

PRESENTE Y FUTURO DE LA TERAPIA INMUNOSUPRESORA

ELSIE M. EUGUI

Roche Bioscience, Palo Alto, California, USA

Resumen Las drogas inmunosupresoras han hecho posible los trasplantes de órganos entre individuos con diferentes antígenos de histocompatibilidad (HLA), que son normalmente rechazados mediante la respuesta inmune del huésped. Los trasplantes de órganos vitales han permitido prolongar la supervivencia de pacientes con enfermedades terminales, y este procedimiento se ha hecho rutina debido principalmente al adelanto en la terapéutica inmunosupresora. Algunas de estas drogas, como glucocorticoides y azatioprina, han sido utilizadas desde hace 30 años, pero recientemente nuevos agentes terapéuticos, con una relación más favorable entre eficacia y toxicidad, se han agregado a la batería de tratamientos inmunosupresores. El conocimiento más detallado del proceso de activación de los linfocitos T del huésped, responsables del rechazo agudo en respuesta a la estimulación por los antígenos de histocompatibilidad del dador, ha facilitado el desarrollo de nuevos agentes más específicos, capaces de bloquear esta respuesta inmune a diferentes niveles. Esto permite también utilizar combinaciones de drogas y/o anticuerpos, de manera de potenciar la inhibición y reducir los efectos adversos. Estos nuevos agentes terapéuticos incluyen inhibidores de calcineurina, inhibidores de la síntesis de purinas, inhibidor de kinasas, y anticuerpos monoclonales que bloquean señales de activación en los linfocitos T, o señales co-estimuladoras. En esta revisión se describe el mecanismo de acción de las drogas más frecuentemente utilizadas. También están siendo exploradas nuevas estrategias con el objeto de facilitar el desarrollo de tolerancia inmunológica. Los adelantos en este tipo de tratamiento, aunque todavía a nivel experimental, ofrecen alternativas prometedoras para estos pacientes. Se discuten posibles tratamientos combinados de drogas y anticuerpos que tienden a facilitar el desarrollo de tolerancia.

Abstract *The present and future of immunosuppressive therapy.* Immunosuppressive drugs make possible the acceptance of organ allografts among individuals with differences in Major Histocompatibility Antigens (HLA). Transplantation of vital organs prolongs the survival of patients with terminal diseases, and this procedure has become a routine practice in the clinic, mainly because of advances in immunosuppressive therapy. Some immunosuppressive drugs, such as glucocorticosteroids and azathioprine, have been used for the past 30 years. More recently, newly discovered agents with a better ratio of efficacy to toxicity have been added to the armamentarium of anti-rejection therapies. Progress in understanding T cell activation in response to alloantigens has contributed to the development of new and more selective strategies to control the immune response and prevent acute rejection. The use of drugs in combination, with or without monoclonal antibodies, has also improved the efficacy and reduced the toxicity of immunosuppressive therapies. The new agents include drugs that interfere with calcineurin, inhibitors of *de novo* purine biosynthesis, kinase inhibitors, as well as monoclonal antibodies that block activation signals on the surface of T cells or co-stimulatory signals between T cells and antigen-presenting cells. In this review the modes of action of commonly used immunosuppressive drugs are described. Successful new strategies are also being developed to establish tolerance to allografts in rodents and non-human primates. The progress in these approaches, although still in the experimental stages, offers promising alternatives for these patients in the future. Treatment protocols using combinations of drugs with antibodies that might produce tolerance in humans are also discussed.

Key words: allografts, immunosuppressive drugs, organ transplants

Los trasplantes de órganos que comenzaron a realizarse en la práctica clínica alrededor de 30 años atrás, se hicieron posibles gracias al avance en el desarrollo de drogas inmunosupresoras (IS) para prevenir el rechazo agudo. Fue dentro de este contexto que los estudios más sistemáticos sobre drogas IS se llevaron a cabo. Es por esta razón que, para hacer una revisión de la evolución de este tipo de tratamiento, parece lo más apropiado hacerlo dentro del progreso realizado en el área de los trasplantes de órganos.

piado hacerlo dentro del progreso realizado en el área de los trasplantes de órganos.

Abreviaturas:

ACTA	apoptosis de células T activadas	GTP	guanosina trifosfato
ADA	adenosina deaminasa	IMPDH	inosina monofosfato dehidrogenasa
AZA	azatioprina	IS	inmunosupresión
CMV	citomegalovirus	MMF	micofenolato mofetil (CellCept)
CPA	células presentadoras de antígeno	MPA	ácido micofenólico
CsA	ciclosporina A	6-MP	6 mercaptopurina
ET-1	endotelina-1	MTX	metotrexato
FK506	Tacrolimus, Prograf	NFAT	factor de transcripción nuclear
GC	glucocorticoides	RAPA	Rapamycin, Sirolimus

Dirección postal: Dr. Elsie Eugui, Roche Bioscience, Palo Alto, CA, USA
 Fax: (650) 855-6301 E-mail: elsie.eugui@roche.com

Los primeros trasplantes fueron posibles en base al tratamiento con esteroides y azotioprina. Aunque estas drogas son relativamente eficaces, las altas dosis que se requieren para prevenir el rechazo agudo están asociadas con efectos tóxicos muy serios. La introducción de la ciclosporina A (CsA) al final de la década de los 70, fue un paso importante en el camino de la terapéutica IS. El uso de la CsA como droga IS hizo posible la prolongación de la supervivencia de los trasplantes de riñón, corazón, hígado y otros órganos, que actualmente se realizan como procedimientos de rutina en la práctica clínica. A pesar del adelanto que significó la introducción de CsA, los efectos tóxicos de la misma, en particular su nefrotoxicidad, hicieron evidente la necesidad de nuevas drogas IS que tuvieran un mecanismo de acción diferente y una relación entre efecto terapéutico y toxicidad más favorable. Este fue el motivo por el cual en 1982 comenzamos en *Syntex* nuestro programa de investigación con el objeto de descubrir y desarrollar nuevas drogas IS, el cual culminó con el desarrollo clínico de CellCept®. Recientes avances en la inmunología experimental han facilitado el conocimiento a nivel molecular del proceso de activación de los linfocitos T, en respuesta a la estimulación por parte de un órgano o tejido extraño. Este proceso de activación juega un papel central en el mecanismo de rechazo, y su conocimiento ha permitido identificar blancos de ataque para el diseño de nuevas estrategias inmunosupresoras, basadas en el bloqueo en diferentes estadios de esta activación. En esta revisión se describe en primer lugar el mecanismo de activación de los linfocitos T en respuesta a la estimulación con un tejido alogeneico, con el fin de ubicar el sitio de acción de las drogas utilizadas. En segundo lugar, se resume el mecanismo de acción de las drogas IS utilizadas actualmente, con énfasis en el desarrollo de micofenolato mofetil (MMF, CellCept®), que es el resultado de nuestras investigaciones. Por último, se describen los nuevos adelantos en el desarrollo de tolerancia a los aloinjertos, que hacen prever la posibilidad de que en un futuro no muy lejano, sea posible facilitar la aceptación de un órgano o tejido injertado sin necesidad de IS permanente.

Activación de los linfocitos T

La respuesta inmune contra un tejido u órgano extraño trasplantado, se inicia cuando los linfocitos T del receptor de dicho injerto, reconocen los antígenos de histocompatibilidad (HLA) del donante, que le son presentados por las células presentadoras de antígeno (CPA, células dendríticas y macrófagos). Los linfocitos T reconocen al antígeno mediante el receptor para el antígeno que está asociado con el complejo CD3¹⁻³. Esta interacción inicial entre los linfocitos T y las CPA (señal

1), desencadena una serie de cambios bioquímicos que resultan en la activación de otras moléculas accesorias presentes en la membrana de estos dos tipos de células. Las señales co-estimuladoras (señal 2) son emitidas por distintos pares de receptores presentes en la membrana celular de los linfocitos T, con sus respectivos ligandos que se expresan sobre las CPA. Estos pares de moléculas incluyen CD28:B7.1 (CD80), CD28:B7.2 (CD86), LFA-1:ICAM-1 y CD40:CD40L (CD154)⁴⁻⁸. La activación de las señales 1 y 2 resulta en el envío al interior de la célula de varios mensajes que son transmitidos por intermedio de quinasas, fosfatasa y factores de transcripción nuclear, que incluye entre otros NFAT^{9, 10}. Estos a su vez inducen la producción de citocinas como la IL-2, IL-4 e IFN- γ . Como resultado de las señales 1 y 2, las células T pasan del estado de reposo al de activación, y de aquí a los distintos estadios del ciclo celular que culmina en mitosis. En este proceso, la 3ra señal emitida por las citocinas es fundamental para la proliferación de las células T y la expansión de clones de linfocitos que reconocen el antígeno¹¹. Estos clones de linfocitos T activados son los principales responsables del rechazo agudo del órgano trasplantado. Las drogas IS que se están utilizando actualmente, y las nuevas estrategias que se están desarrollando, están basadas en el bloqueo en algún punto de este complejo proceso de activación de las células T. Seguidamente describiré brevemente las más importantes de las drogas IS, su principal mecanismo de acción y la toxicidad correspondiente. La Tabla 1 presenta una lista de las drogas IS utilizadas actualmente en la prevención del rechazo de los trasplantes de órganos, agrupadas de acuerdo a su mecanismo de acción.

Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) fueron los primeros compuestos que se utilizaron para la prevención del rechazo agudo y para prolongar la supervivencia de los injertos de órganos. Los GC se unen a un receptor nuclear que inhibe la transcripción de varios genes¹². Su principal modo de acción se debe a que disminuyen la producción de citocinas y el factor de transcripción nuclear NFAT. También inhiben la expresión de los antígenos de histocompatibilidad y la presentación del antígeno. Otros efectos de los GC son ejercidos después de la transcripción, como por ejemplo, disminuyendo la estabilidad del ARN mensajero para la IL-1 β ¹³. Los efectos tóxicos de los GC son numerosos y bien conocidos. Basta mencionar que producen efectos metabólicos (diabetes mellitus, hiperlipidemia, obesidad), osteoporosis, glaucoma, hipertensión, y a dosis elevadas, aumento en la susceptibilidad a las infecciones. Actualmente los GC son utilizados en combinación con otras drogas IS en la preven-

TABLA 1.- Mecanismo de acción de las drogas inmunosupresoras

Principal mecanismo de acción	Droga	Blanco
1. Regulación de la expresión de genes	Glucocorticoides	Receptor de glucocorticoides
2. Alkilación	Ciclofosfamida	ADN
3. Inhibidores de kinasas y fosfatasa	Ciclosporina A	Calcineurina, JNK/p38 kinasas
	Tacrolimus	Calcineurina, JNK/p38 kinasas
	Rapamycin	Kinasas de ciclinas
	Inhibidores de fosfodiesterasa de tipo IV	Fosfodiesterasa (PDE) tipo IV
	Inhibidores de kinasa p38	Kinasa p38
4. Inhibición de la síntesis <i>de novo</i> de purinas	Azatioprina	Varias enzimas
	Micofenolato mofetil (MMF)	IMPDH
	Mizoribine	IMPDH
	Metotrexato	Varias enzimas
5. Inhibición de la síntesis <i>de novo</i> de pirimidinas	Leflunomide	DHOD
	Brequinar	DHOD
	Metotrexato	Timidilato sintetasa

PDE - fosfodiesterasa de AMP cíclico
 IMPDH - dehidrogenasa de inosina-5'-monofosfato
 DHOD - dehidrogenasa de dehidro-orotato

ción y el tratamiento de rechazo alógeno agudo, y como parte del régimen de mantenimiento inmunosupresor en los pacientes con trasplantes.

Azatioprina (AZA)

Fue primero descubierta como droga antileucémica¹⁴. Es un precursor de 6-mercaptopurina (6-MP), que en 1959 se demostró que inhibe la formación de anticuerpos contra glóbulos rojos heterólogos¹⁵, y poco más tarde, que prolonga la supervivencia de injertos de piel¹⁶. Durante los años siguientes varios investigadores encontraron que AZA retardaba el rechazo de los trasplantes alógenos y Murray¹⁷ (1963) utilizó por primera vez AZA para prolongar la supervivencia de injertos de riñón en humanos. AZA fue la primera droga IS cuyo modo de acción se basa en inhibición de la síntesis de purinas¹⁸. *In vivo*, AZA es convertida en 6-MP, que a su vez es metabolizada a ácido 6-tioinosínico, un inhibidor de varias enzimas de la síntesis de purinas. Es por este motivo que AZA no es selectiva sino que afecta la proliferación de muchos otros tipos de células, además de los linfocitos T. Debido a su falta de selectividad, afecta también la proliferación de precursores en la médula ósea, y en dosis cercanas a la dosis terapéutica, puede producir supresión de la médula ósea. Por otra parte, una inhibición indiscriminada de

la síntesis de ribonucleótidos de purinas puede producir hepatotoxicidad. Un metabolito de AZA, tioguanosina, es incorporado en el ADN en la forma de un nucleótido fraudulento¹⁴. De esta manera AZA puede ser mutagénica¹⁹. Otras manifestaciones tóxicas resultantes del uso de esta droga incluyen efectos gastrointestinales, reacciones de hipersensibilidad, alopecia, nefritis intersticial, neumonía y enfermedades malignas. La combinación de esteroides con AZA se utilizó como tratamiento de rutina para prolongar la supervivencia de injertos de órganos en humanos hasta que se introdujo la CsA.

Ciclosporina A (Sandimmune[®])

Ciclosporina A (CsA) fue descubierta por Borel en 1976²⁰. Se trata de un undecapéptido lipofílico aislado de un hongo (*Tolypocladium inflatum Gams*). CsA comenzó a utilizarse para prevenir el rechazo agudo mucho antes de conocer su modo de acción. Kronke y colaboradores²¹ en 1984 demostraron que CsA bloquea la expresión del gen de IL-2 en los linfocitos T activados. Liu y colaboradores²² establecieron en 1991 que el complejo formado cuando CsA se une a su receptor citoplasmático, ciclofilina, inhibe la actividad de una fosfatasa que se conoce como calcineurina. Esta inhibición impide la defosforilación y translocación del factor de transcripción nuclear, NFAT, que es responsable de la iniciación

TABLA 2.— Mecanismos involucrados en la toxicidad de ciclosporina A

Acción	Efectos
1. Aumenta la acción de la enzima que activa ET-1, aumentando su producción	Hipertensión sistémica Vasoconstricción renal Disminución de la filtración glomerular
2. Induce apoptosis de las células epiteliales del túbulo renal	Pérdida de las células que tapizan los túbulos renales
3. Aumenta la producción de TGF- β , que induce la expresión de genes de procolágeno	Fibrosis tubulointersticial

de la transcripción de varios genes que codifican para la síntesis de IL-2, IL-4 y CD40L. La transcripción de estos genes es el resultado de la activación de los linfocitos T. Es por esta razón que la CsA se clasifica como un inhibidor de calcineurina. Recientemente se ha comprobado que la CsA bloquea también la vía de activación de dos kinasas, JNK y p38, que son otras señales activadas como consecuencia del reconocimiento del antígeno por las células T²³. La presencia de dos blancos simultáneos en el mecanismo de acción de CsA, hace que esta droga tenga una mayor selectividad sobre los linfocitos T.

Recientes estudios también han ayudado a esclarecer los mecanismos de la toxicidad, particularmente sobre el riñón, que son producidos por esta droga (Tabla 2). Los efectos hemodinámicos de la CsA incluyen vasoconstricción y disminución de la filtración glomerular²⁴ además de hipertensión²⁵. Estos efectos son reversibles y relacionados con la dosis. Endotelina-1 (ET-1), un péptido mitogénico vasopresor, ha sido implicado en estos efectos. Se ha demostrado que CsA aumenta la acción de la enzima que activa la ET-1, y esto resulta en un incremento en la producción de ET-1 por las células endoteliales²⁶. Se cree que ET-1 contribuye a la vasculopatía asociada con los trasplantes y al rechazo crónico; inhibidores de la producción de ET-1 prolongan la sobrevida de aloinjertos de corazón en ratas, en ausencia de inmunosupresión²⁷. El tratamiento con CsA también puede llevar al desarrollo de fibrosis tubulointersticial en el riñón, un efecto asociado con aumento de la expresión de TGF- β que es un factor fibrogénico muy potente²⁸. TGF- β es también un factor que promueve la invasión de células tumorales y formación de metástasis. Hojo y col.²⁹ han sugerido que CsA podría facilitar la progresión de tumores debido a un aumento en la producción de TGF- β . Por otra parte, también se ha demostrado que CsA aumenta la expresión

de genes pro-apoptóticos en el riñón, como son p53, Bax y FasL, mientras que disminuye la expresión de otros genes anti-apoptóticos como Bcl-2³⁰. A pesar de estos efectos adversos serios, CsA es una droga IS muy potente que ha contribuido enormemente a la prolongación de la sobrevida de los órganos trasplantados durante las últimas dos décadas, y que continúa siendo utilizada en combinación con otras drogas IS. La reciente aplicación de nuevas drogas IS hace que sea posible disminuir la dosis de CsA, y con ello su toxicidad, en los tratamientos actuales para prevenir el rechazo de los aloinjertos.

