

LAS CELULAS T REGULADORAS Y SU INFLUENCIA EN LA SOBREVIVENCIA DEL TRASPLANTE RENAL

SONIA Y. VELASQUEZ, LUIS F. GARCIA, CRISTIAM M. ALVAREZ

Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Resumen La respuesta inmune desencadenada frente a un trasplante alógeno conduce usualmente a una respuesta efectora que resulta en el rechazo del aloinjerto; sin embargo, algunos individuos mantienen un trasplante funcionando a largo plazo sin signos de rechazo (tolerancia operacional), aun en ausencia de inmunosupresión. Se ha sugerido que los mismos mecanismos son responsables para la tolerancia hacia antígenos propios y aloantígenos. Uno de estos mecanismos es la regulación inmune y se han identificado varias subpoblaciones de células con propiedades reguladoras. Entre ellas, la población celular mejor caracterizada corresponde a las células T reguladoras (T_{regs}). Aunque las T_{regs} en ratones son $CD4^+CD25^+$, en humanos el fenotipo de las Treg está restringida a las células T CD4 con alta expresión de CD25 ($CD25^{high}$) y del factor de transcripción Foxp3. El análisis fenotípico y funcional de las células T reguladoras o supresoras circulantes en pacientes trasplantados tal vez sea útil para la detección de pacientes tolerantes operacionales. Además, una futura manipulación *in vitro* de estas células con fines terapéuticos podría conducir a lograr la inducción de tolerancia *in vivo* en el trasplante clínico. Aquí, revisamos la evidencia experimental y clínica del papel de las células reguladoras en la biología del trasplante.

Palabras clave: trasplante renal, rechazo de injerto, inmunosupresión, tolerancia al trasplante, tolerancia inmune, linfocitos T

Abstract *Regulatory T cells and their influence in kidney allograft survival.* The immune response elicited by an allogenic transplant usually leads to an effector response resulting in allograft rejection; however, some individuals maintain a long-term functioning transplant without signs of rejection (operational tolerance) even in the absence of immunosuppression. It has been suggested that the same mechanisms are responsible for tolerance to self-antigens and alloantigens. One of such mechanisms is immune regulation and several cell subsets with regulatory properties have been identified. Among them, the best characterized cell populations are the regulatory T cells (T_{reg}). Although T_{reg} in mice are $CD4^+CD25^+$, in humans the T_{reg} phenotype is restricted to CD4 T cells with high expression of CD25 ($CD25^{high}$) and Foxp3. Phenotypic and functional analysis of circulating regulatory or suppressor T cells in transplant patients may be useful for detection of operationally tolerant patients. Moreover, future *in vitro* manipulation of these cells with therapeutic purposes could lead to accomplish induction of *in vivo* tolerance in clinical transplantation. Herein, we review the experimental and clinical evidence for the role of regulatory cells in transplant biology.

Key words: kidney transplantation, graft rejection, immunosuppression, transplantation tolerance, immune tolerance, T-lymphocytes

Estado actual del trasplante renal

El trasplante renal es la solución terapéutica de uso más frecuente en pacientes que presentan enfermedad renal terminal, una serie de enfermedades de amplia distribución a nivel mundial que conducen a la pérdida lenta, progresiva e irreversible de la función renal. Los trata-

mientos para la enfermedad renal terminal son la terapia de reemplazo (diálisis peritoneal y hemodiálisis) y el trasplante renal. Sin embargo, los pacientes que reciben un trasplante tienen una mejor calidad de vida respecto a aquellos que permanecen en diálisis¹.

El progreso en las técnicas quirúrgicas, los avances en los criterios inmunológicos de selección de la pareja donante-receptor, el diseño de fármacos inmunosupresores más eficaces para el manejo clínico de los pacientes trasplantados, la introducción de nuevas técnicas para el seguimiento clínico, así como un conocimiento más detallado de los eventos inmunológicos que tienen lugar cuando un individuo recibe un aloinjerto (trasplante realizado entre individuos de la misma especie, pero

Recibido: 19-I-2007

Aceptado: 5-VI-2007

Dirección postal: Dr Cristian M. Alvarez, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Fax: +57 4 210 6455 e-mail: cristianma@medicina.udea.edu.co

genéticamente diferentes), han hecho posible avanzar de manera significativa en el manejo del trasplante². Sin embargo, aún hay problemas importantes por resolver: 1) las altas tasas de sobrevida de aloinjertos en los primeros años post-trasplante no siempre se correlacionan con las tasas de sobrevida a largo plazo, 2) a pesar del uso de inmunosupresión, el rechazo agudo continúa siendo una causa de pérdida temprana del injerto, 3) las complicaciones de la terapia inmunosupresora son numerosas, principalmente las infecciones, las neoplasias y las complicaciones cardiovasculares, y 4) el rechazo crónico continúa siendo la principal causa de pérdida irreversible a largo plazo del órgano trasplantado³.

Por estas razones se ha planteado como meta del trasplante clínico en humanos la inducción de tolerancia inmunológica al aloinjerto, con el objetivo de disminuir el uso crónico de los inmunosupresores o incluso en la medida de lo posible, prescindir de ellos. Estudios en las últimas décadas de individuos trasplantados con función estable a largo plazo sin evidencia o signos de rechazo, y en ausencia o con dosis mínimas de inmunosupresión, han permitido establecer que la sobrevida a largo plazo en estos pacientes puede ser debida a tolerancia inmunológica⁴. Estos pacientes se han definido como tolerantes operacionales y se ha propuesto que en ellos la interacción de diversos mecanismos inmunológicos podría explicar la ausencia de rechazo⁵.

El objetivo de esta revisión es brindar una aproximación teórica a los eventos inmunológicos que tienen lugar cuando un individuo recibe un trasplante, así como realizar una descripción de los mecanismos de regulación inmune, particularmente de las células T reguladoras CD4⁺CD25^{high} y su influencia en el mantenimiento de la sobrevida de aloinjertos.

Respuesta inmune hacia el aloinjerto

El reconocimiento de aloantígenos, como los productos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), designados HLA en humanos, es el principal responsable de inducir una respuesta inmune celular y humoral frente al aloinjerto. Sin embargo, otros mecanismos no inmunes que pueden tener influencia sobre el rechazo incluyen la isquemia prolongada, la manipulación quirúrgica y el daño por reperfusión^{6, 7}.

Inicialmente, como consecuencia del trauma asociado a la isquemia y al procedimiento quirúrgico, se promueve en el órgano una condición inflamatoria multifactorial e independiente de antígeno, que puede facilitar la inducción del rechazo del órgano. Los efectos de la isquemia-reperfusión sobre el aloinjerto se evidencian principalmente a corto plazo e inducen la activación del endotelio, aumento en la permeabilidad y en la expresión de moléculas de adhesión⁸.

