

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen
Volume **50**

Número
Number **3**

Julio-Septiembre
July-September **2003**

Artículo:

Eventos inmunológicos mediados por células durante el rechazo de xenotrasplantes.

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Eventos inmunológicos mediados por células durante el rechazo de xenotrasplantes.

Reconocimiento celular en el xenotrasplante de órganos vascularizados

Palabras clave: Xenotrasplante, extravasación leucocitaria, adhesión celular, carbohidratos, interacción MHC.

Key words: Xenotransplantation, leukocyte extravasation, cell adhesion, carbohydrates, MHC interactions.

Recibido: 23/06/2003

Aceptado: 24/07/2003

Gabriel Arteaga Troncoso,* Fernando M Guerra-Infante**

* Investigador Asociado adscrito al Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal. Instituto Nacional de Perinatología INPer, Secretaría de Salud (SSA). Profesor adscrito al Posgrado en Investigación Clínica, Escuela Superior de Medicina, IPN.

** Investigador en Inmunología. INPer, SSA. Profesor adscrito a la Escuela Superior de Ciencias Biológicas, IPN.

Correspondencia:

C. Dr. en C. Gabriel Arteaga Troncoso.

Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal, SS Montes Urales 800.

Col. Lomas Virreyes, 11000 México D.F.

Tel: (55) 55-20-99-00 ext. 334, Fax: (55) 55-20-00-34

E-mail: garteaga@latinmail.com

129

Abreviaturas: α -Gal, α -galactosa; HAR, rechazo hiperagudo; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; SLA, antígeno leucocitario porcino.

Resumen

Los avances en las técnicas quirúrgicas, el desarrollo de nuevos inmunosupresores y las estrategias de intervención han conducido al trasplante en una elección apropiada de tratamiento para la falla del órgano en etapa terminal, proporcionando a los pacientes una larga supervivencia y una alta calidad de vida. Los costos benéficos del trasplante han sido reconocidos y sólo el trasplante renal ahorra enormes sumas de dinero expedido durante la diálisis. La brecha entre los miembros de las listas de espera y de los órganos disponibles continúa ampliándose debido a la reducción del número de donadores en muchos países. El xenotrasplante tiene algunos beneficios potenciales, siempre que varios obstáculos puedan ser superados. El uso de cerdos como fuente de órganos casi proveerá del abastecimiento ilimitado de los mismos. Los ór-

Summary

Major advances in surgical techniques and the development of new immunosuppressive drugs and strategies of operation have led to transplantation becoming the treatment of choice for end stage organ failure, with patients achieving long term survival and a high quality of life. The cost benefits of transplantation have been well recognized and renal transplantation alone saves huge amounts of money spent on dialysis. The gap between the numbers on waiting lists and the available organs continues to widen as the number of donors declines in many countries. Xenotransplantation has several potential benefits provided the various obstacles can be overcome. The use of pigs as a source of organs would provide an almost unlimited supply. The organs would be available at all times, allowing surgery to be planned and

ganos podrán estar disponibles en todo momento, permitiendo la planeación del acto quirúrgico en tiempo óptimo, y los efectos perjudiciales en los órganos de la muerte cerebral podrán ser abolidos. El principal obstáculo puede ser la reacción inmunológica en el injerto. En los casos donde la reacción hiperaguda de los anticuerpos y la mediada por el complemento de los xenoinjertos vascularizados han sido controladas, el rechazo agudo vascular y el rechazo agudo mediado por las células T causan la lisis del tejido. La infiltración de leucocitos en el tejido conlleva a las dos modalidades de rechazo tardío. En primer lugar, el proceso de extravasación leucocitaria es dirigido por las moléculas de adhesión y las proteínas de la familia de las quimiocinas, y la presencia de los anticuerpos anti-cerdo que modulan la migración de los leucocitos a través del endotelio porcino, así como de los polimorfonucleares. Del mismo modo, la destrucción de la pared del tejido por las células asesinas naturales como también de las células T se han reportado. Por otra parte, las moléculas del endotelio porcino pueden disparar la producción de citocinas y de la actividad citolítica de las células NK. La xenorespuesta mediada por la célula T es establecida por el reconocimiento directo e indirecto de los antígenos leucocitarios porcinos, las moléculas de clase I y II son reconocidas por los linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente. Las células T CD4+ son capaces de mediar la reactividad de hipersensibilidad tardía, resultando el daño del injerto debido a la producción de las citocinas *in situ*, así como de la citotoxicidad directa. Si los problemas del rechazo inmunológico pueden ser superados, aún queda lo concerniente a las incompatibilidades o limitaciones anatómicas y fisiológicas que afectan la función del injerto y su supervivencia.

130

Introducción

Los modelos experimentales han mostrado que las respuestas celulares xenogénicas humanas anti-cerdo son siempre vigorosas, pero significativamente menores que las observadas en las alorrespuestas;¹ asimismo, los xenotrasplantes son rechazados más rápidamente que los aloinjertos cuando los tejidos son trasplantados bajo circunstancias similares debido a la disparidad filogenética entre el donador que favorece la actividad humorar del receptor. Es evidente que, el reconocimiento de los anticuerpos naturales "preexistentes" y subsecuentemente los

optimally timed, and the damaging effects of brain death on the organs would be avoided. The major obstacle would be the immune reaction of the host to the graft. In cases where antibody and complement-mediated hyperacute rejection of vascularized xenografts has been prevented, acute vascular rejection and acute T cell mediated rejection cause graft lysis. Infiltration leukocytes into the graft execute the latter two rejection modalities. In the first place, the leukocyte extravasation process is governed by adhesion molecules and the chemokine protein family, and the presence of human anti-pig antibodies modulated the migration of leukocytes across porcine endothelium, as well as neutrophil polymorph cells. Likewise, graft face destruction by natural killer cells as well as T cells have been reported. On the other hand, porcine endothelium molecules can trigger both cytokine production and cytolytic activity by NK cells. The T cell mediated xeno response is thought to be direct and indirect recognition of porcine swine leukocyte antigens, class I and II molecules are recognized by CD8+ and CD4+ T cells respectively. However, the mechanism of destruction by CD4+ T cells is poorly understood. CD4+ T cells are capable of mediating delayed-type hypersensitivity reaction, resulting in graft damage because of the production cytokines *in situ* as well as direct cytotoxicity. If the problems of immunological rejection can be overcome, there remain concerns that there may be physiological or anatomical incompatibilities or limitations that effect graft function or survival.

componentes del complemento, plaquetas y las sustancias tensoactivas incrementan la actividad celular dirigida al xenoinjerto. Sin embargo, los mecanismos humorales aparentemente pueden variar entre los diferentes modelos animales y la supervivencia del injerto puede depender más del órgano o tejido transplantado que de la disparidad de las especies.²

El xenotrasplante de órganos vascularizados, tales como el riñón y el corazón, muestran un tipo de rechazo mediado por anticuerpos que toma lugar en pocos minutos y hasta en horas, dependiendo de la combinación de especies.³ Las lesiones patológicas observadas durante el rechazo hiperagudo son caracterizadas por trombosis masiva con hemorragia intersticial y marginación leucocitaria que muestran claramente el daño intravascular del tejido.⁴ El principal antígeno de

superficie reconocido por los anticuerpos preformados es el disacárido terminal α -1,3 galactosa.⁵⁻⁷

El epitopo es expresado abundantemente en varias células de mamíferos no primates y está relacionado con el antígeno de los grupos sanguíneos humanos AB0.⁸ Además, los anticuerpos preformados que reaccionan con estos antígenos están presentes en los humanos debido a la exposición previa hacia algunos patógenos.⁹ La unión de los anticuerpos a estos oligosacáridos en la superficie de las células epiteliales porcinas ha demostrado que el inicio del daño es debido a la participación del complemento.