Micofenolato Mofetil (MMF, CellCept®)

Las drogas descritas en las secciones precedentes eran los únicos tratamientos IS disponibles para prevenir el rechazo de los trasplantes de órganos cuando comenzamos nuestro programa en Syntex en el año 1982. La necesidad de nuevas drogas IS, mas selectivas y con una relación mas favorable entre IS y toxicidad era obvia. La estrategia propuesta por AC. Allison se basó en observaciones en niños con una deficiencia hereditaria en adenosina deaminasa (ADA), una enzima importante en la vía *de novo* de síntesis de purinas, quienes padecen de una inmunodeficiencia combinada severa, de tipo celular y humoral³¹. Por otra parte, niños que carecen de hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa, una enzima en la vía de rescate de la síntesis de purinas, padecen de una deficiencia mental y metabólica (síndrome de Lesch Nyhan), pero las funciones inmunológicas son normales³². Estas observaciones llevaron a postular³³ que la vía *de novo* de síntesis de purinas es críticamente importante para la proliferación y expansión de clones de linfocitos estimulados, mientras que la vía de rescate no es utilizada. El hecho que los niños con deficiencia en ADA son normales en todas sus otras funciones, excepto en el sistema inmune, sugirió que otras células pueden utilizar la vía de rescate para síntesis de purinas, mientras que los linfocitos carecen de esta capacidad. De esta manera, los distintos tipos de células y tejidos pueden ser clasificados de acuerdo a su dependencia de la vía *de novo* o la vía de rescate para la síntesis de purinas, con los linfocitos en un extremo, las células cerebrales en el otro, y la mayoría de los otros tejidos que pueden utilizar indistintamente una vía o la otra, por lo cual ocuparían una posición intermedia. Otros estudios demostraron que la proliferación linfocitaria está acompañada de un aumento en la síntesis de purinas^{34, 35}, conjuntamente con la activación de varias enzimas de la vía *de novo*, incluyendo inosina monofosfato dehidrogenasa (IMPDH)³⁶, que es la primera enzima específica para la síntesis de nucleótidos de guanosina (GMP). Como la deficiencia de ADA está asociada con

inmunodeficiencia, era lógico prever que la inhibición de esa enzima podría resultar en un efecto inmunosupresor³⁷. Se encontró que corfomicina, un fármaco inhibidor de ADA es un potente inhibidor de la proliferación de linfocitos estimulados por mitógenos³⁸. Este fármaco fue ensayado en pacientes con leucemia linfocítica, pero debido a su toxicidad no pudo ser utilizado como agente inmunosupresor. Fue por esta razón que consideramos otras enzimas de la vía *de novo* como blanco para producir inmunosupresión. Debido a que IMPDH es la enzima que controla la síntesis de GMP, comenzamos nuestros estudios analizando el efecto de algunos inhibidores de esta enzima que eran conocidos. Así encontramos que el ácido micofenólico (MPA) resultó ser el inhibidor de IMPDH más potente para bloquear la proliferación de linfocitos estimulados por mitógenos o antígeno³⁹. Comenzamos entonces un programa de síntesis química bajo la dirección de Peter Nelson, que condujo a la selección de un éster prodroga, el morfolinoetiléster del ácido micofenólico (MMF), el cual posee una biodisponibilidad oral mejor que la del compuesto original, y fue seleccionado para ensayos clínicos. El éster MMF (conocido inicialmente como RS-61443), es rápidamente hidrolizado *in vivo* y genera MPA que es el principio activo. La vía principal de metabolismo es la glucuronización.

El mecanismo de acción del MPA ha sido descrito detalladamente en numerosos trabajos³⁹⁻⁴³. En breve, es un agente antiproliferativo, con selectividad para linfocitos, debido a que estas células dependen totalmente de la vía *de novo* para la síntesis de purinas. A concentraciones farmacológicas inhibe la respuesta a mitógenos y también a los aloantígenos, como se demostró en cultivo mixto de linfocitos. El efecto antiproliferativo se debe a que produce una disminución del pool de nucleótidos de guanosina (GTP). El agregado de guanosina revierte el efecto inhibidor, lo que demuestra que se trata de un efecto selectivo y reversible. Se han caracterizado dos isoformas de esta enzima⁴⁴. La IMPDH de tipo I es constitutiva y su concentración no varía durante la respuesta proliferativa de linfocitos estimulados por mitógenos. La IMPDH de tipo II no está presente en las células en reposo, pero se expresa y su concentración aumenta cuando las células linfoides son estimuladas. El MPA tiene una afinidad aproximadamente 5 veces mayor sobre la IMPDH de tipo II, lo cual aumenta su especificidad por los linfocitos activados.

Otra consecuencia de la reducción del pool de GTP en linfocitos es la inhibición de la transferencia de manosa y fucosa a las glicoproteínas, algunas de las cuales son moléculas de adhesión, cuyo papel es facilitar el contacto entre los linfocitos activados y las células endoteliales o las células blanco del órgano injertado. La glicosilación de proteínas se lleva a cabo a través de nucleótidos intermedios: manosa y fucosa son transferidas a través

del intermediario guanosina difosfato. La reducción del pool de GTP en los linfocitos hace que también disminuya la transferencia de estos azúcares a las glicoproteínas. Mediante este mecanismo, el MPA puede disminuir el reclutamiento de linfocitos y monocitos en los sitios de inflamación, y en un órgano vascularizado como es el caso de los trasplantes. Estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento con MPA produce una reducción en la glicosilación de VLA4, una de las moléculas de adhesión presente en linfocitos activados, y una reducción en la adhesión de linfocitos a las células endoteliales⁴⁵. También *in vivo* se ha observado una reducción en la expresión de algunas moléculas de adhesión en modelos experimentales de rechazo crónico de trasplantes⁴⁶.

In vivo se ha demostrado que el MMF prolonga la supervivencia de trasplantes alogéneos en numerosos modelos experimentales en diversas especies animales, incluyendo riñón, corazón, hígado, intestinos, miembros inferiores, páncreas y médula ósea⁴⁷⁻⁵⁶. También se ha demostrado que MMF es capaz de revertir el rechazo agudo en modelos de trasplantes renales en perros⁵⁷, de corazón en ratas⁵⁸, y de miembros inferiores también en ratas⁵⁹. Además de estos efectos, el MMF también inhibe la arteriopatía proliferativa asociada con el rechazo crónico de los trasplantes, como se demostró en modelos experimentales de injertos alogéneos de aorta, de corazón y de riñón en ratas^{46, 58-60}, y también en injertos de corazón entre distintas especies de primates⁶¹. Este efecto es probablemente debido en parte a que el MPA inhibe la proliferación de las células musculares lisas que forman la neointima, como se observó en cultivos de células de origen humano^{42, 62}, y de rata⁶³. Se cree que la proliferación de estas células musculares lisas contribuye a la oclusión del lumen arterial en el rechazo crónico. Como resultado, es posible que el uso continuado de esta droga ayude a prevenir el rechazo crónico, que es uno de los problemas que todavía persisten en la supervivencia a largo plazo de los trasplantes.

Los ensayos clínicos realizados con CellCept® incluyeron tres estudios independientes en pacientes que recibieron trasplante de riñón (~ 1500 pacientes)⁶⁴⁻⁶⁷, y un estudio en pacientes de trasplante de corazón⁶⁸ (578 pacientes). En estos ensayos participaron numerosos centros de trasplantes en los Estados Unidos, Canadá, varios países europeos y Australia. Todos los ensayos realizados fueron randomizados y doble ciego. En estos ensayos se compararon dos dosis diferentes de CellCept® (1.0 g y 1.5 g dos veces por día), con AZA en dos de los estudios, y con placebo en el tercero. En todos los casos se utilizó conjuntamente una terapia IS de mantenimiento que consistió en CsA y corticosteroides. Los resultados demostraron que CellCept® disminuye significativamente la incidencia de crisis de rechazo agudo durante los 6 meses posteriores al trasplante. En base

a estos resultados CellCept® fue aprobado por las autoridades reguladoras en numerosos países, para ser usado en la prevención de rechazo agudo en trasplantes de riñón y corazón, en combinación con CsA y corticoides. La reducción en el número de crisis de rechazo que se obtuvo como resultado del tratamiento combinado con CellCept® fue aproximadamente el 50%. Resultados de la sobrevida de los trasplantes renales obtenidos en los pacientes tratados con CellCept® después de tres años de tratamiento, demuestran que el uso prolongado de la droga también reduce la pérdida de los aloinjertos a largo plazo⁶⁹. Las reacciones adversas más comunes asociadas con el uso de CellCept® son gastrointestinales (diarrea, náusea y vómito), infecciones oportunistas, en particular debido a CMV, y también infecciones del tracto urinario. La incidencia de enfermedades malignas entre los 1483 pacientes con trasplante de riñón tratados con CellCept® que se registraron después de un año o más de tratamiento, es similar a la incidencia que se ha descrito en la literatura en pacientes tratados con otros agentes IS. Otras reacciones adversas en los pacientes tratados con CellCept® fueron muy similares a las de los grupos control que recibieron terapia IS de mantenimiento con el agregado de AZA o placebo. Resultados de estos estudios han sido publicados⁶⁴⁻⁶⁷. También se han com-

pletado estudios para la prevención de rechazo en pacientes con trasplantes de hígado, y hay sido sometidos a las autoridades reguladoras (FDA) para su aprobación. También se han efectuado estudios clínicos en niños con trasplantes, y el análisis de los resultados está siendo completado para ser presentado a la FDA a corto plazo.