En las primeras etapas de la respuesta alógena, las células dendríticas (DC) del donante presentes en el injerto entran a la circulación del receptor, migran hasta el bazo y allí presentan los antígenos del donante a las células T del receptor. Este evento, sumado al aumento en la expresión de selectinas específicas en las células del injerto (E-selectinas), como producto de la reacción inflamatoria que se desencadena tras el proceso de extracción y almacenamiento del órgano, conduce a un aumento en la expresión de quimioquinas y moléculas de adhesión "in situ" que facilitan el tráfico de células T expandidas y activadas hasta el injerto⁹. El reconocimiento de los aloantígenos del injerto y de las células presentadoras de antígeno (APCs), por células T del receptor ocurre por tres vías diferentes. En la vía directa de alorreconocimiento, las células T del receptor a través de su TCR reconocen directamente complejos MHC-péptidos en las DC del donante residentes en el tejido trasplantado, que han migrado hasta el bazo del receptor y que constituyen un potente estímulo para las células T¹⁰. En esta vía, los aloantígenos MHC de clase I son reconocidos por células T CD8⁺, y los aloantígenos MHC de clase II son reconocidos por células T CD4⁺¹¹. En la vía indirecta, los aloantígenos MHC de clase I y clase II, que se encuentran como antígenos solubles circulantes o se liberan por daño del injerto, son procesados y presentados por las APCs del receptor como péptidos extraños en el contexto de las moléculas MHC clase II, a células T CD4⁺ del receptor en el bazo^{12, 13}. La tercera vía propuesta, la vía semidirecta, funcionaría como enlace entre las vías directa e indirecta¹⁴. En esta vía, las DC del receptor adquieren y presentan moléculas intactas MHC clase I del donante, capaces de estimular a células T CD8⁺ y a la vez pueden procesar y presentar moléculas MHC del donante, como péptidos, en moléculas MHC clase II a células T CD4⁺¹⁵ (Fig. 1).

Como resultado de la exposición a aloantígenos y después de la activación por parte de APCs, las células T CD4⁺ antígeno específicas se diferencian en células efectoras especializadas en la producción de diferentes citoquinas y con capacidad citotóxica. Las células T CD4⁺ o ayudadoras, cuya principal función es producir citoquinas que permitan la proliferación y activación de las células efectoras, pueden diferenciarse en tres subtipos: células Th1, Th2 y Th17¹⁶. Las principales citoquinas producidas por las células Th1 son interferón gamma (IFN- γ), interleuquina (IL)-2, IL-15 y factor de necrosis tumoral (TNF- β) y su secreción induce la fase efectora de la inmunidad celular, principalmente por activación de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y macrófagos. Las células Th2 producen citoquinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, las cuales son críticas en la inducción de la inmunidad humoral y en la aparición de la eosinofilia¹⁷. De otra parte, las recientemente caracterizadas células Th17 representan una única subpoblación de células T CD4⁺

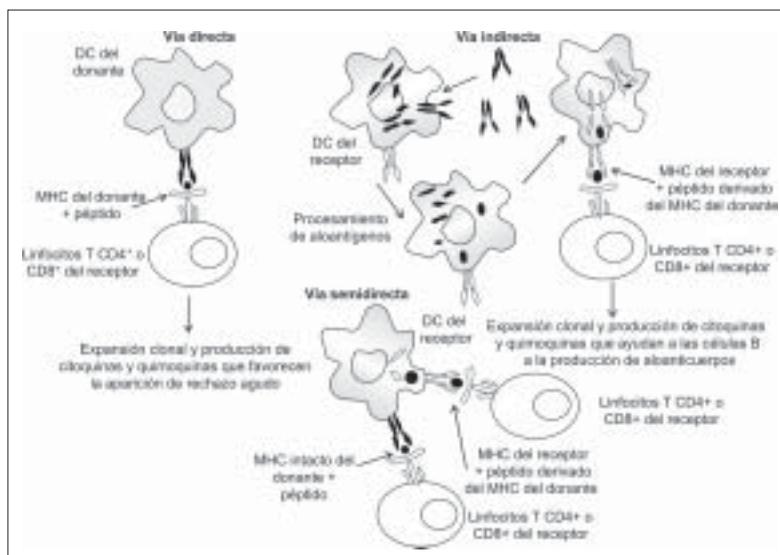


Fig. 1.— Vías de alorreconocimiento. Las células T del receptor a través de su receptor celular T (TCR) reconocen complejos MHC-péptidos mediante tres vías distintas. En la vía directa, los aloantígenos MHC de clase I y II son reconocidos por células T CD8⁺ y T CD4⁺, respectivamente. En la vía indirecta, los aloantígenos MHC solubles son reconocidos por células T CD4⁺ del receptor, como péptidos extraños presentados por APCs en moléculas MHC de clase II. En la vía semidirecta, las DC del receptor adquieren y presentan moléculas intactas MHC clase I del donante que estimulan a células T CD8⁺ y a la vez procesan y presentan moléculas MHC del donante, como péptidos, en moléculas MHC clase II que son reconocidos por células T CD4⁺.

productoras de IL-17, regulada por IL-23 y distinta de las subpoblaciones Th1 y Th2. La IL-17, una citoquina proinflamatoria, facilita la activación de las células T y estimula fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células epiteliales para producir múltiples mediadores proinflamatorios, incluyendo IL-1, IL-6, TNF- α , NOS-2, metaloproteasas y quimioquinas, resultando en la inducción de inflamación¹⁸. Existe un proceso de regulación cruzada entre las citoquinas Th1, Th2 y Th17, de tal modo que el IFN- γ secretado por las Th1, inhibe la diferenciación de las células Th2 y Th17. Similarmente, la IL-4 secretada por las Th2, inhibe la diferenciación de las células Th1 y Th17, mientras que la IL-23 induce selectivamente la expansión de células productoras de IL-17 (Th17) y no de las subpoblaciones Th1 y Th2^{19,20}. Se ha sugerido que los factores que pueden direccionar esta diferenciación son el entorno local de citoquinas, la dosis de antígeno, la afinidad por el antígeno, los haplotipos del MHC, el tipo de DC (1 o 2), la acción de otras APCs diferentes a las DC y el tipo de ligando para el CD28 (CD80 o CD86)²¹⁻²⁴.

