin inhibitors. *Transplant Proc* 2007; 39:2290-2292.
- (119) Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1007-1018.
- (120) Torres MI, Le DM, Lorite P, Rios A, Gassull MA, Gil A et al. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol* 2004; 16(4):579-583.
- (121) Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 2002; 99(2):609-617.



ANEXO I

# Soluble HLA-G in Heart Transplantation: Their Relationship to Rejection Episodes and Immunosuppressive Therapy

J. Luque, M.I. Torres, M.D. Aumente, J. Marín, G. García-Jurado, R. González, D. Pascual, N. Guerra, F. López-Rubio, M.R. Álvarez-López, J.M. Arizón, and J. Peña

**ABSTRACT:** The aims of this study were to quantify the level of soluble HLA-G in heart transplant patients, to determine the relationship between the sHLA-G levels and the appearance of acute rejection episodes, and to identify the influence of immunosuppressive therapy on sHLA-G levels. Analysis of sHLA-G, measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the transplant patients, revealed the existence of two similarly sized groups of patients. One group displayed a significant increase ( $p < 0.001$ ) in sHLA-G during the first month after transplantation while the other group maintained low levels of the molecule (0–30 ng/ml) throughout the study. The latter group displayed a high incidence of recurrent severe

rejection. A significant increase ( $p < 0.01$ ) in sHLA-G 2 hours after administration of immunosuppressive treatment (mycophenolate mofetil, cyclosporine A/FK506, corticoids) was found. These results suggest that sHLA-G participates in the induction of certain levels of immunological tolerance in these recipients. *Human Immunology* 67, 257–263 (2006). © American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2006. Published by Elsevier Inc.

**KEYWORDS:** HLA; sHLA-G; heart transplantation; cyclosporine; tolerance; immunosuppressive treatment

## ABBREVIATIONS

sHLA-G soluble human leukocyte antigen-G  
MMF mycophenolate mofetil  
APC antigen-presenting cells  
CsA cyclosporine A

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay  
MPA mycophenolic acid  
NK natural killer  
MP methylprednisone

## INTRODUCTION

One of the keys to successful organ transplantation is the prevention of their rejection as a consequence of graft allo-recognition of the donor allo-antigens by the recipient immune system [1]. Allo-recognition and the subsequent allo-response are complex processes that are currently minimized by means of immunosuppressive treatment [2]. The immunosuppressive treatment in cur-

rent use comprises calcineurin inhibitors, steroids, anti-metabolites, antiproliferatives, and other components such as monoclonal antibodies [3].

The common mechanism of action of the immunosuppressive treatment, which is based on nonspecific blockage of the immune system, displays serious limitations, including a high incidence of viral infections and the appearance of certain tumors [4]. In view of these limitations, efforts to specifically block the allo-recognition and the allo-response to the graft antigens are currently being made [5], while maintaining the functions of the immune system as a whole. This process, based on therapeutic tolerance, may protect the graft more efficiently, avoiding side effects. A large number of studies are currently attempting to make therapeutic improvements in this tolerogenic direction [6–8].

*From the Services of Immunology (J.L., J.M., G.G.-J., R.G., J.P.), Pathology–Anatomy (F.L.-R.), Cardiology (J.M.A.), and Pharmacy (M.D.A.) Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain; Services of Cardiology (D.P.) and Immunology (M.G., M.R.A.-L.), Virgen de la Arrixaca Hospital, Murcia, Spain; and Department of Experimental Biology, University of Jaen, Spain (M.I.T.).*

*Address reprint requests to: Professor José Peña, Department of Immunology, Reina Sofía University Hospital Cl. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain; Tel and Fax: +34 957 011628; E-mail: filpemaj@uco.es.*

**TABLE 1** Clinical characteristics of the heart transplant patients of Group 2

Patients	Type of treatment	Cause of transplant	Age	Sex	Acute rejection*
T21	CsA, MMF,MP.	IM	49	M	+
T22	CsA, MMF,MP.	IDCM	38	M	+
T23	CsA, MMF,MP.	IDCM	24	M	–
T24	CsA, MMF,MP.	IM	40	M	–
T25	CsA, MMF,MP.	IDCM	51	M	–
T26	CsA, MMF,MP.	CM	28	M	–
T27	FK506, MMF,MP.	DCM	17	F	–
T28	CsA, MMF,MP.	IM	60	M	+
T29	CsA, MMF,MP.	DCM	52	M	+
T30	CsA, MMF,MP.	IDCM	49	M	+
T31	FK506, MMF,MP.	IDCM	16	M	–
T32	CsA, MMF,MP.	IM	37	F	–
T33	FK506, MMF,MP.	DCM	48	M	+
T35	CsA, MMF,MP.	IDCM	59	F	+
T36	CsA, MMF,MP.	DCM	41	M	–
T37	FK506, MMF,MP.	IM	39	F	–

IM, ischemic cardiomyopathy; IDCM, idiopathic dilated cardiomyopathy; DCM, dilated cardiomyopathy; CM, congenital cardiomyopathy; M/F, male/female.

\* During the first month after transplantation.

HLA-G is a molecule with tolerogenic capacity in both its membrane and its soluble isoforms [9]. Specifically, the tolerogenic capability of soluble HLA-G (sHLA-G) is related to its capacity to induce apoptosis of activated CD8 T cells [10], to act on T regulatory cells [11], and to modulate the activity of natural killer cells [12]. HLA-G also has the ability to block allo-cytotoxic T lymphocyte response [13] and allo-proliferation [14], which suggests that this molecule could be involved in transplantation tolerance. In fact, high levels of sHLA-G in serum of transplant patients have been associated with better acceptance of combined liver–kidney transplants [15]. In heart transplant patients, although their levels of sHLA-G have not yet been quantified, it has been demonstrated that there is a relationship between the presence of this molecule in the serum of transplanted patients and a lower rate of rejection [16]. The aims of this study were to accurately measure soluble HLA-G in heart transplant patients by means of ELISA and to relate sHLA-G levels to episodes of acute rejection. We also investigated a possible link between soluble HLA-G expression and immunosuppressive therapy received by heart transplantation patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

This was a collaborative study of the Spanish Transplant Immunotolerance Group (RED-GIT). Serum samples were obtained from 20 healthy individuals (control group), 19 heart transplant patients from the Virgen de la Arrixaca Hospital in Murcia (Group 1), age range 25–63 years, and 16 heart transplant patients from the Reina Sofía Univer-

sity Hospital in Cordoba (Group 2), age range 16–60 years (Table 1). Heart transplantation had been performed as consequence of dilated cardiomyopathy in 15 patients, idiopathic dilated cardiomyopathy in 6 patients, ischemic cardiomyopathy in 11 patients, and congenital heart disease and other causes in 3 patients. No patient was found to have specific HLA antibodies before the transplant. The degree of rejection was classified according to the working formulation of the International Society for Heart and Lung Transplantation [17].

