



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

## **ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA EXPANSIÓN *EX VIVO* A LARGO PLAZO DE CÉLULAS T REGULADORAS FOXP3<sup>+</sup> CON FENOTIPO Y FUNCIÓN SUPRESORA ESTABLE**

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Arimelek Cortés Hernández**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL**

**Dr. Enrique Ortega Soto**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

**Dr. Rogelio Hernández Pando**

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ

**MÉXICO, D. F. Noviembre 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de investigación fue apoyado por el proyecto CONACYT-Salud #180288. ACH fue apoyado con beca de CONACYT con # CVU=549444. La asistencia al XXI Congreso Nacional de Inmunología fue apoyada por el Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP). Toda la investigación contenida en esta tesis fue realizada en el laboratorio A107 del departamento Inmunología del Instituto de investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM. Se agradece al Biól. Jesús Ramsés Chávez Ríos y Q.F.B Carlos Castellanos Barba por su apoyo técnico en la realización del presente proyecto de investigación.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
ÍNDICE DE TABLAS .....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN .....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Células T reguladoras .....	1
1.2 Subtipos de células T reguladoras.....	2
1.2.1 Células T reguladoras tímicas.....	2
1.2.2 Células T reguladoras inducidas .....	4
1.2.3 Marcadores moleculares para distinguir células tTreg de iTreg.....	5
1.3 Regulación de la expresión de FOXP3.....	6
1.3.1 Promotor de <i>FOXP3</i> .....	7
1.3.2 CNS1 .....	7
1.3.3 CNS2 .....	8
1.3.4 CNS3 .....	9
1.4 Mecanismos de Supresión de las células Treg.....	9
1.5 Potencial Terapéutico de las células Tregs .....	12
1.6 Retos para la aplicación clínica de células Treg en humanos .....	13
1.6.1 Aislamiento de Treg .....	14
1.6.2 Expansión de células Treg .....	15
1.7 Terapia adoptiva de células Treg .....	16
1.7.1 Tolerancia al Injerto Trasplantado .....	16
1.7.2 Prevención de Enfermedades Autoinmunes.....	18
1.8 Terapia adoptiva de Tregs en humanos: primeros ensayos clínicos.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	21
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
RESULTADOS .....	26
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES .....	39
PERSPECTIVAS .....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
ANEXO I: REACTIVOS .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Factores de transcripción que regulan la expresión de FOXP3.	6
2	Mecanismos de supresión ejercidos por las células Treg.	11
3	Purificación y caracterización fenotípica de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> .	26
4	Rapamicina promueve el mantenimiento de la expresión de FOXP3 y CD25 en las células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> expandidas <i>ex vivo</i> .	28
5	Rapamicina mantiene la expresión de Helios y aumenta la expresión de CTLA-4 y CCR7 en las células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> expandidas <i>ex vivo</i> .	29
6	Células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> expandidas en presencia de rapamicina tienen una mejor función supresora <i>in vitro</i> .	30
7	Efecto de la criopreservación sobre el fenotipo de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> expandidas <i>ex vivo</i> .	32
8	Efecto de la criopreservación sobre la función <i>in vitro</i> de las células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> expandidas.	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Comparación entre células T reguladoras tímicas e inducidas	2
<b>2</b>	Efectos adversos de los fármacos inmunosupresores.	12
<b>3</b>	Terapia adoptiva de Células Treg en humanos	20

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígeno
<b>CCR7</b>	<i>C-C chemokine receptor type 7</i> (Receptor de quimiona C-C tipo 7)
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de Diferenciación)
<b>CD25</b>	Cadena $\alpha$ del receptor para Interleucina 2
<b>CD127</b>	Cadena $\alpha$ del receptor para Interleucina 7
<b>CMN</b>	Células Mononucleares
<b>CNS</b>	<i>Conserved Non-Coding Sequences</i> (Secuencias No codificadas Conservadas)
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> (Antígeno 4 del linfocito T citotóxico)
<b>DC</b>	<i>Dendritic Cell</i> (Célula Dendrítica)
<b>EICH</b>	Enfermedad Injerto Contra Hospedero
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> (Separacion Celular Activada por Fluorescencia)
<b>FOXP3</b>	Factor de transcripción <i>forkhead box P3</i>
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMFr</b>	Intensidad Media de Fluorescencia relativa
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo Principal de Histocompatibilidad)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (Amortiguador de Fosfato Salino)
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TCR</b>	<i>Receptor T cell</i> (Receptor de Células T)
<b>Treg</b>	Célula T reguladora
<b>Tconv</b>	Célula T convencional
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Factor de crecimiento transformante beta)
<b>Th</b>	Célula T Cooperadora

## RESUMEN

Actualmente, las estrategias terapéuticas para prevenir el desarrollo de enfermedades mediadas por células T, incluyendo las autoinmunes y rechazo de trasplantes, se basan en el uso de fármacos inmunosupresores los cuales pueden tener efectos adversos a largo plazo como generar susceptibilidad a patologías infecciosas o desarrollo de neoplasias. Las células T reguladoras (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> son esenciales para prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inducir la tolerancia hacia alo-injertos, por lo que ha habido un interés en utilizarlas como agentes terapéuticos. La inmunoterapia con Tregs tendrían como ventajas que medían su inmunosupresión de manera antígeno-específica, evitando así efectos adversos de los fármacos inmunosupresores, y podrían establecer la tolerancia inmunológica a largo plazo. Una limitante para la aplicación clínica de Tregs en humanos es el número limitado en sangre periférica. En el presente trabajo nos planteamos establecer un protocolo de expansión *ex vivo* a largo plazo de células Treg FOXP3<sup>+</sup> con fenotipo y capacidad supresora estable. Para lo anterior, se purificaron células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> de individuos sanos y se estimularon *in vitro* con anticuerpos anti-CD3/-CD28 e IL-2, en presencia o ausencia de rapamicina. Los resultados mostraron que las Tregs expandidas cuatro semanas en presencia de rapamicina mantuvieron una mayor expresión de moléculas relacionadas con su función supresora (FOXP3, Helios, CD25 y CTLA-4) y su migración (CCR7), así como una mejor función supresora *in vitro* sobre la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Por último, las Tregs expandidas con rapamicina después de ser criopreservadas tuvieron una alta expresión de FOXP3, CD25, Helios, CTLA-4 y CCR7, y mejor capacidad supresora *in vitro*. En conclusión, nuestros resultados demuestran que rapamicina favorece la expansión de las células Tregs funcionales, evidenciando su potencial terapéutico en pacientes con trasplantes de órganos o con enfermedades autoinmunes.



# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Células T reguladoras

Las células T reguladoras (Treg) son una subpoblación especializada de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que son requeridas para la inducción y mantenimiento de la tolerancia inmunológica periférica [1]. Estas células pueden suprimir la activación, proliferación y funciones efectoras (como la producción de citocinas) de una amplia gama de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células asesinas naturales (NK), células NKT, linfocitos B y células presentadoras de antígeno (CPA), tanto *in vitro* como *in vivo* [2]. Esta diversidad de poder controlar la respuesta inmune hace que las células Treg sean esenciales para: a) prevenir de enfermedades autoinmunes, inmunopatologías y alergias; b) regular la respuesta inmune contra infecciones de origen viral, bacteriano o parasitario; c) mantener la homeostasis intestinal; d) inducir y mantener la tolerancia materno-fetal y hacia el alo-injerto [2].

Aunque existen varias subpoblaciones de linfocitos T reguladores y por lo tanto gran heterogeneidad en su fenotipo, la subpoblación mayoritaria y mejor estudiada se caracteriza por la expresión constitutiva de CD25 y el factor de transcripción FOXP3, el cual es indispensable para mantenimiento de su función supresora [1]. La importancia de este factor se pone en evidencia en experimentos donde mutaciones de FOXP3 conllevan una autoinmunidad hiperproliferativa fatal [3, 4]. Por ejemplo, en ratones, la mutación espontánea “Scurfy”, que induce una pérdida de la función de FOXP3, induce la ausencia completa de células Tregs conduciendo a la muerte de los ratones a las 3-4 semanas de edad [3]. De manera similar, pacientes con enfermedad autoinmune multisistémica IPEX (*immunedysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked síndrome*) presentan un fenotipo poliendocrino autoinmune que se relaciona con la pérdida de células Tregs funcionales [4, 5].

## 1.2 Subtipos de células T reguladoras

Las células Treg CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> de acuerdo a su lugar de generación se han clasificado en dos principales subtipos: células T reguladoras de origen tímico (tTreg), y células T reguladoras adaptativas o inducidas (iTreg), que se generan en la periferia (fuera del timo) [1]. Existen diferencias fundamentales en las señales que favorecen el desarrollo de ambas subpoblaciones y se resumen en la tabla 1.

<b>Tabla 1. Comparación entre células T reguladoras tímicas e inducidas</b>		
<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>tTreg</b>	<b>iTreg</b>
Sitio de Inducción	Timo	Órganos linfoides secundarios, tejidos con inflamación, tejido trasplantado.
Citocinas Requeridas	IL-2 e IL-15, TGF-β?	IL-2, TGF-β, Ácido Retinoico
Co-estimulación Requerida	CD28	CTLA-4
Especificidad	Auto ó alo-antígenos	Alo-antígenos, alergenicos de comida, microbiota de intestino, tejido trasplantado, auto-Ag (inflamación).
Marcadores Comunes	FOXP3, CD25, GITR, CTLA-4	
Marcadores Específicos	Helios, Nrp1, PD-1, Swap70	Dapl1, Igfbp4
Mecanismo de Supresión	Dependiente contacto célula-célula?	Dependiente de citocinas?
Modificado de [6].		

### 1.2.1 Células T reguladoras tímicas

La evidencia del origen tímico de las células Treg se basan en experimentos en ratones neonatos que desarrollan autoinmunidad si el timo se elimina (timectomía) en el día 3 de nacimiento pero no en el día 7 [7, 8]. Aunque existe controversia, se ha propuesto que la especificidad del TCR hacia antígenos propios es importante para la selección de linfocitos tTreg [1, 9]. Estudios realizados en ratones RAG deficientes con TCR transgénicos específicos para péptidos extraños como ovoalbúmina o proteína básica de mielina, tienen una disminución o ausencia de células tTreg [10, 11]. En contraste, ratones silvestres (RAG intacto) son capaces

de recombinar las cadenas TCR $\alpha$  que se acoplan a las TCR $\beta$  para generar los TCR específicos para los complejos de auto-péptido-MHC II y por lo tanto permitir el desarrollo de células Treg [11]. Estos mismos modelos de estudios han mostrado que las células tTreg requieren de una señal de alta avidéz mediada por el TCR y la expresión del antígeno por células estromales tímicas para ser seleccionadas [11, 12]. Cabe mencionar que esta alta avidéz es muy cercana a aquella que desencadena la selección negativa de los timocitos [9]. De hecho, se ha observado que la reducción de las señales inducidas por el TCR se correlaciona con una disminución de las células tTreg, mientras que el aumento de la intensidad de la señal de TCR favorece su generación [9].

Consistente con los anteriores conceptos, las células tTreg requieren señales a través del TCR para su desarrollo y homeostasis. Por ejemplo, ratones con células T deficientes de LAT o con mutación en LAT que no permite su interacción con la fosfolipasa C gamma 1 (PLC $\gamma$ 1), ambas moléculas importantes para la señalización del TCR, desarrollan autoinmunidad debido a la ausencia de células Treg [13-15]. Del mismo modo, una disminución en la función de ZAP70 debido a una mutación afecta el desarrollo de tTreg; ratones deficientes de otras moléculas de señalización río abajo del TCR como PKC $\theta$ , Bcl10, Lck, o CARMA1, así como ratones que carecen de IKK $\beta$  o NF- $\kappa$ B/Rel también tienen un defecto en el desarrollo y mantenimiento de los linfocitos Treg [16-24]. Así, los datos apoyan que el TCR y sus moléculas de señalización río abajo están directamente involucrados en la generación de células Treg.

Además de las señales de TCR, las señales co-estimuladoras a través de CD28 tienen un papel esencial en la diferenciación de las células tTreg. Ratones deficientes de CD28 o CD80/CD86 tiene una disminución en las frecuencias de células T FOXP3<sup>+</sup> en el timo y periferia [25, 26]. Cabe resaltar que el dominio de unión a Lck en la cola citoplásmica de CD28 y c-Rel (miembro de la familia del NF- $\kappa$ B) activado río debajo de CD28 son críticos para la inducción de FOXP3, lo que sugiere un rol coordinado entre las señales del TCR y de CD28 para la diferenciación tímica de las células Treg [27-29].

Aunado al mecanismo anterior, se han propuesto señales adicionales a las del TCR que participan en la generación de las células tTreg. Se propone que la generación de estas células ocurre en un proceso de dos pasos: el primero depende de la alta avididad de las señales del TCR que da lugar a la generación de células precursoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>-</sup>, y la siguiente fase donde estas células precursoras expresan FOXP3 en respuesta a citocinas como IL-2 e IL-15 que inducen señales a través de la cadena gamma común ( $\gamma$ c) y activan STAT5 [30, 31].

### 1.2.2 Células T reguladoras inducidas

Las células iTreg se pueden generar a partir de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes tanto *in vitro* como *in vivo* a través de distintas vías y dependiendo de los contextos inmunológicos. Uno de los mecanismos mejor definidos en la inducción de linfocitos Tregs involucra un mecanismo dependiente TGF- $\beta$ . Así, la estimulación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> vírgenes a través de su TCR y en presencia de TGF- $\beta$  se genera *de novo* una subpoblación de células que son fenotípicamente similares a los linfocitos tTreg, en cuanto a la expresión de CD25, CTLA-4 y FOXP3 [6]. Mecanísticamente, TGF- $\beta$  a través de su receptor activa SMAD3 el cual puede unirse al gen *FOXP3* y en conjunto con otros factores induce su expresión (ver apartado 1.3 Regulación de la expresión de FOXP3) [32].

La especificidad del TCR que presentan las células iTregs generadas *in vivo* es parcialmente diferente al de las células T vírgenes periféricas y difiere en su mayoría con los TCRs de las células tTregs, lo que sugiere que cierto tipo de antígenos favorecen la generación de Tregs en periferia [33]. Además la intensidad de las señales a través de su TCR parecen ser diferentes al de las células tTreg, ya que en un inicio se observó que la inducción de Tregs *in vitro* es favorecida por señales sub-óptimas de TCR o señales óptimas en presencia de alta concentración de TGF- $\beta$  [34-36].

El tipo de co-estímulo también es diferente en ambas poblaciones de Treg: mientras que para la generación de linfocitos tTregs es necesaria la interacción con CD28, en periferia el entrecruzamiento de CD28 inhibe la inducción de FOXP3 en linfocitos T vírgenes bajo estimulación con TGF- $\beta$ ; por el contrario, un estímulo inhibitorio por medio de CTLA-4 (regulador negativo de la señalización del TCR) es necesario para generar iTreg en presencia de TGF- $\beta$  [37, 38].