La unión de las inmunoglobulinas a las células endoteliales conduce a la activación de la cascada del complemento, induciendo en la superficie celular la deposición de fibrina y la unión de las plaquetas al lumen de los vasos sanguíneos, lo que conduce a la masiva trombosis vascular.¹⁰ Mientras los anticuerpos y el complemento han sido implicados en el rechazo hiperagudo (*Hyperacute Rejection*, HAR) de xenotrasplantes, la inmunidad celular de estos injertos ha contribuido al rechazo agudo. La acumulación de polimorfonucleares en el tejido dañado y la liberación del contenido de sus gránulos, agravan la respuesta vascular que conduce al rechazo inmediato. Asimismo, los leucocitos pueden acumularse por medio de sus moléculas adhesivas y ejercer su papel sobre el tejido injertado.¹¹

Existe evidencia de la infiltración de las células asesinas naturales (NK) en el rechazo de alo y xenoinjertos. En particular, las consecuencias de la interacción entre las células NK humanas y las células endoteliales porcinas han sido, sorprendentemente, los cambios estructurales y la integridad de las uniones célula-célula porcina. Las células NK humanas no causan citólisis significativa de los blancos porcinos, a menos que las células efectoras sean pretratadas con interleucina 2 (IL-2) o interferón gamma (INF γ).¹² Es importante enfatizar que el efecto citológico ocurre a los 20 minutos y la secreción de INF γ en el

medio es sólo cuatro horas después del estímulo de IL-2.

Basado en el conocimiento de la respuesta alo-génica de los linfocitos T, dos distintos mecanismos de activación pueden ocurrir durante el rechazo de xenoinjertos, uno mediado directamente por las células epiteliales y el otro a partir de las células presentadoras profesionales autólogas (*Antigen-Presenting Cell*, APC). Es quizás la principal forma de activación xenogénica mediada por células cuando los linfocitos T pueden reconocer y responder a la presentación de antígenos acoplados a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) de otras especies sin el requerimiento del procesamiento y presentación del péptido xenogénico en la molécula MHC propia, como es en el caso de los alotrasplantes. Diferencias en la respuesta celular de algunos modelos animales conllevan a especificar qué forma de activación puede ser observada. Los estudios experimentales han demostrado que la respuesta de las células T humanas a xenoantígenos murinos es básicamente por el reconocimiento de clase I; sin embargo, Moses y colaboradores (1990) demostraron que la respuesta celular murina anti-mono es restringida a las moléculas MHC de clase II con disminución de la respuesta directa debido a un defecto estructural en la interacción celular.¹³ No obstante, las células T humanas pueden reaccionar directa e indirectamente con estimuladores de otras especies, incluyendo las células endoteliales porcinas.^{14,15} Esta revisión permite definir los componentes inmunológicos que participan en el fenómeno de reconocimiento y del rechazo de los órganos de especies discordantes que será necesario para trazar las estrategias preventivas en la aplicación clínica del xenotrasplante.

131

El estudio del rechazo mediado por células en los modelos animales

Aunque en la práctica clínica son pocos los órganos alogénicos que sufren de rechazo agudo, los

episodios pueden ocurrir al término de la primera semana de vida, a pesar del uso de inmunosupresores. Estos eventos de rechazo son diferentes a lo observado durante la respuesta humoral debido a la ocurrencia tardía, por la ausencia en muchos de los casos de la presencia de anticuerpos anti-donador y por el infiltrado celular frecuentemente observado en las biopsias. En la actualidad, muchas de las terapias para el control del rechazo mediado por células han sido desarrolladas en ausencia del entendimiento del proceso inmunológico, pero han sido extremadamente exitosas para controlarlo.

Mientras la mayoría de los pacientes sufrían la experiencia de uno o varios episodios de rechazo, y sólo la mitad de los receptores fueron capaces de conservar su tejido transplantado por un año, el uso de nuevos inmunosupresores y de los anticuerpos monoclonales anti-linfocito T han cambiado considerablemente esos resultados. Estudios recientes han demostrado que 80% de los receptores de riñón no han experimentado algún episodio de rechazo agudo y es hasta ahora raro el observar la pérdida de un órgano transplantado durante el primer año.¹⁶ Sin embargo, el uso de estos potentes inmunosupresores que son efectivos durante el alotrasplante y que fueron administrados en receptores de xenoinjertos no ha evitado la actividad de las células efectoras en el rechazo del tejido.

Los protocolos experimentales que sirvieron de base para evaluar la respuesta celular fueron llevados a cabo por Widner y Bach (1972),¹⁷ sus resultados demostraron un amplio rango de variabilidad en las reacciones mixtas de linfocitos utilizando células humanas, de ratón y de perro. Posteriormente, Lindahl y Bach (1975)¹⁸ determinaron que la máxima respuesta proliferativa dirigida a los xenoantígenos en un modelo humano anti-ratón dependía de la expresión de las moléculas de clase II. Las células T en las combinaciones alo y xenogénicas respondieron a los mismos determinantes antigenicos en el MHC del ratón, específicamente a la región IA.¹⁹ Por otra

parte, al evaluar la respuesta citotóxica de linfocitos humanos cultivados con distintos estimuladores murinos, Swain y colaboradores (1983)²⁰ demostraron que las células T citotóxicas lisaron más eficientemente a sus blancos cuando éstos fueron cultivados con estimuladores secundarios que expresaban el mismo haplotipo de clase I; sin embargo, la máxima producción de IL-2 fue observada cuando los blancos murinos primarios y secundarios compartían la expresión de las moléculas de clase II. Estas primeras observaciones demostraron que, 1) la respuesta celular a los xenoantígenos es dependiente del MHC, 2) que el patrón de xenorreconocimiento es similar a lo observado en alorreactividad, y 3) que las porciones del MHC son altamente conservadas en una variedad de especies, permitiendo el reconocimiento de las células T humanas.

La fina especificidad de las células T citotóxicas en el reconocimiento de xenoantígenos porcinos ha sido observada en cultivos celulares. Shishido y colaboradores (1997)¹⁴ demostraron que las clonas de linfocitos T CD8+ humanos fueron capaces de reconocer directamente a xenoantígenos porcinos por las moléculas SLA de clase I en una forma similar a lo observado durante alotrasplantes con disparidad MHC. Esta interpretación fue debida a que sólo las células T CD8+ proliferaron en respuesta de las células endoteliales de aorta porcina (PAEC), mientras las CD4+ no respondieron a las PAEC MHC de clase II negativa.

