



## Tolerancia inmunológica en el trasplante hepático

Pablo Ramírez<sup>a,\*</sup>, José Antonio Pons<sup>b</sup>, Pedro Antonio Cascales<sup>a</sup> y Pascual Parrilla<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Trasplante Hepático, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

<sup>b</sup>Sección de Hepatología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

### Introducción

El trasplante hepático (TH) se ha convertido en un tratamiento eficaz para determinadas enfermedades que tienen como consecuencia una insuficiencia aguda o crónica irreversible de la función hepática. Sin duda, los avances en el tratamiento inmunodepresor han sido determinantes en la evolución y en el éxito del TH. Con la introducción de los nuevos fármacos inmunodepresores, la incidencia de rechazo agudo ha disminuido de forma considerable y, actualmente, la supervivencia de los pacientes trasplantados hepáticos es mayor del 85% al año y del 70% a los 5 años del trasplante<sup>1,2</sup>. No obstante, la toxicidad asociada con el uso de fármacos inmunodepresores no es desdeñable, con el desarrollo de complicaciones como hipertensión arterial, hiperlipemia, diabetes, insuficiencia renal y neoplasias de novo en los pacientes trasplantados<sup>3,4</sup>.

Es un hecho bien conocido que el TH alogénico en especies animales como el cerdo y entre ciertas combinaciones de ratas y ratones, puede realizarse sin inmunodepresión (IS)<sup>5-7</sup>. Hay evidencias clínicas en el TH que permiten afirmar que es posible la retirada de la IS en pacientes, alcanzándose lo que se denomina tolerancia clínica operacional (TCO)<sup>8-13</sup>.

En el contexto del TH clínico hay diversos motivos por los que el estudio de la TCO es de gran interés: *a*) es conocida la ausencia de consecuencias negativas del rechazo agudo precoz a largo plazo; *b*) la resolución espontánea, en ocasiones, de los episodios de rechazo sin necesidad de IS adicional; *c*) la baja frecuencia de rechazo crónico; *d*) la posibilidad de retirar completamente la IS en algunos pacientes con TH, y *e*) la retirada de la IS podría mejorar el perfil de complicaciones renales y cardiovasculares.

Aunque la tolerancia sería el objetivo ideal, la heterogeneidad de combinaciones posibles entre donante y receptor, el estado inmune del receptor, la enfermedad de base del paciente trasplantado y las consecuencias imprevisibles de las infecciones hacen que una tolerancia estable sea extremadamente difícil en todos los pacientes<sup>14</sup>. La identificación de biomarcadores capaces de identificar la TCO es un modo más accesible y real de evitar un tratamiento inmunodepresor del que se puede prescindir. Sin embargo, hasta el momento ningún estudio ha podido establecer una herramienta diagnóstica útil que identifique los pacientes con TCO.

El presente artículo tiene por objetivo la revisión de las experiencias clínicas descritas en el marco de la TCO, así como las herramientas que predicen y son capaces de medir dicha tolerancia.

### Tolerancia clínica operacional en el trasplante hepático

Desde un punto de vista inmunológico, la tolerancia es definida como un estado de no reactividad inmune frente a antígenos específicos y que se mantiene indefinidamente aun en ausencia de IS; es la llamada *tolerancia inmunológica* (fig. 1). En el ámbito clínico se ha definido la tolerancia operacional o TCO para designar la situación en la que hay función normal del injerto y ausencia de rechazo agudo o crónico en un paciente inmunocompetente, al que se le retiró completamente la IS. Una situación real en la práctica clínica es la de pacientes con IS a dosis significativamente reducidas con buena función del injerto. Esta situación se define como *tolerancia de mínima IS*.

Diversas observaciones clínicas y experimentales indican que el hígado es "menos inmunogénico" que otros órganos vascularizados, y que el injerto hepático puede inducir propiedades tolerogénicas a otros órganos. En pacientes trasplantados hepáticos seleccionados es posible retirar definitivamente toda la IS hasta en un 25-30% de casos<sup>8-11</sup>, permaneciendo con función hepática normal, en algunos casos, hasta 30 años después de la retirada<sup>12</sup>. El injerto hepático en humanos es menos susceptible al rechazo humoral<sup>15</sup> y no requiere compatibilidad MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) entre donante y receptor<sup>16</sup>. En el trasplante hepatorenal, el injerto hepático protege habitualmente al riñón del rechazo agudo humoral y celular<sup>17</sup>.