*In vivo* existen condiciones tolerogénicas (estimulación crónica con bajas dosis de antígeno en un microambiente no inflamatorio) que favorecen el desarrollo de linfocitos iTregs FOXP3<sup>+</sup> [6]. Por ejemplo, en el microambiente intestinal es rico en células dendríticas CD103<sup>+</sup> las cuales producen altas cantidades ácido retinoico (RA) y TGF- $\beta$ , y ambas moléculas inducen la expresión de FOXP3 en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes (ver apartado 1.3 Regulación de la expresión de FOXP3); de esta manera, la exposición crónica a antígenos de la dieta y de la flora bacteriana favorece la generación de iTregs específicas a dichos antígenos [6].

### **1.2.3 Marcadores moleculares para distinguir células tTreg de iTreg**

Diversos estudios han propuesto marcadores moleculares que permitan diferenciar linfocitos tTreg de iTreg: ambas subpoblaciones expresan marcadores comunes como CD25, FOXP3, GITR y CTLA-4, pero las tTregs exhiben una mayor expresión de PD-1, Neuropilina 1 (Nrp1), Helios (Ikzf2) y CD73, en comparación con iTregs [6, 39, 40]; no obstante, existe controversia entre los diversos estudios.

Helios es un factor de transcripción que en un principio se propuso podría diferenciar las Treg tímicas (Helios<sup>+</sup>) de las Treg inducidas (Helios<sup>-</sup>) [41]. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que células Treg humanas y de ratón generadas *in vitro* pueden expresar este factor dependiendo de las condiciones de activación [42, 43].

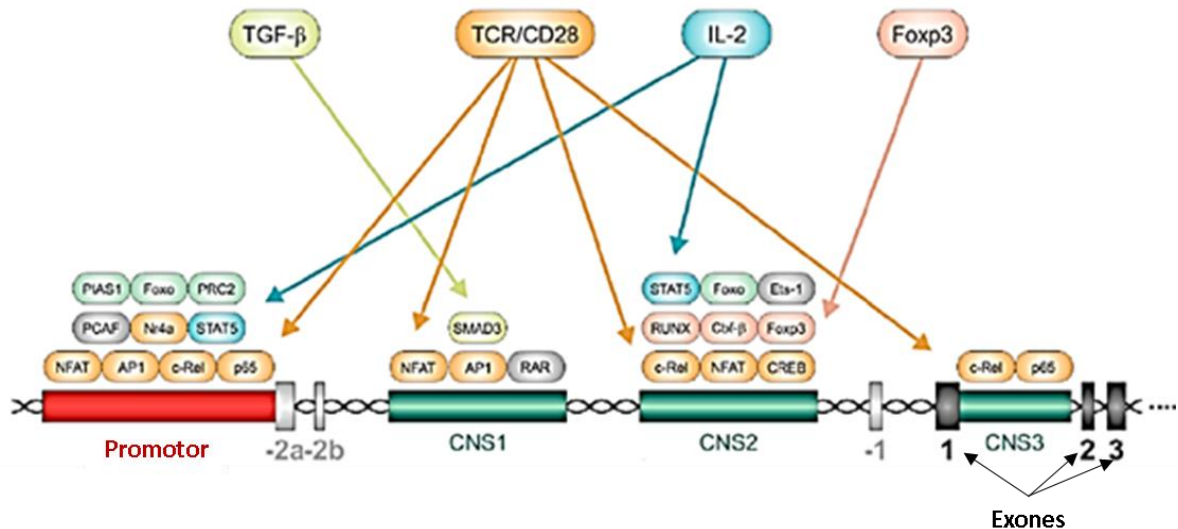
Nrp-1 también ha sido propuesto como marcador de células tTreg, debido a que en ratones RAG deficientes y con TCR transgénicos específico para la proteína básica de mielina, las iTreg generadas *in vivo* e *in vitro* fueron Nrp1<sup>low</sup>; mientras que las tTregs del ratón silvestre la mayoría (57%) expresaron Nrp1 [39]. Además, las

células T Nrp-1<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> tuvieron una baja expresión de los ARN mensajeros de *Nrp1*, *Helios* y *Swap70*, y una alta expresión de *Dapl1* y *Igfbp4* [39]. No obstante, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos pueden expresar Nrp-1 cuando son estimulados *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 [44].

Por lo tanto, es necesario encontrar marcadores moléculas que nos permitan diferenciar entre ambas subpoblaciones de células Treg.

### 1.3 Regulación de la expresión de FOXP3

Factores de transcripción activados río abajo del TCR y CD28 (incluyendo NFAT, NF-Kb, AP-1, entre otros), así como de los receptores de las citocinas IL-2 y TGF-β (STAT5 y SMAD3, respectivamente), se unen a la región promotora y a tres secuencias no codificantes conservadas (CNS1-3) del gen *FOXP3* para regular su transcripción (figura 1) [32].



**Figura 1. Factores de transcripción que regulan la expresión de FOXP3.** Factores de transcripción activados río abajo del TCR y CD28 (naranja), así como de los receptores de las citocinas IL-2 (azul) y TGF-β (verde), se unen a la región promotora y a tres secuencias no codificantes conservadas (CNS1-3) en el locus de *FOXP3* para inducir su expresión. AP-1, proteína activadora 1; c-Rel, miembro de la familia del factor de transcripción NF-kB; CREB, proteína de unión a elementos sensibles a cAMP; NFAT, factor nuclear de células T activadas; p65 (Rel-A), miembro de la familia del factor de transcripción NF-kB. IL-2 de señalización (azul): STAT5, transductor de señal y activador de la transcripción 5; SMAD3, miembro 3 de la familia de SMAD; CBF-β, factor central de unión, subunidad beta; RUNX, factor de transcripción relacionado a runt-1. Modificado de [32]

Además de la regulación mediada por factores de transcripción, la evidencia actual sugiere que la expresión de FOXP3 en las células Treg está bajo un control epigenético [45, 46]. La desmetilación del ADN combinado con modificaciones permisivas de las histonas establecen una estructura de la cromatina abierta que favorece la expresión de FOXP3 en las células Treg [47]. Dentro del locus de *FOXP3*, el promotor y las tres secuencias no codificantes conservadas son las principales regiones reguladas epigenéticamente por tanto son necesarias para la estabilidad de la expresión de FOXP3 [32]. A continuación se describen brevemente cada una de las regiones.

### **1.3.1 Promotor de *FOXP3***

El promotor de *FOXP3* se encuentra 6,5 kb (kilobases) río arriba del exón 1 y aproximadamente 500 pb (pares de bases) río arriba del sitio de inicio de la transcripción; esta región contiene sitios de unión de varios factores de transcripción, incluyendo NF- $\kappa$ B, FoxO1/3a, NFAT, AP-1, SP1, STAT5, y Runx, sin embargo, su función en la activación de la transcripción de FOXP3 parece ser débil [48-54]. La anterior característica puede ayudar a prevenir la inducción promiscua de FOXP3 [49]. Por otra parte, se necesitan otros elementos reguladores en *cis* para la inducción y mantenimiento de la expresión de FOXP3 en las células Treg [32, 49]. Respecto a su regulación epigenética, en células Treg el promotor contiene motivos CpG desmetilados y modificaciones permisivas de histonas tales como la acetilación de la histona 3 (H3) y H4, así como di- y tri-metilación de la lisina 4 (K4) de la H3 (H3K4) [53, 55-58].

### **1.3.2 CNS1**

CNS1 está situado dentro del primer intrón, aproximadamente 2 kb río abajo del promotor y es una región crítica para la inducción de FOXP3 durante la diferenciación de las células iTreg, pero no para la diferenciación de células tTreg [56]. La unión de NFAT, SMAD3, y el receptor de ácido retinoico (RAR) a esta región facilitan la inducción de la expresión de FOXP3 en las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes activados por medio de su TCR en presencia de TGF- $\beta$  y de ácido retinoico [49, 55, 56, 59]. CNS1 no contiene motivos CpG y por lo tanto está exclusivamente regulada a través de modificaciones permisivas de histonas, tales como la acetilación de

H3/H4 y las di- y tri-metilación de H3K4; estas dos modificaciones se encuentran enriquecidas en ambas subpoblaciones de linfocitos tTreg e iTreg, en comparación con las células T CD4<sup>+</sup> convencionales (Tconv) [32, 55, 56, 60, 61].

### **1.3.3 CNS2**

CNS2 (también llamado TSDR, *Treg-specific demethylated region*) es un elemento rico islas CpG que se encuentra en el primer intrón, aproximadamente 4 kb río abajo del promotor; en células tTreg las islas CpG se encuentran totalmente desmetiladas para permitir la unión de factores de transcripción, incluyendo c-Rel, FoxO1/3a, NFAT, RUNX, CREB, STAT5, y FOXP3 [48, 52, 56, 62-65]. Consistente con esto, CNS2 se requiere para el mantenimiento de la expresión de FOXP3 cuando las células Treg han sido activadas y se encuentran en división, especialmente en presencia de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-4 e IL-6, o cuando la IL-2 es limitada [48, 49, 66-69]. Tras la activación de TCR, CNS2 interactúa con el promotor de *FOXP3* mediante la vía Calcineurina/NFAT; dicha interacción permite que otros factores de transcripción se unan a CNS2, incluyendo STAT5, y se favorece el mantenimiento de la desmetilación de ésta región [48, 49]. Estudios sugieren que células tTreg son más estables en comparación con células iTreg, debido a que el TSDR está completamente desmetilado en células tTreg, pero total o parcialmente metilado en células T con y en iTreg generadas *in vitro* pTreg [70, 71].

Además de la desmetilación del ADN, CNS2 en las células Treg contiene niveles incrementados de metilación H3K4 y acetilación de H3/H4 [32, 56, 60, 72], lo que sugiere que la desmetilación del ADN y las modificaciones permisivas de las histonas generarán un estado de cromatina abierta en CNS2 que promueve la estabilidad de la expresión FOXP3 [32].



### 1.3.4 CNS3

CNS3 está localizado inmediatamente después del primer exón y aproximadamente a 7 kb río abajo del promotor; también es llamado "elemento pionero" ya que tiene una función fundamental para iniciar la expresión de FOXP3 tanto en las células tTreg como iTreg, pero es prescindible una vez que FOXP3 se expresa [32, 56]. En CNS3 se une c-Rel, el cual es requerido para una eficiente inducción de FOXP3 [56]. Las células Treg tienen un enriquecimiento de mono- y di-metilación (pero no tri-metilación) en H3K4, y estas modificaciones permisivas de las histonas ya se encuentran incrementadas subpoblaciones de timocitos, lo que sugiere que CNS3 facilita la apertura del locus de *FOXP3* en precursores de células Treg [32, 56].

### 1.4 Mecanismos de Supresión de las células Treg

Para adquirir su capacidad supresora, las células Treg deben ser activadas por medio de su TCR en presencia de IL-2 [73-75]. Se han propuesto numerosos mecanismos que se pueden subdividir en cuatro categorías: mediado por citocinas; disrupción metabólica; citólisis; modulación de las células dendríticas (Figura 2) [76].

Las principales citocinas secretadas por las Tregs para ejercer su función supresora son IL-10, TGF $\beta$  e IL-35. Un estudio en ratones con deficiencia específica de IL-10 en linfocitos T FOXP3<sup>+</sup> demuestra que la IL-10 por las células Treg es esencial para controlar la inflamación en colon o pulmones, esto sugiere que la función de esta citocina puede estar restringida a regular la respuesta inmune de la flora intestinal o antígenos ambientales [77]. Ratones deficientes de TGF- $\beta$ 1 o de su receptor desarrollan autoinmunidad mediada por células T [78, 79]; además, el bloqueo de TGF- $\beta$  con anticuerpos abroga parcialmente la supresión *in vitro* de las Treg de ratón y humano sobre la proliferación de los linfocitos Tconv [80-82], lo que sugiere que el TGF- $\beta$  producido por las Treg podría participar en la prevención de autoinmunidad mediada por células T. Al igual que la IL-10, el TGF- $\beta$ 1 producido por células Treg es necesario para prevenir la colitis [83]. Cabe resaltar que las células Treg pueden tener TGF- $\beta$  unido a membrana, y así ejercer su función supresora de manera dependiente de contacto célula-célula [80, 84]. Por último, IL-

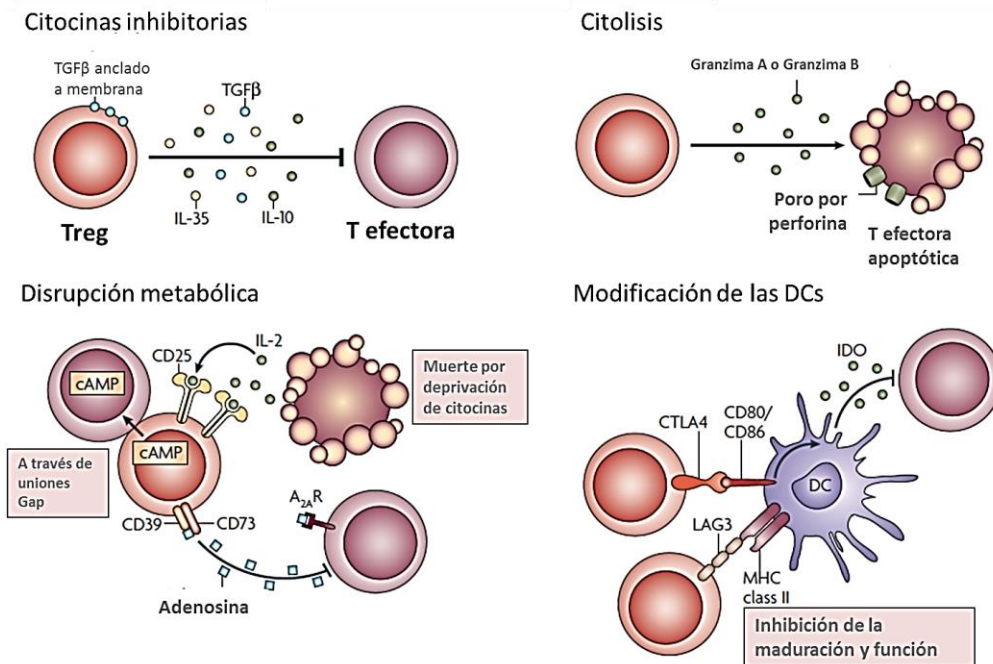
35 también es requerida para mantener la tolerancia inmunológica en el intestino; en ausencia de 12p35 o Ebi3es, los dos principales componentes del IL-35, la transferencia adoptiva de células Treg en huéspedes linfopénicos no controla la linfoproliferación y finalmente conduce al desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal [85].

*In vitro*, las células Treg pueden inhibir la activación de las células Tconv por mecanismos dependientes de contacto célula-célula, ya que ensayos *in vitro* mostraron que las células Tregs eran incapaces de suprimir la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cuando se encontraban físicamente separadas; además al cultivar estas mismas células Tconv con el sobrenadante de las células Tregs activadas no se inhibió su proliferación [74, 86]. Posteriormente, se demostró que las células Treg después de ser activadas producen perforina y granzima (en humanos granzima A y en ratón granzima B), y mediante estas moléculas inducen apoptosis tanto en las células Tconv como en células presentadoras de antígeno [87-89]. Estos hallazgos han sido apoyados por un modelo *in vivo* de trasplante alogénico de piel en el cual se demostró que la granzima B es fundamental para el mantenimiento de la tolerancia a largo plazo mediada por las Treg [90].