CellCept® ha sido utilizado también para revertir el rechazo refractario agudo en pacientes con trasplantes de corazón y de otros órganos⁷⁰⁻⁷², y para el tratamiento de cierto número de otras condiciones clínicas. Una lista de estas indicaciones y la referencia correspondiente están resumidas en la Tabla 3.

FK506 (Tracrolimus, Prograf)

Se trata de un compuesto macrocíclico extraído del cultivo de *Streptomyces tsukubaensis*⁷³. El mecanismo de acción de esta droga IS es similar al de CsA, pero es aproximadamente 100 veces más potente. FK506 también se une a una proteína receptora en el citoplasma celular, que es diferente del receptor para CsA²². Este complejo se une a la fosfatasa calcineurina, y bloquea su acción sobre el factor de transcripción nuclear NFAT.

TABLA 3.— Eficacia de CellCept observada en varias enfermedades

Enfermedad	Autor	Referencia
Artritis reumatoidea	Goldblum et al.	<i>Clin Exp Rheumatol</i> 1993; 11: S117
	Schiff and Leishman	<i>Arthr & Rheum</i> 1998; 41: S364
<i>Myasthenia gravis</i>	Hauser et al.	<i>Neurology</i> 1998; 51: 912
Enfermedades de la piel		
1. Psoriasis	Haufs et al.	<i>Br J Dermatol</i> 1998; 138: 179
	Gaylen et al.	<i>Br J Dermatol</i> 1998; 138: 1101
2. Pénfigo bulloso	Bohm et al.	<i>Lancet</i> 1997; 349: 351
	Nousari et al.	<i>Arch Dermatol</i> 1998; 134: 1509
	Grundmann-Kollman et al.	<i>J Am Acad Dermatol</i> 1999; 40: 957
3. Pénfigo vulgar	Enk & Knop;	<i>Arch Dermatol</i> 1999; 135: 54
	Grundmann-Kollman et al.	<i>J. Am Acad Dermatol</i> 1999; 40: 957
4. Paniculitis nodular idiopática	Enk & Knop	<i>J Am Acad Dermatol</i> 1998; 39: 508
5. Pioderma gangrenoso	Hohenleutner et al.	<i>Lancet</i> 1997, 350: 1748
	Nousari et al.	<i>Arch Dermatol</i> 1998; 134: 1509
Enfermedades renales	1. Briggs et al.	1. <i>Am J Kidney Dis</i> 1998; 31: 213
1. lupus nefritis, 2. nefropatía	2. Nachman et al.	2. <i>J Am Soc Nephrol</i> 1997; 9: 94
membranosa, 3. nefritis por IgA	3. Nowack et al.	3. <i>Lancet</i> 1997; 349: 774
Inflamación ocular	Larkin & Lightman	<i>Ophthalmology</i> 1999; 106: 370
(keratoplastia)	Reis et al.	<i>Brit J Ophthalmol</i> 1998; 82: 700
Anemia hemolítica	Zimmer-Molsberger et al.	<i>Lancet</i> 1997; 350: 1003
autoinmune		
Reacción injerto contra	Wolff et al.	<i>Br J Hematol</i> 1998; 102: 210
huésped (GVHD)		
Enfermedad inflamatoria	Nehme et al.	<i>Gastroenterol</i> 1998; 114: A1049
intestinal (IBD)	Neurath et al.	<i>Gastroenterol</i> 1998; 114: A1050

De esta manera inhibe la síntesis de IL-2 y otras citocinas. Los estudios clínicos con FK506 en combinación con otras drogas IS, han demostrado una eficacia similar a la de CsA en la prevención del rechazo de trasplantes⁷⁴⁻⁷⁶. Los estudios más extensos se han realizado en pacientes con trasplantes de hígado, donde parece tener ventajas sobre el tratamiento con CsA^{77,78}. La toxicidad observada es primariamente renal, pero también posee otros efectos adversos similares a los descriptos para la CsA⁷⁹.

Rapamycin (Sirolimus)

Rapamycin (RAPA) es un antibiótico macrocíclico que se aisló en 1975 de un hongo, *Streptomyces hygroscopicus*, obtenido de una muestra de suelo de la isla de Pascua⁸⁰. Su actividad inmunosupresora fue descubierta poco tiempo después por Martel y col.⁸¹, en 1977, al observar que inhibía dos modelos experimentales de enfermedades autoinmunes en la rata. El mecanismo de acción es diferente al de CsA y FK506. RAPA no es un inhibidor de calcineurina sino que inhibe una cascada de kinasas denominadas ciclinas, que son necesarias para que la célula progrese a través del ciclo celular. El tratamiento con RAPA arresta los linfocitos T en la transición entre los estadios G1/S del ciclo celular⁸². De esta manera previene la proliferación de los linfocitos T en respuesta a la IL-2. Estudios *in vivo* demostraron que RAPA impide el rechazo de aloinjertos en varios modelos experimentales⁸³, y también en ensayos clínicos en humanos⁸⁴, y ha sido aprobada recientemente por las autoridades reguladoras para ser usada en esta aplicación. En humanos, los principales efectos adversos de esta droga consisten en hiperlipidemia, leucopenia y trombocitopenia, pero carece de la nefrotoxicidad característica de los inhibidores de calcineurina⁸⁴. RAPA también inhibe la replicación de células musculares en

la pared arterial y reduce el engrosamiento de la neointima en aorta de ratas, que se observa como consecuencia del daño producido experimentalmente por la inserción de un catéter⁸⁵. Estos autores sugieren que RAPA podría ser útil para prevenir las lesiones arteriales en el rechazo crónico de injertos. Sin embargo, el aumento en los niveles de triglicéridos en plasma observado en pacientes tratados con RAPA es motivo de preocupación.

Anticuerpos monoclonales

Varios anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de la superficie celular de linfocitos T activados, están utilizándose como terapéutica IS. Algunos de estos anticuerpos fueron aprobados para su uso durante la fase de inducción, en el período inmediato post-trasplante, y también para el tratamiento de las crisis de rechazo agudo. Estos anticuerpos en general refuerzan el efecto inmunosupresor de las drogas y se usan a las dosis más altas compatibles con ausencia de infecciones y efectos adversos serios.

Una lista de estos anticuerpos, el blanco que bloquean y su estadio de desarrollo están resumidos en la Tabla 4. En general, aquellos anticuerpos que reconocen todas las células T (anti-CD3) tienden a producir mayor toxicidad y suelen ser utilizados para el tratamiento de las crisis de rechazo en pacientes que se han hecho refractarios a otras drogas. Otros monoclonales como el anticuerpo contra el receptor para IL-2 (Zenapax), reconocen sólo los linfocitos T activados, de manera que son mucho más selectivos y mejor tolerados.

Zenapax (Daclizumab)

Este anticuerpo está dirigido contra la cadena p55 del receptor para IL-2, de manera que bloquea la interacción

TABLA 4.— Anticuerpos utilizados para la prevención del rechazo de aloinjertos y para el tratamiento del rechazo agudo

Anticuerpo	Blanco	Status
Suero policlonal anti-linfocítico	Primariamente células T	Aprobado
Anticuerpo monoclonal anti-CD25 (humanizado)	Células T activadas (IL-2R)	Aprobado
Anticuerpo monoclonal anti-CD3 (humanizado)	Elimina todas las células T	Aprobado
Anti-CD3-inmunotoxina	Elimina las células T sin inducir citocinas	Experimental
Anticuerpo monoclonal anti-CD154 (humanizado)	Ligando para el receptor CD40, no elimina las células T	Experimental
Proteína recombinante fusionada: CTLA4Ig (CTLA-4=CD-152)	Bloquea la unión de CD28/CTLA4 con CD80 (B7-1) y cD86 (B7-2)	Experimental

IL-2:IL-2R e impide la proliferación de las células T. El hecho de haber sido humanizado mediante ingeniería genética hace que sea menos inmunogénico, y que su vida media *in vivo* sea más prolongada⁸⁶. Estudios clínicos en pacientes con trasplante renal demostraron la eficacia de este anticuerpo en combinación con CsA y esteroides, para prevenir el rechazo agudo en los 6 meses posteriores al trasplante⁸⁷⁻⁸⁹. El anticuerpo es administrado cada dos semanas por un total de 5 dosis. No se observaron toxicidades especiales relacionadas al tratamiento con este anticuerpo.