De igual manera, en repetidas ocasiones, al ser reestimuladas las células se causa un marcado incremento en la proliferación de los linfocitos T CD8+, los cuales mostraron citotoxicidad específica en contra de los blancos porcinos singénicos con disminución lítica de las células porcinas no relacionadas, incluyendo aquellas células sensibles a la destrucción por las células asesinas naturales. Además, utilizando ensayos de bloqueo se demostró que los anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de las moléculas MHC de clase I, pero no

de SLA de clase II o las humanas, específicamente disminuyeron la actividad citolítica de las clonas anti-PAEC, también los anticuerpos anti-CD8+, pero no los anti-CD4+ inhibieron marcadamente la destrucción de los blancos porcinos. Estos resultados demostraron que las células T humanas diferencian entre los alelos MHC porcinos, así como muchas de las interacciones coestimuladoras pares-ligandos que pueden ser igualmente funcionales en la combinación humano anti-porcino.¹

Algunas líneas de investigación soportan el papel "potenciador" en el sistema inmunológico del linfocito T CD4+ durante la xenorreactividad. En modelos de ratones tímectomizados que fueron tratados previamente con anticuerpos anti-CD4+, CD8+ o ambos, y en los que se trasplantaron injertos de piel de monos,²¹ los resultados demostraron que los animales tratados con anti-CD4+ y especialmente con la combinación CD4+/CD8+ mostraron una prolongada supervivencia del injerto en comparación con los ratones no tratados o los que sólo recibieron anti-CD8+. Al comparar las respuestas alo y xenogénicas en ratones que recibieron los injertos de piel lepórida o murina con diferente MHC y con reducción de células T CD4+, se evidenció una supervivencia del injerto de conejo y no del aloinjerto de ratón.

Esta dependencia del linfocito T cooperador en la xenorreactividad es similar a lo observado durante los episodios de rechazo en aloinjertos cuando existe una disparidad en los antígenos menores de histocompatibilidad;²² también la supervivencia de los injertos de piel de ratones transgénicos que expresan el antígeno SLA de clase I es prolongada en los receptores tratados con anticuerpos anti-CD4+ comparados con los controles y los animales quienes sólo recibieron anti-CD8+. Los estudios realizados en ratón NOD (ratón espontáneamente diabético) demostraron que el tratamiento previo con anticuerpos anti-CD4+ mejora la supervivencia del xenotrasplante de islotes pancreáticos de perro o de rata, observando una supervivencia del injerto en el grupo control de 10 ± 1.5 a 83 ± 21 días con

células de perro y de 127 ± 30 días con células de rata. La reducción de los linfocitos T CD4+ periféricos fue confirmada por citometría de flujo y la examinación histológica de los islotes transplantados en los animales tratados no mostró evidencia de infiltrado celular con integridad de las células productoras de insulina.²³

Por otra parte, para mejorar el entendimiento del papel inmunológico del linfocito T "cooperador" durante la xenorreactividad, Wren y colaboradores (1993)²⁴ evaluaron el perfil de las citocinas en linfocitos murinos que respondieron a la estimulación de células de rata. Los resultados demostraron tener una predominancia de las citocinas del tipo Th2, es decir aumento de las interleucinas 4 y 10. Las diferencias en las respuestas alo y xenogénicas pueden ser el mejoramiento de la actividad Th2, el cual conduce al preponderante aspecto humoral de la respuesta inmune. Cabe recordar que los agentes inmunosupresores utilizados durante el alotrasplante, incluyendo la ciclosporina y el FK506, tienen sus blancos primarios en las células cuya activación resulta en la producción de IL-2 e INF γ .²⁵ Si las respuestas del tipo Th2 son predominantes en la xenorreactividad, la ineficiencia de los agentes convencionales para controlar el episodio de rechazo de xenoinjertos es aparente debido a que las células responsables de la reacción no son los blancos de la terapia.

133

El procoagulante endotelio porcino es un factor importante en la patogénesis del rechazo agudo vascular

Para nuestro entendimiento del rechazo agudo vascular de los tejidos xenogénicos (AVXR) es sugerida la utilización de un modelo complemento-independiente donde las células endoteliales o epiteliales porcinas desarrollen un cambio fenotípico con relación a la naturaleza de la interacción con los elementos sanguíneos circulantes, estos cambios incluyen: 1) El decremento en la función del plasminógeno activador tisular endógeno y el sub-

secuente incremento del plasminógeno activador inhibidor 1 que conlleva a una pérdida global de la acción fibrinolítica en las células endoteliales, 2) la regulación negativa de la trombomodulina que resulta en la pérdida de la actividad anticoagulante vía la activación de la proteína C, 3) el decremento del proteoglicano sulfato de heparán de la superficie endotelial que conlleva a la pérdida de la actividad anticoagulante vía inhibición de la antitrombina III, 4) la inducción del factor tisular que provoca la actividad del cofactor procoagulante, 5) la inducción en la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 y de la selectina E y P en el endotelio que asisten en la actividad de rodamiento leucocitario, y 6) la secreción de prostaciclina y endotelina 1, las cuales promueven la vasoconstricción y la disminución del flujo intravascular en los tejidos dañados.²⁶⁻³¹

La figura 1 ilustra los principales mecanismos inmunológicos observados durante el rechazo agudo vascular de tejidos xenogénicos. En combinación con el reconocimiento de los anticuerpos anti-cerdo y la actividad sublítica del complemento, el resultado en las lesiones patológicas es la trombo-

sis vascular y la infiltración leucocitaria del xenoinjerto. Saadi y colaboradores (1995)³² reportaron que la deposición de los anticuerpos xenorreactivos y la formación del MAC en los blancos porcinos induce la producción de IL-1 α con una clara función autocrina y paracrina que promueven algunos cambios en la morfología de la célula endotelial. Este problema puede ser exacerbado por la vasoconstricción y la trombosis microvascular observada, resultando en estasis vascular, donde pequeños agregados celulares derivados de la IL-1 α permanecen en el microambiente, creando una retroalimentación positiva. Además, la inducción de los cambios procoagulantes en las células endoteliales observados durante el AVXR pueden ser favorecidos por varios niveles de no-compatibilidad molecular entre los factores procoagulativos humanos, los cuales previenen la regulación negativa normal de un medio ambiente controlado por las células porcinas.³³

En condiciones normales, la trombomodulina es expresada en la superficie vascular de las células y regula negativamente el proceso trombótico por la activación de la proteína C dependiente de trom-