Las células Tregs no son capaces de producir IL-2, pero tienen niveles más altos de CD25 que los linfocitos T vírgenes o activados, por lo cual son más eficientes para utilizar la IL-2 del microambiente; mediante este mecanismo pueden disminuir la capacidad de activación y proliferación de las células Tconv [91]. Las células Tregs también tienen una alta expresión de CD39 y CD73, dos ectoenzimas que hidrolizan ATP/ADP a AMP y AMP a adenosina, respectivamente; la adenosina generada suprime la función de las células Tconv a través de la activación del receptor de adenosina 2A (A<sub>2A</sub>R) [92-94]. Interesantemente, la unión de adenosina a A<sub>2A</sub>R podría favorecer la generación de Tregs al inhibir la secreción de IL-6 e induciendo la secreción de TGF-β [95].

Además de regular directamente a las células T efectoras, las células Tregs pueden modular la maduración y/o función de las células dendríticas (DCs), las cuales son importantes para la activación y diferenciación de células T efectoras [76]. Por

ejemplo, IL-10 que puede ser producida por las Tregs inhibe la expresión de CD80 y CD86 en DCs, así como de moléculas del MHC [96]. CTLA-4 está expresado constitutivamente en células Treg humanas y de ratón, y es un mecanismo importante para suprimir la función de células presentadoras de antígeno [1]. La interacción de CTLA-4 con sus ligandos CD80/CD86 induce en las DCs la secreción deIDO (indolamina 2,3-dioxigenasa), enzima que favorece el catabolismo del triptófano hacia un metabolito tóxico para los linfocitos Tconv [97]. Otra molécula de superficie que se expresada en la mayoría de las células tTregs es Neuropilina-1 (Nrp-1) la cual promueve interacciones más prolongadas entre las Tregs y las DCs inmaduras, y de esta manera disminuyen la probabilidad de que las DCs activen linfocitos T vírgenes o de memoria [98, 99]. Finalmente, LAG-3 es una molécula expresada constitutivamente en las células Treg la cual tiene una alta afinidad hacia moléculas del MHC Clase II en la DC; ésta interacción inhibe la maduración y capacidad presentadora de antígenos de la DC [100-102].



**Figura 2. Mecanismos de supresión ejercidos por las células T reguladoras.** Los mecanismos que utilizan las Treg para llevar a cabo su función supresora se puede dividir en cuatro categorías: mediado de citocinas, incluyen IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$ ; disrupción metabólica, incluye el consumo de IL-2 por alta expresión de CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2) y generación de adenosina por las ectoenzimas CD39 y CD73; citólisis, dependiente de la secreción de granzima A o B y de perforina para inducir apoptosis; modulación de las células dendríticas (DCs), incluye la expresión de LAG-3 que se une a moléculas del MHC II para inhibir la maduración de las DCs, y la expresión de CTLA-4 que al unirse a sus ligandos CD80/CD86 induce en las DCs la secreción deIDO, enzima que favorece el catabolismo del triptófano hacia un metabolito tóxico para los linfocitos Tconv . Modificado de [76].

## 1.5 Potencial Terapéutico de las células Tregs

La inducción de tolerancia inmunológica es esencial para prevenir el desarrollo de enfermedades caracterizadas por la activación descontrolada del sistema inmune, particularmente cuando las células Tconv coordinan la respuesta inmune adaptativa y participan en la patogénesis de enfermedades como las autoinmunes [103], rechazo de trasplante de órganos sólidos [104] y enfermedad injerto contra hospedero (EICH) [105]. En la actualidad, las estrategias terapéuticas para inducir tolerancia se basan en el uso de fármacos inmunosupresores, los cuales eliminan las células T o causan anergia en éstas mismas [106]. Debido a que esta inmunosupresión no elimina específicamente a células T auto-reactivas (en el contexto de autoinmunidad) o alo-reactivas (en el caso de trasplante de órganos o tejidos alogénicos), estos tratamientos convencionales tienen efectos adversos asociados con la inmunosupresión farmacológica a largo plazo como susceptibilidad a infecciones por microorganismos patógenos o desarrollo de cáncer, entre otros efectos (tabla 2) [107].

<b>Tabla 2. Efectos adversos de los fármacos inmunosupresores</b>	
<b>FÁRMACO</b>	<b>EFFECTOS ADVERSOS</b>
<b>Anti-CD25</b> (basiliximab, daclizumab)	Anafilaxia, reacciones alérgicas.
<b>Anti-CD52</b> (alemtuzumab)	Depleción células T, ↑ riesgo infección.
<b>Globulina Anti-timocito</b> (ATG)	Linfopenia, anafilaxia, shock, broncoespamos.
<b>Corticosteroides</b>	Retención de líquidos, diabetes mellitus, hipertensión, retraso crecimiento, hiperlipidemia, osteopenia, ↓ cicatrización de heridas.
<b>Inhibidores de Calcineurina (CNI)</b>	Nefrotoxicidad, neurotoxicidad, hipertensión, hiperlipidemia e hiperpotasemia, diabetes mellitus, ↑ de la resorción ósea, hirsutismo, hiperplasia gingival, discapacidad auditiva, síndrome colestásico.
<b>Azatioprina</b>	Hiperplasia nodular hepática, esclerosis hepatoportal, mielosupresión
<b>Micofenolato</b>	Alteración gastrointestinal, retraso del crecimiento, mielosupresión.
Modificado de [108].	

Por lo anterior, las actuales investigaciones se han enfocado en desarrollar terapias dirigidas a regular específicamente las funciones efectoras del sistema inmunológico que están implicadas en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes o en el rechazo del alo-injerto trasplantado.

Debido a la capacidad de las células tTreg para modular las funciones efectoras de una amplia gama de células del sistema inmune de manera antígeno-específica [2], desde hace más de una década ha habido un interés en poder desarrollar inmunoterapias con Tregs [109-112]. De hecho, se ha demostrado su potencial para prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes y la EICH, así como inducir la tolerancia a órganos sólidos trasplantados [113-116].

La inmunoterapia con células Treg en humanos tendría varias ventajas sobre los tratamientos convencionales. En primer lugar, median su inmunosupresión de manera antígeno-específica, evitando así efectos adversos de los fármacos inmunosupresores. En segundo lugar, al ser células autólogas no deben ser rechazadas por su sistema inmune al reintroducirlas. Tercero, la terapia con células T FOXP3<sup>+</sup> puede restablecer la tolerancia inmunológica y tiene efectos terapéuticos a largo plazo en ratones [117].

### **1.6 Retos para la aplicación clínica de células Treg en humanos**

A pesar de las ventajas del uso de células Treg como agentes terapéuticos, la aplicación clínica en humanos ha tenido dos principales retos en el laboratorio. Primero, debido al número limitado de Tregs en sangre periférica (<5 % del total de células T CD4<sup>+</sup>), se debe diseñar estrategias que permitan disponer de una cantidad adecuada de células para obtener el efecto terapéutico deseado. Segundo, aislar una población de células Treg FOXP3<sup>+</sup> altamente “pura”, lo cual continúa siendo un gran desafío debido a la ausencia de un marcador de superficie celular específico de Treg. También cabe destacar que estudios en ratones han descrito una población de células T FOXP3<sup>+</sup> (~ 5%) que en condiciones particulares puede dejar de expresar FOXP3 [118].

Por lo tanto, los estudios recientes se han centrado en descifrar los mecanismos que regulan la estabilidad del linaje de células Treg, así como el descubrimiento de marcadores selectivos de Tregs en los humanos y la generación a gran escala de Treg para uso clínico.

### **1.6.1 Aislamiento de Treg**

Además de la expresión de CD25 y FOXP3, células Treg humanas también expresan CD27, CD45RA, CD39, CD122, CTLA-4 (CD152) y GITR [2]. Sin embargo, la mayoría de estos marcadores de superficie celular no son exclusivos de las células Treg y también son expresados por las células Tconv CD4<sup>+</sup> activadas, lo que plantea un reto durante el proceso de aislamiento. A modo de ejemplo, FOXP3 es esencial para el mantenimiento de la función de las Treg [1]. A pesar de esto, células Tconv CD4<sup>+</sup> al activarse pueden expresar FOXP3 sin adquirir un fenotipo regulador [119]. Además, al ser una proteína intracelular este marcador no se puede utilizar para aislar células Treg. Por lo tanto, es necesario encontrar marcadores de superficie que definan poblaciones Treg "puras" para terapia celular.

Dos combinaciones diferentes de marcadores parecen ser prometedoras para el aislamiento de células Treg con fines terapéuticos. El primero se basa en la expresión de CD45RA, debido a que se ha demostrado que las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD45RA<sup>+</sup> tienen una mayor capacidad supresora dentro de la población total de células CD25<sup>hi</sup>, y además las células T CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> contienen mayor número de precursores de células Th17 [120]. La segunda combinación es CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>low</sup>, ya que existe una inversa correlación entre la expresión de CD127 y de FOXP3 [121], incluso estas células tienen una mayor capacidad para inducir tolerancia al alo-injerto, en comparación con aislamiento basado solo en la expresión de CD25 [122].

### 1.6.2 Expansión de células Treg

Un obstáculo importante en la aplicación clínica de células Treg es su número limitado en periferia, que no excede el 5 % del total de células T CD4<sup>+</sup>. Por lo tanto, es de particular importancia expandir *ex vivo* estas células antes de re-infundir al paciente.

Las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> son relativamente anérgicas a la estimulación de su TCR *in vitro* [86], sin embargo pueden ser activadas para proliferar mediante la combinación en la estimulación con anti-CD3/-CD28 y altas concentraciones de IL-2 o IL-2 en combinación con IL-15 [123]. Además, es importante destacar que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas *ex vivo* conservan su función supresora tanto *in vitro* [124] como *in vivo* en modelos animales [125]. Sin embargo, se ha reportado que después de tres semanas de expansión *in vitro* la estimulación repetida del TCR en células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> causa pérdida de la expresión de FOXP3 [126].

Además, debido a que células Tconv CD4<sup>+</sup> bajo activación pueden expresar transitoriamente CD25 y FOXP3 [127], en la población celular aislada podría existir un rastro de contaminación de células T no reguladoras las cuáles podrían proliferar en las condiciones de expansión mencionadas anteriormente y al ser reinfundidas podrían causar efectos adversos al paciente. Por lo tanto, es de vital importancia comenzar los cultivos con una población de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> altamente pura o crear condiciones que solo favorezcan la proliferación de células Treg.

Existen estudios *in vitro* que han demostrado que la rapamicina, un fármaco inhibidor de la vía PI3K/Akt/mTOR, impide la proliferación de células Tconv y confiere una ventaja selectiva para la proliferación de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> [128, 129],

## **1.7 Terapia adoptiva de células Treg**

El uso de células Treg como agentes terapéuticos en humanos mediante una transferencia adoptiva (tratamiento en el cual las células de un individuo se manipulan *in vitro* y posteriormente son reinfundidas) se basa en estudios que se han realizado en diversos modelos animales. A continuación se proporcionan algunos ejemplos en los cuales se ha demostrado su eficacia para el tratamiento de enfermedades mediadas por células T [114].

### **1.7.1 Tolerancia al Injerto Trasplantado**

El rechazo al injerto renal mediado por células T se desarrolla cuando alo-antígenos del donante son presentados por CPAs en moléculas de HLA clase I o II y activan células T que se diferencian en subconjuntos efectores incluyendo CD8<sup>+</sup> citotóxicos y CD4<sup>+</sup> cooperadoras, las cuales tienen la capacidad de infiltrarse en el injerto trasplantado donde liberan citocinas y quimiocinas, causando la muerte celular directa o indirectamente [130]. Con la introducción de fármacos inmunosupresores se redujo la incidencia de rechazo agudo y se aumentó el tiempo de supervivencia del injerto a más un año [130]. A pesar de excelentes tasas de supervivencia del injerto a corto plazo, actualmente la supervivencia a largo plazo sigue siendo subóptima debido a la morbilidad y mortalidad asociadas con el tratamiento a largo plazo de inmunosupresores, caracterizado por incremento en la susceptibilidad al desarrollo de patologías infecciosas, neoplásicas, cardiovasculares, entre otras [131]. Por ejemplo, durante el desarrollo y progresión del daño en injertos renales participan factores inmunológicos (mecanismo de evasión al efecto inmunosupresor de fármacos) y no inmunológicos (efectos nefrotóxicos asociado a inmunosupresores como los inhibidores de calcineurina), teniendo como resultado final los cambios histopatológicos observados en el injerto en etapas tardías de disfunción de éste [132].

Existen reportes que apoyan el papel de células T reguladores (Treg) en la inducción de la tolerancia del trasplante [133]. En humanos un buen pronóstico en la aceptación del alo-injerto renal se correlaciona con un incremento en la población de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> [134].



La importancia de la aplicación de células Treg en el contexto del trasplante de órganos fue apoyado por el trabajo de Sakaguchi *et al.* [73], que mostró que las células Treg impidieron el rechazo de injertos de piel alogénicos en ratones nude (deficientes de células T) cuando fueron co-transferidas con células T CD25<sup>-</sup>. Posteriormente, una serie de modelos preclínicos en ratones con trasplante alogénico cardíaco e islotes pancreáticos demostró que las células Treg co-transferidas en el momento con el alo-injerto son críticas en la inducción y mantenimiento de la tolerancia [133, 135]. En apoyo de este tipo de estudios, en modelos de trasplante de médula ósea la transferencia de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> junto con el alo-injerto previenen el desarrollo de la enfermedad de injerto contra hospedero (EICH) e inducen tolerancia a largo plazo [136].

En los modelos de ratón, la terapia con Treg tiene una característica constante: las Treg purificadas a partir de ratones que desarrollaron tolerancia son más eficaces para transferir la tolerancia a nuevos hospederos con alo-injerto, en comparación con las Tregs de ratones que no han recibido un trasplante. Esto puede deberse al aumento de la frecuencia de Treg alo-antígenos específicas [137].

Las células T pueden reconocer el alo-antígeno mediante dos vías de presentación: la vía directa donde las células T reconocen el alo-antígeno expresado en las CPAs del donante; y la vía indirecta las células T reconocen alo-antígenos del donante procesados y presentados por CPAs del receptor [138]. Dos estudios en ratón compararon la eficacia de Treg activadas por la vía directa e indirecta, y encontraron que la especificidad indirecta es más eficaz para inducir tolerancia al injerto a largo plazo [139, 140]. Interesantemente, al transferir células Treg activadas vía directa junto con policlonales pueden ser capaces de inducir la supervivencia del alo-injerto a largo plazo [137]. Alternativamente, las células Treg alo-reactividad directa puede crear un entorno tolerogénico en el tejido del injerto para promover el desarrollo de Tregs indirectas, logrando así la tolerancia a largo plazo. Tomados en conjunto, la combinación de células Treg alorreactivas directas e indirectas puede ser óptimo en la inducción de la supervivencia del injerto cuando el número de Treg es limitado [137].

Finalmente, en modelos de ratón se ha demostrado que la terapia con células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expandidas *ex vivo* es capaz de prevenir el rechazo agudo y crónico de alo-injertos de hígado, renal, piel y cardíaco, así como prevenir la EICH [139, 141, 142].

### **1.7.2 Prevención de Enfermedades Autoinmunes**

Diversos estudios han demostrado que existe una disminución del número de las células Treg en individuos con enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo 1, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple y artritis reumatoide [143].