Una vez activadas, las células T funcionan sinérgicamente con células del sistema inmune innato para rechazar el aloinjerto a través de: (1) citotoxicidad de células T dependientes de contacto, mediante la vía perforina/granzima (en células T CD8⁺ y células NK) y la

interacción Fas/FasL (en células T CD4⁺); (2) activación de macrófagos mediada por citoquinas tipo Th1 como IFN- γ y TNF- α ; (3) producción de aloanticuerpos específicos por las células B; y (4) secreción de citoquinas proinflamatorias por células estromales y macrófagos, mediada por las células Th17^{6, 25}.

De acuerdo a los mecanismos predominantes, en la fase efectora del alorreconocimiento se han descrito diferentes tipos de rechazo. El rechazo más inmediato del aloinjerto, denominado rechazo hiperagudo, ocurre en los primeros minutos u horas postrasplante como consecuencia de anticuerpos preformados contra aloantígenos de grupos sanguíneos, endotelio, algunos determinantes de carbohidratos específicos de especie o antígenos HLA (estos últimos por un contacto previo a través de transfusiones, embarazos u otros trasplantes) que activan rápidamente el sistema del complemento y la cascada de coagulación produciendo la lisis de la célula blanco y trombosis arteriolar^{26, 27}. El otro tipo de rechazo que puede ocurrir en los primeros días postrasplante se conoce como rechazo acelerado. Este rechazo es causado por anticuerpos no fijadores de complemento, que generan una respuesta de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK y macrófagos²⁸.

El rechazo agudo, por su parte, puede presentarse en las primeras semanas o meses postrasplante como resultado del reconocimiento alógeno mediado por las células T CD4⁺ y CD8⁺²⁹. Otro tipo de rechazo que puede presentarse después de meses o años postrasplante es el rechazo crónico, el cual se desarrolla a través de vías no muy conocidas e involucra aloinmunidad hacia el injerto mediada por células T y por anticuerpos³⁰. Además, los injertos pueden ser lesionados crónicamente por mecanismos no inmunes, tales como medicamentos, isquemia, envejecimiento o enfermedad parenquimal de novo o recurrente, así como episodios de rechazo agudo tratados inadecuadamente; sin embargo, una definición estricta de rechazo crónico excluye a tales mecanismos. Lo más importante para resaltar de este tipo de rechazo es que se trata de un deterioro gradual de la función del injerto que conduce a una falla tardía del injerto y no puede revertirse con inmunosupresión³¹.

Inmunosupresión y limitantes en el trasplante renal

Para evitar o revertir el rechazo, las estrategias utilizadas en la práctica clínica y en los modelos experimentales incluyen el uso de diversas drogas inmunosupresoras como análogos de nucleótidos (azatioprina y micofenolato mofetil), inhibidores de la calcineurina (ciclosporina, tacrolimus), esteroides (glucocorticoides) y anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra diferentes marcadores de superficie del linfocito (CD3, CD52, CD25, CD40L, CTLA-4). Estos medicamentos inhiben la fase de activación y proliferación de linfocitos T mediante la reducción, la desviación del tráfico de linfocitos y/o el bloqueo de las vías de activación del linfocito T³².

Los agentes inmunosupresores empleados actualmente en la práctica clínica no son específicos y por lo tanto no distinguen entre una respuesta inmune benéfica contra agentes infecciosos y una respuesta inmune destructiva contra el injerto. Esto hace que resulten muy efectivos a corto plazo disminuyendo la incidencia y severidad del rechazo agudo e incrementando la supervivencia de los aloinjertos. Sin embargo, no son eficaces en el tratamiento del rechazo crónico y generan efectos secundarios como la vasculopatía asociada al trasplante (nefropatía crónica del aloinjerto) producto de la toxicidad de los medicamentos y principalmente, una mayor susceptibilidad a infecciones y cáncer^{33, 34}.

Tolerancia en trasplantes

El objetivo más importante en inmunología de trasplantes es inducir tolerancia específica para el donante que

permita la supervivencia del injerto a largo plazo sin inmunosupresión farmacológica. La tolerancia inmunológica se define como la ausencia de respuesta efectora frente a un antígeno específico (propio o extraño), inducida por un contacto previo con dicho antígeno³⁵.

La tolerancia puede ser central o periférica. En la inducción de la tolerancia central se eliminan en el timo los linfocitos autorreactivos mediante un proceso de delección clonal. La tolerancia periférica hace que los linfocitos T maduros, que reconocen antígenos propios en los tejidos periféricos, se tornen incapaces de responder a exposiciones posteriores a estos autoantígenos³⁶. Los mecanismos de tolerancia periférica que se conocen son: 1) la anergia o inactivación funcional de células T por ausencia en la producción de IL-2, de la respuesta dependiente de IL-2 y/o coestimulación ineficiente³⁷, 2) la delección clonal o eliminación de linfocitos T mediante muerte celular inducida por activación conocida también como "clonal exhausting"³⁸, 3) la desviación inmune, un mecanismo que involucra un predominio de los productos inmunorreguladores de los linfocitos Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), en lugar de los productos proinflamatorios de los linfocitos Th1 (IL-2, IFN- γ , IL-15 e IL-18)³⁹ y 4) la regulación inmunológica, la cual implica la supresión de la activación linfocítica y de las funciones efectoras por células reguladoras⁴⁰.

Se ha establecido que los mecanismos inmunológicos que intervienen en la inducción de tolerancia hacia un aloinjerto son básicamente los mismos que mantienen la tolerancia hacia los antígenos propios. Sin embargo, una diferencia importante radica en la alta frecuencia de células T alorreactivas en el repertorio general y en la ausencia de delección tímica de las células T alorreactivas en humanos. Por esto, la interacción de los mecanismos extratímicos parece ser el factor más importante en la aceptación del injerto a largo plazo, y entre ellos la regulación inmunológica parece ser uno de los mecanismos predominantes⁴¹.

En trasplantes de órganos y tejidos, la tolerancia se define como el mantenimiento a largo plazo de la función del aloinjerto, en ausencia de rechazo y sin inmunosupresión. Este fenómeno ha podido establecerse exitosamente en modelos animales, pero aún constituye una meta evasiva en humanos. Por tal motivo, se ha establecido el término de "tolerancia clínica parcial" para explicar el mantenimiento de la función estable del trasplante en algunos pacientes, en ausencia o con dosis mínimas de inmunosupresión⁴². En estos pacientes, la inducción de tolerancia clínica parcial depende del grado de compatibilidad HLA, el tratamiento previo de los receptores con transfusiones específicas de donante, trasplantes de médula ósea, irradiación corporal total o irradiación linfocítica total, o uso de terapias inductoras con drogas inmunosupresoras⁵.