### Experiencia clínica en tolerancia clínica operacional en el trasplante hepático

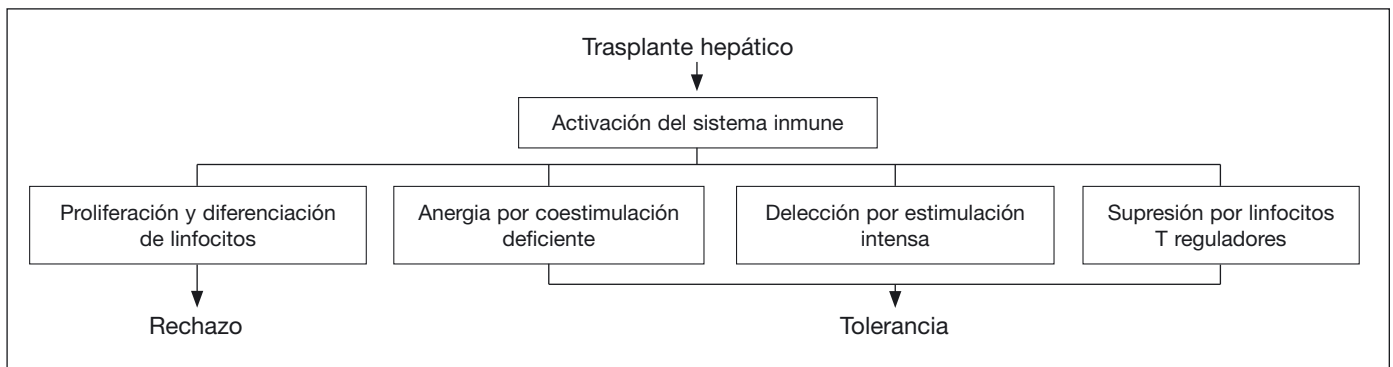
De acuerdo con la estrategia de retirada del tratamiento IS, la TCO puede dividirse en 4 grupos. El primer grupo identifica los casos de retirada de IS sin la utilización de ningún tratamiento previo. El segundo grupo incluye los casos de retirada de IS después de tratamiento con moléculas tolerogénicas. El tercer grupo comprende los casos de retirada de IS después de una terapia celular tolerogénica. Finalmente, en el cuarto grupo se describen los casos de TCO desarrollada después de un trasplante de médula ósea.

*Grupo A. Retirada de inmunodepresión sin tratamiento previo de acondicionamiento (tabla 1)*

Los primeros casos de TCO después del TH fueron documentados por Starzl et al.<sup>19,18-23</sup> a principios de los años noventa. Basándose en el hallazgo de que 11 pacientes trasplantados hepáticos habían dejado de tomar la medicación IS, por falta de adherencia al tratamiento o por enfermedad linfoproliferativa postrasplante, los autores designaron un estudio prospectivo de retirada intencionada de IS en pacien-

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ramirezp@um.es (P. Ramírez).



**Figura 1.** Mecanismos de rechazo y tolerancia en el trasplante de órganos.

tes con TH y toxicidad asociada a la IS. En 28 (29%) de los 95 pacientes incluidos en el estudio se pudo retirar la IS completamente sin alteraciones de la función hepática hasta 2,2 años después de la inclusión. Girlanda et al<sup>10,24</sup> publicaron el seguimiento durante 10 años de un ensayo clínico con 18 pacientes con complicaciones derivadas de la IS que fueron sometidos a retirada de IS. El protocolo de retirada fue inicialmente posible en 5 (28%) pacientes, pero solamente 2 (11%) de ellos permanecieron libres de IS a largo plazo. Tanaka et al<sup>11,25</sup> documentaron su experiencia inicial en TCO en una población de 63 receptores pediátricos con trasplante de donante vivo. La TCO se obtuvo en 24/63 (38%) niños tras un período de seguimiento de 23,5 meses (rango, 3-69 meses). Dieciséis (25,4%) niños presentaron rechazo en un período medio de 9,5 meses, controlado en todos los casos con el reinicio del tratamiento IS o esteroideo. Nuestro grupo, en el año 2003, fue el cuarto en el ámbito mundial en realizar un estudio prospectivo de TCO en 9 pacientes con TH<sup>8</sup>. Tisone et al<sup>26,27</sup> publicaron los resultados a 4 años de un estudio prospectivo, en el cual la retirada de IS se realizó en 34 pacientes con TH y recurrencia del virus de la hepatitis C (VHC). La IS se pudo retirar de forma segura en 8/34 (27,2%) pacientes, aunque el impacto de la TCO en la progresión de la enfermedad por VHC no fue tan pronunciado como el análisis realizado a los 4 años de la retirada de la IS<sup>28</sup>.