### Immunosuppressive Therapy

Immunosuppressive treatment consisted of cyclosporine (CsA) or tacrolimus (FK506), methylprednisone (MP), and mycophenolate mofetil (MMF). CsA was started at a dosage of 4 mg/kg/day (administered as two doses) within the first 24 hours following transplantation, after which the dose was adjusted to maintain target  $C_0$  levels: 1 month, 200–400 ng/ml; 2–3 months, 200–300 ng/ml; 4–6 months, 150–250 ng/ml; 6–12 months, 100–200 ng/ml. CsA levels were measured using fluorescence polarization immunoassay (AxSYM). Additional immunosuppression consisted of corticosteroids: methylprednisolone 500 mg IV intra-operatively, 125 mg  $\times$  three doses IV on day 1, followed by oral deflazacort, tapering to 0.2–0.3 mg/kg/day by 1 month, 0.15–0.20 mg/kg/day by 3 months, 0.1–0.2 mg/kg/day by 6 months, and then 0.05 mg/kg/day; and MMF at a starting dose of 1 g b.i.d, adjusted according to the mycophenolic acid (MPA) target range of 2.5–4.5  $\mu$ g/ml. MPA levels were measured by homogeneous enzyme immunoassay. Tacrolimus was administered for the first 1–3 days after transplantation at a dose of 0.3 mg/kg/day in two di-

vided doses with the aim of targeting the whole-blood FK506 through concentration at 10–20 ng/ml.

Dosage was monitored by measuring blood levels, even when centers had reached target levels. For cyclosporine we adopted the viewpoint that the 2-hour post-dose level was a better indicator of immunosuppression. Cyclosporine and tacrolimus share variable oral bioavailability, which necessitates drug monitoring. This variability is attributed to large interindividual differences. An absorption profile taken during the first 2 hours after administration (C2) was found to be a more reliable parameter. We therefore monitored the C0 and C2 levels of cyclosporine and tacrolimus in transplant patients (Group 2) to assess their applicability and potential clinical utility. Blood samples were also obtained both 1 and 2 hours after drug administration.

#### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Soluble HLA-G was measured by ELISA in plates coated with the capture antibody MEM-G/09 (sHLA-G Kit; Exbio, Czech Republic) which recognizes sHLA-G1 and HLA-G5 isoforms. After several washes, diluted serum was added to each well (100  $\mu$ l) in duplicate and the plates were incubated for 1 hour. The labeling was performed with the sHLA-G (Exbio Kit) and the optical densities were measured at 450 nm (SLT, Spectra II, Austria). The final concentration was determined by optical density according to the standard curves.

Total soluble class-I molecules (sHLA-I) were measured using W6/32 mAb (8  $\mu$ g/ml) as a capture antibody. After several washes, diluted serum was added to each well (100  $\mu$ l) in duplicate and the plates were incubated for 1 hour. Anti- $\beta_2$ -microglobulin horseradish peroxidase (DAKO, Denmark) was then added and the plates were incubated for 1 hour. The chromogenic substrate, orthophenylenediamine dihydrochloride (Sigma, St Louis, MO, USA), was added for 20 minutes in the dark. We used standard serum samples of sHLA-I previously obtained in our laboratory to calibrate the optical density data.

#### Statistics

The Kruskal–Wallis test was used to compare the sHLA-G levels between the two subgroups in Group 1 of patients. Student's *t*-test was used to compare sHLA-G levels before and after the immunosuppressive therapy. *p* values <0.05 were considered significant.

## RESULTS

Levels of sHLA-G were measured in the sera of the patients from Group 1 previous to undergoing transplantation and several weeks after transplantation up to 1 year after the transplant. The observed levels of sHLA-G

revealed that there is high variability of sHLA-G in these patients. The patients belonging to Group 1 can be distributed into two different new groups according to their levels of sHLA-G (Table 2). *Group 1a* showed a significant increase ( $p < 0.001$ ) in sHLA-G within the first month following transplantation, gradually decreasing to close to the basal levels found pretransplantation, whereas *Group 1b* remained at a low level (0–30 ng/ml) throughout the study period (Figure 1). It is also interesting to note that five patients in *Group 1b* were classified as displaying recurrent severe rejection (50%), whereas two patients had weak rejection and only three patients showed no signs of rejection. In *Group 1a*, no patients were classified as displaying recurrent severe rejection, five evidenced no rejection (55.5%), only one presented severe rejection, and three displayed weak rejection.

In view of the above results, we decided to further analyze sHLA-G during the first 3 weeks post-transplantation in a second group of heart transplant patients (Group 2). It was found that levels of soluble HLA-G increased immediately after the transplant and later fell again to basal levels (Figure 2). These results confirm the data previously obtained with Group 1 patients.