Regulación inmunológica: el nuevo paradigma

La regulación inmune constituye un mecanismo clave para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune, tanto para el establecimiento de la tolerancia hacia antígenos propios y evitar los fenómenos de enfermedades autoinmunes, como para la modulación de la respuesta inmune hacia antígenos extraños. Las células reguladoras son las principales mediadoras de este mecanismo y se definen funcionalmente como células que inhiben la respuesta inmune al modular la actividad de otros tipos celulares, entre ellos linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, APCs, macrófagos y células NK⁴³.

El concepto de “células T supresoras” fue introducido en los años 70 cuando Gerhson y Kondo reportaron que algunas células estimuladas con antígeno eran capaces de inducir tolerancia después de ser transferidas a ratones vírgenes. Kilswal, Brent y Pinto definieron el papel de estas células en el contexto de la tolerancia al trasplante en ratones. Sin embargo, en los años 80 la dificultad para trasladar a los modelos *in vitro* el fenómeno de supresión evidenciado *in vivo*, impidió llegar a un consenso respecto a la validez de las observaciones y fue solo hacia mediados de la década del 90 cuando varios grupos se interesaron nuevamente en estudiar estas poblaciones celulares⁴⁴. Estudios funcionales *in vivo*, realizados por Sakaguchi et al., permitieron establecer que la tiroiditis autoinmune presente en ratones timectomizados a la edad de tres días, se debía a la ausencia de poblaciones de células T CD4⁺CD25⁺⁴⁵.

La relevancia de esta población para los trasplantes fue demostrada en ratones con trasplantes de médula ósea, gracias al hallazgo de que estas mismas células atenuaban la enfermedad injerto contra hospedero (GVHD) y transmitían tolerancia^{46,47}. Graca et al. presentaron evidencias de que la tolerancia estaba mediada de una manera activa por células T CD4⁺ y requiere una exposición continua al antígeno^{48,49}.

Además de las células T reguladoras (T_{regs}) CD4⁺CD25⁺, que han sido las más estudiadas en el contexto del trasplante, se han descrito varias poblaciones con diferentes fenotipos de superficie celular, y en algunos casos con diferentes mecanismos de acción, entre ellas las células CD4⁺ Tr1, CD4⁺ Th3, CD8⁺CD28⁻, CD4⁺CD28⁻, CD3⁺CD4⁺CD8⁻, NKT, T_H17 y DC tipo 2⁵⁰⁻⁵².

La subpoblación de células T CD4⁺ -T_{regs} naturales surge durante el desarrollo de células T en el timo y se caracteriza por la expresión constitutiva de la cadena α del receptor de IL-2, el CD25⁴⁵. Estas células exhiben también otros marcadores de superficie como CD45RB, CTLA-4, GITR (receptor relacionado con la familia de receptores del TNF inducido por glucocorticoides), CD122, CD103 (integrina $\alpha_E\beta_7$), CD134 (OX40) y CD62L

(L-selectina), cuyos niveles de expresión relativa fueron usados inicialmente para definir y aislar las T_{regs} CD4⁺CD25⁺. En la actualidad ninguna de tales moléculas representa por sí sola un marcador definitivo para las T_{regs} naturales, pues estas moléculas también son expresadas en otras subpoblaciones de células T CD4⁺, particularmente células T activadas⁵³. Recientemente, el análisis de la expresión del gen Foxp3, que codifica para el factor de transcripción “Scurfin”, lo ha situado como un gen regulador del desarrollo y función de las células T_{regs} y por tanto como un marcador muy útil para identificar esta subpoblación, considerando la expresión simultánea del CD25⁵⁴. Sin embargo, se ha demostrado que su expresión, aunque predominantemente alta en células T_{regs} CD4⁺CD25⁺ naturales, también puede detectarse a muy bajos niveles en células T CD4⁺ y CD8⁺ totales⁵⁵, incluyendo a células CD4⁺CD25⁺ inducidas por aloantígenos y subpoblaciones de células T CD8⁺CD28⁻, con propiedades reguladoras⁵⁶.

Se ha descrito una segunda subpoblación de células T CD4⁺ denominada como T_{regs} adaptativas, la cual se genera durante el curso de una respuesta inmune normal y expresa igualmente el CD25, pero de manera variable. Tal subpoblación incluye a su vez dos subpoblaciones similares, denominadas Th3 y Tr1, las cuales difieren en la secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL-10 respectivamente y pueden generarse por acción de las T_{regs} CD4⁺CD25⁺ sobre las células CD4⁺CD25⁻⁵⁷.

Las células T CD8⁺CD28⁻ son denominadas por algunos autores como “células supresoras” para distinguirlas de las T_{regs} T CD4⁺CD25⁺ (naturales o adaptativas). Estas células T CD8⁺ carecen de actividad citotóxica, son FOXP3⁺, están restringidas por moléculas MHC clase I y son capaces de tolerizar APCs profesionales como DC, y APCs no profesionales como células endoteliales⁵⁸. Su actividad supresora es mediada por contacto directo con las APCs, sobre las cuales se regulan positivamente los receptores inhibitorios de transcritos tipo inmunoglobulina (ILT)-3 e ILT-4 y se regula negativamente la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86⁴³. Varios estudios en pacientes trasplantados de corazón demuestran un incremento progresivo en el porcentaje de células T CD8⁺CD28⁻CD27⁺ Perforina⁺, en los pacientes libres de rechazo⁵⁹. Adicionalmente, se ha descrito que estas células exhiben un fenotipo regulador en un modelo de enfermedad autoinmune en ratones⁶⁰.

En relación con las células NKT, éstas constituyen una sublinaje conservado de células T con propiedades únicas que incluyen: reactividad hacia antígenos lipídicos presentados a través de la molécula CD1d, expresión de una cadena α invariante del TCR y requerimientos para la selección tímica diferentes a las células T convencionales⁶¹. Estas células expresan moléculas coestimuladoras

como CD40L y producen citoquinas como IFN- γ e IL-12, que conducen a la activación de DC y al direccionamiento de las respuestas hacia un patrón tipo Th1. Sin embargo, las células NKT también pueden producir citoquinas tipo Th2 como IL-4, IL-10 e IL-13 después de la estimulación, por lo cual serían capaces de modular diversas respuestas inmunes y procesos patogénicos, especialmente a través de la inducción de DC con propiedades reguladoras y productoras de IL-10, la cual a su vez es esencial para la generación de células T CD4 reguladoras⁶².