#### Grupo B. Protocolos tolerogénicos basados en terapias moleculares (tabla 2)

En el año 2003, Starzl et al<sup>29</sup> publicaron los resultados de un ensayo en el que administraron inicialmente un protocolo de IS (depleción linfocitaria en sangre con monoterapia posterior con tacrolimus) a 82 adultos receptores de trasplantes renales, hepáticos, intestinales y de páncreas. En esta situación, la reposición posterior del sistema inmune puede ocurrir una vez que los antígenos extraños se han adaptado con el nuevo trasplante. Tras un seguimiento de 18 meses, los porcentajes de supervivencia de los pacientes y del injerto al año fueron del 95 y el 82%, respectivamente. No hubo mortalidad relacionada con la IS y 48 de los 72 supervivientes recibían dosis espaciadas de tacrolimus en monoterapia. Estos resultados fueron considerados muy novedosos dado que 25/39 (64%) pacientes con trasplante renal, 12/17 (70%) con trasplante hepático, 5/12 (42%) con trasplante de páncreas y 6/11 (54%) trasplantes intestinales llevaban dosis espaciadas de tacrolimus.

Inspirados en la experiencia de Pittsburgh, Eason et al<sup>30</sup> intentaron la retirada completa de IS en 18 pacientes, con al menos 6 meses de seguimiento postrasplante hepático, que habían recibido globulina antitímocítica de conejo como inducción de IS en combinación con

**Tabla 1**  
Experiencia clínica en tolerancia clínica operacional sin protocolos tolerogénicos

Centro/año (referencia)	Número de pacientes	Media entre TH y retirada IS (meses)	% de retirada completa de IS	% de rechazo agudo/crónico	% de pérdidas de injerto	Seguimiento desde la retirada de IS (meses)
Pittsburg/1997 (9)	95	70	29	26/0	0	180
Londres/1998 (10)	18	60	11	22/5,5	5,5	120
Kyoto/2001 (11)	63	> 24	38	25	0	24
Murcia/2003,2008 (8,42)	22	40	45,4	27,2	0	61
Roma/2006 (27)	54	63	23,5	76,4/0	0	45
Otros (Columbus, Bruselas, Taiwán, Sydney) (43-47)	4 (1 por centro)	2-60	1 por centro	0	0	36-60
Total*	256	51,4	29,4	35,2	1,1	86

IS: inmunodepresión; TH: trasplante hepático.

\*Sin contar las experiencias con casos aislados.

**Tabla 2**  
Protocolos tolerogénicos basados en terapias moleculares

Centro/año (referencia)	Número de pacientes	Media entre TH y retirada IS (meses)	Protocolo tolerogénico	n (%) de retirada completa de IS	% de rechazo agudo/crónico	% de pérdidas de injerto	Seguimiento desde la retirada de IS (meses)
Pittsburg/2003 (29)	82 (múltiples órganos)	Al inicio	ATG	0	?	0	15
New Orleans/1998 (30)	18	≥ 6	ATG	1 (6%)	77	0	12
Ontario/2007 (31,32)	26	56	AUDC	2 (8%)	58	0	12
Total	61			3 (5%)		0	13

IS: inmunodepresión; TH: trasplante hepático.

**Tabla 3**

Protocolos tolerogénicos basados en terapias celulares

Centro/año (referencia)	Número de pacientes	Media entre TH y retirada IS (meses)	Protocolo tolerogénico	n (%) de retirada completa de IS	% de rechazo agudo/crónico	% de pérdidas de injerto	Seguimiento desde la retirada de IS (meses)
Innsbruck-Viena/2000 (48)	1	2	Trasplante de células madre de su madre	1 (100)	0	0	4
Göteborg/2005 (49)	1	Al inicio	Trasplante de células madre de su padre	1 (100)	0	0	60
Ghent-Bruselas/2004 (50-52)	26	Al inicio	Trasplante de células madre de donante vivo	3 (100)	66 pero con TCO posterior	0	16
Miami/2005 (34)	104	≥ 12	Perfusión células MO del donante	20 (19%)	67/1,9	0,96	26
Total	132			25 (19)		0,24	26,5

IS: inmunodepresión; TH: trasplante hepático.

tacrolimus solo o en combinación con micofenolato mofetil. Los resultados del estudio fueron desalentadores, concluyendo los autores que la retirada de IS fue más peligrosa que beneficiosa.