Nuevas estrategias para el desarrollo de tolerancia

La manipulación de la respuesta inmune para que acepte el injerto de un tejido extraño sin producir rechazo, y desarrolle tolerancia específica, es el sueño de los inmunólogos que se dedican a trasplantes. Se han descrito dos tipos de tolerancia, una central (tímica) y otra periférica. La selección negativa durante el desarrollo del timo impide la maduración de las células autorreactivas a partir de los precursores inmaduros. Con el reconocimiento de los autoantígenos que le son presentados principalmente por las células del estroma de la médula ósea, los timocitos autorreactivos son eliminados por un proceso de muerte celular programada conocido como apoptosis⁹⁰. Alternativamente, las células T autorreactivas en el timo pueden hacerse "anérgicas" y de esta manera no reaccionar al ser re-expuestas a su antígeno específico. A pesar de estos mecanismos, la tolerancia central no siempre es completa, y células T con autorreactividad son a veces detectables entre los linfocitos de sangre periférica. Por lo tanto deben existir otros mecanismos para impedir que estas células potencialmente peligrosas produzcan daño. Se han descrito varios mecanismos diferentes como responsables de la inducción y el mantenimiento de la tolerancia periférica de las células T. Estos incluyen anergia, regulación/supresión, deleción, y exhaustión o apoptosis de células T inducida por activación (ACTA). Algunos de estos mecanismos son los que están implicados también en el desarrollo de tolerancia a los aloinjertos.

Anergia es definida funcionalmente como un estado de hiporrespuesta en el que las células T no proliferan ni producen IL-2, luego que se liga el receptor para el antígeno (TCR). Esta forma de tolerancia puede ser inducida cuando el complejo MHC/antígeno es reconocido sin la co-estimulación apropiada⁹¹ (ejemplo, si se bloquea alguna de las moléculas co-estimuladoras como CD28 o CD154). La ausencia de la señal 2 debido al bloqueo de cualquiera de estas interacciones, resulta en un defecto funcional con inhibición parcial o completa de la expresión del gen de IL-2. Más importante aún,

estas células T anérgicas no son activadas nuevamente al ser expuestas al mismo antígeno por CPA competentes. Esta anergia puede persistir por períodos prolongados. Sin embargo, estas células T pueden sobreponerse a la anergia si son expuestas a otras citocinas diferentes de la IL-2 que pueden ser producidas por células T diferentes.

El bloqueo de otra de las señales accesorias, entre LFA-1 e ICAM-1, resulta en cambio en una inhibición activa de las células T, en vez de anergia⁴. La regulación activa mediada por células T, o por productos solubles de las células T, es lo que se ha denominado regulación o supresión. Sin embargo la caracterización de estas células T reguladoras involucradas en la inhibición específica de la respuesta a un antígeno ha resultado difícil. Recientemente se ha descrito un clon de células reguladoras CD4+, que producen IL-10 y que parecen suprimir la activación específica de células T por parte del antígeno⁹².

Deleción, otro de los mecanismos de tolerancia, no ocurre solamente durante la selección en el timo, sino que se ha demostrado que también contribuye a la inducción de tolerancia entre células T periféricas⁹³. Sin embargo parece que este tipo de deleción periférica es menos importante que otros de los mecanismos operacionales en la tolerancia periférica de las células T.

La exposición repetida a un antígeno por largo tiempo puede llevar a la extinción de clones de células T activadas, por un mecanismo de apoptosis (ACTA)^{94, 95}. Este proceso es mediado ya sea por la expresión de Fas:FasL (CD95:CD95L) en la superficie de linfocitos T activados, o por la producción de TNF- α . Un defecto hereditario en Fas o en FasL está asociado con autoinmunidad y otras enfermedades^{96, 97}.

El conocimiento más detallado de los mecanismos que conducen a la tolerancia de las células T ha revelado que se trata de un proceso dinámico que opera en distintas etapas de la vida. Por otra parte, la delineación de los varios requerimientos para la activación de las células T, ha hecho que este complejo proceso sea factible de ser manipulado, con el objeto de inducir tolerancia específica contra los aloantígenos de trasplantes. Varias estrategias consistentes en el bloqueo de alguna de las señales coestimuladoras, han producido resultados *in vivo* muy prometedores para inducir tolerancia específica a los aloinjertos. Esto se ha logrado bloqueando distintas interacciones entre algunos de estos ligandos y su receptor correspondiente. Uno de ellos es la unión de CD40 sobre la superficie de las CPA (lo cual previene la expresión de B7), con CD40L, y otro es el bloqueo directo de la unión entre CD28 sobre las células T con B7 (CD80 y CD86) sobre las CPA. Por otra parte, tratamientos que aumentan la apoptosis de las células T activadas, como ser el tratamiento con ciertas drogas, en combinación con el bloqueo de algunas de las señales

TABLA 5.— Anticuerpos utilizados para inducir tolerancia a aloinjertos en primates

Anticuerpo	Autores
Anti-CD3 inmunotoxina: FN18-CRM9, IgG1 conjugada con una toxina diftérica mutada, CRM9	SJ Knechtle <i>et al</i> 1997 ⁹⁹ JM Thomas <i>et al.</i> 1997 ¹⁰⁰
Anticuerpo monoclonal humanizado contra CD154 (hu5C8) CD154 es el ligando para CD40	AD Kirk <i>et al.</i> 1999 ⁹⁸

coestimulatorias, también han facilitado la inducción de tolerancia en modelos experimentales. Seguidamente se detallan algunos resultados experimentales como ejemplo de las estrategias descritas para la inducción de tolerancia a aloinjertos.

Anticuerpos monoclonales en la inducción de tolerancia

De éstos el que parece más prometedor es un anticuerpo monoclonal humanizado (hu5C8) que está dirigido contra CD154, el ligando para el receptor CD40 (Tabla 5). Se ha demostrado que la administración de este anticuerpo en forma intermitente, por un período de cinco meses después del trasplante renal, prolonga la sobrevida del aloinjerto entre monos rhesus cuyos antígenos de histocompatibilidad (MHC) son diferentes, sin que se produzcan crisis de rechazo⁹⁸. Este efecto persistió largo tiempo, aun después de que se interrumpió la administración del anticuerpo, sin necesidad de ninguna otra droga IS. El uso de tacrolimus o de esteroides parece antagonizar el efecto anti-rechazo de este anticuerpo, mientras que CellCept[®] no interfirió con el desarrollo de este estado de tolerancia. La actividad de este anticuerpo no parece estar mediada por la depleción global de células T o B. Los animales que sobrevivieron a largo plazo perdieron la reactividad específica contra los antígenos del dador en cultivo mixto de linfocitos, pero generaron anticuerpos específicos y células T que infiltraron el órgano injertado sin alterar su función. Estos resultados, aunque prometedores, hacen sospechar que la sobrevida a largo plazo de estos trasplantes puede aún estar comprometida.

Otro tratamiento que se ha ensayado en primates es un anticuerpo monoclonal contra CD3 (FN18) conjugado con una toxina diftérica mutada (CRM9)^{99, 100}. Esta toxina retiene la habilidad de inhibir la síntesis de proteína, pero su toxicidad es reducida a 1/300 comparada con la toxina nativa. Este anticuerpo produce depleción de las células T. Un corto tratamiento con este anticuerpo,

simultáneamente con el trasplante de riñón entre monos rhesus con diferentes MHC, en combinación con MMF administrado durante 3 días solamente, prolongó la sobrevida del injerto a largo plazo⁹⁹. La pérdida de los injertos después de 135 días de sobrevida se debió a rechazo crónico. Los linfocitos CD4+ comenzaron a recuperarse gradualmente después de 6 meses del tratamiento con el anticuerpo. Como sugieren los autores, es posible que prolongando el tratamiento con MMF se logre reducir el desarrollo de rechazo crónico.