Se ha sugerido que las células NKT podrían estar involucradas en la tolerancia hacia aloinjertos mediante la producción de IL-10, debido a sus efectos antiinflamatorios y supresores en la mayoría de células hematopoyéticas⁶³, y a través del bloqueo de moléculas coestimuladoras requeridas para la activación de las células T como CD28/B7 y LFA-1/ICAM-1⁶⁴. Además, se ha descrito recientemente su papel regulador de la homeostasis de la célula T en la enfermedad GVHD⁶⁵.

Las células T $\gamma\delta$ se han postulado como importantes poblaciones reguladoras en tejidos epiteliales, que modulan negativamente la repuesta de células T $\alpha\beta$. Aunque los mecanismos de regulación no son claros, los análisis de expresión génica en las células T $\gamma\delta$ revelan que expresan altos niveles de RNA mensajero para quimoquinas como RANTES (CCL5), MIP1 α (CCL3), MIP1 β (CCL4) y linfotactina (XCL1), y además expresan altos niveles de efectores citolíticos como granzima A, granzima B, Fas ligando (CD95L) y linfotoxina⁶⁶.

Se ha propuesto que las células T $\gamma\delta$ podrían regular las respuestas inmunes sistémicas, principalmente al inducir la citólisis de células efectoras, mediante la activación de su receptor NKG2D tras el reconocimiento de moléculas como RAE1 y/o MICA en células activadas. Igualmente, al promover la citólisis de células T $\alpha\beta$ Fas⁺ (CD95) gracias a su alta expresión de Fas ligando.

La contribución de las citoquinas producidas por las células T $\gamma\delta$ murinas aún no es clara, pero se ha descrito que a nivel clonal las respuestas pueden ser tipo Th1 o Th2. El predominio de citoquinas tipo Th1, como IFN- γ , favorecería la expresión de FASL y de quimoquinas, como la proteína 10 inducible con IFN (IP10; CXCL10), en las células T $\gamma\delta$, mientras que la producción de citoquinas Th2 como IL-4 e IL-10 permitiría inhibir las acciones de linfocitos T citotóxicos (CTL) y células NK. Las células T $\gamma\delta$ también pueden producir timosina- β 4 (T- β 4) y factor de crecimiento queratinocítico (KGF), los cuales podrían contribuir a la reparación del injerto⁶⁷. Aunque varios modelos murinos han demostrado el papel regulador de las células T $\gamma\delta$ en cáncer y enfermedades autoinmunes e infecciosas, en trasplantes poco se ha investigado su posible intervención.

Células T_{regs} CD4⁺CD25^{high}: las principales protagonistas

Uno de los aportes más importantes para el conocimiento actual de la función de las células T supresoras o reguladoras fue el de Nishizuka y Sakakura y Penhale et al, con el cual se evidenció cómo en ciertas cepas de ratones timectomizados al tercer día de vida que presentaban un síndrome de tiroiditis autoinmune, era posible prevenir el síndrome al restituirlos con células T CD4⁺CD25⁺⁴⁴. Posteriormente, Sakaguchi et al. demostraron que después de la transferencia adoptiva de células T depletadas de las subpoblaciones CD4⁺CD25⁺ en ratones inmunodeficientes, era posible la inducción de varias enfermedades autoinmunes órgano-específicas, entre ellas diabetes mellitus dependiente de insulina, tiroiditis y gastritis. Estos estudios permitieron proponer a las células T CD4⁺CD25⁺ como un componente importante para la generación y el mantenimiento de la tolerancia hacia antígenos propios en ratones^{68, 69}.

Estudios posteriores mostraron que en ratones las células CD4⁺CD25⁺ representan entre un 5-10% del total de las células T CD4, son anérgicas, tienen efectos supresores sobre células T CD4⁺CD25⁻ *in vitro*, la supresión no constituye una variación de los patrones de citoquinas conocidos y a pesar de que expresan la cadena α del receptor de IL-2, no requieren de esta citoquina^{70, 71}.

El aislamiento, identificación y caracterización en humanos de las poblaciones de células T CD4⁺CD25⁺ circulantes, mediante experimentos *in vitro* similares a los realizados con las células T CD4⁺CD25⁺ de ratones, ha revelado que en sangre periférica, en lugar de una única subpoblación de células T CD4⁺CD25⁺, existen poblaciones circulantes de células CD4⁺CD25^{high} o CD4⁺CD25⁺⁺, capaces de suprimir la proliferación de células CD4⁺CD25⁻, y células no reguladoras CD4⁺CD25^{low} que representan, respectivamente, 1-2% y hasta 16% del total de las células T CD4⁺^{72, 73}. Las células CD4⁺CD25^{low}, definidas también como células CD4⁺CD25⁺, son más similares a las subpoblaciones CD4⁺CD25⁻ que a las células reguladoras CD4⁺CD25^{high}, dado que la subpoblación CD4⁺CD25⁺ no es homogénea, e incluye linfocitos CD4⁺ activados a partir de la subpoblación CD4⁺CD25⁻ e incluso un pequeño número de células T_{regs} CD4⁺CD25⁺⁺^{74, 75}.

En ratones, se ha determinado que las células T_{regs} naturales se desarrollan en el timo, ejercen sus funciones inmunosupresoras a través de un mecanismo dependiente del contacto célula-célula e independiente de citoquinas y se encuentran predominantemente en los órganos linfoides. Su efecto sobre otras células T, directa o indirectamente, se presenta a través de modificaciones de las APCs que pueden resultar en la regulación

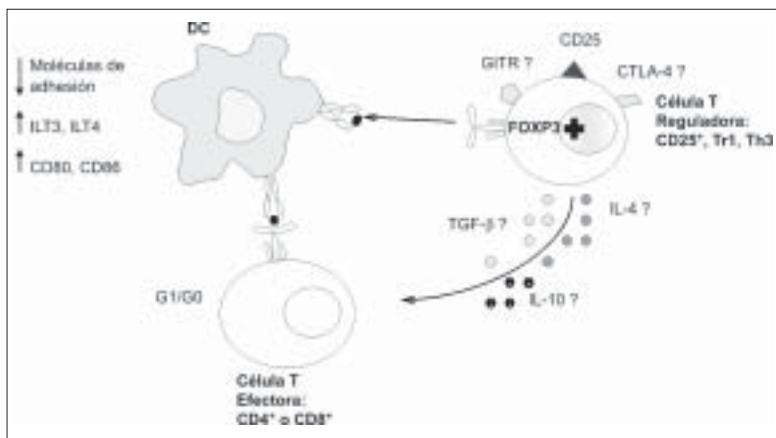


Fig. 2.– Control de las respuestas de células efectoras por las células T reguladoras. Aunque los mecanismos moleculares por los cuales las células reguladoras ejercen su función todavía están sujetas a estudio y son algo controversiales, los mecanismos sugeridos para las células T reguladoras incluyen: supresión vía mediadores solubles como citoquinas (IL-4, IL-10 y TGF-β), contacto célula-célula (activación a través del TCR y expresión de GITR, CTLA-4 y FOXP3) y modificación de las APCs (expresión baja de moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión, y expresión alta de moléculas inhibitoras ILT3 e ILT4).