Assy et al<sup>31,32</sup> publicaron los resultados de un ensayo no controlado de retirada total de IS después del TH. Los autores separaron en 2 grupos de forma aleatoria a 26 pacientes con TH para recibir 15 mg/kg de ácido ursodeoxicólico (AUDC) o placebo seguido de retirada paulatina de IS. La base de dicha pauta era la evidencia de que el AUDC reducía la incidencia y severidad del rechazo agudo en el TH, a través de una reducción en la expresión de HLA en el epitelio biliar y las venas centrolobulillares<sup>33</sup>. Los resultados no confirmaron la hipótesis de trabajo, puesto que 15/26 (58%) pacientes presentaron un rechazo agudo entre la 12 y 21 semanas del inicio de la retirada de IS. Solamente 2 (8%) pacientes pudieron retirar completamente la IS.

#### Grupo C. Protocolos tolerogénicos basados en terapias celulares (tabla 3)

Tzakis et al<sup>34</sup> plantearon la hipótesis de que la perfusión perioperatoria de células de médula ósea del donante podría favorecer la TCO después del TH. El concepto se basaría en que la perfusión de células de médula ósea del donante prolonga la supervivencia del injerto por mecanismos aún no bien conocidos<sup>35,36</sup>. Se incluyeron 104 pacientes en un estudio estratificado en 2 grupos: el grupo 1 recibió perfusión de células de médula ósea del donante en el momento del TH, y el grupo 2 no la recibió. La IS se disminuyó durante un período de 3 meses. La tasa de rechazo y TCO fueron similares en ambos grupos y no hubo diferencias en el quimerismo entre los 2 grupos. Por tanto, el resultado del estudio fue negativo y no confirmó la hipótesis de trabajo. La evidencia previa<sup>37,38</sup> de las propiedades inmunomoduladoras de las células madre y otras células de la médula ósea, como las células madre mesenquimales, sugiere que la hipótesis de trabajo podría ser correcta, aunque su traslado a la clínica no se ha optimizado. El resto de experiencias tolerogénicas basadas en terapias celulares queda reflejado en la tabla 3.

#### Grupo D. Trasplante de médula ósea previo por enfermedades hematológicas (tabla 4)

Basado en experiencias puntuales, Urban et al<sup>39</sup> publicaron el caso de un paciente de 7 años que recibió un TH al presentar enfermedad crónica del injerto contra el huésped con afectación cutánea y hepática, después de un trasplante de médula ósea (TMO) alogénico 7 años antes por anemia sideroblástica. El donante fue una prima con HLA idéntico. Kadry et al<sup>40</sup> publicaron un caso de TCO en un paciente con TH de donante vivo por colangiocarcinoma en el hilio hepático. Trece años antes había recibido un TMO del mismo donante por leucemia linfática aguda. Andreoni et al<sup>41</sup> describieron el caso de una mujer de 42 años trasplantada por cirrosis por VHC con hígado de donante vivo, que había recibido un TMO a los 15 años por anemia aplásica. El donante fue, en ambos casos, un familiar con HLA idéntico.

#### Monitorización de la tolerancia clínica operacional en el trasplante hepático

La evaluación clínica de la tolerancia en el TH se ha limitado a la valoración de laboratorio de la función del injerto. Otras herramientas son la monitorización histológica mediante biopsia hepática. Hasta el momento, no hay una prueba fiable que permita definir de forma exacta la posibilidad de TCO. Sin embargo, en los últimos años se han investigado diversos biomarcadores muy prometedores que incluyen el estudio de los distintos subtipos de células dendríticas, análisis funcional de células T, estudio de HLA-G y de anticuerpos específicos de donante, y estudios de expresión genética mediante *microarrays*. Los resultados de estos biomarcadores de tolerancia están dando información importante que podría hacernos comprender algunos aspectos de la tolerancia en el ámbito del TH (tabla 5). Estas pruebas varían considerablemente en cuanto a su dificultad, precisión, especificidad, reproducibilidad, coste y tipo de información relevante acerca de la regulación del sistema inmune. Estos ensayos se realizan, en su mayoría, en sangre periférica, pero hay posibilidades para su aplicación en estudios del propio tejido hepático, espe-