We also investigated a possible link between the expression of sHLA-G and the use of immunosuppressive therapies in patients of Group 2 to determine the possible effect of immunosuppression on the increase in sHLA-G observed during this critical period after transplantation. Levels of sHLA-G were measured predose (C0) and 2 hours after the daily administration of the immunosuppressive treatment (C2). A significant increase ( $p < 0.01$ ) in sHLA-G levels 2 hours after the administration of the immunosuppressive treatment was found (Figure 3). In contrast, the level of soluble HLA-I measured in this group of patients did not change 2 hours after the immunosuppression treatment was supplied (Figure 4A). Levels of sHLA-I and sHLA-G obtained were also compared, and no correlation was found between them (Figure 4B). In five of these patients, sHLA-G levels were measured until 12 hours after the administration of the immunosuppressive treatment, and a raised level of sHLA-G was found in the period of time between 2 and 6 hours after the dose (data not shown).

## DISCUSSION

It has previously been shown that HLA-G inhibits the allo-response through direct inhibition of natural killer (NK) and T cell functions [18, 13]. For this reason, we wished to accurately quantify levels of sHLA-G in the sera of heart transplant patients in whom acute rejection episodes frequently occur. We observed that many patients studied display a significant rise in sHLA-G levels

**TABLE 2** sHLA-G levels (ng/ml) in the serum of heart transplanted patients of Group 1

Patients	Pretransplant	Post-transplant weeks				Rejection intensity**
		1	3	36	70	
1a T2	58.0	152.9	12.0	-	8.4	Severe
T3	10.0	57.4	172.6	-	14.0	No
T6	27.9	117.0	58.0	-	16.0	No
T7	11.5	224.7	27.92	-	11.4	No
T9	10.6	125.7	41.7	-	9.3	No
T14	88.3	56.8	43.6	8.0	-	Weak
T18	23.8	81.7	62.4	17.4	-	Weak
T20	26.8	87.7	27.5	17.1	-	Weak
T40	78.2	72.75	30.1	24.8	-	No
mean $\pm$ SD	37.23 $\pm$ 30.0	108.5 $\pm$ 54.2*	52.9 $\pm$ 47.6*	16.8 $\pm$ 6.8	11.8 $\pm$ 3.1	
1b T1	14.3	19.0	14.8	-	17.1	No
T4	21.3	27.1	19.8	9.8	-	Sev rec
T5	10.0	9.0	9.6	-	8.9	Weak
T8	15.6	8.3	8.0	-	8.2	No
T10	19.2	18.0	17.0	14.0	-	Sev rec
T11	10.8	28.0	15.9	18.4	-	Sev rec
T13	12.3	20.8	22.0	14.24	-	Sev rec
T19	19.4	21.7	20.2	18.8	-	Weak
T38	1.2	2.3	2.9	3.5	-	Sev rec
T39	16.4	9.4	1.35	-	15.74	No
mean $\pm$ SD	14 $\pm$ 5.8	17.1 $\pm$ 8.6	13.2 $\pm$ 7.6	13.1 $\pm$ 5.7	12.48 $\pm$ 4.5	

Healthy individuals: 50.18  $\pm$  39.56

These patients has been regrouped in sHLA-G high levels (1a >50 ng/ml) and low levels patients (1b, <30 ng/ml). In each subgroup, 1a and 1b, are included nine and ten patients, respectively.

\*  $p < 0.05$  (Kruskal–Wallis test).

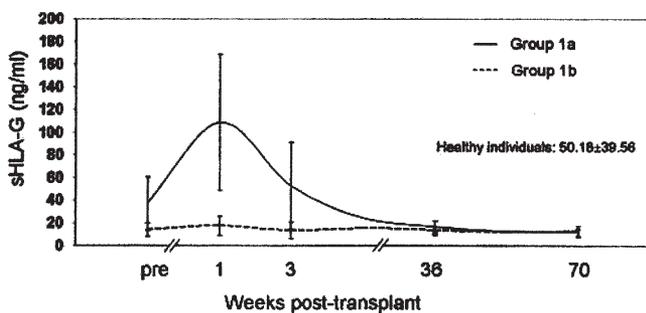
\*\* weak, less than 3A; Severe, 3A; Sev rec, several 3A.

during the first month after transplantation but not for the remainder of the study period. One possible explanation for this pattern that postsurgical stress may affect the pattern of HLA-G transcription and thus be responsible for the changes observed. However, although this is possible, this does not appear to be the case here because we found no correlation between the ischemia time and

the sHLA-G levels during the first days after transplantation (data not shown).

Comparing the sHLA-G levels found in this study with the degree of acute rejection episodes, it was interesting to note that 50% of the patients with low levels of sHLA-G also presented recurrent severe rejection episodes, whereas patients who expressed high levels of sHLA-G did not present any recurrent severe rejection episodes. These results demonstrate an inverse relationship between sHLA-G levels and recurrent severe rejection and suggest that high levels of sHLA-G in serum (>50 ng/ml during the first month) predispose heart transplant patients to better graft acceptance.

On the other hand, the rise in sHLA-G levels during the first month following heart transplant is probably related to the immunosuppression therapy, which is administered intensively during this period to avoid acute rejection (Figure 1). The effect of therapy on sHLA-G levels (Figure 3) helps to prolong allo-graft acceptance, leading to a donor-specific tolerance by the host to the cardiac transplant because of sHLA-G functions. Based on the demonstration by Lila *et al.* [14] that sHLA-G can be secreted by alloreactive CD4<sup>+</sup> T cells, it is reasonable to speculate that the rise in sHLA-G observed in the sera



**FIGURE 1** Detection of soluble human leukocyte antigen (HLA-G) by enzyme-linked immunoabsorbent assay in the sera of healthy controls and heart transplant patients. In sera we can distinguish two groups of patients; those with levels below 30 ng/ml after transplantation (Group 1b) and those with levels higher than 50 ng/ml after transplantation (Group 1a).

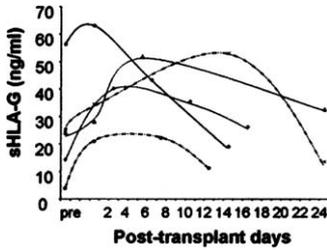


FIGURE 2 Detection of soluble human leukocyte antigen (HLA-G) ELISA in the sera of heart transplant patients from group 2, during the first month post-transplant and on the day before transplantation (pre). Patients [T21 (●), T24 (◆), T26 (×), T27 (◇), T30 (△)].

of heart transplant patients could be produced by  $CD4^+$  allo-reactive T cells.