negativa de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) o moléculas de adhesión, inhibición de la producción y secreción de citoquinas. Así mismo, las modificaciones en las APCs pueden promover anergia, eliminación de la población efectora al promover la muerte celular y conversión de células T efectoras al fenotipo regulador, para que puedan actuar cooperativamente, propagando y reforzando un estado de tolerancia en períodos post-trasplante^{50, 76}. Otro de los rasgos distintivos de las T_{regs} CD4⁺CD25⁺ naturales es su habilidad para inhibir la proliferación de otras poblaciones de células T mediante el contacto célula-célula, después de ser activadas a través de su TCR, lo cual resulta en inhibición de la producción de IL-2⁵⁰. Este mecanismo no involucra la muerte de estas células y es independiente de IL-4, IL-10 y TGF-β. Las células T CD4⁺CD25⁺ no previenen la activación inicial de las células T respondedoras, de manera que estas últimas sufren una detención del ciclo celular en el estado G₀/G₁ y no proliferan^{76, 77} (Fig. 2).

Las células T_{regs} poseen un TCR altamente diverso, por lo cual son potencialmente capaces de reconocer un gran número de antígenos, y adicionalmente presentan alta afinidad hacia los antígenos propios. Durante su generación tímica requieren la combinación de fuertes señales antigénicas para la unión del TCR, así como una máxima coestimulación, de modo que cuando migran a los tejidos periféricos son completamente funcionales. En contraste, el desarrollo en periferia de las células T_{regs} puede ser facilitado por señales transductoras del TCR alteradas o por baja afinidad hacia antígenos. Esta característica es determinante para que estas células no

sean funcionales sin una activación posterior, por exposición repetida a antígenos, tal como ocurre durante una infección crónica, un trasplante de órganos, o por el uso de algunas terapias inmunomoduladoras. Estos eventos contribuyen a la adquisición de un repertorio diverso y expandido como consecuencia de reactividades cruzadas fortuitas con proteínas extrañas⁷⁶. Además, algunos trabajos recientes con células T CD4⁺CD25⁺ humanas, sin discriminar entre subpoblaciones CD4⁺CD25^{low} y CD4⁺CD25^{high}, han encontrado que comparten un repertorio complejo y similar al de las células CD4⁺CD25⁺, y que esto ocurre tanto en las poblaciones circulantes como en las del timo^{78, 79}.

Los primeros reportes de la actividad alorreguladora de las células CD4⁺CD25⁺ murinas, corresponden a observaciones realizadas en cultivos mixtos de linfocitos. En estos experimentos, las células CD4⁺CD25⁺ fueron activadas por células estimuladoras alogénicas y regularon la proliferación de células respondedoras de un tercero no relacionado, indicando que no se requiere de la compatibilidad MHC entre las células reguladoras y efectoras para que ocurra la regulación⁸⁰. En modelos animales, se ha evidenciado también que las células T CD4⁺ provenientes de receptores de injertos con supervida a largo plazo pueden transferir tolerancia; fenómeno denominado como tolerancia infecciosa que ha facilitado el entendimiento de la tolerancia a aloinjertos y el papel de la regulación inmune en modelos *in vivo*^{81, 82}. Del mismo modo, Graca et al. demostraron en un modelo murino la presencia de células T reguladoras en los aloinjertos tolerantes. Este hallazgo fortaleció la idea de

que la actividad supresora de estas células no solo estaba limitada a los tejidos donde están presentes los antígenos blanco⁸³.

En modelos murinos hay numerosas evidencias del papel crítico de las células T reguladoras en la tolerancia a aloinjertos. En un modelo de trasplante de piel y trasplante de médula ósea en ratones quiméricos se ha demostrado que las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, obtenidas a partir de ratones vírgenes, o a partir de ratones tolerizados mediante tratamiento con anticuerpos no depletantes que promueven quimerismo, pueden prevenir el rechazo de aloinjertos de piel aún sin especificidad hacia los antígenos del donante⁸⁴. Igualmente, en otro modelo de aloinjerto cardíaco o aloinjerto de piel bajo incompatibilidad en el MHC clase II, se ha demostrado que la depleción de células T CD25^{high} disminuye la sobrevivencia de los aloinjertos y conduce al rechazo de los aloinjertos, en cada caso respectivamente⁸⁵.

Teniendo en cuenta que los diversos trabajos realizados en modelos murinos han permitido establecer un papel esencial de las células reguladoras en el establecimiento e inducción de la tolerancia hacia aloinjertos, se ha propuesto que la aceptación de trasplantes en humanos también está asociada con la regulación inmunológica y que algunas de estas poblaciones celulares podrían influir en el curso del trasplante y la aceptación a largo plazo. En el seguimiento pos-trasplante de pacientes con aloinjerto renal se ha detectado, a partir del tercer mes, la presencia de células con el fenotipo CD4⁺CD25⁺ totales capaces de persistir por algunos años a pesar del uso de inmunosupresión convencional. Este hallazgo ha permitido proponer la existencia de una población de células CD4⁺CD25⁺ específicas de antígeno que estaría suprimiendo la respuesta a los aloantígenos⁸⁶. Adicionalmente, el estudio a largo plazo de poblaciones periféricas de células CD4⁺CD25⁺ totales ha pretendido evaluar la utilidad de esta población como un marcador del estado de tolerancia inmunológica; y aunque el número absoluto de células CD4⁺CD25⁺ no permite diferenciar pacientes con rechazo agudo de quienes no lo presentan, una disminución en número de esta población sí podría estar relacionada con la aparición de tales procesos⁸⁷.