134

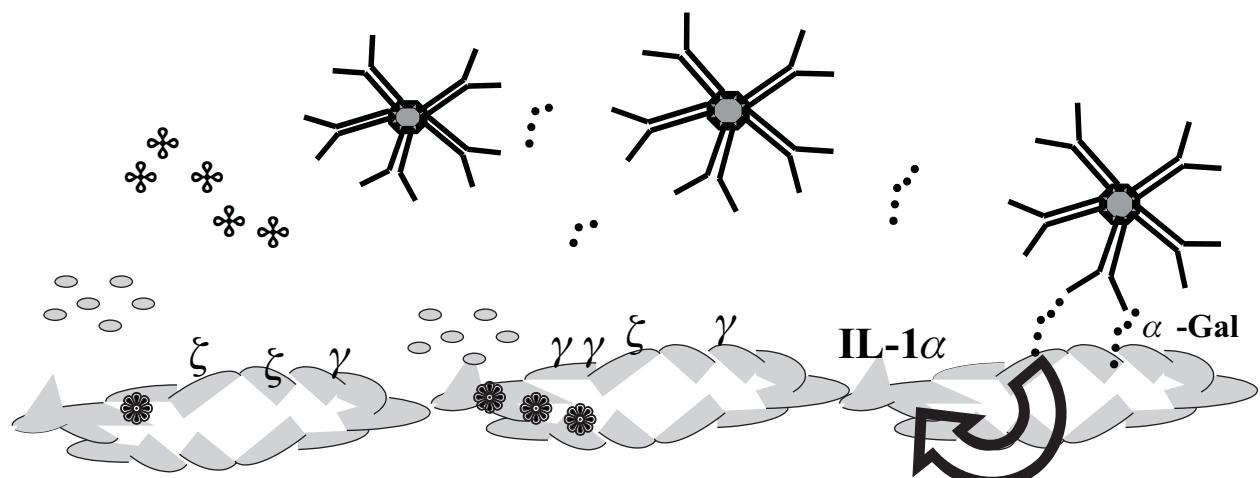


Figura 1. La patogénesis del rechazo agudo vascular xenogénico. El reconocimiento de los anticuerpos anti-cerdo ocurre en la superficie de las células endoteliales seguido por la actividad sublítica de los componentes finales del complemento (formación del complejo de ataque a la membrana). Estos eventos inducen un cambio fenotípico en las células blanco, mediado en parte por la acción de IL-1 α . Complejo de ataque a la membrana (●), factor tisular (ζ), plasminógeno activador inhibidor-1 (γ), trombomodulina (*), fragmentos xenogénicos libres (○○○).

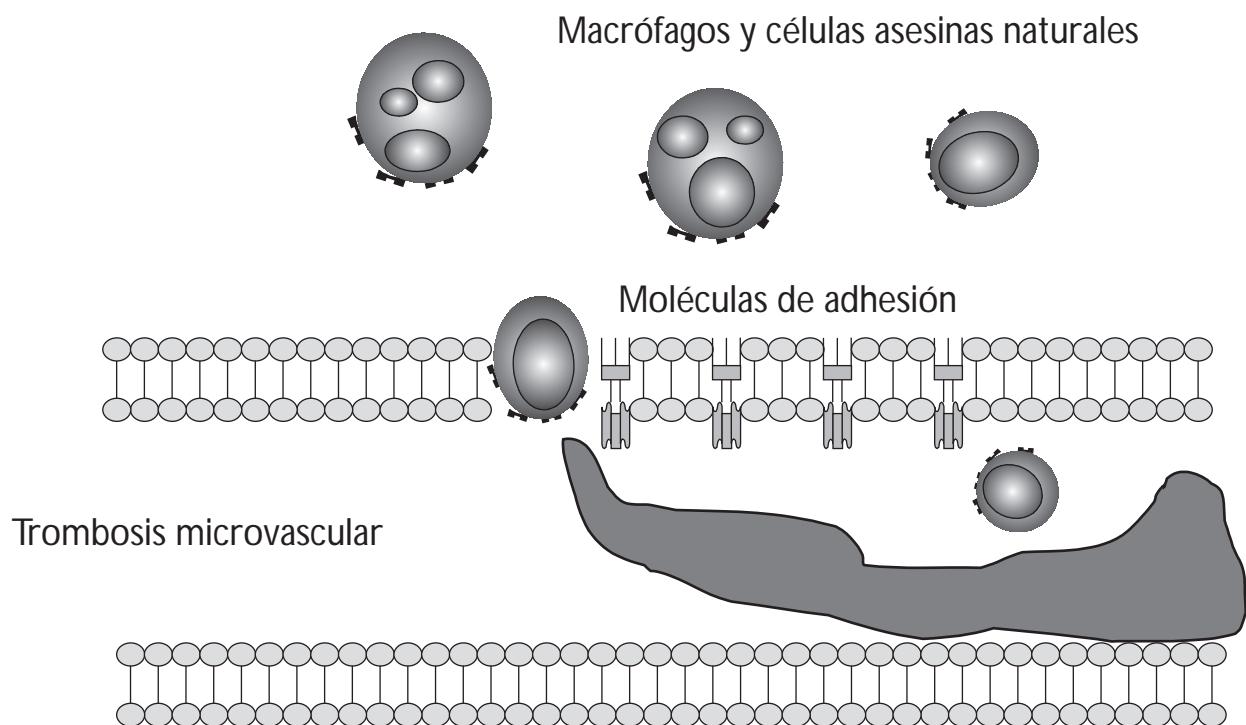


Figura 2. Diagrama esquemático de los hallazgos histopatológicos durante el proceso de rechazo agudo vascular xenogénico. La alteración de la matriz extraendotelial y la isquemia local es causada por la activación de los anticuerpos anti-Gal y el complemento. La trombosis microvascular difusa consistente de fibrina e infiltración del xenoinjerto por los polimorfonucleares, macrófagos y células asesinas naturales activadas son preferentemente observadas.

135

bina. La proteína C activada degrada rápidamente a los cofactores presentes durante la coagulación (factores Va y VIIIa). Lawson y colaboradores (1997)³⁴ demostraron que sólo 2% de la actividad de la trombomodulina porcina tiene efecto sobre la proteína C humana; esto se debe principalmente a la inhabilidad de la trombina humana a unirse a la trombomodulina porcina y a la carencia de interacción con el complejo anti-trombótico porcino. Las implicaciones fisiológicas de estas observaciones sugieren que el microambiente del xenoinjerto puede ser funcionalmente carente de proteína C que pueda interactuar con la trombomodulina porcina, lo que predispone a una trombosis microvascular con agregación de plaquetas. Además, la deposición de fibrina en el órgano vascularizado puede conducir a una progresiva isquemia, llevando a un estado de hipoxia del tejido con la disfunción celular acompañada.