However, the molecular basis of the functions of sHLA-G in heart transplant patients is not known, although it may be contributed to by the capacity of HLA-G to induce the differentiation of  $CD4^+$  T cells into suppressive cells [11] and inhibit allo-cytotoxic T lymphocyte responses [13]. This molecule also protects cells against NK lysis and modulates cytokine secretion [12, 19, 20]. Furthermore, these functions are based on the capacity of sHLA-G to be recognized by certain inhibitory receptors such as KIR2DL4 expressed on NK and certain T cells and ILT-2 and ILT-4 expressed on monocytes, dendritic cells, and certain NK cells [21–23].

Our data suggest that the immunosuppressors may be directly responsible for the upregulated expression of the tolerogenic molecule sHLA-G following heart transplantation. It is interesting that the immunosuppressive treatment is able to raise the level of sHLA-G, but not sHLA-I, within the time indicated. This could be interpreted as the sHLA-G changes being specifically for this molecule.

Although 2 hours after the administration of the immunosuppressive drugs seem to be a very short time to observe changes, it is notable that at this time significant changes in IL-2 production and calcineurin activity inhibition have been observed in transplanted patients [24]. As the immunosuppressive treatment consisted of a combination of corticosteroids, mycophenolate mofetil, and cyclosporine or tacrolimus, the precise identification of which immunosuppressor agents are responsible for the rise in HLA-G levels and their relevance in clinical transplantation requires further analysis. In this respect, the glucocorticoids that enhance the level of HLA-G transcripts in trophoblast cells [25] may participate in this phenomenon. No data are available on the effect of the calcineurin inhibitors (CsA, FK506) or MMF in sHLA-G levels.

sHLA-G seems to be involved in the induction of tolerance, and several studies have shown that

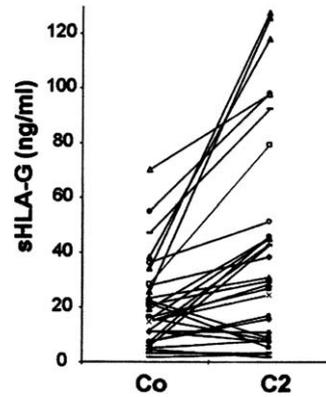


FIGURE 3 Effect of immunosuppressive treatment on sHLA-G serum levels. A significant increase in sHLA-G in serum was observed ( $p < 0.01$ , Student's *t*-test) 2 hours after administration of immunosuppressive dose (C2), compared with predose levels (Co). Patients [T21 (●), T22 (○), T23 (●), T24 (▲), T25 (-), T26 (×), T27 (◇), T28 (□), T29 (◆), T30 (△), T31 (+), T32 (◇), T33 (+), T35 (-), T36 (■), T37 (●)].

$CD4^+CD25^+$  regulatory cells play a role in transplantation tolerance by actively suppressing alloreactive T-cell responses [26]. The fact that there is a decrease in the number of  $CD4^+CD25^+$  T cells in peripheral blood after liver transplantation associated with immunosuppression [27] suggests that the increased expression of sHLA-G upregulated by immunosuppressors drugs could be a compensation mechanism, suppressing allo-reactive T-cell responses and inducing transplantation tolerance, that was broken down due to the decrease in  $CD4^+CD25^+$  regulatory T cells.

Previous studies in trophoblasts, monocytes [28], cutaneous lymphomas [29], and ulcerative colitis have demonstrated that HLA-G can be induced by IL-10 [30]. In our study, it is conceivable that HLA-G expression following heart transplantation reflects a downregulation of the immune response to the graft, in addition to the production of IL-10. Finally, however, we do not know

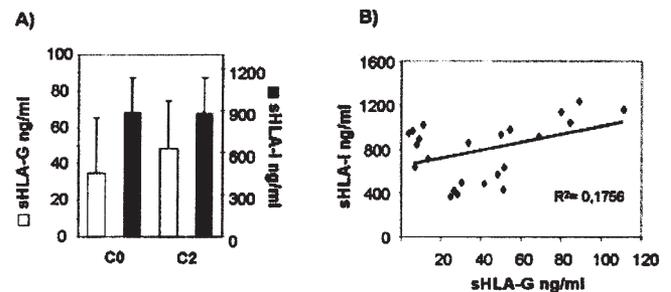


FIGURE 4 (A) Levels of soluble HLA-I and sHLA-G measured in sera of heart transplant patients from Group 2 at 2 hours after the immunosuppressive dose (C2) and predose (C0). (B) Correlation between the levels of sHLA-I and sHLA-G obtained in sera of heart-transplant patients from Group 2.

the causes of differential expression of HLA-G in the different heart-transplanted individuals. This may be related to different factors, such as HLA-G polymorphism [31] and/or the differential susceptibility of the patients to the immunosuppressive treatment.

In summary, this study demonstrates for the first time an association between a rise in sHLA-G levels and the administration of immunosuppressive drugs in heart transplant patients. This suggests that the sHLA-G molecule may participate in the induction of certain levels of immunological tolerance in the host, complementing the action of the immunosuppressive treatment on the immune system. Further studies are required to improve our understanding of the possible implication of sHLA-G in the development of heart transplant patients.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Red Temática Cooperativa de Investigación en Inmunología del Trasplante (Red de grupos G03-104) and Red Temática Cooperativa de Investigación en el Trasplante (Red de grupos C03/03) del FIS from the Spanish Ministry of Health and SAF 2000/0060 from the Ministry of Education.