**Tabla 4**

Trasplante de médula ósea previo al trasplante hepático (TH) por enfermedad hematológica

Centro/año (referencia)	Número de pacientes	Media entre TH y retirada de IS (meses)	Protocolo tolerogénico	n (%) de retirada completa de IS	% de rechazo agudo/crónico	% de pérdidas de injerto	Seguimiento desde la retirada de IS (meses)
Innsbruck/2002 (39)	1	71	Trasplante de MO y TH por EICH	1 (100)	0	0	30
Zurich/2003 (40)	1	Al inicio	Trasplante de MO previo por LLA	1 (100)	0	0	12
Chapell Hill/2004 (50-52)	1	6	Trasplante MO por anemia aplásica	1 (100)	0	0	24
Total	3			3 (100)	0	0	22

EICH: enfermedad injerto contra huésped; IS: inmunodepresión; LLA: leucemia linfóide aguda; MO: médula ósea.

**Tabla 5**

Biomarcadores de tolerancia en el trasplante hepático

Prueba	Descripción	Estudio de tolerancia durante la retirada	Referencias
<i>Células dendríticas</i>			
Proporción CD <sub>8</sub> -p/CD <sub>8</sub> -m	Pacientes tolerantes tienen más CD <sub>8</sub> -p circulantes que CD <sub>8</sub> -m	No	53, 54
Proporción DC <sub>8</sub> -m/CD <sub>8</sub> -p	Aumento DC <sub>8</sub> -m/CD <sub>8</sub> -p se asocia con rechazo tardío	No	55
Proporción PD-L1/CD86	Pacientes tolerantes expresan más PD-L1/CD86 en las CD <sub>8</sub>	No	56
<i>Análisis de células T</i>			
Células Treg	Aumento durante y después de la retirada de IS en pacientes tolerantes. Aumento dentro del injerto en pacientes tolerantes	Sí (ref. 42)	42, 57-59
Análisis funcional de células T (ImmunoKnow-Cylex)	Los pacientes con respuesta inmune alta tienen 30 veces más probabilidades de rechazo celular	No	60
Células T CD154+	Aumento de células T memoria CD154+ pretrasplante se asocian con rechazo	No	61
<i>Factores solubles</i>			
HLA-G en suero	Valores normales asociados a función hepática normal y valores bajos asociados a peor función hepática	No	61, 62
Anticuerpos anti-donante IL-17/IL-23	Presentes en 30% de pacientes con IS mantenida y ausentes en pacientes con tolerancia Aumento durante episodios de rechazo agudo	No No	54 63
<i>Estudio de genes</i>			
Polimorfismo de genes	Pacientes con perfil bajo de TNF $\alpha$ y alto/intermedio de IL-10 tienen más probabilidad de tolerancia	No	64
Huella genética de tolerancia (expresión genética)	Un número bajo de genes en sangre periférica identifica los pacientes con tolerancia	No	58, 65, 66

IS: inmunodepresión; TNF: factor de necrosis tumoral.

cialmente para el estudio de los mecanismos de tolerancia. En el contexto clínico, será importante monitorizar diversos parámetros inmunológicos de forma sistemática antes y después del trasplante, para poder identificar los fenotipos y quizás los polimorfismos genéticos que se asocian con la tolerancia del injerto.

Actualmente hay diversos estudios en marcha que analizan este aspecto, dirigidos a conocer parámetros que en un paciente concreto nos permitan predecir si podrá ser tolerante a la retirada de IS tras un período de adaptación al nuevo órgano trasplantado. Las tecnologías del estudio completo del genoma, y, en particular, las tecnologías de alto rendimiento de expresión genética, son una base de gran oportunidad para el estudio de los mecanismos y de la monitorización de la tolerancia. Estas tecnologías, junto a diversos biomarcadores señalados anteriormente, podrían ayudar a establecer algoritmos de decisión a la hora de plantear la retirada programada de IS en el TH.