En ratones NOD (un modelo de diabetes tipo 1 espontánea), el número de células Treg y la expresión de FOXP3 disminuyen con la edad [144]. La transferencia adoptiva de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expandidas *ex vivo* aminora la enfermedad en los ratones NOD [145], al igual que el tratamiento con IL-2 el cual aumenta la número de Tregs y su expresión de FOXP3 [144].

En el modelo de ratón (NZB × NZW) F1 que desarrolla espontáneamente síntomas tipo lupus, la transferencia adoptiva de células T CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> previamente activadas retrasó el desarrollo de la enfermedad [146], al igual que la terapia con células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> expandidas *ex vivo* las cuales redujeron el daño renal y aumentó la supervivencia de los ratones [147].

Por último, también se ha obtenido resultados positivos en modelos de miastenia gravis [148], enfermedad inflamatoria del intestino (incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa) [149] y encefalomiелitis autoinmune [150].

### **1.8 Terapia adoptiva de Tregs en humanos: primeros ensayos clínicos**

Hasta el año 2015, solo se han reportado cinco ensayos clínicos de inmunoterapia con Treg en humanos (se resumen en la tabla 3), cuatro para el tratamiento de EICH y uno pacientes con diabetes tipo 1. Los cinco ensayos mostraron la seguridad y eficacia del tratamiento. Por ejemplo, Trzonkowski *et al.* [151] realizaron el primer ensayo clínico utilizando Treg expandidas *ex vivo* para tratar dos pacientes con EICH, teniendo resultados positivos en el alivio de síntomas y la reducción de la inmunosupresión en un paciente con EICH crónica.

En el ensayo realizado por Brunstein *et al.*[152], debido a la diferencia de HLA de las Treg provenientes de la sangre de cordón umbilical del donante y las células Tconv del receptor, permitió rastrear la persistencia de células Treg. El incremento en sangre de las células Treg infundidas se pudo detectar entre 4 y 7 días después de la infusión. Sin embargo, después de una segunda infusión de Treg criopreservadas el incremento fue menor en comparación con la primera infusión, lo que sugiere que la crioconservación puede comprometer la viabilidad o estabilidad de las células Treg, aunque otros factores también pueden contribuir como el tratamiento inmunosupresor aplicado después de la primera infusión. Además, se observó una clara tendencia de aumento de las células Treg en los pacientes tratados con rapamicina en comparación con los pacientes tratados con ciclosporina.

En el ensayo de Marek-Trzonkowska *et al.*[153], la infusión de  $20-30 \times 10^6/\text{kg}$  peso corporal de Tregs expandidas policlonalmente en niños (entre las edades de 8 y 16) con diabetes tipo 1, el tratamiento fue seguro y 8 de 12 pacientes se les disminuyó la dosis de insulina, e incluso 2 pacientes fueron insulina-independientes después de un año de la re-infusión. Estos resultados se asociaron con el aumento del porcentaje de células Treg en circulación.

Finalmente, en el ensayo Di Ianni *et al.* [154], la terapia con células Treg permitió la infusión de una dosis más alta de células Tconv para prevenir el desarrollo de infecciones por microorganismo oportunistas, y sin desarrollo de EICH aún en ausencia de tratamiento con fármacos inmunosupresores. En particular, reportaron una mejora notable para la prevención de infección con citomegalovirus. Además, cinco de siete pacientes que recibieron la vacuna contra la influenza después de infusión de células Treg lograron títulos de anticuerpos protectores. Estos resultados sugieren que la infusión de Treg no conduce a la inmunosupresión global para impedir la respuesta inmune contra las infecciones.

**Tabla 3. Terapia adoptiva de Células T reguladoras en humanos.**

Indicación	Dosis (células/kg de peso)	Resultados clínicos	Referencia
(n=2) TMO (paciente 1) TCTH (paciente 2)	10 <sup>5</sup> (paciente 1) o 3×10 <sup>5</sup> (paciente 2)	Retiro de micofenolato de mofetil y ↓ dosis de prednisona (paciente 1); mejoría clínica temporal (paciente 2).	[151]
(n=23) TSCU de donantes no emparentado	0.01–3×10 <sup>6</sup>	↓ incidencia EICH aguda grado II-IV; sin riesgos de infección, recaída o mortalidad temprana.	[152]
(n=28) TCTH HLA haploidéntico	2 x10 <sup>6</sup>	La incidencia de EICH aguda y crónica fue baja en ausencia de fármacos inmunosupresores.	[154]
(n=12) Diabetes Mellitus Tipo 1	10-20 x 10 <sup>6</sup>	8 pacientes en remisión; 2 pacientes insulina independientes; sin efectos adversos.	[153]
(n=5) TCTH	0,5 – 4,5 x 10 <sup>6</sup>	4 pacientes se les disminuyó dosis de fármacos inmunosupresores.	[155]

TMO, Trasplante de Médula Ósea; TCTH, Trasplante de Células Troncales Hematopoyéticas; TSCU, Trasplante de Células Troncales de Sangre de Cordón Umbilical; EICH, Enfermedad Injerto Contra Hospedero.

En general, estos trabajos demostraron que el tratamiento es factible, seguro y potencialmente eficaz. A pesar de que aún falta realizar estudios en pacientes con trasplante de órganos sólidos y otras enfermedades autoinmunes (como lupus eritematoso sistémico, artritis, entre otras), la información recabada de estos ensayos clínicos es fundamental para el diseño de futuras estrategias terapéuticas con células Tregs en humanos.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Una limitante para la aplicación clínica de células Treg FOXP3<sup>+</sup> en humanos es el número limitado de esta subpoblación en sangre periférica. La expansión *ex vivo* permitiría superar este obstáculo, por lo que ya se han publicado diversos protocolos estimulando las Tregs con anti-CD3/-CD28 en presencia de IL-2. Sin embargo, la estimulación repetida *in vitro* del TCR en Treg causa pérdida de la expresión de FOXP3, el cual es importante para mantener su función. Además, debido a la falta de marcadores de superficie que permitan aislar células Treg FOXP3<sup>+</sup> con alta pureza, se deben crear condiciones de cultivo que solo favorezcan el crecimiento de dichas células. Por lo tanto, en el presente trabajo nos planteamos establecer un protocolo de expansión *ex vivo* a largo plazo de células Treg FOXP3<sup>+</sup>, el cual permita su proliferación selectiva *in vitro* y a la vez garantice el mantenimiento de la expresión de FOXP3 y su función supresora.

## **HIPÓTESIS**

Se puede aislar y expandir *ex vivo* a largo plazo células Treg FOXP3<sup>+</sup> manteniendo la expresión de FOXP3 y la función supresora.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer un protocolo de expansión *ex vivo* a largo plazo de células Treg FOXP3<sup>+</sup> con fenotipo y capacidad supresora estable.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Aislar y expandir *ex vivo* células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> provenientes de individuos sanos.
2. Analizar la expresión de FOXP3 y marcadores relacionados con la función supresora y migración de células Treg expandidas.
3. Analizar la función supresora *in vitro* de células Treg expandidas.
4. Evaluar el efecto de la criopreservación sobre el fenotipo y función *in vitro* de células Tregs expandidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sujetos

Se empleó concentrados leucocitarios de seis individuos sanos, tres hombres (42,0  $\pm$  7,2 años) y tres mujeres (38,7  $\pm$  3,8 años), colectados en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas".

### Separación de Células Mononucleares

La sangre se diluyó en PBS 1X en una relación de 1:2, se estratificó en un gradiente de densidad en 2,5 mL Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, UK) por cada 7 mL de sangre diluida, se centrifugó a 2500 rpm por 30 minutos a 18 °C. Las células mononucleares (CMN) se recolectaron de la interfase, se lavaron tres veces (a 1500 rpm, 1200 rpm y 900 rpm durante 5 minutos) con medio RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, USA). La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano (Gibco, USA) y se utilizaron las células con viabilidad mayor del 90 %. Para ensayos de supresión se criopreservaron alícuotas de CMN autólogas en una solución que contiene SFB (Gibco, USA) al 90% y DMSO (Sigma-Aldrich, USA) al 10%, 24 horas a -70 °C y posteriormente se transfirieron a nitrógeno líquido.

### Purificación de Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>

Las células mononucleares se incubaron con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos, anti-CD4-PE (Tombo Biosciences, USA) y anti-CD25-PECY5 (BD Bioscience, USA) durante 30 min/4 °C en oscuridad y posteriormente se lavaron con medio RPMI con 10 % SFB (1200 rpm durante 5 min). Se purificaron células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> por FACS en el citómetro de flujo FACSAria™ I (BD Bioscience, USA).

### Expansión *ex vivo* de Treg

Las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> purificadas por FACS se cultivaron en una placa de 96 pozos fondo plano en medio OpTmizer™ CTS™ T-Cell Expansion (Gibco, USA) suplementado con Suero Humano AB (Gemini Bio-Products, USA) al 10% e IL-2 (300 UI/mL) ((R&D Systems, UK). Las células se estimularon con perlas magnéticas (Dynabeads) acopladas a anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 (Life

Technologies, USA) en una proporción 2:1 (2 perlas: 1 célula), en presencia o ausencia de rapamicina (100 ng/mL) (Sigma-Aldrich, USA). Las células se mantuvieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al día 2 se adicionó IL-2 (200 UI/mL). Al día 4, se retiraron perlas magnéticas anti-CD3/-CD28, se lavaron las células y se colocaron en medio fresco suplementado con IL-2 (50 U/mL). En el día 7, se lavaron las células y se contaron (viabilidad >95%) para realizar: ensayos de supresión y fenotipo (ver apartados Fenotipo Treg y Ensayo de Supresión); re-estimulación de las células con perlas magnéticas anti-CD3/-CD28 (1 perla: 2 células), IL-2 (200 U/mL) y en presencia o ausencia rapamicina (100 ng/mL); criopreservación de muestras de las células expandidas en una solución de SFB al 90% y DMSO al 10%, 24 horas a -70 °C y posteriormente en nitrógeno líquido. El mismo protocolo se realizó durante cuatro semanas (ver el diagrama de flujo al final de Materiales y Métodos).

### **Fenotipo de Treg: Tinción Superficial e Intracelular**

Muestras de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HI</sup> expandidas frescas o criopreservadas se incubaron con anti-CD25-PECy5 (BD Bioscience, USA), anti-CTLA-4-PECy7 (Biolegend, USA) y anti-CCR7-APC Cy7 (Biolegend, USA) durante 20 min/4 °C en oscuridad y después se lavaron con amortiguador FACS. Para la tinción intracelular de FOXP3 y Helios se utilizó “FOXP3/Transcription Factor Staining Buffer Set” (eBioscience, USA). Brevemente, las células se lavaron una vez con 150 µL de amortiguador FACS, se les adicionó 150 µL de la solución Fixation/Permeabilization (1 parte del Concentrado con 3 partes del Diluyente) y se incubaron 12-18 horas a 4°C en oscuridad. Posteriormente las células se lavaron con 150 µL de Permeabilization Buffer 1X y se incubaron con anti-FOXP3-APC (Beckman Coulter, France) y Helios-FITC (Biolegend, USA) durante 40 min/4°C en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con Permeabilization Buffer 1X y finalmente las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Attune® Acoustic Focusing (Life Technologies, USA). Los resultados (frecuencias e Intensidades Medias de Fluorescencia) se analizaron con el programa FlowJo vX.0.7 (Tree Star Ashland, USA).

## Ensayo de Supresión

Las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas, frescas o criopreservadas, fueron co-cultivadas con CMN autólogas descongeladas (previamente marcadas con 5  $\mu$ M CFSE) en distintas proporciones (0-1 Treg: 1-128 CMN), en placa de 96 pozos fondo U en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% Suero Humano AB, L-glutamina (Gibco), Aminoácidos No Esenciales (Gibco), Piruvato de Sodio (Gibco) y 2-Mercaptoetanol (Gibco). Las células fueron estimuladas con Dynabeads anti-CD3/-CD28 (proporción de 1 perla: 15 células) y se mantuvieron en cultivo a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub>. Al día 5 se cosechó la placa, se realizó una tinción superficial con anti-CD4-APC (Tonbo Biosciences, USA) y anti-CD8-PECy7 (Tonbo Biosciences, USA) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, se lavaron 2 veces con amortiguador FACS (PBS 1X, BSA 0.05%, EDTA 2mM, azida de sodio) y fijaron con paraformaldehído al 2 %. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Attune® Acoustic Focusing para determinar la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> por dilución del CFSE. Los resultados se analizaron con el programa FlowJo vX.0.7. Para calcular el porcentaje de supresión se utilizó la siguiente fórmula:

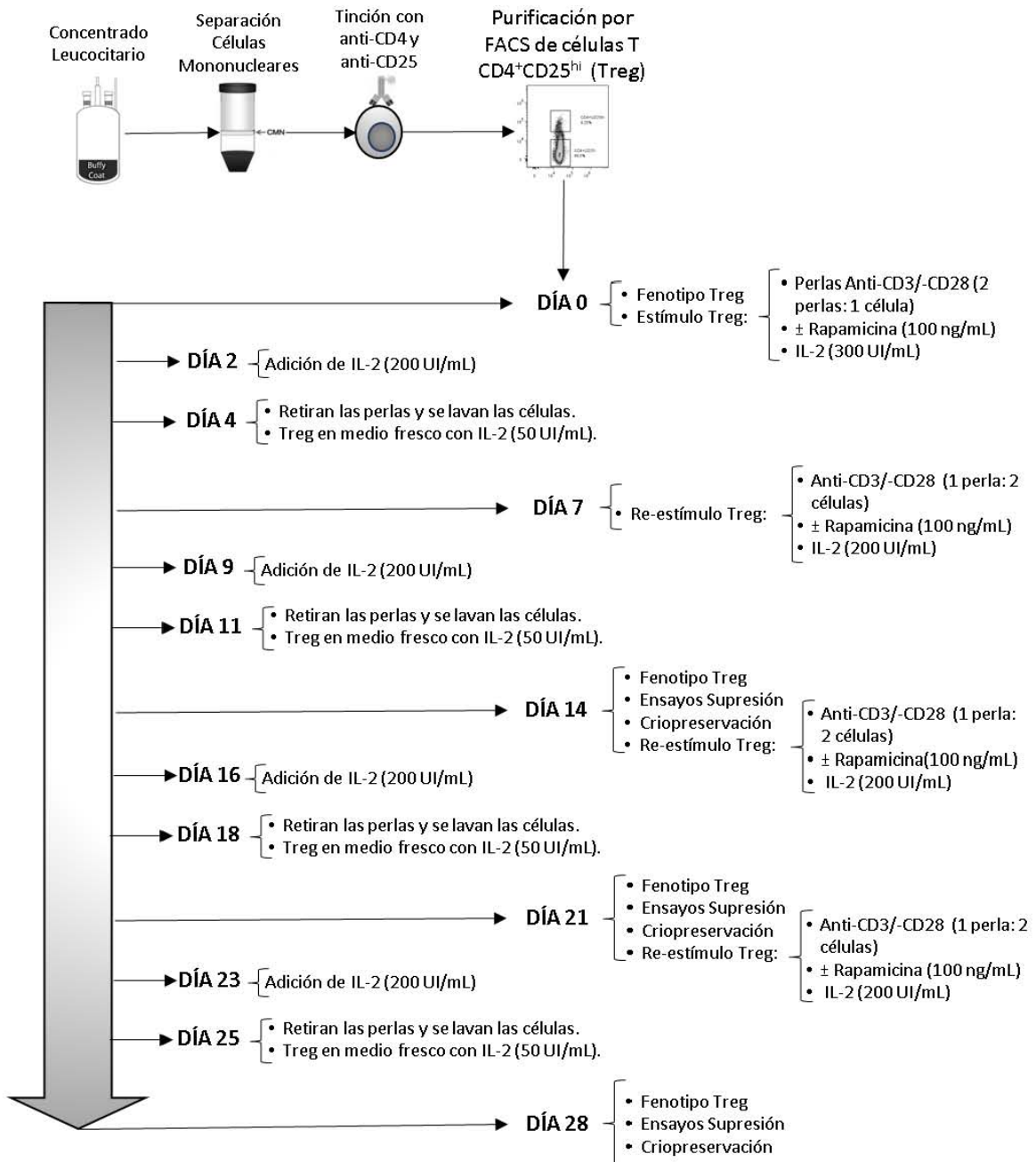
$$\% \text{ Supresión} = \frac{\% \text{ de Proliferación de Tresp sin Treg} - \% \text{ de Proliferación de Tresp con Treg}}{\% \text{ de Proliferación de Tresp sin Treg}} \times 100$$

## Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa de cómputo GraphPad Prism 6.01 (USA). Para determinar la distribución de los datos se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk. Para la comparación de los grupos se utilizó la Prueba U de Mann-Whitney. Los resultados se describieron como media  $\pm$  error estándar. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

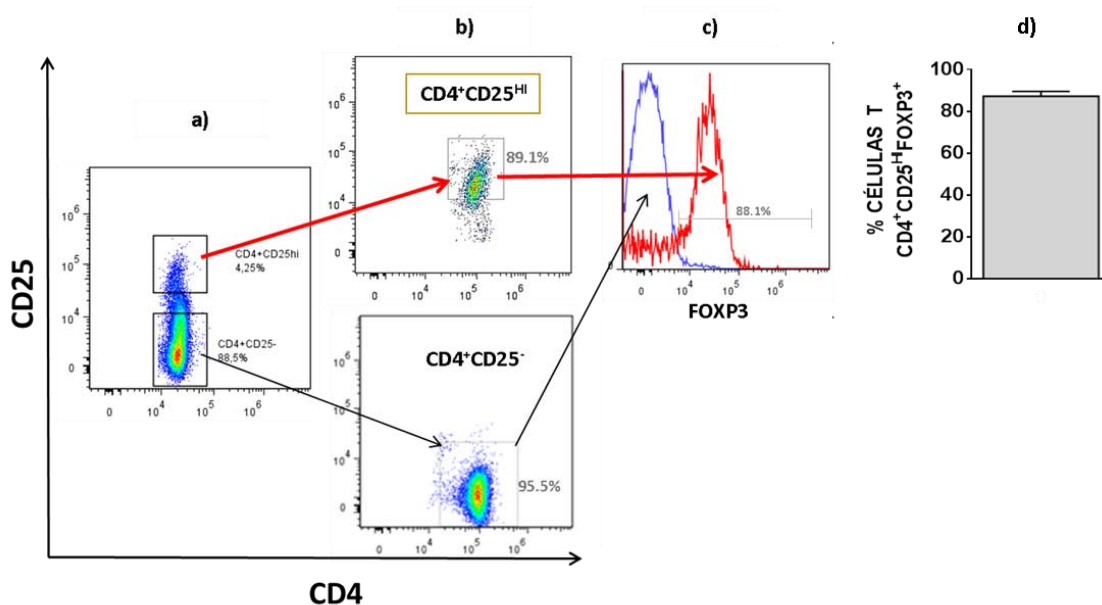


## Diagrama de flujo de la metodología experimental.



## RESULTADOS

El primer paso importante para la obtención de células T reguladoras (Treg) con fines terapéuticos es poder aislar una población de Tregs FOXP3<sup>+</sup> con una alta pureza. Para lograr lo anterior, a partir de células mononucleares de sangre periférica humana se purificaron por FACS las células T CD4<sup>+</sup> que tenían la mayor expresión de CD25 (3-4 % del total de CD4<sup>+</sup>, Figura 3a y 3b). Como se observa en la Figura 3c y 3d, las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> aisladas fueron FOXP3<sup>+</sup> ( $87,23 \pm 2,25$  %).



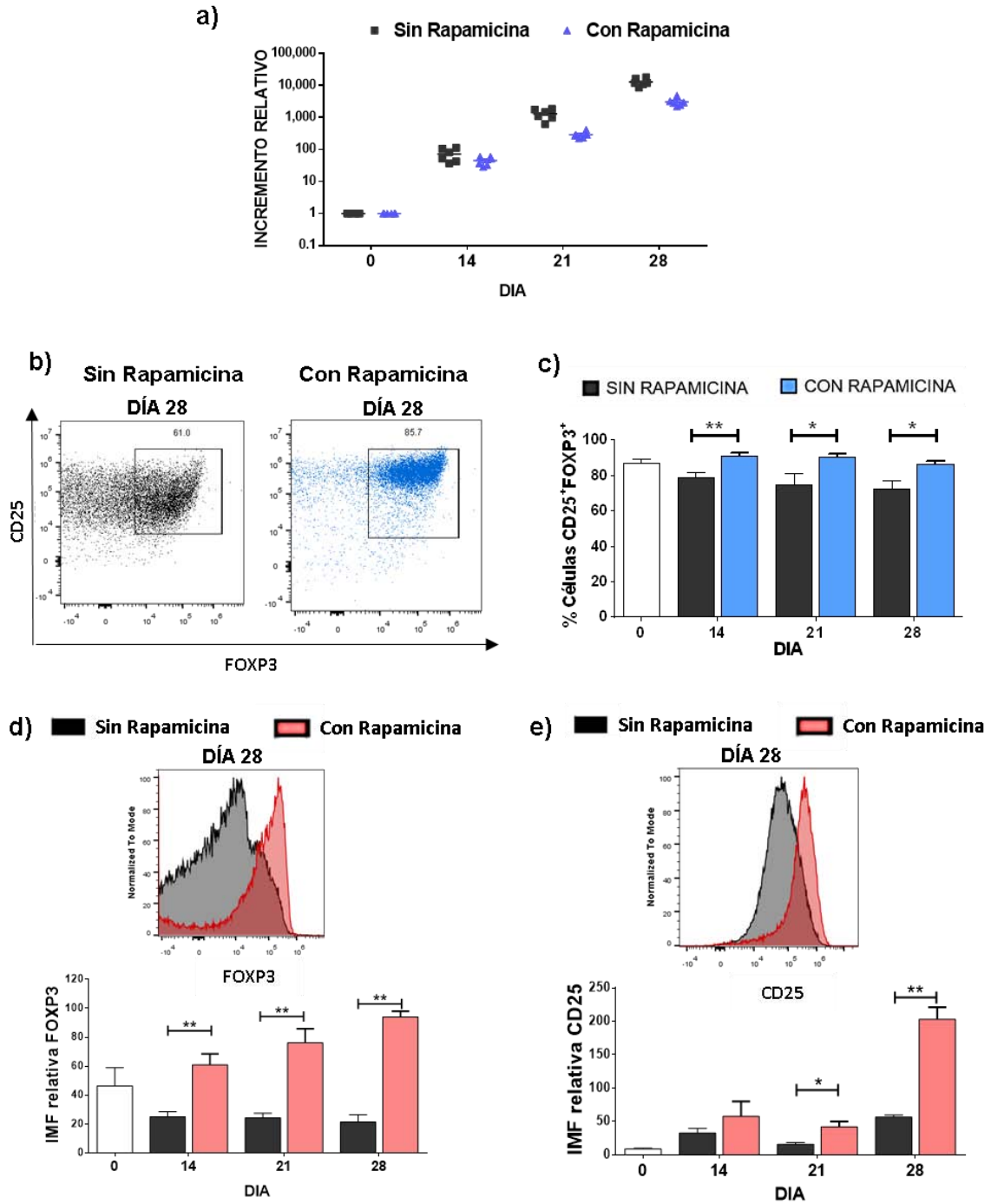
**Figura 3. Purificación y caracterización fenotípica de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>.** Células mononucleares de sangre periférica se marcaron con anti-CD4 y anti-CD25. De la región de células T CD4<sup>+</sup> (inciso a) se purificaron por FACS las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (inciso b). Se complementó el fenotipo marcando las células con anti-FOXP3 (inciso c y d).

Una vez establecida la metodología para el aislamiento de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>, se procedió a su expansión *ex vivo*. Para lograr lo anterior, las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> aisladas se estimularon *in vitro* con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, altas dosis de IL-2 y en presencia o ausencia de rapamicina. Como se observa en la Figura 4a, se obtuvo una mayor proliferación de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> en ausencia de rapamicina (Incremento Relativo=  $12970 \pm 1441$ ) en comparación cuando fueron cultivadas en presencia de rapamicina (Incremento

Relativo=  $3073 \pm 377$ ). Sin embargo, las células expandidas hasta cuatro semanas en presencia de rapamicina mantuvieron un mayor porcentaje de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Sin Rapamicina=  $72,47 \pm 8,03$  %; Con Rapamicina=  $86,53 \pm 3,24$  %;  $p < 0,05$ ) (Figura 4b y 4c) y mayor intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) tanto para la expresión de FOXP3 (Figura 4d: Sin Rapamicina=  $21,39 \pm 8,81$ ; Con Rapamicina=  $94,02 \pm 6,91$ ;  $p < 0,01$ ) como de CD25 (Figura 4e: Sin Rapamicina=  $56,50 \pm 5,48$ ; Con Rapamicina=  $202,80 \pm 31,55$ ;  $p < 0,01$ ), siendo estos resultados estadísticamente significativos.

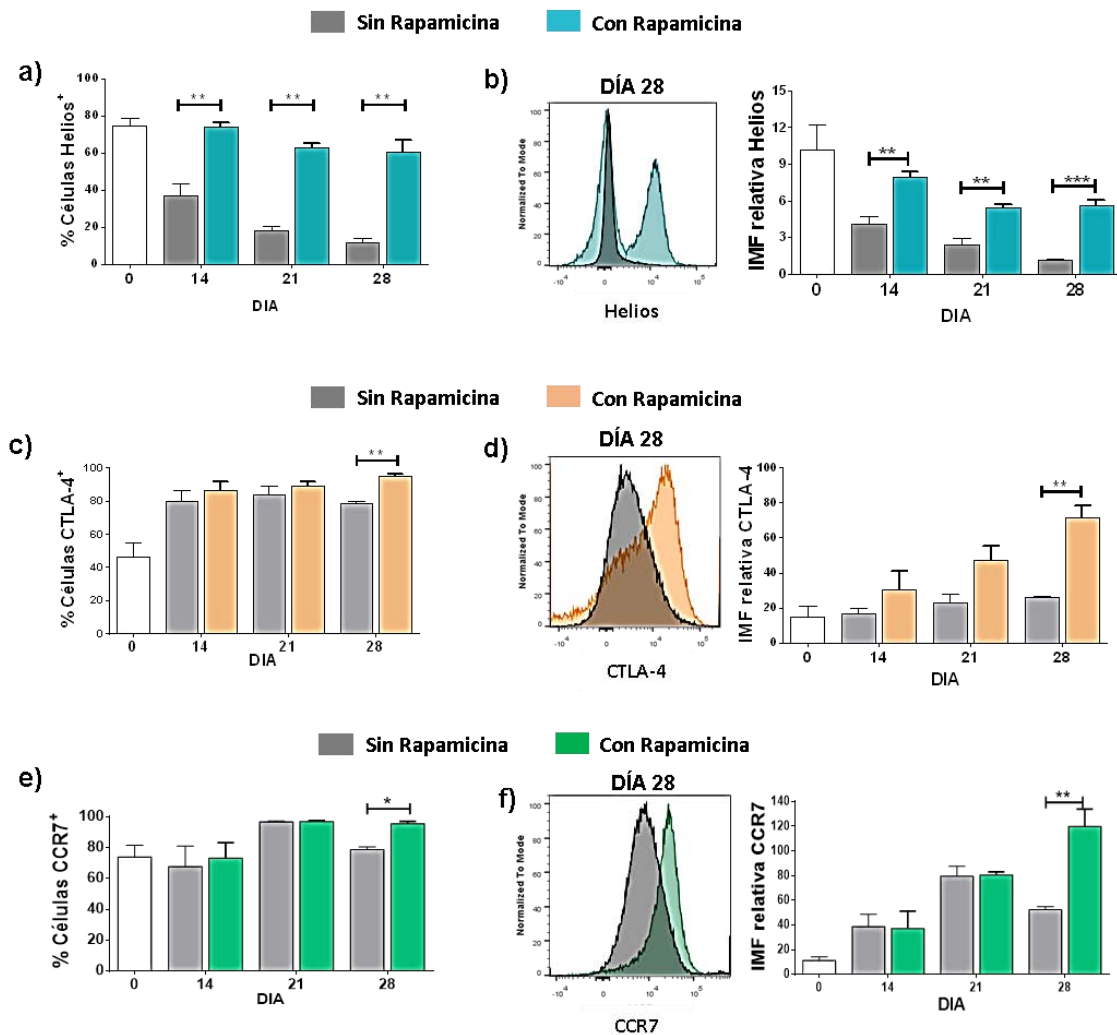
Helios es un factor de transcripción que en el ratón se ha utilizado para distinguir las Treg tímicas (Helios<sup>+</sup>) de las Treg inducidas (Helios<sup>-</sup>) [41]. Sin embargo, la expresión de Helios en células Treg humanas es controversial, y se ha demostrado que este factor se puede expresar en células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> después de ser activadas por su TCR [42]. En el presente trabajo, la mayoría de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> purificadas expresaron Helios ( $74,58 \pm 10,46$  %), pero la estimulación a largo a través de TCR disminuyó la expresión de este factor de transcripción en estas mismas células. Interesantemente, al cultivar en presencia de rapamicina se promovió el mantenimiento de la expresión de Helios, obteniendo después de cuatro semanas de expansión un mayor porcentaje de células Helios<sup>+</sup> (Figura 5a: Sin Rapamicina=  $11,41 \pm 4,88$  %; Con Rapamicina =  $67,00 \pm 8,59$ %;  $p < 0,01$ ) e IMFr de Helios (Figura 5b: Sin Rapamicina=  $1,11 \pm 0,15$ ; Con Rapamicina =  $5,64 \pm 0,80$ ;  $p < 0,01$ ).

CTLA-4 es una proteína importante para que las Treg lleven a cabo su función supresora [76]. En nuestros resultados, las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas en ambas condiciones de cultivo aumentaron la expresión de CTLA-4 en cada día evaluado, pero cuando fueron cultivadas en presencia de rapamicina en la cuarta semana se obtuvo un mayor porcentaje de células CTLA-4<sup>+</sup> (Figura 5c: Sin Rapamicina=  $78,27 \pm 2,83$ %; Con Rapamicina=  $95,23 \pm 1,94$ %;  $p < 0,01$ ) y aumento de la IMFr de CTLA-4 (Figura 5d: Sin Rapamicina=  $26,15 \pm 0,59$ ; Con Rapamicina =  $71,78 \pm 11,33$ ;  $p < 0,01$ ), siendo ambos resultados estadísticamente significativos.