Tolerancia inducida por apoptosis de células T activadas (ACTA)

Un hecho notable es que los trasplantes de hígado en roedores son en general aceptados a través de barreras de histocompatibilidad sin producir rechazo y sin necesidad de tratamiento IS^{101, 102}. Esto es contrario a lo que sucede con trasplantes de otros órganos como el corazón o riñón en la misma combinación de cepas. Estudios recientes han sugerido que la inducción de tolerancia a los trasplantes de hígado en ratas está correlacionada con la activación de los linfocitos T del receptor, que resulta en la eliminación de esos clones específicos para el antígeno mediante un proceso de apoptosis, ACTA¹⁰³. Se comprobó también que este proceso no requiere del timo pues se produce igualmente en animales timentomizados. La tolerancia se rompe si el hígado donante es irradiado antes de ser trasplantado, lo cual elimina los leucocitos residentes en este órgano¹⁰⁴. Se ha demostrado también¹⁰⁵, que hay una rápida migración de leucocitos del dador hacia el bazo y los ganglios linfáticos del receptor, conjuntamente con un aumento rápido y transitorio en la expresión del mRNA para IL-2 y IFN- γ en estos órganos linfoides periféricos. Células apoptóticas que son de origen del huésped se observan rápidamente en el bazo y más tarde en el órgano trasplantado^{101, 105, 106}. Estas células T apoptóticas expresan IL-2R, lo cual demuestra que son células T activadas, e incluyen linfocitos CD4+ y CD8+. Como se mencionó

previamente, el trasplante de riñón entre las mismas cepas de ratas histocompatibles es rechazado al menos que se administre tratamiento IS¹⁰⁵. Pero si se transfieren leucocitos del dador conjuntamente con el órgano trasplantado, se induce tolerancia sin necesidad de tratamiento IS¹⁰³. En este caso también se observa la migración de linfocitos del dador hacia el bazo del receptor, y la activación de los linfocitos T del receptor. Schlitt y col.¹⁰⁷, también han inducido tolerancia a trasplantes de corazón en ratas histoincompatibles, mediante la transfusión simultánea de células esplénicas del donante. Si se administra al huésped un anticuerpo contra los leucocitos del donante simultáneamente con el trasplante, se elimina la tolerancia. En cambio, si el anticuerpo se administra 18 días después del trasplante, la tolerancia no es afectada. Estos resultados indican que el microquimerismo es necesario para el desarrollo pero no para el mantenimiento de la tolerancia. Por esta razón este tipo de tolerancia es considerada periférica, contrariamente a la tolerancia central que ocurre durante la ontogenia (selección negativa en el timo), o en la vida adulta a raíz del trasplante de médula ósea que requiere la persistencia del quimerismo.

Aparentemente dos condiciones son requeridas para el desarrollo de tolerancia periférica a un aloinjerto: una es el órgano trasplantado que proporciona una gran cantidad de aloantígenos de histocompatibilidad, y la segunda son los leucocitos del dador. Esto trae como consecuencia la activación de las células T del receptor que reconocen los aloantígenos, y la eliminación por apoptosis de esos clones de células T activadas (ACTA).

Para estar seguro que las drogas IS utilizadas no interfieran con ACTA, es necesario considerar los mecanismos que inducen apoptosis. Estos incluyen varios pares de receptores y sus ligandos que pertenecen a la familia del TNF y TNFR (Fas:FasL, TNFR1:TNF), como así también CD40:CD40L, APO2-DR4/DR5 y otros pares. IL-2 sensibiliza a las células T a la apoptosis por ACTA, mediante la inducción de FAS¹⁰⁸ y APO2L¹⁰⁹. IL-2 induce a los linfocitos maduros a entrar en la fase S del ciclo celular, donde la apoptosis puede ocurrir más fácilmente¹¹⁰. Por lo tanto no es sorprendente que CsA y GC, que inhiben la formación de IL-2, bloqueen la apoptosis de linfocitos en varios modelos experimentales¹¹¹. Más evidencia que IL-2 juega un rol importante *in vivo* viene de observaciones que en ratones deficientes en IL-2, la apoptosis de células T inducida por aloantígenos, y la prolongación de la supervivencia de aloinjertos, no ocurre¹¹². Ratones con una alteración del gen de IL-2 presentan una acumulación incontrolada de linfocitos T activados y manifestaciones de autoinmunidad¹¹³. Estas mismas anomalías se observan en ratones que carecen del IL-2R de alta afinidad. Como

consecuencia, si uno trata de inducir apoptosis *in vivo* no se debe suprimir la producción o el efecto de IL-2.

Desde el punto de vista terapéutico, sería conveniente facilitar el desarrollo de ACTA en pacientes con trasplantes alogeneicos, como también en enfermedades autoinmunes. Es por esto que la inducción de ACTA es de interés, como así también establecer cuál es el efecto de las drogas IS en la tolerancia natural, como es el caso de trasplantes de hígado en ratas, o en los modelos de aloinjertos de corazón o riñón en ratas, que se realizan simultáneamente con transfusión de leucocitos donantes.

Se ha descrito que el metotrexato (MTX), un antimetabolito que posee efecto inmunosupresor y es utilizado en el tratamiento de artritis reumatoidea y en otras aplicaciones clínicas, induce apoptosis de linfocitos T activados en cultivo¹¹⁴. Nosotros hemos demostrado también que MPA induce apoptosis de células T en una línea celular de origen humano, y de linfocitos T de sangre periférica humana estimulados policlonalmente^{115, 116}. En presencia de MPA, las células linfocíticas se acumulan en la fase S del ciclo celular, donde son más susceptibles a la apoptosis¹¹⁵. Por el contrario, GC y los inhibidores de calcineurina suprimen la ACTA, lo cual como mencionamos previamente puede ser debido a que ambos fármacos inhiben la síntesis de IL-2, y ambas clases de drogas suprimen la transcripción del gen de IL-2. Se ha comprobado que los GC previenen la inducción de tolerancia a los trasplantes de hígado en ratas¹¹⁷, y CsA el desarrollo de tolerancia a los injertos de corazón inducida por leucocitos donantes¹⁰⁷. También ambos tipos de drogas impiden el desarrollo de tolerancia periférica a aloinjertos renales inducida por anticuerpos anti-CD154 en monos rhesus, como se demostró en experimentos descritos previamente⁹⁸. En cambio, MMF no interfirió con el establecimiento de tolerancia inducida mediante este protocolo. En recientes experimentos, Li y col.¹¹⁸ también demostraron que tratamientos que aumentan la apoptosis de las células T activadas en respuesta a aloinjerto, consistente en el bloqueo de una de las señales co-estimuladoras y el agregado de rapamycin, promueven el desarrollo de tolerancia aun en el caso de trasplantes de piel, que son frecuentemente rechazados en la mayoría de los protocolos que inducen tolerancia a otros órganos. Por el contrario, CsA inhibió el desarrollo de tolerancia en este caso. Wells y col.¹¹⁹, también han demostrado que la apoptosis *in vivo* es necesaria para el desarrollo de tolerancia. Estos autores comprueban que ratones transgénicos con expresión aumentada de Bcl-xL, un gen anti-apoptótico, no desarrollan el tipo de tolerancia que es inducida en animales normales por el bloqueo co-estimulador. Estos autores concluyen que la inducción de apoptosis de las células T es esencial para establecer una tolerancia inmune estable a los aloantígenos.

Cómo inducir tolerancia a aloinjertos en la clínica

La próxima pregunta es: ¿cómo se trasladan estos hallazgos experimentales a la clínica? El problema principal es que las drogas más corrientemente utilizadas para prevenir el rechazo agudo, como son GC y CsA, son también las que impiden el desarrollo de tolerancia en modelos experimentales. Estos fármacos han permitido la sobrevida prolongada de los trasplantes, aunque generalmente el órgano trasplantado sucumbe debido al rechazo crónico. Por esta razón el dilema es cómo se ensayan estos nuevos protocolos en pacientes para los cuales existe una terapéutica que tiene éxito a corto plazo. En primer lugar, la administración conjunta con leucocitos del dador, cuando están disponibles, es posible que facilite el desarrollo de tolerancia, y es poco probable que produzca interferencia. En segundo lugar, administrar alguna de las drogas IS que están siendo utilizadas actualmente y que parecen no interferir con el desarrollo de tolerancia, como ser CellCept® o RAPA. En tercer lugar, ensayar alguno de los anticuerpos bloqueadores de co-estimulación, como anti-CD154, que ha demostrado eficacia en primates. Demorar el tratamiento IS por varios días después de realizado el trasplante puede ser beneficioso, ya que permitiría la activación inicial de las células T específicas para el antígeno y el comienzo de la ACTA. El tratamiento IS podría comenzar después de unos 7 días de realizado el trasplante, con la administración conjunta del anticuerpo elegido y una de las drogas propuestas para aumentar la apoptosis de las células T activadas. Sin lugar a dudas varios protocolos deberán ser ensayados hasta lograr el más favorable. Es de esperar que el empleo de estos nuevos agentes IS en combinaciones apropiadas, faciliten el establecimiento de tolerancia inmunológica a los órganos trasplantados en seres humanos. Los recientes adelantos obtenidos con algunos de estos protocolos en primates, permiten prever que este sueño pueda convertirse en realidad en un futuro no muy lejano.