#### REFERENCES

1. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA: Organ transplantation-how much of the promise has been realized? *Nat Med* 11:605, 2005.
2. Kaufman DB, Shapiro R, Lucey MR, Cherikh WS, Bustami T, Dyke DB: Immunosuppression: practice and trends. *Am J Transplant* 4 Suppl 9:38, 2004.
3. Eisen H, Ross H: Optimizing the immunosuppressive regimen in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 23:S207, 2004.
4. Bradley JA, Gibbs P, Watson C: Update in transplantation. *Clin Transpl* 307, 2003.
5. Thorsby E, Pfeiffer P, Leivestad T: Role of HLA molecules in the induction of alloimmune responses: clinical significance in the cyclosporine era. *Transplant Proc* 36:16S, 2004.
6. Fehr T, Sykes M: Tolerance induction in clinical transplantation. *Transplant Immunol* 13:117, 2004.
7. Starzl TE: Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 Suppl 2:14607, 2004.
8. Oluwole SF, Oluwole OO, Adeyeri AO, DePaz HA: New strategies in immune tolerance induction. *Cell Biochem Biophys* 40:27, 2004.
9. Lemaoult J, Le DM, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, McCluskey J, Carosella ED: Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens* 62:273, 2003.
10. Fournel S, guerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, Bensussan A, Le BP: Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8<sup>+</sup> cells by interacting with CD8. *J Immunol* 164:6100, 2000.
11. Lemaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED: HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7064, 2004.
12. Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, Choppin J, Dausset J, Carosella ED, Kirszenbaum M, Guillet J: A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 33:2355, 2001.
13. Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N, Librach CL: HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* 101:191, 2000.
14. Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED: Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4<sup>+</sup> T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4<sup>+</sup> T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12150, 2001.
15. Creput C, Le Fric G, Bahri R, Amiot L, Charpentier B, Carosella E, Rouas-Freiss N, Durrbach A: Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. *Hum Immunol* 64:1033, 2003.
16. Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C, Fabiani JN, Dausset J, Carosella ED, Carpentier A: Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 105:1949, 2002.
17. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Keck BM, Hertz MI: The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report-2004. *J Heart Lung Transplant* 23:796, 2004.
18. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Weiss EH, Dichgans J, Lochmuller H, Hohlfeld R, Melms A, Weller M: The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain* 126:176, 2003.
19. Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, Taketani Y: Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod* 7:195, 2001.
20. Le Bouteiller P: HLA-G and local placental immunity. *Gynecol Obstet Fertil* 31:782, 2003.
21. Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE, Lopez-Botet M: The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29:277, 1999.
22. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Col-

- onna M, Braud VM, Allan DS, Makadzange A, Rowland-Jones S, Willcox B, Jones EY, van der Merwe PA, Kumagai I, Maenaka K: Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8856, 2003.
23. Vitale C, Pitto A, Benvenuto F, Ponte M, Bellomo R, Frassoni F, Mingari MC, Bacigalupo A, Moretta L: Phenotypic and functional analysis of the HLA-class I-specific inhibitory receptors of natural killer cells isolated from peripheral blood of patients undergoing bone marrow transplantation from matched unrelated donors. *Hematol J* 1:136, 2000.
  24. Brunet M, Millan O, Jimenez O, Campistol JM, Vidal E, Rojo I, Oppenheimer F, Fortuna V, Martorell J: New concepts in cyclosporine pharmacokinetic and dynamic monitoring: the impact of concomitant immunosuppression on target C2 concentrations. *Transplant Proc* 36:437S, 2004.
  25. Moreau P, Faure O, Lefebvre S, Ibrahim EC, O'Brien M, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P: Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. *Transplant Proc* 33:2277, 2001.
  26. Yoshizawa A, Ito A, Li Y, Koshihara T, Sakaguchi S, Wood KJ, Tanaka K: The roles of CD25+CD4+ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 37:37, 2005.
  27. Demirkiran A, Kok A, Kwekkeboom J, Metselaar HJ, Tilanus HW, van der Laan LJ: Decrease of CD4+CD25+ T cells in peripheral blood after liver transplantation: association with immunosuppression. *Transplant Proc* 37:1194, 2005.
  28. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P: IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11:803, 1999.
  29. Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R: HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 99:609, 2002.
  30. Torres MI, Le Discorde M, Lorite P, Rios A, Gassull MA, Gil A, Maldonado J, Dausset J, Carosella ED: Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol* 16:579, 2004.
  31. Rebmann V, van d, V, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, Grosse-Wilde H: Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 57:15, 2001.

Brief communication

## sHLA-G levels in the monitoring of immunosuppressive therapy and rejection following heart transplantation

J. Luque<sup>a,1</sup>, M.I. Torres<sup>b,1</sup>, M.D. Aumente<sup>c</sup>, J.M. Lozano<sup>a</sup>, G. García-Jurado<sup>a</sup>,  
R. González<sup>a</sup>, M.R. Álvarez-López<sup>d</sup>, J.M. Arizón<sup>e</sup>, J. Peña<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Service of Immunology, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain

<sup>b</sup> Department of Experimental Cell Biology, University of Jaen, Spain

<sup>c</sup> Service of Pharmacy, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain

<sup>d</sup> Service of Immunology, Virgen de la Arrixaca Hospital, Murcia, Spain

<sup>e</sup> Service of Cardiology, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain

Received 29 August 2006; accepted 13 September 2006

### Abstract

The aim of this study was to further determine the immediate influence, over a 12-h period, after the initiation of daily immunosuppressive treatment on the serum levels of sHLA-G in heart transplant patients during the post-transplant period (1 month). It was found that there are two patterns of patients in term of the changes observed in their levels of sHLA-G in response to the immunosuppressive treatment. One group (group A) showed no changes on sHLA-G while the other group (group B) a significant rise in sHLA-G levels was observed at 2 to 4 h post dose. Interestingly, it was observed that the patients in group B have better prognosis of acceptance of the heart graft than those of group A. On the other hand it was found that the patients with high levels of sHLA-G ( $77.3 \pm 34.8$  ng/ml) in pre-transplant sera have a better prognosis of acceptance of the heart graft than those with low sHLA-G levels ( $9.7 \pm 7.1$  ng/ml). In conclusion, both the intensity of changes of sHLA-G levels induced by immunosuppression and basal levels in pre-transplant could be used in the monitoring of the immunosuppression as well as the heart transplant evolution.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** sHLA-G; Heart transplantation; Cyclosporine; Tolerance; Immunosuppressive treatment

### 1. Introduction

HLA-G is a non classical major histocompatibility complex class I molecule that immunoregulates effector cells following organ transplantation [1]. Four membrane-bound (HLA-G1, -G2, -G3 and -G4) and three soluble HLA-G (HLA-G5 to -G7) isoforms have been described [2,3]. HLA-G inhibits immune cellular function by interacting with its receptors, KIR2DL4,

ILT-2 and ILT-4 [4,5] which are expressed on NK cells and certain CD4 and CD8 T cells.