## Conclusión

Las estrategias investigadas hasta el momento, dirigidas a obtener un estado de libre IS, son numerosas y muy heterogéneas en términos de concepto, justificación, edad de los pacientes, indicaciones para el TH de base, objetivos, tipo de TH (de donante cadáver o vivo), duración del período de retirada de IS, duración del seguimiento, presencia o no de quimerismo de células del donante, herramientas utilizadas para medir los mecanismos de tolerancia, etc. Sin embargo, la experiencia publicada en la bibliografía editada hasta el momento puede resumirse diciendo que un permanente estado de TCO puede obtenerse en algunos pacientes con TH por enfermedades de base no inmunológica, y que los pacientes que no consiguen alcanzar la TCO y presentan rechazo no están expuestos a un mayor riesgo de pérdida del injerto o fallecimiento.

La experiencia en TCO es mayor en los pacientes con TH que en el trasplante de otros órganos. En algunos casos, la TCO ha sido una observación casual, pero en la última década se ha inducido de forma intencionada en un significativo número de ensayos clínicos. Hasta el momento, considerando globalmente los datos publicados en la bibliografía, 1 de cada 5 pacientes desarrolló TCO sin aumentar el riesgo de pérdida de injerto en los tolerantes, por lo que puede aceptarse

como una estrategia dirigida a minimizar los riesgos asociados a la utilización de los fármacos inmunodepresores.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver Transpl*. 2004;10:886-97.
- Disponible en: [http://www.eltr.org/publi/index\\_rv.php3.2010](http://www.eltr.org/publi/index_rv.php3.2010)
- Furukawa H, Todo S. Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. *Transplant Proc*. 2004;36:274S-84S.
- Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs*. 2003;63:1247-97.
- Calne R, Sells RA, Pena JR, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*. 1969;223:472-6.
- Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery*. 1983;93:64-9.
- Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology*. 1994;19:916-24.
- Pons JA, Yelamos J, Ramírez P, Oliver-Bonet M, Sánchez A, Rodríguez-Gago M, et al. Endothelial cell chimerism does not influence allograft tolerance in liver transplant patients after withdrawal of immunosuppression. *Transplantation*. 2003;75:1045-7.
- Mazariegos GV, Reyes J, Marino IR, Demetris AJ, Flynn B, Irish W, et al. Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1997;63:243-9.
- Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27:926-33.
- Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Egawa H, Kiuchi T, Fujita S, et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation*. 2001;72:449-54.
- Sánchez-Fueyo A, Strom TB. Immunological tolerance and liver transplantation. *J Hepatol*. 2004;41:698-705.
- Orlando G, Soker Sh, Wood K. Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol*. 2009;50:1247-57.
- Calne RY. Prope tolerance: the future of organ transplantation—from the laboratory to the clinic. *Transplantation*. 2004;77:930-2.
- Donaldson PT, Thomson LJ, Heads A, Underhill JA, Vaughan RW, Rolando N, et al. IgG donor-specific cross-matches are not associated with graft rejection or poor graft survival after liver-transplantation—An assessment by cytotoxicity and flow-cytometry. *Transplantation*. 1995;60:1016-23.