Bibliografía

- Harding CV, Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting MHC classII/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990; 346: 574-6.
- Sykulev Y, Joo M, Vturina I, et al. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytotoxic T cell response. *Immunity* 1996; 4: 565-71.
- Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Ann Rev Immunol* 1998; 16: 523-44.
- Boussiotis VA, Freeman GJ, Gray G, et al. B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance. *J Exp Med* 1993; 178: 1753-63.
- Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, et al. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 1994; 84: 3261-82.
- June CH, Bluestone JA, Nadler LM, et al. The B7 and CD28 receptor families. *Immunology Today* 1994; 15: 321-31.
- Grewal IS, Flavell RA. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunology Today* 1996; 17: 410-4.
- Bashuda H, Seino K, Ra C, et al. Lack of cognate help by CD4+ T cells and anergy of CD8+ T cells are the principal mechanism for anti-leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1-induced cardiac allograft tolerance. *Transplantation* 1997; 63: 113-8.
- Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 333-42.
- Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, et al. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* 1989; 246: 1617-20.
- Berridge MJ. Lymphocyte activation in health and disease. *Critical Rev Immunol* 1997; 17: 155-78.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270: 286-90.
- Amano Y, Lee SW, Allison AC. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 α , interleukin-1 β and interleukin-6; mediation by decreased mRNA stability. *Molec Pharm* 1993; 43: 176-82.
- Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science* 1989; 244: 41-7.
- Schwartz R, Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* 1959; 183: 1682-3.
- Schwartz R, Dameshek W. The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions. *J Clin Invest* 1960; 39: 952-8.
- Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, et al. Prolonged survival of human kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med* 1963; 28: 1315-23.
- Wolberg G. Antipurines and purine metabolism. *Handb Exp Pharmacol* 1988; 85: 517-30.
- Hrelia P, Murelli L, Scotti M, et al. Organo-specific activation of azathioprine in mice: role of liver metabolism in mutation induction. *Carcinogenesis* 1988; 9: 1011-5.
- Borel JF, Feurer C, Gubler HV, et al. Biological effects of cyclosporin A: a new anti-lymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6: 468-75.
- Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, et al. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5214-8.
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66: 807-15.
- Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000. (In press).
- Curtis JJ, Luke RG, Duborsky E, et al. Cyclosporine in therapeutic doses increases renal allograft vascular resistance. *Lancet* 1986; 2: 477-9.
- Sanders CFJ, Curtis JJ. Role of hypertension in chronic allograft dysfunction. *Kidney Int* 1995; 48: S431.
- Herman WH, Hircik DE, Simonson MS. Cyclosporine activates the endothelin converting enzyme: implications for acute and chronic nephrotoxicity. *Transplantation* 1999; 67: S52.
- Simonson M, Robinson A, Herman W, et al. Endothelin-1 mediates transplant vasculopathy and chronic rejection in LEW/F344 cardiac allografts. *Transplantation* 1999; 67: S52.
- Mihatsch MJ, Morozumi K, Strom EH, et al. Renal

- transplant morphology after long-term therapy with cyclosporine. *Transpl Proc* 1995; 27: 39-42.
29. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell autonomous mechanism. *Nature* 1999; 397: 530-4.
 30. Shihab F, Andoh T, Tamer A, et al. The expression of proapoptotic genes is favored in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1999; 67: S214.
 31. Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, et al. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 1972; II: 1067-9.
 32. Allison AC, Hovi T, Watts RWE, et al. Immunological observations on patients with the Lesch-Nyhan syndrome, and on the role of *de novo* purine synthesis in lymphocyte transformation. *Lancet* 1975; II: 1179-83.
 33. Allison AC, Hovi T, Watts RWE, et al. The role of *de novo* purine synthesis in lymphocyte transformation. *Ciba Found Symp* 1977; 48: 207-23.
 34. Hovi T, Allison AC, Raivio KO, Vaheri A. Purine metabolism and control of cell proliferation. *Ciba Found Symp* 1977; 48: 225-48.
 35. Fairbanks LD, Boffill M, Ruckemann K, et al. Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans. Disproportionate expansion of pyrimidine pools and contrasting effects of *de novo* synthesis inhibitors. *J Biol Chem* 1995; 270: 29682-9.
 36. Nagai M, Natsumeda M, Weber G. Proliferation-linked regulation of the type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer Res* 1992; 52: 258-61.
 37. Hovi T, Smyth JF, Allison AC, et al. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol* 1976; 23: 395-9.
 38. Prentice HG, Smyth JF, Ganeshaguru K, et al. Remission induction with adenosine deaminase inhibitor 2'deoxycofomycin in Thy-lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1980; II: 170-6.
 39. Eugui EM, Almquist S, Muller CD, et al. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid *in vitro*: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 1991; 33: 161-73.
 40. Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol* 1991; 33: 175-83.
 41. Allison AC, Almquist SJ, Muller CD, et al. *In vitro* immunosuppressive effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, RS-61443. *Transplant Proc* 1991; 23 [Suppl 2]: 10-4.
 42. Allison AC, Eugui EM. The design and development of an immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. *Springer Semin Immunopathol* 1993; 14: 353-80.
 43. Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 1993; 136: 5-28.
 44. Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, et al. Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. *J Biol Chem* 1990; 265: 5292-5.
 45. Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, et al. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc* 1993; 25, Suppl 2, 67-70.
 46. Azuma H, Binder J, Heeman U, et al. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* 1995; 59: 460-6.
 47. Morris RE, Hoyt EG, Murphy MP, et al. Mycophenolic acid morpholinoethyl ester (RS-61443) is a new immunosuppressant that prevents and halts heart allograft rejection by selective inhibition of T and B cell purine synthesis. *Transplant Proc* 1990; 22: 1659-62.
 48. Hao L, Lafferty KJ, Allison AC, et al. RS-61443 allows islet allografting and specific tolerance induction in adult mice. *Transplant Proc* 1990; 22: 876-9.
 49. Hao L, Calcinaro F, Gill RG, et al. Facilitation of tolerance induction in adult mice by RS-61443. *Transplantation* 1992; 53: 590-5.
 50. Platz KP, Sollinger HW, Hullett DA, et al. S-61443, a new, potent immuno-suppressive agent. *Transplantation* 1990; 51: 27-31.
 51. Heemann U, Azuma H, Hamar P, et al. Mycophenolate mofetil inhibits lymphocyte binding and the upregulation of adhesion molecules in acute rejection of rat kidney allografts. *Transplant Immunol* 1996; 4: 64-7.
 52. Bechstein WO, Schilling DM, Hullett DA, et al. RS-61443/Cyclosporine combination therapy prolongs canine liver allograft survival. *Transpl Proc* 1993; 25: 702-3.
 53. D'Alessandro AM, Rankin MA. Heterotopic rat intestinal transplantation: effect of cyclosporine and RS-61443 on graft-vs-host disease and rejection. *Transplant Proc* 1994; 26: 1611-2.
 54. D'Alessandro AM, Rankin MA, McVey T, et al. Prolongation of canine intestinal allograft survival with RS-61443, cyclosporine and prednisone. *Transplantation* 1993; 55: 695-701.
 55. Alessiani M, Spada M, Vaccaris S, et al. Combined FK506 and mycophenolate mofetil immunosuppression prolongs survival after small bowel transplantation in pigs. *Transpl Proc* 1996; 28: 2499-500.
 56. Benhaim P, Anthony JP, Lin LY-T, et al. A long term study of allogeneic rat hindlimb transplants immunosuppressed with RS-61443. *Transplantation* 1993; 56: 911-7.
 57. Platz KP, Eckhoff D, Bechstein WO, et al. RS-61443 for reversal of acute rejection in canine renal allografts. *Surgery* 1991; 110: 736-41.
 58. Morris RE, Wang J, Blum JR, et al. Immunosuppressive effects of the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (RS-61443) in rat and nonhuman primate recipients of heart allografts. *Transplant Proc* 1991; 23 [Suppl 2]: 19-25.
 59. Van den Helder TBM, Benhaim P, Anthony JP, et al. Efficacy of RS-61443 in reversing acute rejection in a rat model of hindlimb allotransplantation. *Transplantation* 1994; 57: 427-33.
 60. Steele DM, Hullett DA, Bechstein WO, et al. Effects of immunosuppressive therapy on the rat aortic allograft model. *Transplant Proc* 1993; 25: 754-5.
 61. O'Hair DP, McManus RP, Komorowski R. Inhibition of chronic vascular rejection in primate cardiac xenografts using mycophenolate mofetil. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 1311-5.
 62. Gregory CR, Pratt RE, Huie P, et al. Effects of treatment with cyclosporine, FK-506, rapamycin, mycophenolic acid, or dexospergualin on vascular muscle proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Transplant Proc* 1993; 25: 770-1.
 63. Räisänen-Sokolowski A, Vuoristo P, et al. Mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) inhibits proliferation of rat aortic allografts. *Transpl Immunol* 1995; 3: 342-51.
 64. Sollinger HW for the US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 1995; 60: 225-32.
 65. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; 1: 131-5.
 66. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation

- Study Group. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1029-37.
67. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich SA, et al. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double blind, clinical studies in prevention of rejection. *Transplantation* 1997; 63: 39-47.
 68. Kobashigawa J, Miller L, Renlund D, et al. A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients. *Transplantation* 1998; 66: 507-15.
 69. European Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. *Transplantation* 1999; 68: 391-6.
 70. Taylor DO, Ensley D, Olsen SL, et al. Mycophenolate mofetil (RS-61443): preclinical, clinical and three-year experience in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: 571-82.
 71. Kirklín JK, Bourge RC, Naftel DC, et al. Treatment of recurrent heart rejection with mycophenolate mofetil (RS-61443): initial clinical experience. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: 444-50.
 72. Kobashigawa JA, Renlund DG, Olsen SL. Initial results of RS-61443 for refractory cardiac rejection. *J Am Coll Cardiol* 1992 (Abstract) 19: 203A.
 73. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces. III. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vivo*. *J Antibiot* (Tokyo) 1987; 40: 1256-65.
 74. Vanrenterghem Y. Tacrolimus (FK506) in kidney transplantation (Review). *Transplant Proc* 1998; 30: 2122-3.
 75. Reichart B, Meiser B, Viganò M, et al. European Multicenter Tacrolimus (FK506) Heart Pilot study: on year results-European tacrolimus Multicenter Heart Study group. *J Heart Lung Transplant* 1988; 17: 775-81.
 76. Shapiro R. Tacrolimus in solid organ transplantation: an update. *Transplant Proc* 1999, 31: 2203-5.
 77. Busuttill RW, Holt CD. Tacrolimus is superior to cyclosporine in liver transplantation (Review) *Transplant Proc* 1998; 30: 2174-8.
 78. Wiesner RH. A long term comparison of tacrolimus (FK506) versus cyclosporine in liver transplantation: a report of the United States FK506 Study Group. *Transplantation* 1998; 66: 493-9.
 79. Henry ML. Cyclosporine and tacrolimus (FK506): a comparison of efficacy and safety profiles. *Clinical Transplant* 1999, 13: 209-20.
 80. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new fungal antibiotic. 11. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot* 1975; 8: 727-32.
 81. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 1977; 55: 48-51.
 82. Flanagan WM, Crabtree GR. Rapamycin inhibits p34cdc2 expression and arrests T lymphocyte proliferation at the G1/S transition. *Ann NY Acad Sci* 1993; 696: 31-7.
 83. Boyle MJ, Cahan BD. Immunosuppressive role of rapamycin in allograft rejection. In *Immunosuppressive Drugs*, Thomson AW, Starzl, TG (eds) Boston: Edward Arnold 1994; pp 129-40.
 84. Groth CG, Bäckman L, Morales JM, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 1036-42.
 85. Gegory CR, Huie P, Shorthouse R, et al. Treatment with rapamycin blocks arterial intimal thickening following mechanical and alloimmune injury. *Transplant Proc* 1993; 25: 120-1.
 86. Hakimi J, Chizzonite R, Luke D, et al. Reduced immunogenicity and improved pharmacokinetics of humanized anti-Tac in cynomolgus monkeys. *J Immunol* 1991; 147: 1352-9.
 87. Ekberg H, Backman L, Tufveson G, et al. Zenapax (daclizumab) reduces the incidence of acute rejection episodes and improves patient survival following renal transplantation. N° 14874 and N° 14393 Zenapax Study Groups. *Transplant Proc* 1999; 31: 267-8.
 88. Vincenti F. Daclizumab: novel biologic immunoprophylaxis for prevention of acute rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 2206-7.
 89. Vincenti F, Nasham B, Light S. Daclizumab: outcome of phase III trials and mechanism of action. Double Therapy and the Triple Therapy Study Groups. *Transplant Proc* 1998, 30: 2155-8.
 90. Nagata S. Apoptosis by death factor (Review). *Cell* 1997; 88: 355-65.
 91. Maier CC, Greene MI. Biochemical features of anergic T cells (Review). *Immunol Res* 1998; 17: 133-40.
 92. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-42.
 93. Webb S, Morris C, Sprent J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990; 63: 1249-56.
 94. Moskopidid D, Lechner F, Pircher H, et al. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993; 362: 758-61.
 95. Rocha B, Grandien A, Freitas AA. Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 1995; 181: 993-1003.
 96. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81: 935-46.
 97. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268: 1347-9.
 98. Kirk AD, Burkly LC, Patti DS, et al. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nature Medicine* 1999; 5: 686-93.
 99. Knechtle SJ, Fechner JH, Dong Y, et al. Primates renal transplants using immunotoxin. *Surgery* 1998; 124: 438-47.
 100. Thomas JM, Neville DM, Contreras JL, et al. Preclinical studies of allograft tolerance in rhesus monkeys. *Transplantation* 1997; 64: 124-35.
 101. Qian S, Lu L, Fu F, et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver-allografts. Evidence for deletion of cytotoxic T-cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 1997; 158: 4654-61.
 102. Zimmermann FA, Davies HS, Knoll PP, et al. Orthotopic liver allografts in the rat: influence of strain combination on the fate of the graft. *Transplantation* 1984; 37: 406-10.
 103. Bishop GA, Sharland AF, McCaughan GW. High-dose/activation associated tolerance model for allografts: lessons from spontaneous tolerance for transplanted livers. *Curr Opin Organ Transplant* 1999; 4: 58-69.
 104. Shimizu Y, Goto S, Vari F, et al. Restoration of tolerance to rat hepatic allografts by spleen-derived passenger leukocytes. *Transplant Int* 1996, 6: 593-5.
 105. Sharland A, Yau Y, Wang C, et al. Evidence that apoptosis of activated T-cells occurs in spontaneous tolerance of liver allografts and is blocked by manipulations that break tolerance. *Transplantation* 1999 (in press).

106. Meyer D, Thorwath M, Otto C, et al. Apoptosis of alloreactive T-cells in liver grafts during tolerance induction. *Transpl Proc* 1999; 31: 474.
107. Tsui TY, Schlitt HJ. Induction of long-term allograft survival by post-transplant infusion of allogeneic leukocytes and delayed low-dose cyclosporine. The Sixth Basic Sciences Symposium of the Transplantation Society 1999; Abstract, page 203.
108. Leonardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha-beta T-lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991; 353: 76-9.
109. Zheng L, Fisher G, Miller RE, et al. Induction of apoptosis in mature T-cells by tumor necrosis factor. *Nature* 1995; 377: 348-51.
110. Boehme SA, Leonardo MJ. Propriocidal apoptosis of mature T-lymphocytes occurs at the S phase of the cell cycle. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1552-60.
111. Kroemer G. The pharmacology of T-cell apoptosis. *Adv Immunol* 1995; 58: 211-96.
112. Dai ZH, Koniaczny BT, Boddoura FK, et al. Impaired alloantigen-mediated T-cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2 deficient mice. *J Immunol* 1998; 161: 1659-63.
113. Sadlack B, Merz H, Schorle H, et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with disrupted IL-2 gene. *Cell* 1993; 75: 253-61.
114. Genestier L, Paillet R, Fournel S, et al. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T-cells. *J Clin Invest* 1998; 102: 322-8.
115. Cohn RG, Mirkovich A, Dunlap B, et al. Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. *Transplantation* 1999; 68: 411-8.
116. Cohn RG, Mirkovich A, Caulfield JP, et al. Apoptosis of human activated peripheral T-cells and T-lymphocytic and promonocytic cell lines induced by mycophenolic acid, the active metabolite of CellCept. The Sixth Basic Sciences Symposium of the Transplantation Society, Monterey CA 1999; Abstracts p 173.
117. Bishop GA, Sun J, De Cruz DJ, et al. Tolerance to liver allografts III donor cell migration and tolerance-associated cytokine production in peripheral lymphoid tissues. *J Immunol* 1996; 156: 4925-31.
118. Li Y, Li XC, Zheng XX, et al. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nature Medicine* 1999; 5: 1298-302.
119. Wells AD, Li XC, Li Y, et al. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nature Medicine* 1999; 5: 1303-7.

La producción del hombre de ciencia, como toda actividad del espíritu, hállase rigurosamente condicionada por el medio físico y moral. Con razón se ha dicho que el sabio es planta delicada, susceptible de prosperar solamente en un terreno especial formado por el aluvión de secular cultura y labrado por la solicitud y estimación sociales. En ambiente favorable, hasta el apocado siente crecer sus fuerzas; un medio hostil o indiferente abate el ánimo mejor templado.

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

Reglas y consejos sobre investigación científica. Los tónicos de la voluntad.
7º edición, Madrid, 1935, p 79