Interacciones de los leucocitos humanos y las células endoteliales.

a) Adhesión y migración a través del endotelio porcino

El proceso de extravasación leucocitaria, el cual es un prerrequisito para la infiltración de leucocitos en el tejido, es iniciado por la expresión de las moléculas de adhesión, incluyendo selectinas, integrinas y las proteínas de las familias de las inmunoglobulinas en estrecha relación con factores atrayentes/activadores conocidos como quimiocinas.^{35,36} Las selectinas E y P en el endotelio porcino y la selectina L en los leucocitos inician la fase de rodamiento por unión a carbohidratos receptor-ligando. El rodamiento de las células es requerido para confirmar la adhesión en la zona de migración; esta fase es ejecutada por las integrinas leucocitarias (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18, CD49D/

CD29) unidas a los miembros de las superfamilias de las inmunoglobulinas expresadas en la matriz extracelular endotelial (ICAM-1, 2, 3 y VCAM-1) y potenciadas por la actividad de la quimiocinas endo y exógenas.³⁷⁻³⁹ En el paso de la migración transendotelial es demostrada la participación de otro miembro de la familia de las superinmunglobulinas, PECAM-1 (CD31), el cual interacciona con sus fracciones homo y heterofílicas que facilitan la migración a través de la monocapa endotelial y la lámina basal.^{38,39} Estos hallazgos sugieren que el endotelio porcino soporta la migración transendotelial de las subpoblaciones leucocitarias humanas tan eficientemente como el propio endotelio humano, observando la participación de los monocitos, NK y linfocitos CD3+.⁴⁰

b) El epitopo α -Gal y su importancia en la interacción celular

La principal diferencia fenotípica entre las células endoteliales porcinas y humanas es la expresión en los cerdos del epitopo α -Gal.⁴¹ La importancia de este carbohidrato xenogénico en el inicio del HAR ha sido demostrada; sin embargo, es tentativo considerar que esta molécula también puede influenciar la interacción de los leucocitos humanos con el endotelio porcino, especialmente en el entendimiento de las lectinas eucariotas que han sido descritas.⁴² Inverardi y colaboradores (1997) demostraron que la adhesión de las células NK humanas al endotelio porcino es selectivamente inhibida por los fragmentos F(ab's) de IgG y melibiosa (6- α -D-Galp-D-Glc) que se unen a los determinantes sacáridicos de α -Gal en presencia dependiente de Ca^{2+} .⁴³ Asimismo, las células NK humanas se adhieren específicamente a transfectantes de COS-7 que expresan α -1,3 galactosil transferasa (la enzima responsable de la síntesis del epitopo α -Gal).⁴⁴ Una actividad de adhesión de células NK humanas dependiente de α -Gal fue también sugerido por Miyagawa y su grupo (1999), quienes demostraron que la expresión del glicoan-

tígeno por la transfectación de los genes glicosil-transferasa en células endoteliales porcinas produjeron una marcada reducción de la citotoxicidad directa e indirecta mediada por las NK humanas, de 72 a 94% en el caso de células mononucleares periféricas y 27 a 72% con células YT (células NK humanas).⁴⁵

Por otro lado, una posible estrategia para inhibir la actividad de las NK humanas hacia las células endoteliales porcinas es la expresión de los antígenos MHC de clase I, tales como los HLA-G en los blancos porcinos. Las células NK son capaces de lisar células en las cuales la expresión de las moléculas de clase I, cuando están ausentes o alteradas, al no proveer de las señales para la inhibición de citotoxicidad vía la interacción con los receptores inhibitorios (KIR).⁴⁶ Otras opciones son la expresión del factor de deterioro-acelerador (DAF, CD55) y del ligando Fas (CD95L) inductor de la apoptosis.⁴⁷

La respuesta antigénica del linfocito T humano durante el xenotrasplante

a) Los antígenos MHC

Múltiples loci genéticos en la región MHC codifican para las moléculas HLA (*Human Leucocyte Antigens*) que son las glicoproteínas de membrana expresadas en la superficie de todas las células de mamíferos y que participan en la presentación de antígenos extraños. En los humanos, estos genes se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 y abarca 4,000 kb, describiendo alrededor de 50 genes. El MHC es subdividido en tres regiones denominadas de clase I, II y III. La región de clase I tiene una longitud de 1,500 kb y codifican para las moléculas HLA-A, B, C (H-2K, D, L en el ratón). La estructura conformacional de la molécula observa una cadena pesada de 45 kDa (cadena α) unida no covalentemente a la β 2-microglobulina de 12 kDa (cadena ligera). Las moléculas HLA de clase I participan como los blancos de los linfocitos

citotóxicos durante el rechazo de trasplantes y están involucradas en la regulación de la respuesta inmunológica a través de la presentación de los péptidos citosólicos derivados de los agentes infecciosos virales e intracelulares, un concepto conocido como restricción MHC.⁴⁸ La región HLA-D o de clase II abarca 1,000 kb con tres segmentos genéticos, la región DP localizada en el extremo centromérico en donde se localizan los genes funcionales DPA1 y DPB1, dos seudogenes los DPA2 y DPB2, los genes DNA, DMA, DMB, LMP2, LPM7, TAP1, TAP2 y DOB; el segmento DQ en el centro existiendo 4 loci, DQA1, DQA2, DQB1 y DQB2, y la subregión DR formada por 10 loci, un DRA que es poco polimórfico y 9 DRB del DRB1 al DRB9 de los cuales sólo se expresan los loci DRB1, 3, 4 y 5.⁴⁹ Los genes de clase II codifican para las cadenas α y β expresadas en la superficie de varias estirpes celulares, incluyendo los linfocitos B y las células presentadoras profesionales.

El análogo al MHC porcino, SLA (Swine Leucocyte Antigens), ha sido estudiado extensivamente desde el punto de vista funcional, demostrando que el pareamiento de los genes SLA de clase II son cruciales en la inducción de la tolerancia del injerto.⁵⁰ Cinco variantes genéticas han sido identificadas en la región D del SLA; sin embargo, los resultados sólo demuestran la expresión de las moléculas DQB y DRB (de acuerdo con la nomenclatura HLA, las letras A y B son asignadas para los genes del MHC que corresponden a las cadenas α y β , y que fueron codificadas a partir de una librería genómica). El análisis de restricción enzimática del ADN genómico de diferentes haplotipos SLA demostró la presencia de un gene polimórfico (DQA) y otro no (DRA).⁵¹ La estructura del gene SLA-DRA y la secuencia comparativa con HLA fueron caracterizadas por Hirsch y colaboradores (1982).⁵² Los transcritos obtenidos de un ADN complementario demostraron que ambos haplotipos contienen un marco de lectura de 756 nucleótidos que codifican para 252 aminoácidos, comenzando con un codón de iniciación en la posición

76 y uno de terminación en 832 (L). La región amino-terminal de la proteína comienza con un codón ATC (I) en la posición 145 con una secuencia peptídica de 23 aminoácidos. En contraste con el DRA humano, la secuencia de aminoácidos desplegó un tercer sitio de glicosilación en la posición 124 (N-G-S) aunado a los dos anteriores en las posiciones 78 (N-N-T) y 118 (N-V-T), respectivamente; de igual manera, la presencia de tres sitios de glicosilación han sido reportados en el modelo murino I-A^k.⁵³ El dominio α 2 de la molécula externa situado en la posición 180 a la 229 contiene péptidos conectivos, la región transmembranal y cito-plasmática de la proteína. La alineación de las secuencias DRA en HLA y SLA reveló 87% de homología nucleótida y 83% de amino-peptídica, lo que refleja una fuerte presión selectiva en contra de las mutaciones de la proteína, asimismo confirma que los genes ancestrales de clase II fueron organizados en su estructura final con anterioridad a la evolución de las especies.^{54,55}