Greater levels of HLA-G seem to be associated with better graft acceptance [6–8]. This is probably related to the ability of HLA-G to suppress CD4+ T cell proliferation in response to allogenic stimulation [9,10] and to inhibit both NK cell- and CD8+ T cell-mediated cytotoxicity [11].

Our group has already shown that high levels of sHLA-G in heart transplantation patients are related to a low incidence of acute rejection episodes, confirming previous results obtained by Lila and colleagues [6,12]. Also in the context of heart transplantation, we have demonstrated for the first time the influence of immunosuppressive therapy which rises levels of sHLA-G 2 h after the treatment administration [13], suggesting that post-transplantation therapy could induce sHLA-G and consequently certain level of immunological tolerance.

Immunosuppression following transplantation is a key to the survival of both allograft and heart transplanted patients. Correct

*Abbreviations:* sHLA-G, Soluble human leukocyte antigen-G; MMF, Mycophenolate mofetil; APC, Antigen-presenting cells; CsA, Cyclosporine A; MP, Methylprednisolone; AUC, Area under the concentration-time curve; FK506, Tacrolimus.

\* Corresponding author. Department of Immunology, Reina Sofia University Hospital C/. Menendez Pidal s/n, 14004 Cordoba, Spain. Tel./fax: +34 957 011628.

E-mail address: [fi1pemaj@uco.es](mailto:fi1pemaj@uco.es) (J. Peña).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

Table 1  
Characteristics of the heart transplanted patients

Patients	Treatment	Cause of transplant	Age	Sex	Renal dysfunction
T1	CsA, MMF, MP.	DCM	57	M	No
T2	CsA, Eve, MP.	DCM	51	F	No
T3	CsA, MMF, MP.	IM	40	M	Yes
T4	CsA, MMF, MP.	IM	49	M	Yes
T5	CsA, MMF, MP.	DCM	41	M	No
T6	FK506, MMF, MP.	IDCM	16	M	No
T7	CsA, Eve, MP.	IDCM	30	M	No
T8	CsA, Eve, MP.	DCM	52	F	No
T9	CsA, MMF, MP.	IDCM	60	M	No
T10	CsA, Eve, MP.	IM	52	F	No
T11	CsA, MMF, MP	DCM	50	M	No
T12	CsA, MMF, MP	IDCM	38	M	Yes

IM, Ischemic cardiomyopathy; IDCM, Ideopathic dilated cardiomyopathy; DCM dilatedcardiomyopathy; M/F, Male/female.

monitoring of immunosuppressive drugs administered is essential for adequate immunosuppression and avoidance of toxicity [14], and for have a marked influence on graft outcomes and incidence of acute rejection episodes. Unfortunately, in clinical practice, pre-dose monitoring via blood concentrations is often not a sufficient guide to optimal long-term dosing of these drugs. It is of clinical importance to individualise each patient’s response to drug therapy in order to obtain the best balance between therapeutic efficacy and the incidence of side effects. The current trend in immunosuppressive therapy is thus towards tailoring the therapy according to the needs of the each patient.

**2. Objective**

The aim of this study was to extend our previous results by determining the time and intensity of the changes in sHLA-G levels after the administration of each dose of immunosuppressants. We also wished to clarify whether sHLA-G is capable of protecting against heart graft rejection and whether serum levels of this molecule might be useful in following-up heart transplant evolution.

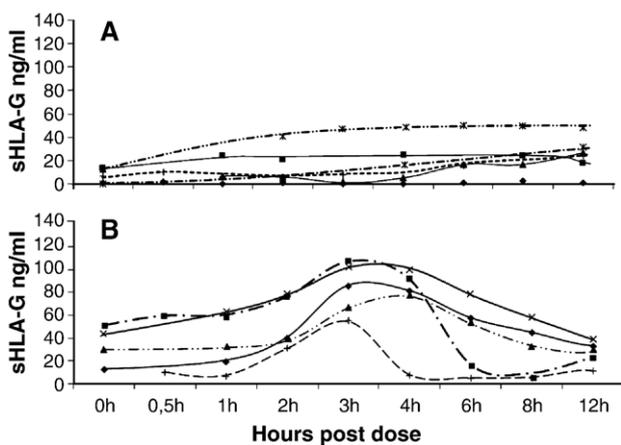


Fig. 1. Serum sHLA-G levels were measured by ELISA after administration of the daily dose of immunosuppressants. Each patient is represented by individual line. Two groups of patients can be distinguished in terms of sHLA-G levels; Group A, in which no changes were observed (Fig. 1.A) and group B, in which a significant sHLA-G increment could be seen (Fig. 1.B).

**3. Methods and patients**

**3.1. Patients**

Twelve heart transplant patients were the subjects of this study (Table 1). Soluble HLA-G was followed up once before transplantation and after daily immunosuppressive therapy in the first month post-transplant. Blood samples were obtained in the course of routine procedures and collected in tubes containing EDTA. Serum samples were stored at -80 °C until determination. All subjects gave their informed consent under the auspices of the appropriate Hospital Research and Ethics Committee.