Mediante citometría de flujo, nuestro grupo ha podido evidenciar que los pacientes sobrevivientes a largo plazo al trasplante renal tienen un porcentaje incrementado de células T CD4⁺CD25⁺ totales circulantes comparativamente con pacientes con trasplante renal en proceso de rechazo crónico, pacientes en diálisis o pacientes con sobrevivencia del aloinjerto a corto plazo. Además, en los pacientes sobrevivientes a largo plazo, estas células exhiben marcadores de activación, lo cual es concordante con el requerimiento de activación de estas células para

ser funcionales. Este hallazgo sugiere que el mantenimiento de la función del trasplante podría ser el resultado de un fenómeno de supresión inmune activa en la periferia que determina el no rechazo del trasplante y por lo tanto ejerce un efecto protector⁸⁸. Otro estudio que ha contrastado la expresión de FOXP3 y la presencia de células T CD4⁺CD25^{high} en pacientes trasplantados renales con rechazo crónico y con tolerancia operacional libre de drogas, ha demostrado que los pacientes con rechazo crónico tienen menos células T CD4⁺CD25^{high} y ausencia de transcritos FOXP3 en comparación con pacientes tolerantes e individuos sanos. Estos hallazgos sugieren que, aunque la tolerancia operacional en los pacientes no pudo ser atribuida a un incremento en las células T CD4⁺CD25^{high} y en los transcritos FOXP3, una reducción en los pacientes con rechazo crónico permite proponer que la tolerancia clínica operacional puede deberse a un fenómeno de tolerancia natural, que está ausente en estos pacientes⁸⁹.

A pesar de estos hallazgos interesantes, algunos de los cuales no discriminaron entre las subpoblaciones CD4⁺CD25^{low} y CD4⁺CD25^{high}, aún no es completamente claro si la presencia de poblaciones de células reguladoras en el trasplante clínico podrá emplearse como un marcador para tolerancia a nivel clínico y si podrán superarse las diversas limitaciones del trabajo en humanos. Además, serían muchas las consideraciones éticas que conllevaría pasar de la evaluación de estas poblaciones en sangre a los tejidos, en los cuales estarían directamente ejerciendo su actividad supresora y cuya caracterización podría revelar de manera más segura el establecimiento de tolerancia clínica⁹⁰.

¿Son clínicamente relevantes las células T_{reg} CD4⁺CD25^{high}?

Aunque hasta el momento los progresos en el área de la inmunología de los trasplantes son numerosos, varios problemas permanecen sin resolver en torno al diseño racional de fármacos inmunosupresores y nuevas formas de inducir tolerancia en humanos. En la actualidad el concepto de que las poblaciones de células reguladoras son determinantes para mantener la homeostasis de la respuesta inmune es de gran aceptación entre inmunólogos. El desafío seguirá siendo entender los mecanismos involucrados en la regulación inmune y hallar una forma segura de manipular estas poblaciones para aumentar su número y actividad en los pacientes trasplantados, permitiendo así trasladar protocolos de tolerancia desde modelos animales hasta una fórmula efectiva en humanos, disminuyendo la posibilidad de rechazo y mejorando la calidad de vida del paciente trasplantado.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología (Bogotá, Colombia) (Proyecto N° 2128).

Bibliografía

- Opelz G, Bujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 334-42.
- Tilney N. Transplantation and its biology: from fantasy to routine. *J Appl Physiol* 2000; 89: 1681-9.
- Lechler R, Sykes M, Thomson A, Turka L. Organ Transplantation –how much of the promise has been realized? *Nat Med* 2005; 11: 605-13.
- Simpson E. Reminiscences of Sir Peter Medawar: In hope of antigen-specific transplantation tolerance. *Am J Transplant* 2004; 4: 1937-40.
- Cortesini R, Suciú-Foca N. The concept of “partial” clinical tolerance. *Transpl Immunol* 2004; 13: 101-4.
- Sykes M, Auchincloss Jr. H, Sachs D. Transplantation Immunology. In: William E. Paul (ed). *Fundamental Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003, p 1481-592.
- Rogers N, Lechler R. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001; 1: 97-102.
- Borosa P, Bromberg JS. New Cellular and Molecular Immune Pathways in Ischemia/Reperfusion Injury. *Am J Transplant* 2006; 6: 652-8.
- Dorling A, Lechler R. The passenger leukocyte, dendritic cell and antigen-presenting cell (APC). In: Tilney NL, Strom TB and Paul LC (eds). *Transplantation Biology, Cellular and Molecular aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p 355-79.
- Game D, Lechler R. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2002; 10: 101-8.
- Gould D, Auchincloss H. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol today* 1999; 20: 77-82.
- Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, et al. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest* 1996; 98: 1150-7.
- Benichou G, Valujskikh A, Heer P. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol* 1999; 162: 352-8.
- Herrera O, Golshayan D, Tibbott R, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173: 4828-37.
- Jiang S, Herrera O, Lechler R. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 550-7.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 139-46.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6: 1123-32.
- Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6: 1133-41.
- Montaner LJ, da Silva RP, Sun J, et al. Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: Differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 1999; 162: 4606-13.
- Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 329-34.
- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O’Garra A, Murphy KM. Development of T_H1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-9.
- Aseffa A, Gumy A, Launois P, MacDonald HR, Louis JA, Tacchini-Cottier F. The Early IL-4 Response to Leishmania major and the Resulting Th2 Cell Maturation Steering Progressive Disease in BALB/c Mice Are Subject to the Control of Regulatory CD4+CD25+ T Cells. *J Immunol* 2002; 169: 3232-41.
- Maggi E, Parronchi P, Maneti R, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992; 148: 2142-7.
- Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10188-92.
- Antonyshamy MA, Fanslow WC, Fu F, et al. Evidence for a Role of IL-17 in Alloimmunity: A Novel IL-17 Antagonist Promotes Heart Graft Survival. *Transplant Proc* 1999; 31: 93.
- Baldwin WM, Pruitt SK, Brauer RB, Daha MR, Sanfilippo F. Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury and rejection. *Transplantation* 1995; 59: 797-808.
- Cai J, Terasaki PI. Incidence and role of antibody in graft injury: How can it best be monitored? *Transplantat Rev* 2004; 18: 192-203.
- Campbell PM. Pathology of acute rejection in the renal allograft. *ASHI Quarterly Scientific Communications* 2004; 86-90.
- Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler R. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol* 2001; 167: 7199-206.
- Joosten SA, Sijpkens YWJ, Kooten Cv, Paul LC. Chronic rejection in renal transplantation. *Transplant Rev* 2004; 18: 86-95.
- Halloran P. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2715-29.
- Vincenti F. Immunosuppression minimization: current and future trends in transplant immunosuppression. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1940-8.
- Hricik DE, Heeger PS. Minimization of immunosuppression in kidney transplantation. *Transplantation* 2001; 72: S32-5.
- Dong VM, Womer KL, Sayegh MH. Transplantation tolerance: The concept and its applicability. *Pediatr Transplantation* 2003; 3: 181-92.
- Charlton B, Auchincloss H, Fathman G. Mechanism of transplantation tolerance. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 707-34.
- Schwartz R. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2002; 21: 305-34.
- Sprent J, and H. Kishimoto. The thymus and central tolerance. *Transplantation* 2001; 72: S25-8.
- Waaga AM, Gasser M, Kist-van Holthe JE, et al. Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopepti-