137

b) La interacción TCR-péptido-MHC en el reconocimiento de los xenoantígenos

Los hallazgos histopatológicos del rechazo agudo vascular son caracterizados por la inflamación del endotelio porcino, la isquemia focal causada por la trombosis microvascular difusa consistentemente en fibrina con infiltración del tejido por macrófagos activados y células asesinas naturales, siendo escasa la presencia de linfocitos T.⁵⁶ Sin embargo, el reconocimiento celular alogénico tiene una base molecular en la interacción TCR-péptido-MHC. La respuesta inmune celular es dependiente del reconocimiento específico de las moléculas $\alpha\beta$ del receptor en los linfocitos T (TCR). La unión física del complejo MHC-péptido al TCR inicia una serie de eventos de señalización que finaliza con la activación de la célula efectora, la liberación de citocinas o de los productos citotóxicos que destruyen a las células blanco. Estas moléculas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ son polipéptidos anclados en la membrana de los linfocitos T y están asociados no

covalentemente con el componente monomórfico CD3. Cada una de las moléculas observa una región constante y un dominio variable; este último es codificado a través del ensamble de varios genes. De estructura similar a las inmunoglobulinas, con relación a los dominios variables ($V\alpha$ y $V\beta$) se observan regiones hipervariables (determinantes de complementariedad, CDR) formando el sitio de unión al péptido-MHC.⁵⁷

Por el contrario, las moléculas MHC de clase I y II han evolucionado para facilitar la detección de péptidos distintos a los propios residentes en los compartimientos intracelulares; aunque la organización de los dominios extracelulares en ambas moléculas es diferente, la presentación de los péptidos es similar a partir de una hendidura formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y $\alpha 1$ y $\beta 1$ para la clase I y II, respectivamente. En ambas moléculas, las α hélices forman la pared del surco con el piso del mismo creado por las ocho bandas β plegadas; sin embargo, las características estructurales de cada molécula dirigen las diferencias en la unión al péptido en composición de cargas peptídicas y en longitud. Los estudios por cristalografía de los complejos TCR-péptido-MHC han demostrado el reconocimiento de antígenos virales, péptidos agonistas y antagonistas y el alorreconocimiento en el rechazo de injertos en donde se acoplan la interfase del TCR con el péptido unido a la molécula MHC; pero no se han observado cambios estructurales en la interacción que puedan favorecer un tipo de señal o determinar diferentes señales de activación. En toda interacción, los CDR2 de los linfocitos $\alpha\beta$ contactan sólo con las moléculas MHC, mientras los CDR1 y CDR3 con el complejo péptido-MHC observando que los dominios $V\alpha$ siempre están unidos al péptido en la región N-terminal y el dominio $V\beta$ a la C-terminal con el TCR, estableciendo un ángulo a través del sitio de unión. En los complejos TCR-péptido-MHC de clase I, el ángulo entre la dirección del péptido y el eje transversal en la interfase del TCR está entre 45 y 70° y en el TCR-péptido MHC de clase II está

entre 70 y 80°. La superficie de contacto del TCR es relativamente plana con una cavidad central, mientras la superficie de la molécula MHC observa dos picos; la aparente unión entre esos picos forma un espacio accesible para las partículas de agua y de proteínas oligoméricas necesarias para el intercambio iónico.

Durante el reconocimiento de antígenos extraños, sólo una tercera parte de los péptidos de superficie están disponibles para ser reconocidos por los TCR. El TCR contacta de cinco a siete aminoácidos en la banda de ocho residuos de los péptidos unidos al MHC de clase I y de seis a siete en la banda de nueve para las de clase II. En algunos casos la superficie plana del TCR contacta la proyección de la cadena lateral de un péptido; en otras, el péptido central (Y) es completamente rodeado por un profundo bolsillo en la superficie del TCR formado por los dos CDR3. El número de los contactos entre el TCR y el péptido es limitado, lo que sugiere la reactividad cruzada de los aminoácidos en los cuales más de una secuencia peptídica puede ajustar el par TCR-MHC, aunque en las reactividades cruzadas de diferentes péptidos puede generar la misma señal de activación, en otros casos la simple sustitución de un aminoácido puede no permitir el contacto del par, convirtiendo una unión fuerte en una función antagonista con disminución en la fosforilación de proteínas intracelulares.^{58,59}

Los eventos iniciales en la cascada de señalización consisten en la activación de las moléculas tirosinas cinasas, tales como ZAP-70 y Lck, así como de la fosforilación de numerosos sustratos.⁶⁰ La presencia de los microdominios membranales llamados "rafts" (balsas de lípidos) facilita el reclutamiento de otras moléculas que participan en la conducción, amplificando la señal comenzada en el complejo TCR, siendo la molécula adaptadora de unión (LAT) la encargada de dirigir el evento de señalización para las diferentes rutas.^{61,62} Los eventos posteriores observados en la ruta de señalización a través del TCR consisten en la traslocación

de factores en el núcleo de la célula y la transcripción de los marcadores de activación, tales como CD69 y CD25 (marcador de activación temprana de linfocitos y el receptor de la cadena α de interleucina 2, respectivamente), también como de algunas citocinas. En caso de que la maquinaria de señalización sea comenzada, otras proteínas membranales como CD8 y CD4 y la molécula co-estimuladora CD28 controlan la magnitud y calidad de la respuesta por el linfocito T.^{63,64}

Por otra parte, no existen modelos xenogénicos *in vitro* que determinen la activación de los linfocitos T humanos con doble especificidad antigenica. Es difícil establecer que estas células sean capaces de diferenciar un específico reconocimiento de otro con un cierto grado de activación; sin embargo, al analizar los efectos aditivos de la estimulación con lisozima de huevo (HEL) y con el péptido del citocromo c en linfocitos T CD4+ con especificidades para ambos antígenos, Robertson y Evavold (1999)⁶⁵ observaron una reducida proliferación celular con el uso de un análogo de HEL, el cual presentaba una sola diferencia en el aminoácido 59, el cual es la posición 8 de la estructura del péptido HEL 50-62 unido a I-A k (N por I). Estos resultados sugirieron que la disminución en la proliferación de los linfocitos T CD4+ fue dependiente de la especificidad por HEL y de la cantidad de los TCR interaccionados en la presentación. Un TCR reconoce a los péptidos unidos a la molécula MHC con una respuesta específica del linfocito T, dependiendo de las características del ligando. Péptidos antagonistas y parcialmente agonistas han sido identificados en diferentes sistemas receptor-ligando.⁶⁶ Estos péptidos son generados a partir de una simple sustitución de algún aminoácido en el punto inmunogénico que interactúa con el TCR. Los péptidos antagonistas pueden estimular a una subserie de linfocitos T con eventos de activación parcial en la fosforilación de la cadena ξ del TCR por ZAP-70 y LAT, y la disminución en la activación de LcK.⁶⁷ Mientras mayor sea el grado de estimulación debida a la interacción del ligando, los even-

tos de señalización tardía y las funciones efectoras de las células serán observadas en los linfocitos T activados.⁶⁸ La precisa identificación de los péptidos antagonistas en la cascada de señalización iniciado por el TCR y que causan el bloqueo de la activación de Ras podrá ofrecer una alternativa en la estrategia terapéutica de la presensibilización de los linfocitos T para la inducción de la no respuesta inmunológica que puede resultar en una prolongada supervivencia del xenoinjerto.