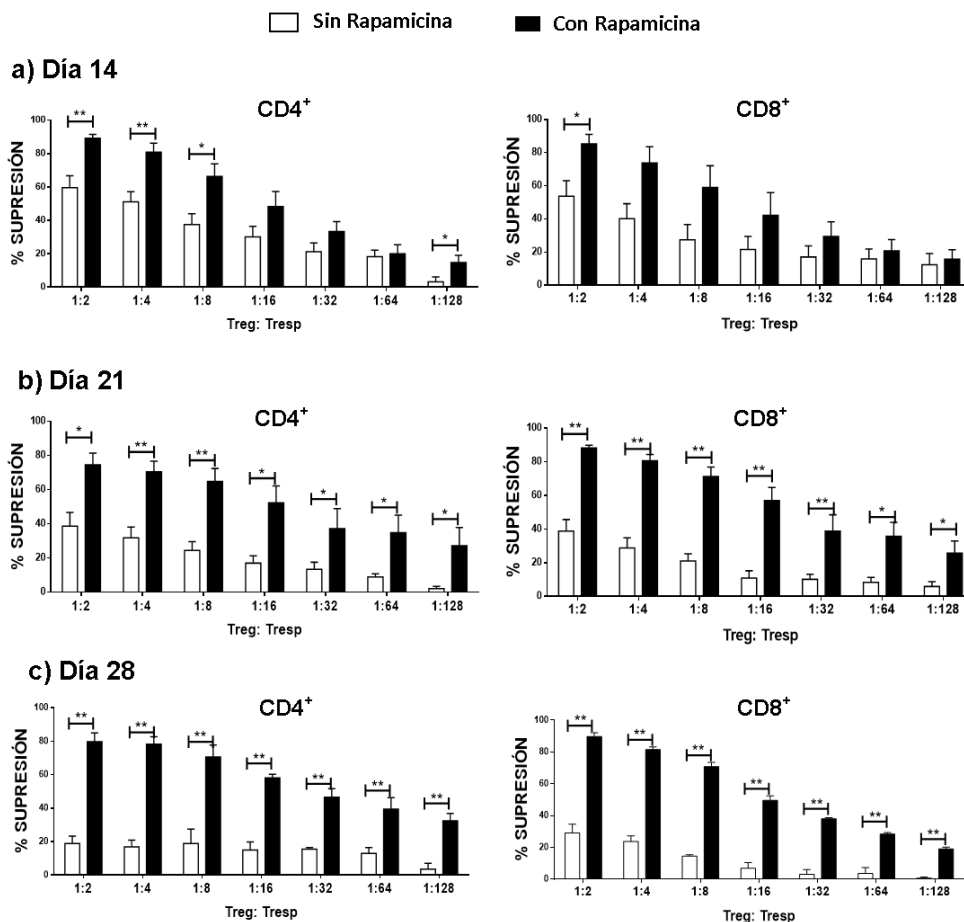
**Figura 4. Rapamicina promueve el mantenimiento de la expresión de FOXP3 y CD25 en las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas *ex vivo*.** Las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> purificadas se estimularon con perlas acopladas con anticuerpos anti-CD3/-CD28, IL-2 y en presencia o ausencia de rapamicina. a) En los días 14, 21 y 28 de expansión se contaron las células y se determinó el Incremento Relativo. b-e) En los días 14, 21 y 28 de expansión se tomaron muestras de los cultivos y se determinó por citometría de flujo la expresión de CD25 y FOXP3. Las gráficas representan la media  $\pm$  error estándar, n=6. \* p<0,05.

Una molécula importante para la migración de células T al ganglio es el receptor de quimiocinas CCR7 [156]. Como se observa en las figuras 5e y 5f, en ambas condiciones de cultivo empleadas no hubo diferencia significativa en la frecuencia de células CCR7<sup>+</sup> y la IMFr de CCR7 después de tres semanas de expansión; pero en el día 28 se obtuvo una diferencia significativa cuando las células fueron expandidas en presencia de rapamicina, siendo mayor tanto el porcentaje de células CCR7<sup>+</sup> (Sin Rapamicina= 78,83 ± 3,04%; Con Rapamicina= 95,73 ± 2,54%; p<0,05) como la IMFr de CCR7 (Sin Rapamicina= 52,46 ± 3,81; Con Rapamicina= 119,90 ± 21,73; p<0,01).



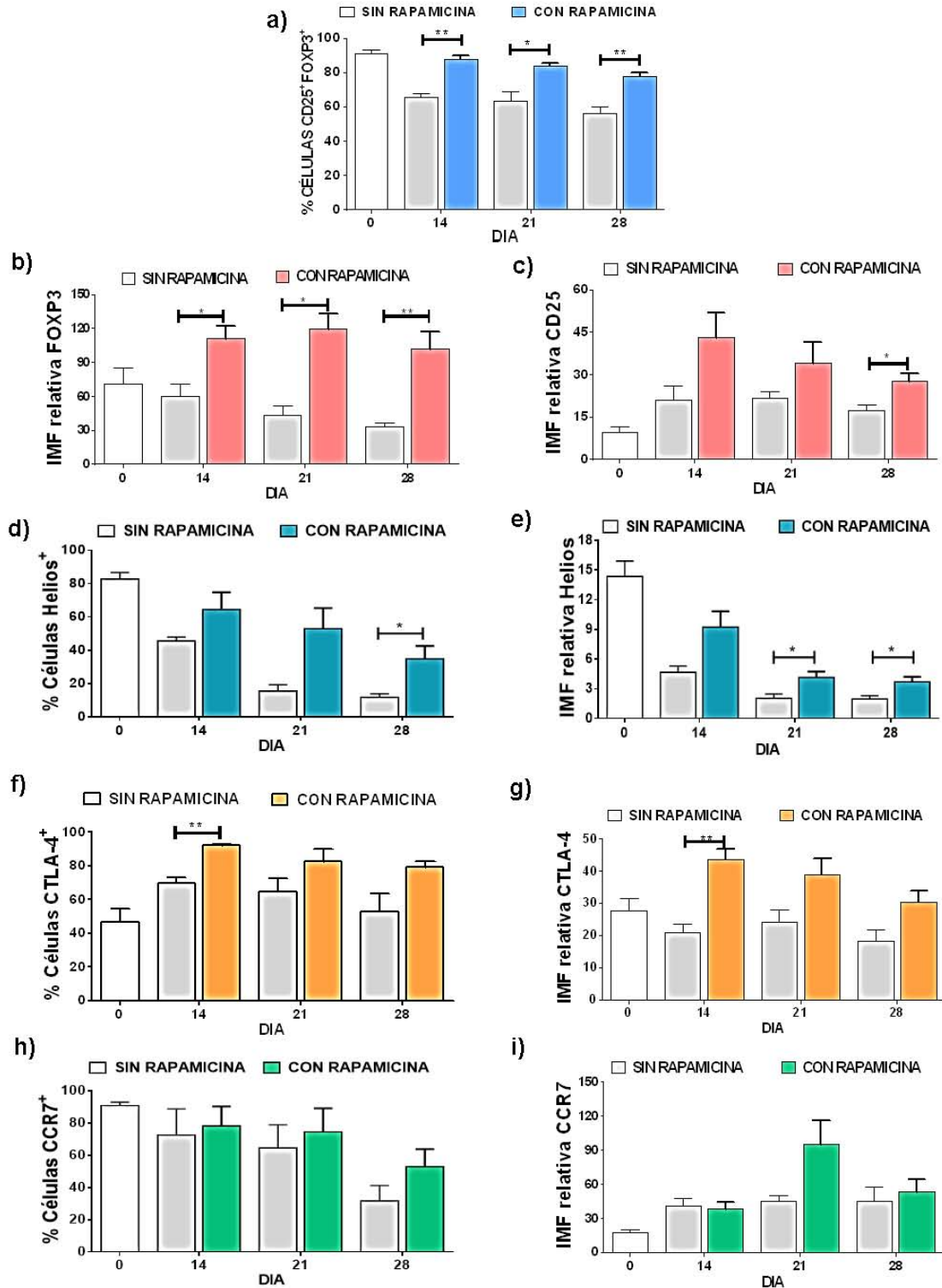
**Figura 5. Rapamicina mantiene la expresión de Helios y aumenta la expresión de CTLA-4 y CCR7 en las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas *ex vivo*.** a-c) En los días 14, 21 y 28 de expansión se tomaron muestras de las Treg en expansión y se determinó por citometría de flujo la expresión de Helios, CTLA-4 y CCR7. Las gráficas representan la media ± error; n=6; \* p<0,05.

Un aspecto importante a monitorear durante un protocolo de expansión de células Treg es el mantenimiento de su función supresora. En el presente trabajo se realizaron ensayos de supresión *in vitro*, co-cultivando en diferentes proporciones las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas con células mononucleares autólogas. Las células expandidas a lo largo de las cuatro semanas en presencia de rapamicina mantuvieron una mejor función *in vitro* (Figuras 6a, b, c), siendo en el día 28 cuando se obtuvo una mayor diferencia significativa en el porcentaje de supresión sobre la proliferación de las células T respondedoras (Tresp) tanto de las CD4<sup>+</sup> (Ejemplo proporción 1:2 (Treg:Tresp): Sin Rapamicina= 19,29 ± 13,76%; Con Rapamicina= 79,66 ± 9,42%; p<0,01) como las CD8<sup>+</sup> (Ejemplo proporción 1:2 : Sin Rapamicina= 29,10 ± 11,41 %; Con Rapamicina= 89,77 ± 3,92; p<0,01).



**Figura 6. Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas en presencia de rapamicina tienen una mejor función supresora *in vitro*.** a-c) Para ensayos de supresión, se co-cultivaron células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> en expansión (de los días 14, 21 y 28) con CMN CFSE<sup>+</sup> autólogas en diferentes proporciones (0-1 Treg: 1-128 CMN) y estimularon con perlas anti-CD3/-CD28. Al día 5 se marcaron las células con anti-CD4 y anti-CD8, y determinó por citometría de flujo el porcentaje de proliferación por dilución de CFSE de células T respondedoras (Tresp) tanto de CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Las gráficas representan la media ± error estándar; n=6; \* p<0,05.

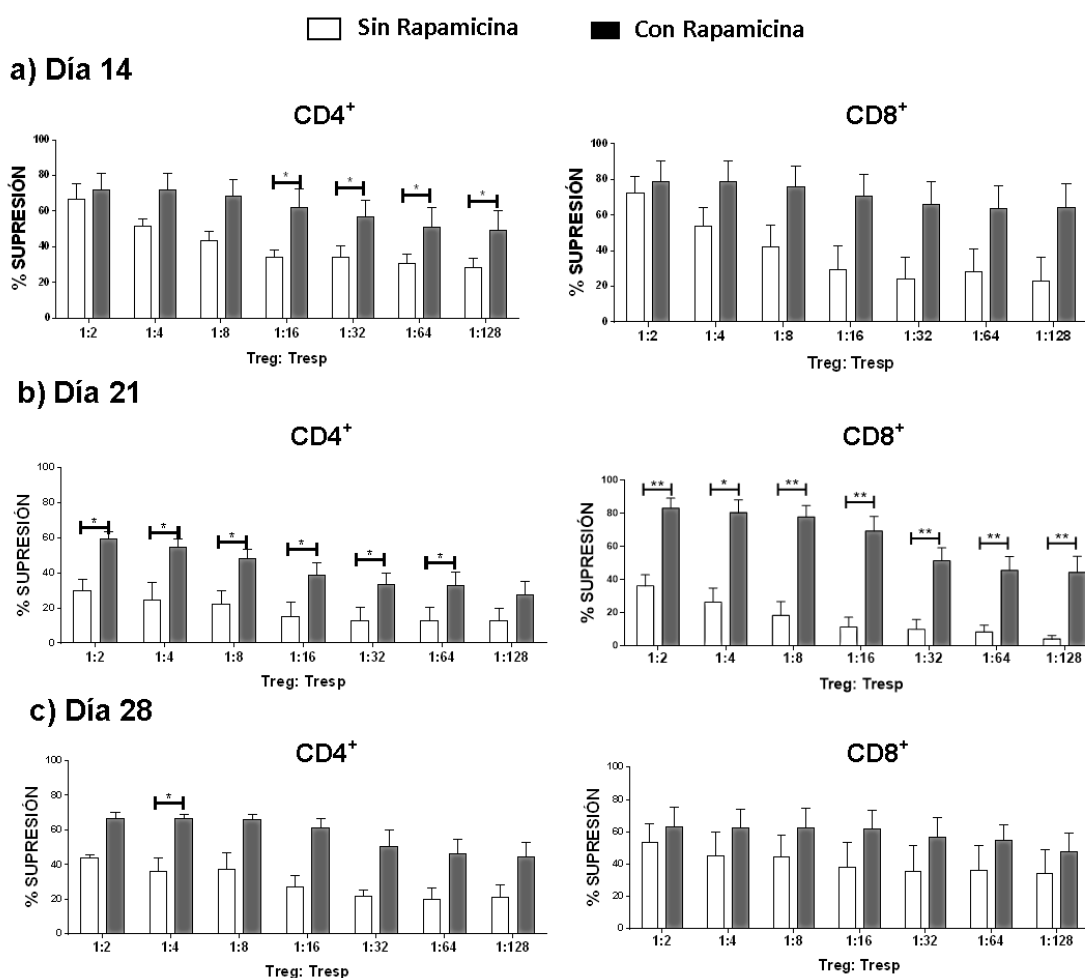
Cuando no se puede obtener frecuentemente muestras de sangre de pacientes para aislar las células Treg, una alternativa es poder utilizar células criopreservadas. Por esta razón se evaluó el efecto de la criopreservación sobre el fenotipo y función de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HI</sup> expandidas. . Al igual que los resultados presentados anteriormente, en presencia de rapamicina las Treg expandidas tuvieron una mayor expresión y porcentaje de los marcadores evaluados (FOXP3, CD25, Helios, CTLA-4) después de ser criopreservadas (Figura 7). Pero en comparación con los resultados obtenidos antes de la criopreservación (Figura 4 y 5), en ambas condiciones las Treg después de ser descongeladas disminuyeron las frecuencias de células CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Figura 7<sup>a</sup> (día 28): Sin Rapamicina= 56,22 ± 9,18%; Con Rapamicina= 77,62 ± 5,11%; p<0,01), Helios<sup>+</sup> (Figura 7d (día 28): Sin Rapamicina= 11,84 ± 4,81%; Con Rapamicina= 34,92 ± 17,25%; p<0,05), CTLA-4<sup>+</sup> (Figura 7f (día 28): Sin Rapamicina= 52,88 ± 23,54%; Con Rapamicina= 79,12 ± 7,29%) y CCR7<sup>+</sup> (Figura 7h (día 28): Sin Rapamicina= 31,90 ± 21,02%; Con Rapamicina= 53,08 ± 24,17%). Esta misma disminución se observó en la expresión(IMFr) de CD25 (Figura 7c (día 28): Sin Rapamicina= 17,16 ± 4,94%; Con Rapamicina= 27,51 ± 6,21%), Helios (Figura 7e (día 28): Sin Rapamicina= 1,98 ± 0,75%; Con Rapamicina= 3,70 ± 1,15 % p<0,05), CTLA-4 (Figura 7g (día 28): Sin Rapamicina= 18,17 ± 8,24%; Con Rapamicina= 30,26 ± 8,17%) y CCR7 (Figura 7i (día 28): Sin Rapamicina= 44,93 ± 18,18%; Con Rapamicina= 53,61 ± 22,31%). Interesantemente, solo las Treg expandidas con rapamicina mantuvieron la expresión de FOXP3 (Figura 7b (día 28): Sin Rapamicina= 33,11 ± 8,24%; Con Rapamicina= 101,50 ± 33,88%; p<0,01) después de ser criopreservadas, obteniendo valores similares a las Treg previas a ser congeladas (Figura 4d).