16. Doran TJ, Geczy AF, Painter D, McCaughan G, Sheil AG, Süsal C, et al. Large, single center investigation of the immunogenetic factors affecting liver transplantation. *Transplantation*. 2000;69:1491-8.
17. Rasmussen A, Davies HFS, Jamieson NV, Evans DB, Calne RY. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft-survival. *Transplantation*. 1995;59:919-21.
18. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology*. 1993;17:1127-52.
19. Reyes J, Zeevi A, Ramos H, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, et al. Frequent achievement of a drug-free state after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*. 1993;25:3315-9.
20. Mazariegos GV, Ramos H, Shapiro R, Zeevi A, Fung JJ, Starzl TE. Weaning of immunosuppression in long-term recipients of living related renal transplants: a preliminary study. *Transpl Proc*. 1995;27:207-9.
21. Ramos HC, Reyes J, Abu-Elmagd K, Zeevi A, Reinsmoen N, Tzakis A, et al. Weaning of immunosuppression in long-term liver transplant recipients. *Transplantation*. 1995;59:212-7.
22. Tzakis AG, Reyes J, Zeevi A, Ramos H, Nour B, Reinsmoen N, et al. Early tolerance in pediatric liver allograft recipients. *J Pediatr Surg*. 1994;29:754-6.
23. Mazariegos GV, Sindhi R, Thomson AW, Marcos A. Clinical tolerance following liver transplantation: long term results and future prospects. *Transpl Immunol*. 2007;17:11-119.
24. Giralda R, Rela M, Williams R, O'Grady JG, Heaton ND. Long-term outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37:1708-9.
25. Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Sakamoto S, Hayashi M, Ueda M, et al. Analysis of alloreactivity and intra-graft cytokine profiles in living donor liver transplant recipients with graft acceptance. *Transpl Immunol*. 2001;8:279-86.
26. Tisone G, Orlando G, Angelico M. Operational tolerance in clinical liver transplantation: emerging developments. *Transpl Imm*. 2007;17:108-13.
27. Tisone G, Orlando G, Cardillo A, Palmieri G, Manzia TM, Baiocchi L, et al. Complete weaning off immunosuppression in HCV liver transplant recipients is feasible and favourably impacts on the progression of disease recurrence. *J Hepatol*. 2006;44:702-9.
28. Orlando G, Manzia T, Baiocchi L, Sánchez-Fueyo A, Angelico M, Tisone G. The Tor Vergata Weaning Off Immunosuppression Trial in HCV liver transplant patients. The updated follow up at 78 months. *Transpl Imm*. 2008;20:43-7.
29. Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, Gray EA, Shapiro R, Eghtesad B, et al. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet*. 2003;361:1502-10.
30. Eason JD, Cohen AJ, Nair S, Alcantera T, Loss GE. Tolerance: is it worth the risk? *Transplantation*. 2005;79:1157-9.
31. Assy N, Adams PC, Myers P, Simon V, Minuk GY, Wall W, et al. Randomized controlled trial of total immunosuppression withdrawal in liver transplant recipients: role of ursodeoxycholic acid. *Transplantation*. 2007;83:1571-6.
32. Assy N, Adams PC, Myers P, Simon V, Ghent CN. A randomised controlled trial of total immunosuppression withdrawal in stable liver transplant recipients. *Gut*. 2007;56:304-6.
33. Persson H, Friman S, Scherster'n T, Svanvik J, Karlberg I. Ursodeoxycholic acid for prevention of acute rejection in liver transplant recipients. *Lancet*. 1990;336:52-3.
34. Tryphonopoulos P, Tzakis AG, Weppeler D, García-Morales R, Kato T, Madariaga JR, et al. The role of donor bone marrow infusions in withdrawal of immunosuppression in adult liver allotransplantation. *Am J Transplant*. 2005;5:608-13.
35. Mathew JM, García-Morales RO, Carreno M, Jin Y, Fuller L, Blomberg B, et al. Immune responses and their regulation by donor bone marrow cells in clinical organ transplantation. *Transpl Immunol*. 2003;11:307-21.
36. Monaco AP, Wood ML. Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice. VII. Optimal cellular antigen for induction of immunologic tolerance with antilymphocyte serum. *Transplant Proc*. 1970;2:489-96.
37. Hematti P. Role of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Transplant Rev*. 2008;22:262-73.
38. Le Blanc K, Ringde'n O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262:509-25.
39. Urban CH, Deutschmann A, Kerbl R, Lackner H, Schwinger W, Königsrainer A, et al. Organ tolerance following cadaveric liver transplantation for chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30:535-7.
40. Kadry Z, Mullhaupt B, Renner EL, Bauerfeind P, Schanz U, Pestalozzi BC, et al. Living donor liver transplantation and tolerance: a potential strategy in cholangiocarcinoma. *Transplantation*. 2003;76:1003-6.
41. Andreoni KA, Lin JJ, Groben PA. Liver transplantation 27 years after bone marrow transplantation from the same living donor. *N Engl J Med*. 2004;350:2624-5.
42. Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramírez P, Martínez-Alarcón L, Sánchez-Bueno F, et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation*. 2008;86:1370-8.
43. VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*. 2000;106:145-55.
44. Geissler F, Jankowska-Gan E, DeVito-Haynes LD, Rhein T, Kalayoglu M, Sollinger HW, et al. Human liver allograft acceptance and the tolerance assay: in vitro anti-donor T cell assays show hyporeactivity to donor cells, but unlike DTH, fail to detect linked suppression. *Transplantation*. 2001;72:571-80.
45. Gras J, Wieërs G, Vaerman JL, Truong DQ, Sokal E, Otte JB, et al. Early immunological monitoring after pediatric liver transplantation: cytokine immune deviation and graft acceptance in 40 recipients. *Liver Transpl*. 2007;13:426-33.
46. Hsu LW, Goto S, Nakano T, Lai CY, Lin YC, Kao YH, et al. Immunosuppressive activity of serum taken from a liver transplant recipient after withdrawal of immunosuppressants. *Transpl Immunol*. 2007;17:137-46.
47. Alexander SI, Smith N, Hu M, Verran D, Shun A, Dorney S, et al. Chimerism and tolerance in a recipient of a deceased-donor liver transplant. *N Engl J Med*. 2008;358:369-74.
48. Matthes-Martin S, Peters C, Königsrainer A, Fritsch G, Lion T, Heitger A, et al. Successful stem cell transplantation following orthotopic liver transplantation from the same haploidentical family donor in a girl with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2000;96:3997-9.
49. Mellgren K, Fasth A, Saalman R, Olausson M, Abrahamsson J. Liver transplantation after stem cell transplantation with the same living donor in a monozygotic twin with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2005;84:755-7.
50. Donckier V, Troisi R, Toungouz M, Colle I, Van Vlierberghe H, Jacquy C, et al. Donor stem cell infusion after nonmyeloablative conditioning for tolerance induction to HLA mismatched adult living-donor liver graft. *Transpl Immunol*. 2004;13:139-46.
51. Donckier V, Troisi R, Le Moine A, Toungouz M, Ricciardi S, Colle I, et al. Early immunosuppression withdrawal after living donor liver transplantation and donor stem cell infusion. *Liver Transpl*. 2006;12:1523-8.
52. Craciun L, Stordeur P, Troisi R, Le Moine A, Toungouz M, Colle I, et al. A rapid test of alloreactivity based on interleukin-2 mRNA expression might identify liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transplant Proc*. 2007;39:2665-7.
53. Mazariegos GV, Zahorchak A, Reyes J, Ostrowski L, Flynn B, Zeevi A, et al. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am J Transp*. 2003;3:689-96.
54. Mazariegos GV, Zahorchak A, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson A. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and nontolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transp*. 2005;5:314-22.
55. Gupta A, Kumar CA, Ningappa M, Sun Q, Higgs BW, Snyder S, et al. Elevated myeloid: plasmacytoid dendritic cell ratio associates with late, but not early, liver rejection in children induced with rabbit antihuman thymocyte globulin. *Transplantation*. 2009;88:589-94.
56. Tokita D, Mazariegos GV, Zahorchak AF, Chien N, Abe M, Raimondi G, et al. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation*. 2008;85:369-77.
57. Li Y, Koshida T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant*. 2004;4:2118-25.
58. Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7:309-19.
59. Li Y, Zhao X, Cheng D, Haga H, Tsuruyama T, Wood K, et al. The presence of FoxP3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation*. 2008;86:1837-43.
60. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a metaanalysis using an immune function assay. *Transplantation*. 2006;82:663-8.
61. Ashokkumar C, Talukdar A, Sun Q, Higgs BW, Janosky J, Wilson P, et al. Allospecific CD154<sup>b</sup> T cells associate with rejection risk after pediatric liver transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9:179-91.
62. Basturk B, Karakayali F, Emiroglu R, Sözer O, Haberal A, Bal D, et al. Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation. *Transplant Proc*. 2006; 38:571-4.
63. Fàbrega E, Unzueta MG, Cobo M, Casafont F, Amado JA, Romero FP. Value of soluble CD30 in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2007;39:2295-6.
64. Mazariegos GV, Reyes J, Webber SA, Thomson AW, Ostrowski L, Abmed M, et al. Cytokine gene polymorphisms in children successfully withdrawn from immunosuppression after liver transplantation. *Transplantation*. 2002;73:1342-5.
65. Kawasaki M, Iwasaki M, Koshida T, Fujino M, Hara Y, Kitazawa Y, et al. Gene expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant living donor liver transplant recipients. *Int Surg*. 2007;92:276-86.
66. Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Isabel Puig-Pey, Orlando G, Tisone G, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest*. 2008;118:2845-57.