The occurrence and severity of acute rejection (within a period of 3 months after the transplant operation), was assessed according to the norms of the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT), defined as recurrent acute rejection (several episodes grade ≥3 A) and severe rejection

Table 2  
Pharmacological profile, sHLA-G levels and acute rejection episodes in heart transplanted patients

	Patients	AUC CsA	Clearance rate	Cmax CsA	sHLA-G (ng/ml)	Acute rejection
Group A	T1	6325.2	24.035	1115	3.5	Severe
	T2	4778.3	31.392	1326	20.7	Rec sev <sup>+</sup>
	T3	7051.6	24.817	1188	68.9	No
	T4	5078.81	29.535	1128	8.6	Rec sev <sup>+</sup>
	T5	4375.86	42.773	995	100.1	No
	T9	5764.22	30.307	1115	12.3	No
	T10	6801.6	18.378	1485	3.5	Rec sev <sup>+</sup>
	mean	5739	28.78	1193	31.1	
	SD	1033	7.6	162	38	
Group B	T6*	83.42	35.960	13.1	80.3	No
	T7	2492.71	30.088	1203	59.6	No
	T8	7044.8	35.487	1077	39.74	No
	T11	–	–	–	52.3	No
	T12	10,557.41	21.310	1841	142.4	Severe
	mean	6698	28.9	1373	74.8	
	SD	4011**	7.1**	409**	40.56	

Patients who do not respond (group A) and respond (group B) increasing the sHLA-G levels after immunosuppressive therapy. AUC, ng\_h/ml. Clearance rate, L/h. Cmax, maximum peak of drug concentration for CsA (ng/ml) and FK506 (µg/ml). sHLA-G levels 1 day before transplantation and immunosuppressive treatment was initiated. <sup>+</sup>Recurrent severe acute rejection. \*FK506 used as calcineurin inhibitor but not CsA. \*\*Mean without taking account FK506 value.

(only one episode grade  $\geq 3$  A). Renal function was considered to be normal with a serum creatinine level up to 1.5 mg/dl, as monitored according to standard laboratory methods.

### 3.2. Immunosuppressive therapy and pharmacokinetic analysis

The immunosuppressive treatment consisted of cyclosporine (CsA) or tacrolimus (FK506), methylprednisolone (MP) and mycophenolate mofetil (MMF) or Everolimus (Eve). The immunosuppressive therapy dosage of these patients is fully described in an earlier publication [15]. The true exposure to the drugs was determined by the *Area Under the concentration-time Curve* (AUC) which is known as a marker of total immunosuppressive therapy exposure, previously published [15]. In brief, the linear trapezoidal rule was used to calculate the AUC from 0 h to 12 h. Blood samples for the full AUC<sub>0–12</sub> were drawn predose and at 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 12 h after the morning dose, when steady state was reached (after 3 d on the same dose of CsA). The CsA blood levels were measured by the AxSYM cyclosporine assay (based on fluorescence polarization immunoassay [FPIA] technology). The lower detection limit was 9.8 ng/mL, and the coefficients of variation were 10% at 70 ng/mL ( $n=250$ ), 5.3% at 300 ng/mL ( $n=250$ ), and 7.1% at 600 ng/mL ( $n=230$ ). Blood levels of FK506 were measured by the MEIA immunoassay and analyzed by IMx (Abbott, IL, USA).

### 3.3. Soluble HLA-G analyses

Soluble HLA-G levels were measured by ELISA using the sHLA-G-Kit (Exbio, Czech Republic). Optical densities were measured at 450 nm (SLT, Spectra II, Austria) and sHLA-G concentrations were determined from the optical density value according to standard curves.

### 3.4. Statistics

Data are reported as means  $\pm$  SD. Significant mean differences between patients were determined by Student's *t* test and  $p < 0.05$  was considered as indicative of significance.

## 4. Results

Serum levels of sHLA-G from heart transplant patients were analyzed over a period of 12 h after a single daily administration of immunosuppressive drugs. It was found two patterns of patients in terms of the changes observed in their sHLA-G levels in response to the immunosuppressive treatment. One group (group A) displayed stable low sHLA-G levels (Fig. 1A) in whom no changes were observed,

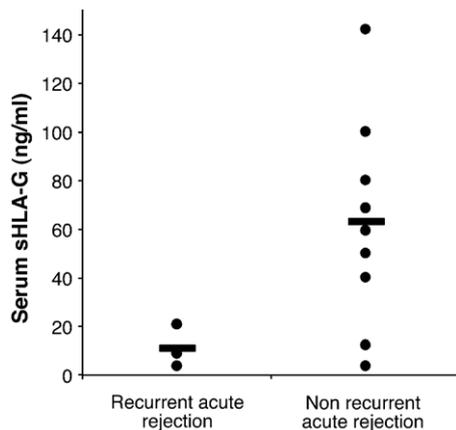


Fig. 2. Serum sHLA-G levels were measured by ELISA 1 day before patients received the heart transplant. Each point represents an individual sHLA-G value and the mean values represented by a line. These patients were classified according to the presence or absence of recurrent acute heart rejection episodes.

while the other group (group B) presented a significant rise in sHLA-G, which rose to twice the basal levels in the interval from 2 to 4 h post dose, falling again to the basal levels at 10 h post dose (Fig. 1B).

Interestingly, none of the group B patients presented recurrent acute rejection episodes, while 42.8% of the members of group A (Table 2), presented recurrent acute rejection during the first 3 months after transplantation, the whole period analyzed in this study.

sHLA-G was also measured as a control parameter in the patients before they received the heart transplants and before the immunosuppressant treatment commenced. It was found that patients can be grouped in those who present high ( $77.3 \pm 34.8$  ng/ml) or low ( $9.7 \pm 7.1$  ng/ml) levels of sHLA-G (Fig. 2). Interestingly, when the relationship between the sHLA-G levels and heart rejection episodes in these patients was analyzed, it was found that only one patient with high serum sHLA-G levels presented recurrent acute rejection, while 60% of the patients with low levels of sHLA-G showed recurrent acute rejection episodes (Table 2 and Fig. 2).

## 5. Discussion

Recent studies have opened up new perspectives on HLA-G in solid organ transplantation [16]. Lila et al. [12] and others, including our group [13], have demonstrated an association between high levels of soluble HLA-G after heart transplantation and a lower frequency of graft rejection episodes. This association is probably related to the capacity of sHLA-G to induce tolerance by modulating the immune system response [1].