**Figura 7. Efecto de la criopreservación sobre el fenotipo de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HI</sup> expandidas *ex vivo*.** a-b) En los días 14,21 y 28 de expansión se criopreservaron muestras de Treg y posteriormente se descongelaron para determinar por citometría de flujo la expresión de CD25, FOXP3, Helios, CTLA-4 y CCR7. Las gráficas representan la media  $\pm$  error; n=5; \* p<0,05



Como consecuencia de los cambios en el fenotipo, las Treg expandidas criopreservadas en la cuarta semana tuvieron una tendencia a disminuir su función supresora *in vitro* sobre la proliferación de las Tresp tanto de las CD4<sup>+</sup> (Figura 8c, proporción 1:2 (Treg:Tresp): Sin Rapamicina= 53,25 ± 9,57%; Con Rapamicina= 73,40 ± 18,13%) como CD8<sup>+</sup> (Figura 8c, proporción 1:2 : Sin Rapamicina= 53,33 ± 26,50 %; Con Rapamicina= 70.42 ± 32,66), en comparación con las Treg no criopreservadas (Figura 6). Además, debido a la variabilidad de los resultados no hubo diferencia significativa entre las dos condiciones de expansión, pero se obtuvo una tendencia de que las Tregs tratadas con rapamicina después de ser criopreservadas tienen una mejor capacidad supresora *in vitro* (Figura 8).



**Figura 8. Efecto de la criopreservación sobre la función supresora *in vitro* de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas *ex vivo*.** a-c) Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> expandidas y criopreservadas (de los días 14, 21 y 28) se cocultivaron con CMN CFSE<sup>+</sup> autólogas en diferentes proporciones (0-1 Treg: 1-128 CMN), se estimularon con perlas anti-CD3/-CD28. Al día 5 se marcaron las células con anti-CD4 y anti-CD8, y determinó por citometría de flujo el porcentaje de proliferación por dilución de CFSE de células T respondedoras (Tresp) tanto de CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Las gráficas representan la media ± error estándar; n=5; \* p<0,05.

## DISCUSIÓN

Una limitante para la aplicación clínica de las células Tregs FOXP3<sup>+</sup> en humanos es su número limitado en sangre periférica, para lo cual se han diseñado diversas estrategias de expansión *ex vivo* basadas principalmente en la estimulación policlonal con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-2 [123, 157-160]. Sin embargo, en el presente trabajo encontramos que al expandir *in vitro* las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> a largo plazo había una disminución tanto en la frecuencia de éstas células como en la expresión de FOXP3, lo cual concuerda con un trabajo previo [126]. Interesantemente, al cultivar estas mismas células en presencia de rapamicina (un fármaco inhibidor de la vía PI3K/Akt/mTOR), el porcentaje y expresión de FOXP3 se mantuvo hasta las cuatro semanas de expansión (Figuras 4b-d). Además, en las Treg expandidas bajo esta misma condición hubo un aumento de la expresión de CD25 (figura 4e) y esto puede ser consecuencia del mantenimiento en la expresión de FOXP3 el cual en cooperación con NFAT (activado río abajo del TCR) regulan la expresión de CD25 [161].

La alta expresión de CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2, IL2-R) en células Treg FOXP3<sup>+</sup> es esencial para el desarrollo, función y mantenimiento de este linaje celular; IL-2 a través de su receptor regula directamente estabilidad de la expresión de FOXP3 y la proliferación de las Tregs mediante la vía de STAT5 [31, 32]. En las células T, la señalización río abajo del receptor de IL-2 puede proceder a través de la vía PI3K/Akt/mTOR o vía JAK/STAT [162]. Mientras que rapamicina inhibe la vía PI3K/mTOR en células Treg, la vía JAK/STAT no se ve afectada evitando la apoptosis inducida por rapamicina y permitiendo su proliferación [162]. Se ha descrito que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> en presencia de rapamicina tienen una alta expresión de moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL. En contraste, las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en las mismas condiciones disminuyen significativamente la expresión de Bcl-2 o Bcl-XL y aumentan los niveles de la molécula pro-apoptótica Bax, promoviendo así su apoptosis [163]. Cabe resaltar que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> en humanos expresan constitutivamente PTEN [164], un regulador negativo de la vía PI3K/Akt, por lo que éstas células tienen un uso

reducido de esta vía, a diferencia de las células Tconv dependen de la vía PI3K para su proliferación y supervivencia [163]. Además, la vía PI3K/Akt/mTOR inhibe la expresión de FOXP3 mediante la inactivación de las proteínas FoxO [51, 165]; FoxO1 y FoxO3a se unen al gen *FOXP3* y participan en la regulación de la expresión de FOXP3 [32, 51]. Por lo tanto, en los cultivos tratados con rapamicina podría actuar de dos maneras: primero permitiendo una proliferación selectiva de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>, y segundo favorece el mantenimiento de la expresión de FOXP3.

Helios es un factor de transcripción de la familia Ikaros que en un principio se propuso que podría discriminar entre tTregs y iTregs porque la mayoría de las células FOXP3<sup>+</sup> derivadas del timo expresaron Helios, mientras que no lo hicieron las iTregs generadas *in vitro* con TGF- $\beta$  [41]. Actualmente, el uso de Helios como un marcador de tTregs está siendo re-evaluado, ya que este factor puede ser expresado por células Tconv humanas e iTregs de ratón dependiendo de las condiciones de activación [42, 43]. En nuestros datos describimos cómo la estimulación a largo plazo de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> causa disminución de la expresión de Helios, pero en presencia de rapamicina el decremento fue menor (Figura 5a, b). Aunque se desconocen las bases moleculares que regulan su expresión, se ha demostrado que la expresión de Helios favorece la estabilidad de la expresión de FOXP3 [166]. En células Treg de humanos, Helios puede unirse al promotor de *FOXP3* y la inhibición de la expresión de Helios con ARN silenciador resulta en la disminución de la expresión de FOXP3 y de la función supresora *in vitro* de las células Treg [166]. Recientemente, se describió que la expresión forzada de Helios, en cooperación con FOXP3, incrementa la expresión de moléculas relacionadas con la función supresora en células Treg inducidas de ratón [167]. Esto podría sugerir que en presencia de rapamicina, a través de FOXP3, se podría estar favoreciendo la expresión de Helios.

CTLA-4 está expresado constitutivamente en células Treg humanas y de ratón, y es un mecanismo importante para llevar a cabo su función supresora [1]. *In vitro*, el bloqueo de CTLA-4 disminuye la supresión mediada por células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> [168]. *In vivo*, la deficiencia específica de CTLA-4 en células T FOXP3<sup>+</sup> resulta en desarrollo espontáneo de autoinmunidad mediada por células T, caracterizada por una linfoproliferación descontrolada e hiperproducción de IgE [169]. En nuestros resultados, las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> expandidas en presencia de rapamicina tuvieron un aumento en la expresión CTLA-4 en cada día evaluado (Figura 5c, d). Este aumento puede ser consecuencia del incremento de la expresión de FOXP3, el cual al interactuar con NFAT aumenta la expresión de CTLA-4 [161, 170]. Cabe resaltar que además de regular directamente las funciones de las células Tconv, las células Tregs pueden modular las respuestas del sistema inmune mediante la regulación de las funciones y/o la maduración de las células dendríticas (DCs), y uno de los mecanismos de supresión involucra la alta expresión de CTLA-4 [76]. Cuando CTLA-4 se une a sus ligandos CD80/CD86 induce en las DCs la secreción deIDO (indolamina 2,3-dioxigenasa), enzima que favorece el catabolismo del triptófano hacia un metabolito tóxico para los linfocitos Tconv [97]. Además, CTLA-4 puede disminuir la expresión de CD80/CD86 en células presentadoras de antígeno (CPAs) mediante un proceso denominado trans-endocitosis y de esta manera las Tregs disminuyen la capacidad de las CPAs para activar a linfocitos Tconv [169, 171].

El efecto de rapamicina en el mantenimiento de la expresión de FOXP3 y Helios, así como el aumento de la expresión de CD25 y CTLA-4, se correlacionó con una mayor inhibición de la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Figura 6). Las células Tregs no son capaces de producir IL-2, pero tienen niveles de expresión de CD25 más altos que los linfocitos T vírgenes o activados, por lo cual son más eficientes para utilizar la IL-2 del microambiente y mediante este mecanismo pueden disminuir la capacidad de activación y proliferación de las células Tconv [91]. Como se citó antes, Helios en cooperación con FOXP3 aumentan la capacidad supresora de las células Treg [167].

Durante una respuesta inmune, las células Treg deben migrar tanto al sitio de inflamación como a ganglios linfáticos de drenaje para ejercer su función [172]. Estudios *in vivo* han demostrado que CCR7 tiene un papel importante en la supresión mediada por células Treg a través del control de su migración a zonas del ganglio donde se favorezca su función y tengan acceso a IL-2 [173, 174]. Nuestros datos muestran que con la estimulación *in vitro* del TCR de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Hl</sup>FOXP3<sup>+</sup> aumentan su expresión de CCR7, llegando a su mayor expresión en la cuarta semana en presencia de rapamicina (Figura 5e, f).

Por último, es importante señalar que la inmunoterapia con células Treg podría avanzar aún más si dichas células pueden ser eficientemente criopreservadas y almacenadas para futuras aplicaciones clínicas, como una alternativa al uso de Tregs recién aisladas y expandidas [175]. Actualmente, nuestro conocimiento del impacto de la criopreservación sobre la viabilidad y funcionalidad de las células Treg aún es limitado [175]. Basándose en datos de células mononucleares de sangre periférica, la criopreservación puede tener un efecto negativo sobre células Tregs, ya que puede disminuir su viabilidad y causar secreción anormal de citoquinas, así como alterar la expresión de marcadores de superficie relacionados con su función supresora [175]. Hay varios mecanismos que podrían ser responsables de tales efectos, incluyendo el estrés oxidativo, lesión mecánica debido a la formación de cristales durante el congelamiento, propiedades físicas alteradas de las estructuras celulares, daño por cambios osmóticos, perturbación de homeostasis de iones debido a inhibición de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, y la apoptosis [176]. Sin embargo, aún falta determinar los mecanismos específicos que están involucrados en los efectos de la criopreservación sobre el fenotipo y función de las Treg. Resulta interesante que en nuestros resultados observamos que al expandir las Treg en presencia de rapamicina después de ser criopreservadas mantenían una alta expresión de los marcadores evaluados (FOXP3, CD25, Helios, CTLA-4, CCR7), así como mejor función supresora *in vitro*.

En general, nuestros resultados demuestran que rapamicina favorece la expansión de células Treg funcionales y evidencia su potencial terapéutico en humanos para el tratamiento de inmunopatologías mediadas por células Tconv, ya que diversos estudios en modelos animales han demostrado la eficacia de la inmunoterapia con células Treg para prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes [145, 146, 150, 177, 178] y la enfermedad injerto contra hospedero [136, 139, 179], así mismo para inducir la tolerancia hacia el alo-injerto trasplantado [135, 136, 139, 141, 142].

## CONCLUSIONES

- Células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HI</sup> provenientes de individuos sanos y expandidas *ex vivo* en presencia rapamicina mantienen una alta expresión de moléculas relacionadas con su función supresora (FOXP3, Helios, CD25, CTLA-4) y migración (CCR7) después de cuatro semanas de estimulación policlonal con anti-CD3/anti-CD28.
- Rapamicina promovió una mejor función supresora *in vitro* en las células Treg expandidas a largo plazo.
- Células Treg expandidas en presencia de rapamicina después de ser criopreservadas tuvieron una alta expresión de FOXP3, Helios, CD25, CTLA-4 y CCR7, y mejor capacidad supresora *in vitro*.

## **PERSPECTIVAS**

1. Determinar la desmetilación de la región TSDR del locus de FOXP3, como medida de la estabilidad en la expresión de FOXP3 en las células Treg expandidas *ex vivo*.
2. Evaluar la estabilidad de las Treg expandidas mediante el efecto *in vitro* de un ambiente inflamatorio sobre su fenotipo y función.
3. Análisis de la expresión de otros marcadores superficie relacionados con su función supresora (PD-1, CD39, CD73, GITR, LAG-3) y producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$ ) en células Treg expandidas.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Josefowicz, S.Z., L.-F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 531-64.
2. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(7): p. 490-500.
3. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 68-73.
4. Ochs, H.D., E. Gambineri, and T.R. Torgerson, *IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity*. *Immunol Res*, 2007. **38**(1-3): p. 112-21.
5. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 20-1.
6. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, *Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 733-58.
7. Nishizuka, Y. and T. Sakakura, *Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice*. *Science*, 1969. **166**(3906): p. 753-5.
8. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 387-96.
9. Hsieh, C.-S., H.-M. Lee, and C.-W.J. Lio, *Selection of regulatory T cells in the thymus*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(3): p. 157-67.
10. Itoh, M., et al., *Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance*. *J Immunol*, 1999. **162**(9): p. 5317-26.
11. Hori, S., et al., *Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8213-8.
12. Apostolou, I., et al., *Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(8): p. 756-63.
13. Koonpaew, S., et al., *LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development*. *J Exp Med*, 2006. **203**(1): p. 119-29.
14. Shen, S., et al., *The importance of LAT in the activation, homeostasis, and regulatory function of T cells*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(46): p. 35393-405.
15. Chuck, M.I., et al., *The role of the LAT-PLC-gamma1 interaction in T regulatory cell function*. *J Immunol*, 2010. **184**(5): p. 2476-86.
16. Siggs, O.M., et al., *Opposing functions of the T cell receptor kinase ZAP-70 in immunity and tolerance differentially titrate in response to nucleotide substitutions*. *Immunity*, 2007. **27**(6): p. 912-26.
17. Gupta, S., et al., *Differential requirement of PKC-theta in the development and function of natural regulatory T cells*. *Mol Immunol*, 2008. **46**(2): p. 213-24.
18. Tanaka, S., et al., *Graded attenuation of TCR signaling elicits distinct autoimmune diseases by altering thymic T cell selection and regulatory T cell function*. *J Immunol*, 2010. **185**(4): p. 2295-305.
19. Barnes, M.J., et al., *Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery*. *PLoS Biol*, 2009. **7**(3): p. e51.
20. Schmidt-Suppran, M., et al., *Mature T cells depend on signaling through the IKK complex*. *Immunity*, 2003. **19**(3): p. 377-89.
21. Molinero, L.L., et al., *CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2009. **182**(11): p. 6736-43.
22. Zheng, Y., et al., *Combined deficiency of p50 and cRel in CD4+ T cells reveals an essential requirement for nuclear factor kappaB in regulating mature T cell survival and in vivo function*. *J Exp Med*, 2003. **197**(7): p. 861-74.
23. Isomura, I., et al., *c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2009. **206**(13): p. 3001-14.