- de-specific Th2 clones in vivo. *J Clin Invest* 2001; 107: 909-16.
40. Jiang H, Chess L. An integrated model of immunoregulation mediated by regulatory T cell subsets. *Adv Immunol* 2004; 83: 253-88.
 41. Lechler R, Garden O, Turka L. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 147-58.
 42. Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol* 2004; 13: 117-30.
 43. Jiang S, Lechler RI. Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity. *Am J Transplant* 2003; 3: 516-24.
 44. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 531-62.
 45. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.
 46. Johnson BD, Becker EE, LaBelle JL, Truitt RL. Role of Immunoregulatory Donor T Cells in Suppression of Graft-Versus-Host Disease Following Donor Leukocyte Infusion Therapy. *J Immunol* 1999; 163: 6479-87.
 47. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99: 3493-9.
 48. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 2002; 168: 5558-65.
 49. Chen TC, Cobbold SP, Fairchild PJ, Waldmann H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J Immunol* 2004; 172: 5900-7.
 50. Wood K, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210.
 51. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: Distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323-7.
 52. Orabona C, Puccetti P, Vacca C, et al. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 2006; 107: 2846-54.
 53. Shevach E. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 389-400.
 54. Fontenot, JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-6.
 55. Walker M, Kaspirowicz D, Gersuk V, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ t cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 1437-43.
 56. Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, et al. Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and antigen specific CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺CD28⁻ T suppressor cells. *Hum Immunol* 2004; 65: 1297-306.
 57. Bluestone J, Abbas A. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253-7.
 58. Filaci G, Fravega M, Negrini S, et al. Nonantigen specific CD8⁺ T suppressor lymphocytes originate from CD8⁺CD28⁻ T cells and inhibit both T-Cell proliferation and CTL function. *Hum Immunol* 2004; 65: 142-56.
 59. Colovai AI, Mirza M, Vlad G, et al. Regulatory CD8⁺CD28⁻ T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 2003; 64: 31-7.
 60. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, et al. Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 2003; 112: 1037-48.
 61. Godfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; 21: 573-83.
 62. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005; 26: 877-900.
 63. Sonoda KH, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J. NKT cell-derived IL-12 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol* 2001; 166: 42-50.
 64. Seino K, Fukao K, Muramoto K, et al. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2577-81.
 65. Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, et al. Stimulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates Acute Graft-versus-Host Disease by inducing Th2 polarization of donor T Cells. *J Immunol* 2005, 174: 551-6.
 66. Hayday A, Tigela R. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 233-42.
 67. Carding S, Egan Paul. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 336-45.
 68. Sakaguchi, S, Fukuma K, Kuribayashi K, Msuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 1985; 161: 72-87.
 69. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184: 387-96.
 70. Chen TC, Cobbold SP, Fairchild PJ, Waldmann H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J Immunol* 2004; 172: 5900-7.
 71. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 162: 5317-26.
 72. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1303-10.
 73. Fai Ng W, Duggan P, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, et al. Human CD4⁺CD25⁺ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; 98: 2736-44.
 74. Baecher-Allan C, Brown J, Freeman G, Hafler D. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167: 1245-53.
 75. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler D. Inhibition of human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell function. *J Immunol* 2002; 169: 6210-7.
 76. Bach J. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 189-98.
 77. Lee IV MK, Moore DJ, Jarrett BP, et al. Promotion of allograft survival by CD4⁺Cd25⁺ regulatory T cells: evidence for in vivo inhibition of effector cell proliferation. *J Immunol* 2004; 172: 6539-44.
 78. Kasow K, Chen X, Knowles J, Wichlan D, Handgretinger R, Riberdy J. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells share equally complex and comparable repertoires with CD4⁺CD25⁻ counterparts. *J Immunol* 2004; 172: 6123-8.

79. Fujishima M, Hirokawa M, Fujishima N, Sawada K. TCR $\alpha\beta$ repertoire diversity of human naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Immunol Lett* 2005; 99: 193-7.
80. Oluwole OO, DePaz HA, Adeyeri AO, Jin MX, Hardy MA, Oluwole SF. Role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from naive host thymus in the induction of acquired transplant tolerance by immunization with allo-major histocompatibility complex peptide. *Transplantation* 2003; 75: 1136-42.
81. Hall BM, Fava L, Chen J, et al. Anti-CD4 monoclonal antibody-induced tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts maintained by CD4⁺ suppressor T cells that are not dependent upon IL-4. *J Immunol* 1998; 161: 5147-56.
82. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168: 1080-6.
83. Graca L, Cobbold S, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002; 12: 1641-6.
84. Graca L, Le Moine A, Lin CY, Fairchild PJ, Cobbold SP, Waldmann H. Donor-specific transplantation tolerance: the paradoxical behavior of CD4⁺CD25⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10122-6.
85. Benghiat FS, Graca L, Braun MY, et al. Critical influence of natural regulatory CD25⁺ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression. *Transplantation* 2005; 79: 648-54.
86. Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25⁺ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1643-51.
87. Satoh S, Linuma M, Mitsumori K, et al. The number of peripheral CD4⁺CD25⁺ cells and early postoperative episodes in renal transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34: 1755-6.
88. Alvarez C, Paris S, Arango L, Arbeláez M, García LF. Kidney transplant patients with long-term graft survival have altered expression of molecules associated with T-cell activation. *Transplantation* 2004; 78: 1541-7.
89. Louis S, Braudeau C, Giral M, et al. Contrasting CD25^{high}CD4⁺ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 398-407.
90. Newell K, Larsen C. Tolerance assays: measuring the unknown. *Transplantation* 2006; 81: 1503-9.

El principal descubrimiento que nos ha traído este siglo de investigación y ciencia es probablemente la profundidad de nuestra ignorancia de la naturaleza. Cuanto más sabemos, más nos damos cuenta de la magnitud de esta ignorancia. Es esto en sí una gran novedad... Durante mucho tiempo se ha pretendido comprender de qué manera funcionaban las cosas. O simplemente se han contado historias para tapar agujeros. Ahora que hemos comenzado a estudiar seriamente la naturaleza, no podemos por menos que percibir la amplitud de los problemas y medir la distancia que hay que recorrer para intentar darles respuestas. El gran peligro de la humanidad no es el desarrollo del saber. Es la ignorancia.

François Jacob (Premio Nobel 1965)

El ratón, la mosca y el hombre. Barcelona: Crítica, 1998, pp 194-5