The objective of this study was to analyze the influence of immunosuppressive therapy on serum sHLA-G levels during the first month post-transplant. In this period, where immunosuppressive therapy aims essentially at graft survival, our results not only corroborate previous data demonstrating that immunosuppressive therapy is capable of increasing the levels of sHLA-G in certain cases as 2 h after the drug administration [13], but also extends that observation to a longer period of time, from 0 to 12 h post-dose. The increment in sHLA-G we observed, in the present work, lasted from 2 to 5 h post-dose (Fig. 1).

We do not know the direct cause of the increment in sHLA-G. No differences in the mean of CsA absorption measured was found between the two groups, A (AUC = 5739 ng h/ml) and B (AUC = 6698 ng h/ml), however as the peak of sHLA-G observed in group B of patients overlaps (in time) with the maximum blood concentrations of calcineurin inhibitors, we cannot discard an association between serum sHLA-G levels and individual predisposition to these drugs. Due to the erratic absorption profile of MMF, we cannot obtain any conclusion about the effect over HLA-G levels of this drug. Nevertheless, as corticoids are capable of raising sHLA-G levels in vitro [17], these components seem to be involved in the sHLA-G changes observed.

We also observed that all patients who presented high pre-transplant levels of sHLA-G were able to maintain these levels in the post-transplant period, when the immunosuppressive treatment has been implemented. Interestingly enough, these patients did not present recurrent acute rejection, even when therapeutic levels of calcineurin inhibitors (CsA or FK506) were not reached. This suggests that these patients can be treated with smaller doses of calcineurin inhibitors.

The results suggested a more favourable outcome of cardiac transplantation in patients who present high levels of sHLA-G before they receive the transplants and before daily doses of immunosuppressive agents commence. This is the first report of such data, which are in line with previous observations of our group [13] and of Lila et al. [6], indicating that high levels of sHLA-G are associated with better graft acceptance. This phenomenon may be attributable to a direct effect of sHLA-G following transplantation, and may be partially explained by the results recently obtained by Le Rond et al. [18], who showed that certain sHLA-G are able to induce new populations of regulatory/suppressive T cells *in vitro*.

The above findings thus permit us to suggest that measurements of soluble HLA-G serum levels in pre-transplant and after immunosuppressive treatment during the early post-transplant period could be used to monitor transplant patients, providing early predictive information on the prognosis of the graft. In any case, further studies are required in order to improve our understanding of the possible implication of sHLA-G in the outcome of heart transplant patients and the potential application of this molecule in the follow-up of heart transplants.

### Acknowledgements

This study was supported by grants from the Red Temática Cooperativa de Investigación en Inmunología del Trasplante (Red de grupos G03-104) and Red Temática Cooperativa de Investigación en el Trasplante (Red de grupos C03/03) del FIS from the Spanish Ministry of Health.

### References

- [1] Lemaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. *Autoimmun Rev* 2005;4:503–9.
- [2] Lemaoult J, Le DM, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, McCluskey J, et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens* 2003;62:273–84.
- [3] O'Callaghan CA, Bell JI. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev* 1998;163:129–38.
- [4] Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8856–61.
- [5] Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE, Lopez-Botet M. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 1999;29:277–83.
- [6] Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet* 2000;355:2138.
- [7] Creput C, Le FG, Bahri R, Amiot L, Charpentier B, Carosella E, et al. Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver–kidney transplantation: possible implications for monitoring patients. *Hum Immunol* 2003;64:1033–8.
- [8] Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G Expression and Renal Graft Acceptance. *Am J Transplant* 2006;6:2152–6.
- [9] Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 2005;35:1133–42.
- [10] Le RS, Le MJ, Creput C, Menier C, Deschamps M, Le FG, et al. Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. *Eur J Immunol* 2004;34:649–60.
- [11] Fournel S, guerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, Toubert A, et al. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 2000;164:6100–4.
- [12] Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C, Fabiani JN, et al. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation* 2002;105:1949–54.
- [13] Luque J, Torres MI, Aumente MD, Marin J, Garcia-Jurado G, Gonzalez R, et al. Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy. *Hum Immunol* 2006;67:257–63.
- [14] Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003;107:857–63.
- [15] Aumente-Rubio MD, Arizon JM, Lopez Malo MD, Cardenas AM, Segura Saint-Gerons J, Lopez GA, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus in heart transplantation: new strategies of monitoring. *Transplant Proc* 2003;35:1988–91.
- [16] Rouas-Freiss N, Lemaoult J, Moreau P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant* 2003;3:11–6.
- [17] Moreau P, Faure O, Lefebvre S, Ibrahim EC, O'Brien M, Gourand L, et al. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. *Transplant Proc* 2001;33:2277–80.
- [18] Le Rond, Azema C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *J Immunol* 2006;176:3266–76.

EL TRIBUNAL CALIFICADOR DEL  
V PREMIO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN  
Patrocinado por BARCLAYS FUNDACIÓN  
y convocado por esta

*Fundación Ilustre*

*Colegio de Médicos de Córdoba*

La Fundación CMC, a propuesta del Jurado  
Correspondiente, acuerda conceder el  
ACCESIT al trabajo:

**Soluble HLA-G in Heart Transplantation:  
Their Relationship to Rejection episodes and  
Immunosuppressive Therapy**

SIENDO SUS AUTORES:

**J. Luque, M.I. Torres, M.D. Aumente, J. Marín, G. García-  
Jurado, R. González, D. Pascual, N. Guerra, F. López-  
Rubio, M.R. Álvarez-López, J. M. Arizón, and J. Peña.**

Premiado con 2.000 euros.

Publicado en: Human Immunology 67, 257-263 (263) (2.006).  
American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2.006.

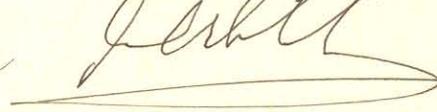
Córdoba, 19 de Diciembre de 2007.

El Presidente,



Fdo. Serafín Romero Agüit

El Presidente del Jurado,



Fdo. Pedro Sánchez Guijo