24. Kim, J.K., et al., *Impact of the TCR signal on regulatory T cell homeostasis, function, and trafficking*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6580.
25. Salomon, B., et al., *B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 431-40.
26. Tang, Q., et al., *Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3348-52.
27. Nazarov-Stoica, C., et al., *CD28 signaling in T regulatory precursors requires p56lck and rafts integrity to stabilize the Foxp3 message*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 102-10.
28. Vang, K.B., et al., *Cutting edge: CD28 and c-Rel-dependent pathways initiate regulatory T cell development*. J Immunol, 2010. **184**(8): p. 4074-7.
29. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 152-62.
30. Lio, C.-W.J. and C.-S. Hsieh, *A two-step process for thymic regulatory T cell development*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 100-11.
31. Mahmud, S.A., L.S. Manlove, and M.A. Farrar, *Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function*. JAKSTAT, 2013. **2**(1): p. e23154.
32. Huehn, J. and M. Beyer, *Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells*. Semin Immunol, 2015. **27**(1): p. 10-8.
33. Hsieh, C.-S., et al., *Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 267-77.
34. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
35. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
36. Selvaraj, R.K. and T.L. Geiger, *A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 11 p following 1390.
37. Zheng, S.G., et al., *TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3321-9.
38. Benson, M.J., et al., *All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1765-74.
39. Yadav, M., et al., *Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1713-22, S1-19.
40. Lin, X., et al., *Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(2): p. 116-23.
41. Thornton, A.M., et al., *Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3433-41.
42. Akimova, T., et al., *Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24226.
43. Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison, *Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 976-80.
44. Milpied, P., et al., *Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg*. Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1466-71.
45. Kitagawa, Y., N. Ohkura, and S. Sakaguchi, *Epigenetic control of thymic Treg-cell development*. Eur J Immunol, 2015. **45**(1): p. 11-6.
46. Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi, *Development and maintenance of regulatory T cells*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 414-23.
47. Ohkura, N., et al., *T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 785-99.
48. Li, X., et al., *Function of a Foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity*. Cell, 2014. **158**(4): p. 734-48.

49. Li, X. and Y. Zheng, *Regulatory T cell identity: formation and maintenance*. Trends Immunol, 2015. **36**(6): p. 344-53.
50. Barbarulo, A., et al., *Notch3 and canonical NF-kappaB signaling pathways cooperatively regulate Foxp3 transcription*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6199-206.
51. Ouyang, W., et al., *Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 618-27.
52. Burchill, M.A., et al., *IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 280-90.
53. Mantel, P.-Y., et al., *Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3593-602.
54. Bruno, L., et al., *Runx proteins regulate Foxp3 expression*. J Exp Med, 2009. **206**(11): p. 2329-37.
55. Tone, Y., et al., *Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer*. Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 194-202.
56. Zheng, Y., et al., *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 808-12.
57. Rudra, D., et al., *Runx-CBFbeta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1170-7.
58. Sekiya, T., et al., *Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis*. Nat Immunol, 2013. **14**(3): p. 230-7.
59. Liu, Z.-M., et al., *The role of all-trans retinoic acid in the biology of Foxp3(+) regulatory T cells*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(5): p. 553-7.
60. Sekiya, T., et al., *The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 269.
61. Xu, L., et al., *Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I*. Immunity, 2010. **33**(3): p. 313-25.
62. Kim, H.-P. and W.J. Leonard, *CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1543-51.
63. Long, M., et al., *Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 921-31.
64. Yao, Z., et al., *Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4368-75.
65. Ruan, Q., et al., *Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 932-40.
66. Feng, Y., et al., *Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus*. Cell, 2014. **158**(4): p. 749-63.
67. Yang, X.O., et al., *Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 44-56.
68. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
69. Takaki, H., et al., *STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor*. J Biol Chem, 2008. **283**(22): p. 14955-62.
70. Huehn, J., J.K. Polansky, and A. Hamann, *Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 83-9.
71. Baron, U., et al., *DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(9): p. 2378-89.
72. Floess, S., et al., *Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e38.
73. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
74. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.

75. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
76. Vignali, D.A.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
77. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 546-58.
78. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 99-146.
79. Marie, J.C., D. Liggitt, and A.Y. Rudensky, *Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 441-54.
80. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
81. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 834-42.
82. Levings, M.K., et al., *Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells*. J Exp Med, 2002. **196**(10): p. 1335-46.
83. Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie, *Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 313-38.
84. Shen, E., et al., *The suppressive effect of CD25+Treg cells on Th1 differentiation requires cell-cell contact partially via TGF-β production*. Cell Biol Int, 2011. **35**(7): p. 705-12.
85. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
86. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
87. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
88. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
89. Zhao, D.-M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
90. Gondek, D.C., et al., *Transplantation survival is maintained by granzyme B+ regulatory cells and adaptive regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4752-60.
91. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
92. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
93. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
94. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
95. Zarek, P.E., et al., *A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells*. Blood, 2008. **111**(1): p. 251-9.
96. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4772-80.
97. Grohmann, U., et al., *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1097-101.

98. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. *Immunity*, 2008. **28**(3): p. 402-13.
99. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(1): p. 7-13.
100. Workman, C.J. and D.A.A. Vignali, *Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223)*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 688-95.
101. Huang, C.-T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 503-13.
102. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 5916-26.
103. Christen, U. and M.G. von Herrath, *Initiation of autoimmunity*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(6): p. 759-67.
104. Liu, Z., H. Fan, and S. Jiang, *CD4(+) T-cell subsets in transplantation*. *Immunol Rev*, 2013. **252**(1): p. 183-91.
105. Fiuza-Luces, C., et al., *Understanding graft-versus-host disease. Preliminary findings regarding the effects of exercise in affected patients*. *Exerc Immunol Rev*, 2015. **21**: p. 80-112.
106. Hartono, C., T. Muthukumar, and M. Suthanthiran, *Immunosuppressive drug therapy*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(9): p. a015487.
107. Marcén, R., *Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection*. *Drugs*, 2009. **69**(16): p. 2227-43.
108. Saidi, R.F. and S.K. Hejazii Kenari, *Clinical transplantation and tolerance: are we there yet?* *Int J Organ Transplant Med*, 2014. **5**(4): p. 137-45.
109. Horwitz, D.A., et al., *Regulatory T cells generated ex vivo as an approach for the therapy of autoimmune disease*. *Semin Immunol*, 2004. **16**(2): p. 135-43.
110. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 816-22.
111. Cohen, J.L. and B.L. Salomon, *Therapeutic potential of CD4+ CD25+ regulatory T cells in allogeneic transplantation*. *Cytotherapy*, 2005. **7**(2): p. 166-70.
112. Salomon, B., *[CD4+, CD25+ regulatory T-lymphocytes: current concepts and therapeutic potential]*. *J Soc Biol*, 2002. **196**(4): p. 263-6.
113. Prinz, I. and C. Koenecke, *Therapeutic potential of induced and natural FoxP3(+) regulatory T cells for the treatment of Graft-versus-host disease*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012. **60**(3): p. 183-90.
114. Singer, B.D., L.S. King, and F.R. D'Alessio, *Regulatory T cells as immunotherapy*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 46.
115. Schliesser, U., M. Streitz, and B. Sawitzki, *Tregs: application for solid-organ transplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2012. **17**(1): p. 34-41.
116. Roncarolo, M.-G. and M. Battaglia, *Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(8): p. 585-98.
117. Wang, X., L. Lu, and S. Jiang, *Regulatory T cells: customizing for the clinic*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(83): p. 83ps19.
118. Sawant, D.V. and D.A.A. Vignali, *Once a Treg, always a Treg?* *Immunol Rev*, 2014. **259**(1): p. 173-91.
119. Tran, D.Q., H. Ramsey, and E.M. Shevach, *Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype*. *Blood*, 2007. **110**(8): p. 2983-90.
120. Hoffmann, P., et al., *Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion*. *Blood*, 2006. **108**(13): p. 4260-7.
121. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
122. Nadig, S.N., et al., *In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells*. *Nat Med*, 2010. **16**(7): p. 809-13.
123. Karakhanova, S., et al., *Highly efficient expansion of human CD4+CD25+ regulatory T cells for cellular immunotherapy in patients with graft-versus-host disease*. *J Immunother*, 2006. **29**(3): p. 336-49.

124. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo, *Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function.* J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1295-302.
125. Cohen, J.L., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease.* J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 401-6.
126. Hoffmann, P., et al., *Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation.* Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 1088-97.
127. Kmiecik, M., et al., *Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function.* J Transl Med, 2009. **7**: p. 89.
128. Basu, S., et al., *Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin.* J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5794-8.
129. Battaglia, M., et al., *Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients.* J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8338-47.
130. Nankivell, B.J. and S.I. Alexander, *Rejection of the kidney allograft.* N Engl J Med, 2010. **363**(15): p. 1451-62.
131. Saeed, B., *Pediatric renal transplantation.* Int J Organ Transplant Med, 2012. **3**(2): p. 62-73.
132. Fadili, W., M. Habib Allah, and I. Laouad, *Chronic renal allograft dysfunction: risk factors, immunology and prevention.* Arab J Nephrol Transplant, 2013. **6**(1): p. 45-50.
133. Wood, K.J. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in transplantation tolerance.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 199-210.
134. Zhang, G.Y., et al., *Foxp3 as a marker of tolerance induction versus rejection.* Curr Opin Organ Transplant, 2009. **14**(1): p. 40-5.
135. Sánchez-Fueyo, A., et al., *Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance.* J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2274-81.
136. Joffre, O., et al., *Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes.* Blood, 2004. **103**(11): p. 4216-21.
137. Tang, Q. and J.A. Bluestone, *Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(11).
138. Ali, J.M., et al., *Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance.* Transplantation, 2013. **96**(8): p. 681-8.
139. Joffre, O., et al., *Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes.* Nat Med, 2008. **14**(1): p. 88-92.
140. Tsang, J.Y.-S., et al., *Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice.* J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3619-28.
141. Pu, L.-Y., et al., *Adoptive transfusion of ex vivo donor alloantigen-stimulated CD4(+)CD25(+) regulatory T cells ameliorates rejection of DA-to-Lewis rat liver transplantation.* Surgery, 2007. **142**(1): p. 67-73.
142. Ma, A., et al., *Adoptive transfer of CD4+CD25+ regulatory cells combined with low-dose sirolimus and anti-thymocyte globulin delays acute rejection of renal allografts in Cynomolgus monkeys.* Int Immunopharmacol, 2011. **11**(5): p. 618-29.
143. Buckner, J.H., *Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 849-59.
144. Tang, Q., et al., *Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction.* Immunity, 2008. **28**(5): p. 687-97.
145. Tang, Q., et al., *In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes.* J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1455-65.
146. Humrich, J.Y., et al., *Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 204-9.
147. Scalapino, K.J., et al., *Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells.* J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1451-9.
148. Souroujon, M.C., et al., *Regulatory T cell-based immunotherapies in experimental autoimmune myasthenia gravis.* Ann N Y Acad Sci, 2012. **1274**: p. 120-6.

149. Izcue, A. and F. Powrie, *Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier*. Immunology, 2008. **123**(1): p. 6-10.
150. Kohm, A.P., et al., *Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4712-6.
151. Trzonkowski, P., et al., *First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells*. Clin Immunol, 2009. **133**(1): p. 22-6.
152. Brunstein, C.G., et al., *Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics*. Blood, 2011. **117**(3): p. 1061-70.
153. Marek-Trzonkowska, N., et al., *Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up*. Clin Immunol, 2014. **153**(1): p. 23-30.
154. Di Ianni, M., et al., *Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3921-8.
155. Theil, A., et al., *Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease*. Cytotherapy, 2015. **17**(4): p. 473-86.
156. Förster, R., A.C. Davalos-Misllitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-71.
157. Hoffmann, P., et al., *Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells*. Blood, 2004. **104**(3): p. 895-903.
158. Earle, K.E., et al., *In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation*. Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 3-9.
159. Peters, J.H., et al., *Clinical grade Treg: GMP isolation, improvement of purity by CD127 Depletion, Treg expansion, and Treg cryopreservation*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3161.
160. Pahwa, R., et al., *Isolation and expansion of human natural T regulatory cells for cellular therapy*. J Immunol Methods, 2010. **363**(1): p. 67-79.
161. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. Cell, 2006. **126**(2): p. 375-87.
162. Bensinger, S.J., et al., *Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5287-96.
163. Strauss, L., et al., *Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5994.
164. Zeiser, R., et al., *Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells*. Blood, 2008. **111**(1): p. 453-62.
165. Mori, S., et al., *The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88891.
166. Getnet, D., et al., *A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. Mol Immunol, 2010. **47**(7-8): p. 1595-600.
167. Takatori, H., et al., *Helios Enhances Treg Cell Function in Cooperation With FoxP3*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(6): p. 1491-502.
168. Birebent, B., et al., *Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression*. Eur J Immunol, 2004. **34**(12): p. 3485-96.
169. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
170. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
171. Qureshi, O.S., et al., *Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4*. Science, 2011. **332**(6029): p. 600-3.
172. Ding, Y., J. Xu, and J.S. Bromberg, *Regulatory T cell migration during an immune response*. Trends Immunol, 2012. **33**(4): p. 174-80.

173. Schneider, M.A., et al., *CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 735-45.
174. Smigiel, K.S., et al., *CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets*. J Exp Med, 2014. **211**(1): p. 121-36.
175. Golab, K., et al., *Challenges in cryopreservation of regulatory T cells (Tregs) for clinical therapeutic applications*. Int Immunopharmacol, 2013. **16**(3): p. 371-5.
176. Mallone, R., et al., *Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society*. Clin Exp Immunol, 2011. **163**(1): p. 33-49.
177. Tarbell, K.V., et al., *CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes*. J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1467-77.
178. Mottet, C., H.H. Uhlig, and F. Powrie, *Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 3939-43.
179. Ermann, J., et al., *Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2220-6.



## ANEXO I: REACTIVOS

### Medio OpTmizer T-Cell Expansion Suplementado (100 mL)

❖	Glutamina 0,2 M (Gibco)	1 mL
❖	Piruvato de sodio 100mM (Gibco)	1 mL
❖	Antibióticos 100x (Gibco)	
○	Penicilina 10000 U	1 mL
○	Estreptomina 10 ng/mL	1 mL
❖	OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement	1,04 mL
❖	OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium	94,96 mL

### PBS 10X PH 7,4

❖	NaCl	40,0 g
❖	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,2 g
❖	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 g
❖	Agua destilada	500 mL

### PBS-BSA 10%

❖	Albumina Sérica Bovina	5g
❖	PBS 1X	aforar a 50 mL

### PBS-p-FORMALDEHÍDO 2%

❖	p-FORMALDEHÍDO	2 g
❖	PBS 1X	aforar 100 mL

Calentar previamente el PBS hasta aproximadamente 56 °C, agregar el p-formaldehído, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 100 mL

### **Amortiguador MACS**

❖	PBS 1X	47,3 mL
❖	BSA 10 %	2,5 mL
❖	EDTA 0.5 M	200 µL

### **Amortiguador FACS**

❖	Suero fetal bovino	2 mL
❖	EDTA 0.5 M	1.6 mL
❖	Azida de Sodio 2.5%	1.6 mL
❖	PBS 1X	394.8 mL