Asimismo, el desbalance entre las funciones mediadas por las células Th1 y Th2 son un paradigma frecuentemente referido como una explicación de las magnitudes en las respuestas inmunológicas durante el rechazo de injertos. Las subseries T cooperadoras han sido definidas por los patrones de citocinas que ellas producen, aunque distintos marcadores de superficie celular pueden ser observados preferencialmente en las células Th (marcador de activación temprana y molécula quimioatrayente receptor homólogo expresada en las células Th2).⁶⁹ Además, se ha reportado que los factores de transcripción T-bet y GATA-3 y las proteínas Tec y Itk de la familia de las tirosina cinasa controlan el proceso de diferenciación de las subseries Th. Asimismo, la identificación de las actividades agonistas y antagonistas de las moléculas quimioatrayentes producidas por las células Th, las cuales regulan la migración leucocitaria en la inflamación e inmunidad.⁷⁰⁻⁷³

139

Conclusiones

Una caracterización molecular de los eventos que conducen la interacción de los leucocitos humanos con el endotelio porcino en un ambiente pro-coagulante es esencial para entender la patogénesis del rechazo de órganos vascularizados mediado por células y cómo estos hallazgos pueden diferir de lo observado en alotrasplantes. Para evitar el rechazo del xenoinjerto, deberán ser establecidas nuevas estrategias en la terapia clínica con el propósito de inhibir la interacción específica de los

leucocitos en el endotelio porcino, así como la inmunosupresión de las subseries celulares activas. El apropiado uso de las drogas inmunosupresoras, de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia los receptores de adhesión, de proteínas de fusión químérica dirigidas a la adhesión de inmunoglobulinas, de fragmentos extracelulares solubles recombinantes anti-receptores, de péptidos miméticos y glicomiméticos utilizados en los modelos animales, así como del uso de cerdos transgénicos, permitirá al proceso del xenotrasplante ser una realidad clínica para los pacientes que lo requieran.

Referencias

- Dorling A, Binns R, Lechner RI. Direct human T-cell anti-pig xenoresponses are vigorous but significantly weaker than direct alloresponses. *Transpl Proc* 1996; 28: 653.
- Auchincloss H. Xenogeneic transplantation. *Transpl* 1988; 46: 1-20.
- Arteaga Troncoso G, Guerra-Infante F. Mecanismos de reconocimiento humoral en el xenotrasplante de órganos sólidos: I. Revisión del rechazo hiperagudo. *Rev Mex Patol Clin* 2002; 49: 130-140.
- Rose AG, Cooper DKC, Human PA, Reichenspurner H, Reichart B. Histopathology of hyperacute rejection of the heart: Experimental and clinical observations in allografts and xenografts. *J Heart Lung Transpl* 1991; 10: 223-234.
- Galili U. Interaction of the natural anti Gal antibody with α -galactosid epitopes: A major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 1993; 14: 480-482.
- Cooper CKD, Koren E, Oriol R. Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunol Rev* 1994; 141: 31-58.
- Alvarado GC, Cotterell HA, McCurry RK, Collins HB, Magee CJ et al. Variation in the level of xenoantigen expression in porcine organs. *Transpl* 1995; 59: 1589-1596.
- McMorrow I, Comrack C, Sach DH, Dersimonian H. Crossreactivity of human anti-pig IgG and IgM natural antibodies with alpha 1,3 Gal. *Transpl* 1996; 28: 547.
- Avila JL, Rojas M, Galili U. Immunogenic Gal- α 1,3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic american *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Immunol* 1989; 142: 2828.
- Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, Oegema TR, Bach FH, Dalmasso AP. Release of heparan sulfate from endothelial cells. *J Exp Med* 1990; 171: 1363-1368.
- Inverardi L, Pardi R. Early events in cell-mediated recognition of vascularized xenografts: Cooperative interactions between selected lymphocyte subsets and natural antibodies. *Immunol Rev* 1994; 71-93.
- Malyguine AM, Saadi S, Platt JL, Dawson JR. Human natural killer cells induce morphologic changes in porcine endothelial cell monolayers. *Transpl* 1996; 61: 161-164.
- Moses RD, Pierson RN, Winn HJ, Auchincloss H. Xenogeneic proliferation and lymphokine production are dependent on CD4+ helper T cells and self antigen-presenting cells in the mouse. *J Exp Med* 1990; 172: 567.
- Shishido S, Naziruddin B, Howard T, Mohanakumar T. Recognition of porcine major histocompatibility complex class I antigens by human CD8+ cytolytic T cell clones. *Transpl* 1997; 64: 340-346.
- Shishido S, Naziruddin B, Xiao-Chun X, Howard T, Mohanakumar T. Indirect recognition of porcine xenoantigens by human CD4+ T cell clones. *Transpl* 1998; 65: 706-712.
- Muñoz R, Romero B, Medeiros M, Zaragoza L. Renal graft survival in children with early acute rejection. *Pediatr Transplantation* 1998; 2: 294-298.
- Widner MB, Bach FH. Allogeneic and xenogeneic response in mixed lymphocyte cultures. *J Exp Med* 1972; 135: 1204-1208.
- Lindahl KF and Bach FH. Human lymphocytes recognize mouse alloantigens. *Nature* 1975; 254: 607.
- Lindahl KF, Bach FH. Genetic and cellular aspects of xenogeneic mixed leukocyte culture reaction. *J Exp Med* 1976; 144: 305-318.
- Swain SL, Dutton RW, Schwab R, Yamamoto J. Xenogeneic human anti-mouse T cell responses are due to the activity of the same functional T cell subsets responsible for allospecific and major histocompatibility complex restricted responses. *J Exp Med* 1983; 157: 720-729.
- Pierson RN III, Winn HJ, Russell PS, Auchincloss H Jr. Xenogeneic skin graft rejection is specially dependent on CD4+ T cell. *J Exp Med* 1989; 170: 991-996.
- Goulmy E, Pool J, Van Lochem E, Völker-Dieben H. The role of human minor histocompatibility antigens in graft failure: a mini-review. *Eye* 1995; 9: 180-184.
- Auchincloss H Jr, Moses R, Conti D, Sundt T, Smith C, Sach DH. Rejection of transgenic skin expressing a xeno class I antigen is CD4 dependent and CD8 independent. *Transpl Proc* 1990; 22: 1059-1060.
- Wren SM, Wang SC, Thai NL, Conrad B, Hoffmann RA, Fung JJ. Evidence for early Th2 cell predominance in xenoreactivity. *Transpl* 1993; 56: 905-911.
- Starzl TE, Todd S, Fung JJ. FK506 for liver, kidney and pancreas transplantation. *Lancet* 1989; 334: 1000-1004.
- Bustos M, Saadi S, Platt JL. Modulation of endothelial metabolism by xenogenic serum: implications for vasoconstriction and permeability. *Transpl Proc* 1996; 28: 624-627.
- Rosenberg RD, Bauer KA. Thrombosis in inherited deficiencies of antithrombin, protein C, and protein S. *Hum Pathol* 1987; 18: 253-262.
- Platt JL. A perspective on xenograft rejection and accommodation. *Immunol Rev* 1994; 141: 127-149.
- Brindley NP. Role of vascular endothelial cells in the allograft response. *Eye* 1995; 9: 167-172.
- Holgersson J, Ehrnfelt C, Hauzenberger E, Serrander L. Leukocyte endothelial cell interactions in pig to human organ xenograft rejection. *Vet Immun Immunopathol* 2002; 87: 407-415.
- Lawson JH, Platt JL. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transpl* 1996; 62: 303-310.
- Saadi S, Holzknecht RA, Patte CD, Stern DM, Platt JL. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med* 1995; 182: 1807.
- Siegel JB, Grey ST. Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin. *Transpl* 1997; 64: 888-896.
- Lawson JH, Daniels LJ, Platt JL. The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation. *Transpl Proc* 1997; 65: 756-759.
- Warrens AN, Simon AR et al. Cross-species compatibility of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) with its ligands. *Transpl* 2000; 69: 394-399.
- Robinson LA, Tu L, Steeber DA, Preis O, Platt JL et al. The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine

- vascular endothelium: Implications for xenotransplantation. *J Immunol* 1998; 161: 6931-6938.
37. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127.
 38. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
 39. Simon AR, Warrens AN et al. Cross-species interaction of porcine and human integrins with their respective ligands. Implications for xenogeneic tolerance induction. *Transpl* 1998; 66: 385-394.
 40. Hauzenberger E, Hauzenberger D, Hultenby K, Holgersson J. Porcine endothelium supports transendothelial migration of human leukocyte subpopulations. Anti-porcine VCAM-1 antibodies as species-specific blockers of transendothelial monocyte and NK cell migration. *Transpl* 2000; 69: 1837-1849.
 41. Phelps CJ, Chihiro K, Vaught TD, Boone J, Wells KD et al. Production of α -1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 2003; 299: 411-414.
 42. Crocker PR, Varki A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol* 2001; 22: 337-342.
 43. Inverardi L, Clissi B. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transpl* 1997; 63: 1318-1330.
 44. Galili U, Anaraki F. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood* 1993; 82: 2485-2493.
 45. Miyagawa S, Nakai R, Yamada M, Tanemura M, Ikeda Y, Taniguchi N, Shirakura R. Regulation of natural killer cell-mediated swine endothelial cell lysis through genetic remodeling of a glycoantigen. *J Biochem* 1999; 126: 1067-1073.
 46. Anita S, Chong F. Receptors that turn on and turn off natural killer cells. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 675-683.
 47. Kusama T, Miyagawa S, Moritan T, Kubo T, Yamada M, Sata H, Fukuda D, Matsunami K, Shirakura R. Downregulation of NK cell-mediated swine endothelial cell lysis by DAF (CD55). *Transplant Proc* 2003; 35: 529-532.
 48. Yewdell JW, Norbury CC, Bennink JR. Mechanisms of exogenous antigen presentation b7y MHC Class I molecules *in vivo* and *in vitro*: Implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Advances Immunol* 1999; 73: 1-77.
 49. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993; 14: 349-352.
 50. Pescovitz MD, Thistlethwaite JR Jr., Auchincloss H Jr., Ildstad ST, Sharp TG, Terrill R, Sachs DH. Effect of class II antigen matching on renal allograft survival in miniature swine. *J Exp Med* 1984; 160: 1495-1499.
 51. Sachs DH, Germana S, El-Gamil M, Gustafsson K, Hirsch F, Pratt K. Class II genes of miniature swine. I. Class II gene characterization by RFLP and by isolation from a genomic library. *Immunogenetics* 1988; 28: 22-25.
 52. Hirsch F, Germana S, Gustafsson K, Pratt K, Sachs DH, Leguern C. Structure and expression of class II α genes in miniature swine. *J Immunol* 1992; 149: 841-846.
 53. Cowan EP, Cummings RD, Schwartz BD, Cullen SF. Analysis of murine Ia antigen glycosylation by lectin affinity chromatography. *J Biol Chem* 1982; 257: 11241-1126.
 54. Figueroa F, Gunther E, Klein J. MHC polymorphism pre-dating speciation. *Nature* 1988; 335: 265.
 55. Hammer C, Suckfull M, Saumweber D. Evolutionary and immunological aspects of xenotransplantation. *Transpl Proc* 1992; 24: 2397-2400.
 56. Blakely ML, Van Der Werf WJ et al. Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transpl* 1994; 58: 1059-1066.
 57. Reinherz EL, Tan K, Tang L, Kern P, Liu J et al. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 1999; 286: 1913-1921.
 58. Hennecke J, Wiley DC. T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* 2001; 104: 1-4.
 59. Shaw AS, Gauen LK, Zhu Y. Interactions of TCR tyrosine based activation motifs with tyrosine kinases. *Semin Immunol* 1995; 7: 13.
 60. Viola A. The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends Immunol* 2001; 22: 322.
 61. Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Trible RP, Samelson LE. LAT: The ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cell activation. *Cell* 1998; 92: 8.
 62. Germain RN. T-cell signaling: The importance of receptor clustering. *Curr Biol* 1997; 7: 640.
 63. Viola A, Schroeler S, Sakakibara, Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by recognition of membrane microdomains. *Science* 1999; 283: 680.
 64. Robertson MJ, Evavold DB. Dueling TCRs: Peptide antagonism of CD4+ T cells with dual antigen specificities. *J Immunol* 1999; 163: 1750-1754.
 65. Jameson SC, Bevan MJ. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* 1995; 2: 1-4.
 66. McKay BD, Irie YH, Hollander G et al. Antigen-induced unresponsiveness results in altered T cell signaling. *J Immunol* 1999; 163: 6455-6461.
 67. Madrenas J, Wange RL, Wang JL et al. ξ phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 1995; 267: 515-516.
 68. Castro AG, Hauser TM, Cocks BG, Abrams J, Zurawski S et al. Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): Differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 1999; 163: 5860-5866.
 69. Nagata K, Tanaka K, Ogawa K, Kimmoto K, Imai T et al. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells *in vivo*. *J Immunol* 1999; 162: 1278-1284.
 70. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000; 21: 479.
 71. Kashiwakura J, Suzuki N, Nagafuchi H, Takeno M, Takeba Y et al. Txk, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family, is expressed in T helper type 1 cell and regulates interferon α production in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1999; 190: 1147-1152.
 72. Fowell DJ, Shinkai K, Liao XC, Beebe AM, Coffman RL et al. Impaired NFATc translocation and failure of Th2 development in Itk-deficient CD4+ T cells. *Immunity* 1999; 11: 399-404.
 73. Loestscher P, Clark-Lewis I. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 881-884.